



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Farmacia

**“Fotosensibilizadores fotodinámicos
naturales y potenciales aplicaciones
terapéuticas”**

Lic. en Qca. Farm. Jesica Ayelen Dimmer

*Tesis presentada para optar por el título de Doctor en
Ciencias Químicas*

Córdoba, 28 de marzo 2017

Comisión de Tesis

Director:

Dr. José Luis Cabrera

IMBIV-Dpto de Farmacia, FCQ, UNC.

Miembros del tribunal:

Dra. Susana Núñez Montoya

IMBIV-Dpto de Farmacia, FCQ, UNC.

Dra. Ana María Cabanillas

CIBICI-Dpto de Bioquímica Clínica, FCQ, UNC.

Dr. Gerardo A. Argüello

Dpto de Físicoquímica, FCQ, UNC.

Evaluador externo:

Dr. Mario E. Arena

INQUINOA – FBQF, UNT.

*Esta tesis está dedicada
en primer lugar, a mi familia de origen...*

A mi Mamá Stella

A mi Hermana Vanesa

A mi Papá Roberto

y

al amor de mi Vida...

Albano Antonelli

Agradecimientos

Al Dr. José Luis Cabrera, hombre sabio y de pocas palabras pero con un gran corazón. Por darme la oportunidad de desempeñarme en el área de investigación, a la cual aspiré desde el día que ingresé a la FCQ. Por guiarme en este trabajo de tesis y también darme la libertad de tomar mis propias decisiones. Por su paciencia y por confiar en mí.

A la Dra. Susana Núñez Montoya, "Susí", por acompañarme en el desarrollo de esta tesis, por tus consejos y tu ayuda constante. Tu presencia me ayudó a aprender muchas cosas en mi vida...Muchas gracias!

A la Dra. Virginia Sosa por haber participado en este tribunal, por sus aportes en los estudios químicos de esta especie.

A la Dra. Ana María Cabanillas, quien comenzó a formar parte casi en la finalización de este trabajo, pero que siempre demostró su interés y buena predisposición con una mirada desde otra área de las Ciencias Químicas.

Al Dr. Gerardo Arguello que siempre demostró interés por mi trabajo de tesis, realizando aportes en todas las reuniones y mostrando buena predisposición para todo aquello que necesitaba.

Al Dr. Mario Arena por aceptar ser evaluador externo de este trabajo de tesis doctoral.

A Sonia Mendoza, sin tu ayuda y tu dedicación esta tesis no hubiese sido posible, gracias por proveerme a *H. lycioides* y por tu amistad a pesar de la distancia!

A los aportes económicos realizados por las siguientes instituciones: SeCyT, CONICET y FONCyT. A las becas que me permitieron la realización de dos estadías en Brasil: "Programa de Movilidad de posgrado de la Red de

Macrouiversidades de América Latina y el Caribe” y “Programa Cuarto Centenario profesores” otorgada por la UNC.

A la Dra. Ana Santiago y a la Dra. Romina Di Paola por el asesoramiento brindado en los ensayos de masa de alta resolución.

A los integrantes del “Green Team”:

Gaby, por invitarme a trabajar en el grupo de Farmacognosia, por estar siempre, especialmente cuando necesité tus consejos. Por ser mi compinche a la hora del almuerzo y por todas las charlas compartidas!!

Mariel, por ser la persona que siempre me apoyó y confió en mi trabajo, como te dije sos mi “Mamá” en el grupo, gracias por tu apoyo incondicional!

Maaaariiii, gracias por ayudarme a dar mis primeros pasos en investigación, por ser mi confidente y amiga, por todas las largas charlas compartidas.

Marita, mi compa Abelera! por brindarme siempre tu amistad y todo lo que te pedía. Has sido de mucha ayuda en la parte química de esta especie.

Marce, “col” gracias por brindarme tu amistad y tu ayuda siempre. Por acompañarnos en “eso” que nos pone tristes, pero que compartido se hace más liviano.

Sofi, por tu buena onda y tu buena predisposición, a pesar de que sos la más “joven” del grupo.

Lau C., por toda la ayuda brindada en los estudios fotofísicos y sobretodo en el capítulo de la tesis. Por esas charlas que nos ayudaban a aliviar un poco la tristeza.

A las chulengas:

Pame, por tu amistad, porque a pesar de todo, sabemos que siempre podemos contar con nosotras. Gracias por tu ayuda desinteresada en los ensayos fotobiológicos.

Laurita M., por tu amistad, por estar ahí siempre pendiente de mí y por las largas charlas compartidas en el labo por las tardes.

Mica, por tantos viajes compartidos; Dani, por tu buena onda; y Juli, por tus ricos mates! A todas por esas largas charlas, after office, el día a día, congresos, docencia y muchas cosas más. Cada una de ustedes ha dejado en mí una enseñanza y agradezco haberlas conocido en este largo camino.

A Gise C. por aceptar trabajar conmigo y por tomar este trabajo con tanta responsabilidad, pero por sobretodo, por tu amistad, por compartir esas locuras que solo nosotras dos entendemos.

A personitas que han formado parte de nuestro grupo: Maaaatiiiii, Edu y Leo, por su amistad y por todas las enseñanzas que me dejaron.

Brenda, Javi, Flor y Mauri, “los chicos del Viro”, por su amistad y todo lo aprendido de ustedes.

Al Dr. Juan Carlos Oberti y la Dra. Viviana Nicotra, por haberme permitido dar mis primeros pasos en el grupo de productos naturales y haberme contagiado su amor por la ciencia. Gracias porque a pesar de “abandonarlos”, siempre estuvieron ahí para lo que yo necesitaba. A mis compañeros Eze, Anita, Manu y Tania.

A Glori Bonetto, porque sus exigencias me ayudaron a hacer espectros cada vez mejores y por brindarme su amistad.

A Pauli Paez, por haberme dado la posibilidad de trabajar con vos y sobretodo brindarme tu amistad cuando más lo necesité. A las chicas del grupo de microbiología, Meli y Vivi, por hacerme sentir parte de su grupo y

por colaborar conmigo en todo lo que necesité. Solchu, por ese viaje a Brasil compartido, por esas lindas anécdotas que guardo en mi corazón.

A la Dra. Martha S. Ribeiro, por abrirme las puertas de su laboratorio y ponerlo a mi disposición para realizar los ensayos, por estar siempre dispuesta a recibir mis inquietudes y haber aceptado ser mi directora de beca postdoctoral.

Al grupo de mis compañeros brasileiros: Fer, mi compañera iluminada, gracias por todo tu apoyo y por demostrarme que se puede trabajar de a dos y lograr los mejores resultados, por tu alegría y tus locuras que me hicieron pasar hermosos momentos en Brasil. Caetano, amigo, gracias por ser mi compañero en los almuerzos y por valorar mi trabajo y hacer tus aportes desinteresadamente. Tânia, gracias por tu compañía, tu ayuda y por llevarme a conocer la danza más bonita de Brasil, el "Forró". Cami, gracias por aceptar trabajar conmigo y por tu predisposición con todas mis dudas. Clau, Caró y Maite, gracias por brindarme su amistad y a todos por los lindos momentos compartidos comiendo sushi (Xuxiii) y tomando skol!.

Al Dr. Claudio Borsarelli, por permitirme realizar los ensayos fotofísicos en su laboratorio y a las personas que forman parte de su grupo, Edu, Ricardo y Vale, por haberme ayudado con los ensayos y estar pendiente de mí para todo lo que necesitaba.

A Meli Corti, por brindarme su amistad y por nuestras largas charlas compartidas en el colectivo, gracias vecinita!

A Caro Romañuk por brindarme su amistad y por su gran apoyo en mis viajes a Brasil.

A Moni García, a quien tuve la posibilidad de conocer en mi segundo viaje a Brasil y que sin duda fue una persona muy importante en esa estadía.

A las fotobiólogas del departamento, Jime, Luchy, Diame y Ceci con quienes he compartido congresos, cursos y largas charlas de pasillo!

A todas las personas del departamento de Farmacia, con quienes de alguna forma u otra he compartido momentos, brindis de fin de año, charlas de pasillo, entre otras cosas. A quienes me han brindado su ayuda desinteresada, Flavia B., Caro Luciani, Ari Zoppi y Lau Guzmán.

A las secres del departamento, Laurita y Fer y a la secre de Unitefa, Cari, por toda la ayuda brindada y por todo el apoyo que me han dado.

A mis amigas de Voley-Padel Mari, Pato, Cris, Sil, Pau, Kar y Ayi, por estar siempre, por su apoyo incondicional en mi trabajo y alentarme en todo momento. Las quiero con el alma!!

A Maru, mi amiga desde jardín, que tanto me ha apoyado en esta carrera, por su amistad incondicional que sigue intacta con el paso de los años.

A Mari y Cari, por esa amistad de tantos años, que marcó nuestra infancia.

A mis tíos y primos por su apoyo incondicional, por hacerme el aguante cuando estaba en Brasil, ayudándome a “acortar” un poco las distancias. Especialmente a Javi, por toda tu ayuda con la impresión de la tesis.

A mi tía Susana, por despertar en mí las ganas de enseñar.

A la familia de mi esposo, a mis suegros Blanca y Ángel por ser tan buenas personas y aceptarme como una más en su familia. A mis cuñadas, que son las hermanas que me dió la vida, Naty, Mari y Lu. A mis sobris que me llenan de energías y siempre me demuestran su afecto, Marti, Isa, Pauli y Valen. A mis “concus”, Fredy y Diego, por acompañar a Albano en mi ausencia.

A mis abuelitos, Pepe y Clelia y Delfor y Nelly, por todo el cariño que me brindaron. Me hubiese encantado que estén acá!. A mi tío-abuelo Héctor, por su interés en mis estudios.

A mi familia de origen: a mi Mamá Stella gracias por todo el esfuerzo que hiciste para que yo pueda conseguir mi herencia, ya la tengo!! A mi

hermana Vanesa, porque sin su apoyo no hubiese podido terminar la carrera en 5 años y junto a su esposo César, por darme al regalo más hermoso que pude tener en mi vida, a mi ahijada Flor. A mi Papá Roberto, te llevo en mi corazón y agradezco todas las enseñanzas que me dejaste y que aún hoy, en tu ausencia física, continúo descubriendo. Los amo, son la mejor familia que Dios me dió!

Y a mi esposo, Albano, gracias por estar siempre, en las buenas y en las malas, por aceptar mi profesión y apoyarme en todo momento, entendiendo lo importante que es para mí. Sos el mejor compañero que puedo tener. TE AMO PARA SIEMPRE!

GRACIAS TOTALES!!!!

No te rindas, aun estas a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras, enterrar tus miedos,
liberar el lastre, retomar el vuelo.

No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros y destapar el cielo.

No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frio queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se esconda y se calle el viento,
aun hay fuego en tu alma,
aun hay vida en tus sueños,
porque la vida es tuya y tuyo tambien el deseo,
porque lo has querido y porque te quiero.

Vivir la vida y aceptar el reto,
recuperar la risa, ensayar el canto,
bajar la guardia y extender las manos,
desplegar las alas e intentar de nuevo,
celebrar la vida y retomar los cielos...

Mario Benedetti



Resumen

El desarrollo del presente trabajo consistió en el estudio químico de las partes aéreas de *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith (Rubeaceae), especie fototóxica endémica de la región andina de Bolivia y sur de Perú. La aplicación de sucesivas técnicas cromatográficas y el empleo de diferentes técnicas espectroscópicas (IR, UV-Vis, RMN, HRMS, DC, entre otros) permitieron el aislamiento y elucidación estructural de 7 antraquinonas (AQs). Tres resultaron ser nuevas estructuras para esta familia de compuestos: 5-clorosoranjidiol (5-clsor), 7-clorobisoranjidiol (7-clbis) y lycionina (lyc). La estructura de las dos nuevas AQs cloradas fue confirmada por semisíntesis a partir de soranjidiol y bisoranjidiol. Las cuatro restantes resultaron ser estructuras conocidas, por haberse aislado previamente de otra especie del mismo género (*H. pustulata*): soranjidiol (sor), bisoranjidiol (bis), pustulina y heterofilina. Cabe destacar que por primera vez se informa de la presencia de AQs halogenadas en la familia de las Rubiáceas, hecho que resulta novedoso teniendo en consideración la amplia diversidad de géneros y especies que presenta esta familia.

Las nuevas AQs fueron estudiadas a fin de determinar sus propiedades fotosensibilizadoras, es decir, como generadores de especies reactivas del oxígeno (ERO) cuando son activadas por acción de la luz. Se demostró que las tres nuevas estructuras generan ERO mediante los mecanismos fotodinámicos Tipo I (generación de radical anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$) y II (producción de 1O_2), destacándose 7-clbis como mayor productor de $O_2^{\bullet-}$ y 5-clsor como mayor productor de 1O_2 . Por lo tanto, podemos afirmar que las nuevas AQs aisladas de *H. lycioides* contribuyen efectivamente a la fototoxicidad que se le atribuye a esta especie.

En lo relativo a la actividad biológica de las AQ aisladas, se evaluó por un lado, la fotoinactivación de una cepa clínica de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible y por otro lado, la fotoinactivación de

Leishmania amazonensis. Referente a la fotoinactivación bacteriana, se comprobó que 5-clsor dio la mejor respuesta al ser sometido al tratamiento por irradiación con luz actínica, al reducir en dos logaritmos las unidades formadoras de colonias respecto del tratamiento en oscuridad. Los resultados de la fotoinactivación de *Leishmania amazonensis* empleando LED azul mostraron que sor, bis y 5-clsor reducen la actividad metabólica por encima del 90 %.

Los resultados preliminares de actividad biológica realizados, indican que varias de las AQs aisladas de *H. lycioides*, 5-clsor, sor y bis, se comportan como agentes fotosensibilizadores, con potencialidad para su aplicación en Terapia Fotodinámica Antimicrobiana.

Abstract

Heterophyllaea lycioides (Rusby) Sandwith (Rubeaceae) is a phototoxic species endemic to the Andean region of Bolivia and southern Peru. Chromatographic and spectroscopic techniques (IR, UV-VIS, RMN, HRMS, DC, among others techniques) allowed the isolation and structural elucidation of 7 anthraquinones (AQs). Three of them are new structures for this family of compounds: 5-chlorosoranjidiol (5-clsor), 7-chlorobisoranjidiol (7-clbis) and lycionine (lyc). Structure of chlorinated AQs was confirmed by synthesis. The remaining four structures were already isolated in another species of the same genus (*H. pustulata*): soranjidiol (sor), bisoranjidiol (bis), pustuline and heterophylline. Considering the wide diversity of genera and species presented by Rubiaceae family, it is important to point out that it is the first time that the presence of halogenated anthraquinones in this family is reported.

The new AQs were studied in order to determine their photosensitizing properties. It was demonstrated that the three new structures produce reactive oxygen species (ROS) by means of the Type I and II photodynamic mechanisms. 7-clbis generates the highest production of $O_2^{\bullet-}$ whereas 5-clsor showed the highest production of 1O_2 . Therefore, we can affirm that the new AQs isolated from *H. lycioides* effectively contribute to the phototoxicity attributed to this species.

Regarding biological activity assays of the isolated AQs, the photoinactivation of a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Leishmania amazonensis*, were evaluated. About the first assay, it was found that 5-clsor gave the best response to irradiation treatment with actinic light, by reducing in two logarithms the colony-forming units with respect to the treatment in the dark. Results of the photoinactivation of *Leishmania amazonensis* by using blue LED showed that sor, bis and 5-clsor reduce metabolic activity above 90 %.

Preliminary results of biological activity indicate that several of the isolated AQs from *H. lycioides*, 5-clsor, sor and bis, are promising photosensitizing agents, to be applied in Antimicrobial Photodynamic Therapy.

Abreviaturas

λ	longitud de onda
$\lambda_{\text{máx}}$	longitud de onda máxima
λ_{em}	longitud de onda de emisión
λ_{exc}	longitud de onda de excitación
δ	corrimiento químico
ε	absortividad molar
ν	frecuencia
Φ_{F}	rendimiento cuántico de fluorescencia
Φ_{Δ}	rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete
Γ	decaimientos radiativos
k_{nr}	decaimientos no radiativos
$\tau_{\text{F}}^{\text{AV}}$	tiempo de vida media de fluorescencia
$[\alpha]_D^{25}$	ángulo α rotación óptica específica de la luz polarizada, medido a 25°C, en la línea D del sodio aproximadamente a los 589 nm de longitud de onda
5-clsor	5-clorosoranjidiol
7-clbis	7-clorobisoranjidiol
Abs	absorbancia
Acetona- d_6	acetona deuterada
AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
AQ/AQs	antraquinona/s
ATCC	cepas bacterianas de referencia. Del inglés, <u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection.
Ben	benceno
biAQs	biantraquinonas
bis	bisoranjidiol
<i>br</i>	banda ancha. Del inglés, <i>browser</i>
CC	cromatografía en columna
CCD	cromatografía en capa delgada
CCD-p	cromatografía en capa delgada preparativa
CBM	concentración bactericida mínima
CIM	concentración inhibitoria mínima

<i>conc.</i>	concentración
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CHCl ₃	cloroformo
CDCl ₃	cloroformo deuterado
COSY	experimentos de correlación homonuclear. Del inglés, <u>correlated spectroscopy</u>
<i>d</i>	doblete
DC	Dicroísmo Circular
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido deuterado
E _L	energía del láser
ERO	<u>E</u> species <u>R</u> eactivas del <u>O</u> xígeno
ESIPT	transferencia intramolecular de protones en estado excitado. Del inglés, <u>E</u> xcited <u>S</u> tate <u>I</u> tramolecular <u>P</u> roton <u>T</u> ransfer.
EtOH	etanol
FE	fase estacionaria
FM	fase móvil
FS	fotosensibilizador
FS ₀	fotosensibilizador en su estado electrónico basal o fundamental
FS*	fotosensibilizador en su estado electrónico excitado
¹ FS*	fotosensibilizador en su estado singulete excitado
³ FS*	fotosensibilizador en su estado triplete excitado
FN1	línea de celular de fibroblastos
H ₂ O ₂	peroxido de hidrógeno
Hex	hexano
HBSS	buffer Hanks
HMBC	experimentos de correlación heteronuclear a dos o más enlaces. Del inglés, <u>H</u> eteronuclear <u>M</u> ulti <u>B</u> ond <u>C</u> orrelation spectroscopy
HPLC	cromatografía líquida de alta performance. Del inglés, <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
HPLC-MS	cromatografía líquida de alta performance acoplada a un espectrómetro de masas. Del inglés, <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography - <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry (MS)
HPLC-DAD- qTOF	cromatografía líquida de alta performance acoplada a un detector de arreglo de diodos y un analizador cuadrupolo tiempo de vuelo. Del inglés, <u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography -

	<u>D</u> iode <u>A</u> rray <u>D</u> etector- <u>q</u> uadrupole <u>T</u> ime of <u>F</u> light.
HRMS	espectrometría de masas de alta resolución. Del inglés, <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HR-ESI-MS	espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray. Del inglés, <i>High Resolution- ElectroSpray Ionization- Mass Spectrometry</i>
HSQC	experimentos de correlación heteronuclear a un enlace. Del inglés, <i>Heteronuclear Simple Quantum Coherence</i> .
h ν	fotón de energía
I ₀	intensidad de luminiscencia generada por la desactivación del oxígeno singulete producido, extrapolada a tiempo cero.
IC	conversión interna. Del inglés, internal conversión.
IR	Infrarrojo
ISC	cruce entre sistemas. Del inglés, <u>I</u> nter <u>S</u> ystem <u>C</u> rossing.
<i>J</i>	constante de acoplamiento en resonancia magnética nuclear.
La-LUC	<i>Leishmania amazonensis</i> transfectada (sobreexpresa enzima luciferasa).
LED	diodo emisor de luz. Del inglés, <u>L</u> ight- <u>E</u> mitting <u>D</u> iode.
lyc	lycionina
[M-H]	ion quasimolecular
MeOH	metanol
m/z	relación masa/carga eléctrica
m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
NBT	nitroblue tetrazolium
N-clsuc	N-clorosuccinamida
O ₂ ^{•-}	radical anión superóxido
¹ O ₂	oxígeno singulete
³ O ₂	oxígeno molecular
OH [•]	radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	buffer fosfato
PIT	tiempo de incubación previo a la irradiación. Del inglés, pre-irradiation time.
PN	perinaftenona
UVA	radiación ultravioleta A (315-400 nm)

PUVA	terapia que emplea Psoralenos y radiación UVA
R _f	relación de frentes
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN-1D	Resonancia Magnética Nuclear en una dimensión
RMN-2D	Resonancia Magnética Nuclear en dos dimensiones
r.p.m.	revoluciones por minuto
sh	hombro. Del inglés, <i>shoulder</i> (espectrofotometría UV-Visible)
SFM	sistema fagocítico mononuclear
SM	solución madre
SOD	enzima superóxido dismutasa
sor	soranjidiol
TFD	Terapia Fotodinámica
TFDA	Terapia Fotodinámica Antimicrobiana
t _R	tiempo de retención
TR	tiempo resuelto
UFC	unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
UV-V	Ultravioleta-Visible

Índice

CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN	3
FOTOSENSIBILIZADORES.....	3
<i>Mecanismo de acción</i>	3
BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA.....	4
FUENTES DE LUZ EMPLEADAS EN TERAPIA FOTODINÁMICA.....	5
CARACTERÍSTICAS DE UN FOTOSENSIBILIZADOR PARA SER APLICADO EN TERAPIA FOTODINÁMICA Y TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIMICROBIANA.....	6
<i>Fotosensibilizadores fotodinámicos sintéticos</i>	7
<i>Fotosensibilizadores fotodinámicos naturales</i>	9
Curcumina.....	9
Hipericina.....	10
Antraquinonas de <i>Heterophyllaea pustulata</i>	11
GÉNERO <i>HETEROPHYLLAEA</i>	12
<i>Antecedentes de Heterophyllaea pustulata</i>	13
<i>Heterophyllaea lycioides</i>	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
REFERENCIAS.....	16
CAPÍTULO 2	21
ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE PARTES AÉREAS DE <i>H. LYCIOIDES</i>	23
ANTECEDENTES QUÍMICOS.....	23
PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.....	23
ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR.....	24
CONCLUSIONES PARCIALES.....	25
REFERENCIAS.....	25
CAPÍTULO 3	27
PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTRAQUINONAS	29
ANTECEDENTES.....	29
<i>Química de las antraquinonas</i>	29
<i>Biosíntesis y actividad biológica de las antraquinonas</i>	30
<i>Antraquinonas en la familia de las Rubiáceas</i>	31
METODOLOGÍA DE PURIFICACIÓN.....	33
<i>Purificación del extracto bencénico</i>	33
<i>Purificación del extracto acetato de etilo</i>	35
ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS ANTRAQUINONAS DE <i>H. LYCIOIDES</i>	36
<i>Nuevas antraquinonas aisladas de H. lycioides</i>	37
AQ-1.....	37
AQ-2.....	46
AQ-3.....	57
<i>Identificación de antraquinonas informadas para otras especies</i>	69
AQ-4: Soranjidiol.....	70

AQ-5: Bisoranjidiol	71
AQ-6 y AQ-7: Pustulina y Heterofilina	73
CONCLUSIONES PARCIALES	75
REFERENCIAS.....	77
CAPÍTULO 4.....	79
CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE <i>H. LYCIOIDES</i>.....	81
ANTECEDENTES	81
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES	86
REFERENCIAS.....	87
CAPÍTULO 5.....	89
CARACTERIZACIÓN DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES TIPO I	91
ANTECEDENTES	91
<i>Mecanismo fotodinámico tipo I.....</i>	<i>91</i>
<i>Mecanismo fotodinámico tipo II.....</i>	<i>93</i>
<i>Daño celular.....</i>	<i>93</i>
METODOLOGÍA	94
<i>Ensayo del NBT</i>	<i>94</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	95
CONCLUSIONES PARCIALES.....	97
REFERENCIAS	98
CAPÍTULO 6.....	99
ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y FOTOSENSIBILIZADORAS TIPO II DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS	101
ANTECEDENTES	101
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	104
<i>Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete</i>	<i>104</i>
<i>Estudio de las propiedades fluorescentes</i>	<i>106</i>
Espectros de emisión y excitación	106
Rendimientos cuánticos relativos de fluorescencia (Φ_F) y tiempos de vida media de fluorescencia (τ_F^{AV})	109
<i>Estudio de la fotoestabilidad de las AQs: Fotólisis en estado estacionario</i>	<i>111</i>
CONCLUSIONES PARCIALES	115
REFERENCIAS.....	116
CAPÍTULO 7.....	119
ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	121
ANTECEDENTES	121
<i>Resistencia antibacteriana</i>	<i>121</i>
<i>Terapia fotodinámica antimicrobiana</i>	<i>121</i>
METODOLOGÍA	122
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
<i>Actividad antibacteriana en extractos de <i>H. lycioides</i>.....</i>	<i>123</i>
<i>Actividad antibacteriana de compuestos puros.....</i>	<i>124</i>
Determinación de CIM y CBM.....	124
Tratamiento de irradiación sobre cepas de <i>S. aureus ms</i>	125
CONCLUSIONES PARCIALES	128

REFERENCIAS.....	129
CAPÍTULO 8.....	131
FOTOINACTIVACIÓN DE LEISHMANIA AMAZONENSIS.....	133
ANTECEDENTES.....	133
<i>Breve descripción de Leishmaniosis.....</i>	<i>133</i>
<i>Ciclo Biológico.....</i>	<i>134</i>
<i>Manifestaciones clínicas.....</i>	<i>134</i>
<i>Medicamentos empleados en la actualidad.....</i>	<i>135</i>
<i>Terapia fotodinámica antimicrobiana.....</i>	<i>135</i>
METODOLOGÍA.....	136
<i>Método de bioluminiscencia.....</i>	<i>136</i>
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	137
<i>Selección de la concentración de las AQs a ensayar.....</i>	<i>137</i>
<i>Fotoinactivación de La-LUC empleando LED azul y AQs.....</i>	<i>139</i>
<i>Fotoinactivación de La-LUC empleando 5-clsr y LEDs diferentes.....</i>	<i>141</i>
<i>Estudio de captación de las antraquinonas.....</i>	<i>143</i>
<i>Estudio de citotoxicidad de AQs en línea celular de fibroblastos FN1.....</i>	<i>144</i>
CONCLUSIONES PARCIALES.....	145
REFERENCIAS.....	147
CAPÍTULO 9.....	149
CONCLUSIONES GENERALES.....	151
REFERENCIAS.....	153
CAPÍTULO 10.....	155
PROYECCIONES.....	157
CAPÍTULO 11.....	159
MATERIALES Y MÉTODOS.....	161
CAPÍTULO 2: ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE PARTES AÉREAS DE <i>H. LYCIOIDES</i>	161
<i>Procesamiento del material vegetal (MV).....</i>	<i>161</i>
Recolección del MV.....	161
Desecado y fragmentado del MV.....	161
Extracción del material vegetal.....	161
<i>Análisis fitoquímico preliminar.....</i>	<i>162</i>
Ensayo para detección de Flavonoides aglicones: Reacción de Shinoda.....	162
Ensayo para detección de antraquinonas aglicones: Reacción de Boerträger.....	162
Detección de asperulósido.....	162
CAPÍTULO 3: PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTRAQUINONAS.....	162
<i>Métodos Cromatográficos.....</i>	<i>162</i>
Solventes.....	162
Cromatografía en columna (CC).....	163
Cromatografía en capa delgada (CCD).....	163
D. Fases móviles empleadas en CCD y CCDp.....	163
Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	164
<i>Técnicas espectroscópicas.....</i>	<i>164</i>
Espectrofotometría UV-Visible.....	164
Espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS).....	165
Espectroscopía infrarroja (IR).....	165
Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	165
Dicroísmo circular (DC).....	165

Rotación óptica ($[\alpha]_D$).....	166
Reacciones químicas.....	166
Ruptura Reductora.....	166
Reacción de Cloración.....	166
CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE <i>H. LYCIOIDES</i>	167
Preparación de las muestras.....	167
Cromatografía líquida de alta performance (HPLC).....	167
Cromatografía líquida de alta performance acoplado a Masas (HPLC-MS).....	167
CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS COMO FOTSENSIBILIZADORES TIPO I.....	168
Obtención de neutrófilos.....	168
Materiales y equipamiento.....	168
Procedimiento.....	169
Soluciones de antraquinonas.....	170
Ensayo colorimétrico.....	170
Absorbancia promedio del basal.....	171
Sistema de irradiación.....	171
CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y FOTSENSIBILIZADORAS TIPO II DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS.....	172
Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete.....	172
Estudio de las propiedades fluorescentes.....	173
Espectros de emisión y excitación.....	173
Rendimientos cuánticos relativos de fluorescencia (Φ_F).....	173
Determinación de los tiempos de vida media de fluorescencia (τ_F^{AV}).....	174
Estudio de la fotoestabilidad de las AQs: Fotólisis en estado estacionario.....	175
CAPÍTULO 7: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	176
Preparación de Buffer PBS.....	176
Actividad antibacteriana en extractos de <i>H. lycioides</i>	176
Preparación de soluciones de extractos de partes aéreas de <i>H. lycioides</i>	176
Cepas bacterianas.....	176
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	177
Actividad antibacteriana de compuestos puros aislados de <i>H. lycioides</i>	178
Soluciones de antraquinonas.....	178
Cepas bacterianas.....	178
Determinación de CIM y CBM.....	178
Tratamiento de irradiación sobre cepas de <i>S. aureus ms</i>	179
Recuento de bacterias y determinación de ERO.....	180
CAPÍTULO 8: FOTOINACTIVACIÓN DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	181
Cultivo de <i>Leishmania amazonensis transgénica</i>	181
Determinación de la linealidad del método.....	181
Fotoinactivación de La-LUC.....	182
Preparación del fotosensibilizador.....	182
Efecto fotodinámico en promastigotes de La-LUC.....	182
Estudio de captación de antraquinonas.....	183
Estudio de citotoxicidad de AQs en línea celular de fibroblastos FN1.....	183
Preparación del fotosensibilizador.....	183
Línea celular FN1.....	184
Ensayo de MTT.....	184
REFERENCIAS.....	186
PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....	187
PUBLICACIONES CIENTÍFICAS CON REFERATO.....	189
PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	189

<i>Nacionales</i>	189
<i>Internacionales</i>	190
AUTOBIOGRAFÍA	193

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Y

OBJETIVOS

INTRODUCCIÓN

FOTOSENSIBILIZADORES

Los fotosensibilizadores (FS) son compuestos químicos de variada complejidad estructural, que en presencia de luz, a determinada longitud de onda, y oxígeno molecular dan origen a especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas especies se generan a través de reacciones de fotosensibilización, que finalmente inducen la muerte celular (Allison *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2010).

Mecanismo de acción

Básicamente, pueden ocurrir dos tipos de mecanismos de fotoactivación del FS, uno de ellos involucra la generación de radicales libres del oxígeno, tales como el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) (reacción fotodinámica Tipo I), y otro mecanismo implica la producción de oxígeno singlete (1O_2) (reacción fotodinámica Tipo II) (Fig. 1.1) (Nagy *et al.*, 2010). Estas ERO atacan con frecuencia a los ácidos grasos insaturados que conforman las membranas celulares (Eisenberg *et al.*, 1992), cuya peroxidación lipídica da lugar a la formación de hidroperóxidos alílicos; se inician así procesos de radicales libres, lo que induce a la lisis de los constituyentes de las membranas y eventual muerte celular (Valenzelo, 1987; Korytowski *et al.*, 1992; Bunting J, 1992). La mayoría de los FS fotodinámicos no se acumulan en el núcleo, por lo que su potencial daño del ADN, mutaciones y carcinogénesis es muy bajo (Dalla Via & Magno, 2001).

Sin embargo, se ha postulado que determinados FS, pueden generar fotoaductos que se unen al ADN, a través del mecanismo Tipo I. Este es el caso particular de estructuras como los psoralenos, estructuras empleadas en la llamada terapia PUVA (Psoralenos-radiación UVA), utilizada en el tratamiento de la psoriasis y el vitiligo (Lindelöf *et al.*, 1991; Nagy *et al.*, 2010; Baptista *et al.*, 2017).

La aplicación de FS fotodinámicos y luz sobre determinadas patologías, especialmente de piel, ha dado origen a la terapia fotodinámica (TFD).

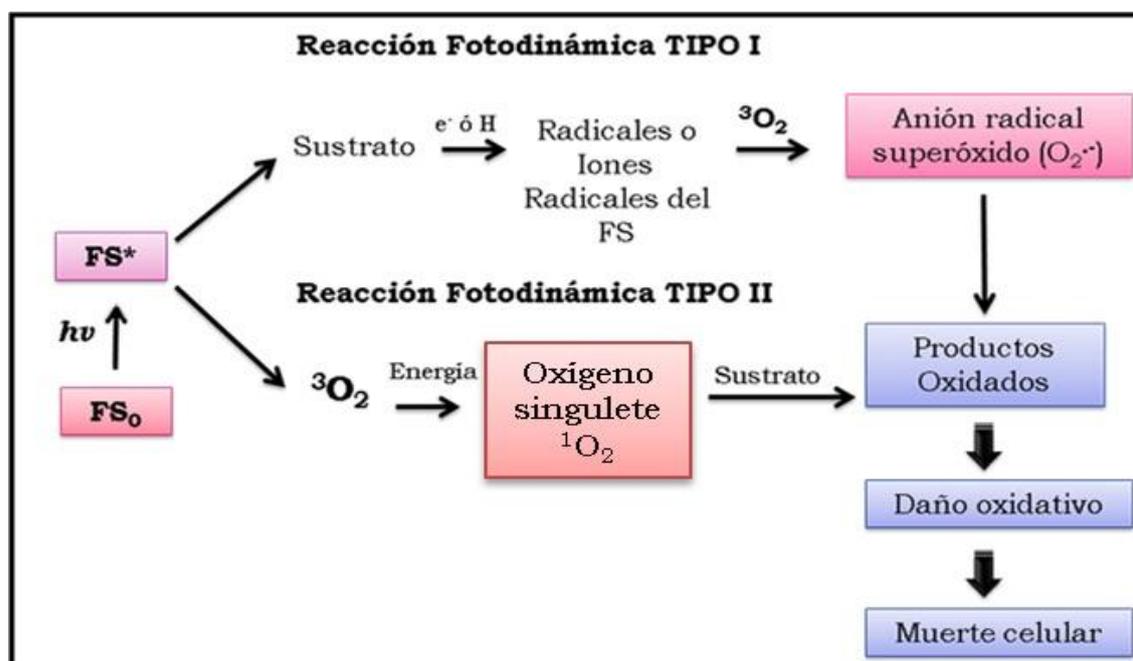


Figura 1. 1. Mecanismos fotodinámicos

BREVE RESEÑA HISTÓRICA DE LA TERAPIA FOTODINÁMICA

Los orígenes de la terapia fotodinámica se remontan al año 1900, cuando Oscar Raab describió por primera vez, la muerte de *Paramecium* spp. (Protistas ciliados) por interacción entre acridina y radiación infrarroja (Nagy *et al.*, 2010). Simultáneamente, Tappeiner en el año 1904 comienza a emplear el término “fotodinámico” para describir reacciones químicas consumidoras de oxígeno inducidas por una fotosensibilización, luego de emplear eosina tópica y luz blanca en el tratamiento del cáncer de piel (Gilaberte *et al.*, 2006). En esa misma época, el científico dinamarqués Niels Finsen, fue galardonado con el tercer premio Nobel de Medicina en la historia del desarrollo de tratamientos basados en luz para infecciones de la piel (Allison *et al.*, 2004).

Luego de estos descubrimientos, transcurrió un período de tiempo en el cual no se informaron nuevas investigaciones hasta 1948. Ese año, Figge demostró que la Hematoporfirina tenía no sólo potencial aplicación en el tratamiento de leucemia linfática, sino que también permitía determinar la localización tumoral. La síntesis de derivados de Hematoporfirinas por Lipson y Baldes en los años 60 y el impulso de Dougherty en ciencia básica y aplicaciones clínicas, despertó el interés de investigadores para impulsar esta nueva modalidad terapéutica (Castano *et al.*, 2004). Esto implicó no sólo la búsqueda de nuevos fotosensibilizadores, sino también el estudio de los procesos

fotofísicos y fotoquímicos involucrados en TFD así como también el desarrollo de nuevos y sofisticados equipos de irradiación (Dalla Via & Magno, 2001).

La TFD presentaba la ventaja de poseer baja toxicidad sistémica y la capacidad de producir la muerte en células cancerígenas en forma selectiva. Se presentaba como una terapia específicamente para el tratamiento de enfermedades localizadas, más que un tratamiento sistémico y a su vez, podía ser combinada con otros tratamientos, por ejemplos post-quirúrgicos (Nagy *et al.*, 2010).

Si bien, la TFD fue desarrollada para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, a comienzos de los 90, los científicos advirtieron que esta terapia también podría ejercer un poderoso efecto antimicrobiano, dando origen a la llamada terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) (Hamblin, 2016). La misma posee numerosas ventajas como la de ser altamente específica en su accionar (por diseño y elección del FS y protocolo de aplicación), presenta escasos efectos secundarios y no desarrolla mecanismos de resistencia microbiana. Esta técnica se utiliza actualmente en la desinfección de la sangre y productos sanguíneos, en particular para la inactivación viral, para el tratamiento de heridas infectadas o numerosas infecciones orales (Lukšienė, 2005).

FUENTES DE LUZ EMPLEADAS EN TERAPIA FOTODINÁMICA

Como se mencionó en la definición de FS, se requiere la presencia de luz para generar ERO. Cualquier fuente de luz adecuada a las características del espectro de excitación del FS, capaz de penetrar lo necesario en los tejidos (a mayor longitud de onda, mayor poder de penetración) y con la potencia suficiente puede ser utilizada en esta terapia (Gilaberte *et al.*, 2006).

En general, los protocolos actuales requieren el uso de fuentes de luz monocromáticas para lograr un mejor rendimiento. Las tecnologías disponibles son láseres o lámparas de luz no coherentes, como las lámparas de arco de xenón, lámparas con filamentos incandescentes o diodos emisores de luz (LEDs) (Gilaberte *et al.*, 2006; Sellera *et al.*, 2017).

Los láseres permiten seleccionar con exactitud la longitud de onda correspondiente a utilizar, ya que presentan un estrecho ancho de banda (1-2 nm), como así también la aplicación precisa de la luz en un área pequeña. Se emplea tanto para tratamientos como para diagnóstico de enfermedades. El empleo de láseres acoplado a fibras ópticas revolucionó la TFD permitiendo la

aplicación endoscópica de luz, es decir, la llegada de la misma a cada sitio del cuerpo humano. La gran desventaja de esta fuente es el alto costo en equipamiento (Nagy *et al.*, 2010).

Entre las fuentes de luz incoherentes, podemos destacar los LEDs, recursos eficientes y capaces de emitir luz relativamente monocromática, ya que poseen un ancho de banda mayor al de los láseres (10-50 nm). Son de bajo costo y permiten irradiar áreas mayores (Nagy *et al.*, 2010; Sellera *et al.*, 2017).

Numerosas lámparas son también usadas en TFD, puesto que presentan la ventaja de ser económicas y de fácil mantenimiento. Debido al amplio espectro de emisión, en comparación con láseres y LEDs, usualmente son empleadas en combinación con filtros que reducen el ancho de banda. Las lámparas presentan la desventaja de producir hipertermia y dolor durante el tratamiento (Brancaleon y Moseley, 2002).

CARACTERÍSTICAS DE UN FOTOSENSIBILIZADOR PARA SER APLICADO EN TERAPIA FOTODINÁMICA Y TERAPIA FOTODINÁMICA ANTIMICROBIANA

Los estudios de FS desarrollados hasta el momento, han permitido determinar que los mismos deben tener determinadas características para ser empleados en TFD. Las mismas se detallan a continuación (Castano *et al.*, 2004; Gilaberte., 2006):

- Alta producción de ERO.
- Presentar una baja o nula actividad en oscuridad.
- Tener un alto coeficiente de absorción para reducir la dosis del FS a emplear.
- Debe obtenerse con un alto grado de pureza y composición constante.
- Debe ser estable químicamente y frente a la irradiación (fotoestable).
- No debe agregarse en medios biológicos puesto que esto disminuye la producción de oxígeno singulete.
- La eliminación del FS debe ser rápida, en menos de un día, para evitar la fotosensibilidad post-tratamiento.

Además, la absorción del FS en la región visible del espectro es esencial. Entre los 400-500 nm (región azul del espectro), la aplicación será para dolencias tópicas o superficiales, ya que la luz presenta menor poder de penetración. Mientras que en la región del rojo, por encima de los 600 nm, se

emplea para el tratamiento de tumores, ya que la luz penetra 50–200% más que en la región del azul (Brancaleon y Moseley, 2002; Castano *et al.*, 2004).

Respecto a los requerimientos en la estructura de los FS, cuando se emplean en el tratamiento de diversos tipos de cáncer (TFD), se requiere una alta lipofilidad para difundir a través de las membranas biológicas. Mientras que los FS empleados en TFDA presentan algunas variaciones para lograr mayor selectividad. Se ha demostrado que los FS neutros o aniónicos son capaces de matar bacterias Gram-positivas y hongos, mientras que para la inactivación de bacterias Gram-negativas se necesitan FS con cargas positivas. De esta manera, los FS catiónicos pueden unirse y penetrar a través de la barrera de permeabilidad externa compuesta por lipopolisacáridos cargados negativamente (Sharma *et al.*, 2012).

Además existen otras estrategias para mejorar la selectividad de los FS en TFDA, entre las cuales podemos mencionar el agregado de sales inorgánicas (Vecchio *et al.*, 2015) o la encapsulación de FS aniónicos o neutros en vesículas con cargas positivas como polímeros (Hamblin *et al.*, 2002; Tegos *et al.*, 2006), liposomas (Bombelli *et al.*, 2008) o nanopartículas (Perni *et al.*, 2011).

Los avances realizados en las últimas décadas, relativos al tratamiento de diversas patologías mediante la aplicación de la TFD y la TFDA, han despertado interés en la búsqueda de nuevas estructuras químicas con actividad fotosensibilizadora. Estas búsquedas han sido orientadas ya sea tanto por la vía de la síntesis orgánica como a partir de los productos naturales.

Fotosensibilizadores fotodinámicos sintéticos

Los FS que se detallan a continuación se estudiaron para ser aplicados en tratamientos contra el cáncer principalmente. Se obtuvieron por la vía sintética y se clasifican de acuerdo a sus estructuras químicas (Dalla Via & Magno, 2001; Nagy *et al.*, 2010; Oniszczyk *et al.*, 2016; Sellera *et al.*, 2017):

1) Fotosensibilizadores porfirínicos:

- a. Primera generación: Constituido por derivados de Hematoporfirinas (Fig. 1.2, I). Las principales desventajas de estos FS es que se trata de mezclas de varios componentes, presentan baja absorción en la ventana terapéutica de irradiación, baja selectividad y producen fotosensibilidad

en la piel. Photofrin®, fue el primer medicamento aprobado para el tratamiento de distintos tipos de cáncer en numerosos lugares del mundo, incluso en Argentina.

- b. Segunda generación: Este grupo incluye dímeros y oligómeros de porfirinas, dímeros y trímeros de Clorinas (Fig. 1.2, II), purpurinas y derivados metálicos, tetrafenilporfirinas, ftalocianinas y naftalocianinas. Algunas de las ventajas que presentaban respecto al grupo mencionado anteriormente eran la pureza de los FS, el aumento de la banda de absorción en el rojo y la reducción significativa de la fotosensibilidad en la piel. El Ácido 5-aminolevulínico (ALA, Levulan®) es un profármaco empleado en la clínica para el tratamiento de tumores superficiales. Tiene la particularidad de ser un precursor que promueve la generación del fotosensibilizador activo *in situ*. También se emplean sus metil (Metvix), hexil (Hexvix) y bencil (Benzvix) éster derivados. Otros medicamentos aprobados dentro de este grupo son Foscan o Temoporfin® y Visudyne o Verteporfin® derivados de clorina y Tookad®, derivado de bacterioclorigina.
- c. Tercera generación: Consisten en FS de 2º generación conjugados con moléculas transportadoras: albúmina sérica, polientilenglicol, polisacáridos, anticuerpos, ciclodextrinas, liposomas, entre otras. Esta conjugación incrementa la especificidad de los mismos.
- d. Otro grupo de FS son los tetrapirroles que forman complejos con metales diamagnéticos como el Zn, Pd, In, Sn y Lu (Fig. 1.2, III). Estos metales, a diferencia de los metales paramagnéticos (Fe, Cu, Gd), preservan las propiedades de los FS. Muchos de estos compuestos presentan la desventajas de ser insolubles en agua, por lo que requieren ser vehiculizados (Castano *et al.*, 2004).

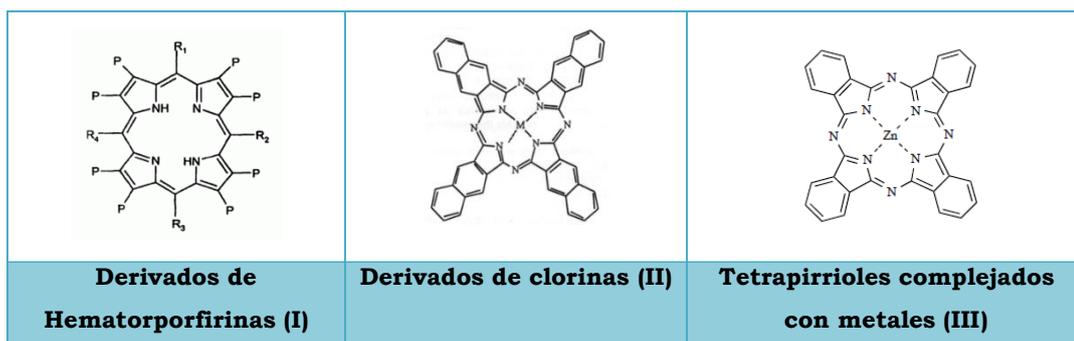


Figura 1. 2. Estructuras químicas de algunos FS Porfirínicos.

2) Fotosensibilizadores No porfirínicos:

- a. Colorantes sintéticos: este grupo está conformado por diferentes estructuras como derivados de xantenos, fenotiazinas, derivados de triarilmetanos, antraciclina, antrapirazoles, entre otros (Fig. 1.3).

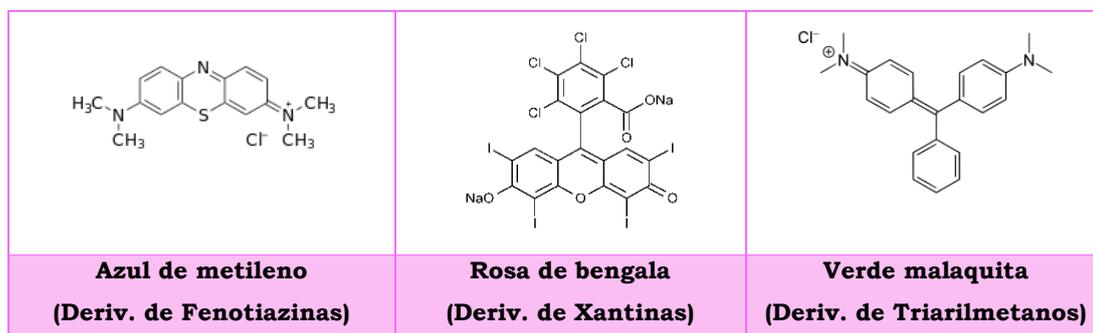


Figura 1. 3. Estructuras de FS no Porfirínicos

Fotosensibilizadores fotodinámicos naturales

Contrariamente a lo anteriormente mencionado respecto a derivados sintéticos, no son muchos los ejemplos que se pueden mencionar cuando se hace referencia a fotosensibilizadores fotodinámicos obtenidos de la naturaleza. Estudios recientes han dado lugar al descubrimiento de nuevas estructuras fotosensibilizadoras en el reino vegetal, que son informadas como novedosos agentes para su aplicación, tanto en TFD como en TFDA. Las estructuras encontradas forman parte de dos familias de compuestos naturales distintas, si bien pertenecen al conjunto de estructuras denominadas polifenoles (Bruneton, 1991). Por un lado, los curcuminoides cuyo principal representante es curcumina y por otro lado la familia de las AQs.

Curcumina

Es una estructura perteneciente a la familia de los curcuminoides. Desde el punto de vista químico es un diaril-heptanoide (Fig. 1.4), sustancia colorante obtenida de las raíces de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae). Es una hierba de clima tropical nativa del sud y sudeste de Asia, principalmente cultivada en India y China (Evans, 1991). A esta planta se le atribuyen numerosas propiedades para el tratamiento de diversas enfermedades (Gupta *et al.*, 2012; Heger *et al.*, 2014), destacándose entre sus constituyentes curcumina a la cual también se la menciona por su potencial aplicación en TFDA (Santezi *et*

al., 2016; Pröhl *et al.*, 2016). Este FS natural no presenta toxicidad a dosis altas y muestra buenas propiedades fluorescentes. Sin embargo, tiene algunas desventajas, como la escasa solubilidad en agua o la rápida eliminación, que impiden que este compuesto consiga alcanzar su máximo potencial. En la actualidad, se están estudiando algunas estrategias para mejorar estas desventajas (Pröhl *et al.*, 2016; Oniszczyk *et al.*, 2016).

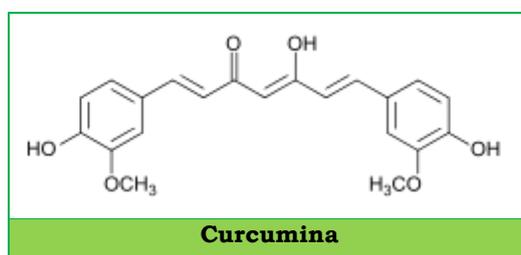


Figura 1. 4. Estructura química de la curcumina.

Hipericina

Es una nafto diantrona de estructura dimérica (Fig. 1.5), perteneciente a la familia de las AQs. Es uno de los principales constituyentes químicos de *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae Juss.), planta nativa de Europa, Norte de África y Asia (Saddiqe *et al.*, 2010). Su principal constituyente químico es hipericina. *H. perforatum* ha promovido numerosos estudios relativos a las propiedades antidepresivas de sus extractos (Bombardelli & Morazzoni, 1995; De Smet & Nolen, 1996). Otros estudios demuestran las potencialidades de hipericina *per sé* como antimicrobiano, incrementándose su efecto en presencia de luz (TFDA) (Lopez-Bazzocchi *et al.*, 1991; Höpfner *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2013). Por este motivo, en los últimos años ha sido objeto de estudio en TFD (Seitz *et al.*, 2008; Davids *et al.*, 2008).

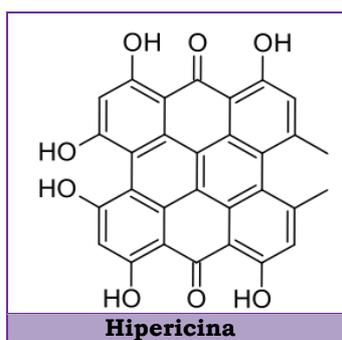


Figura 1. 5. Estructura química de Hipericina

Antraquinonas de *Heterophyllaea pustulata*

En nuestro grupo de trabajo, a fines de la década de los noventa, se comenzó con el estudio de una planta autóctona de nuestro país que era descrita en bibliografía como fototóxica (Hansen y Matiarena, 1967; Gallo 1988). En estos estudios se elucidaron las estructuras químicas de 10 AQs aglicones (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.* 2006): tres de ellas informadas por primera vez en la naturaleza (Fig. 1.6) y 7 antraquinonas que ya habían sido aisladas de otras especies vegetales (Fig. 1.7).

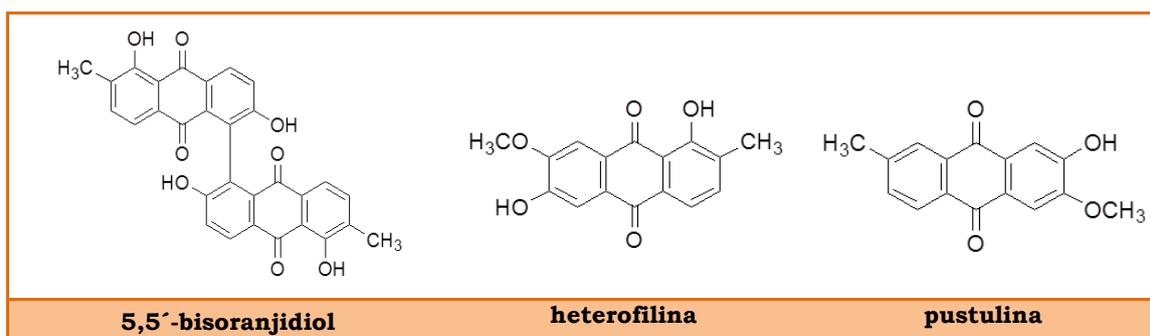


Figura 1. 6. Nuevos derivados antraquinónicos aislados de *H. pustulata*

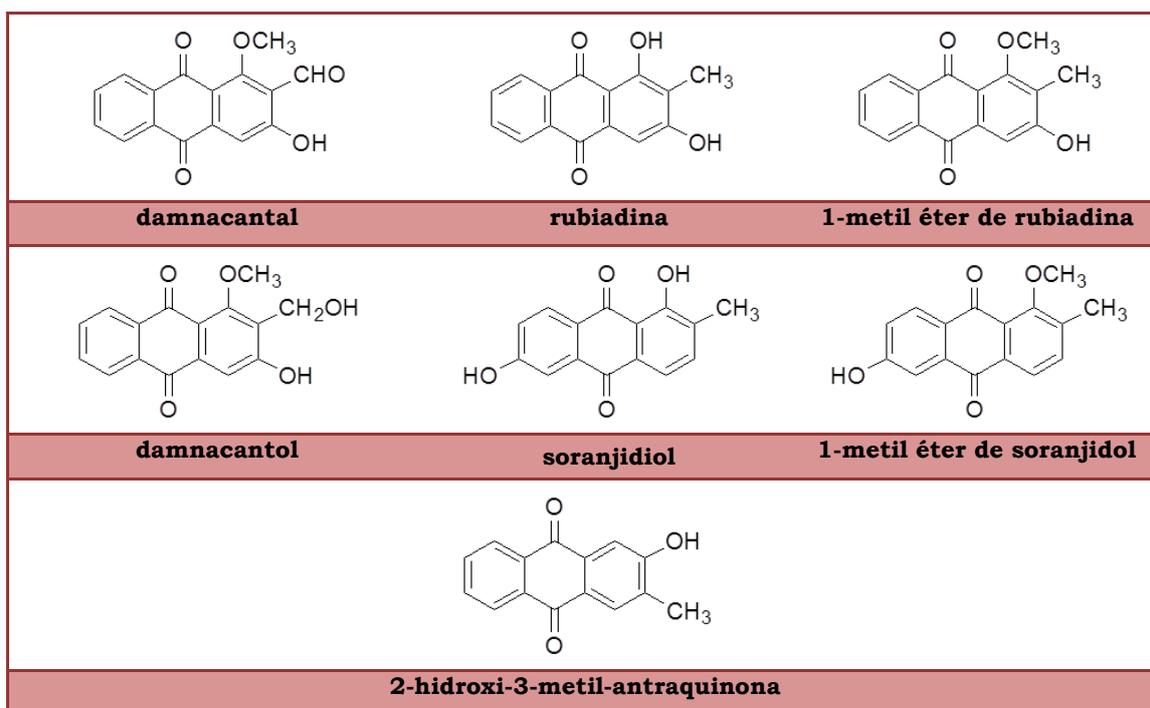


Figura 1. 7. Otros derivados antraquinónicos aislados de *H. pustulata*

Se demostró la incidencia de estas estructuras en las propiedades tóxicas atribuidas a la especie (Núñez Montoya *et al.*, 2008). Asimismo, se evaluaron las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de cada una de las AQs (Núñez

Montoya *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007a; Comini, 2007b), demostrando además sus potenciales aplicaciones en TFD y TFDA (Comini *et al.*, 2011a; Comini *et al.*, 2011b; Königheim *et al.*, 2012; Rumie Vittar *et al.*, 2014; Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

En nuestro conocimiento, *H. pustulata* constituye la primera especie de origen americano que se distingue por contener un alto contenido de derivados antraquinónicos con propiedades fotosensibilizadoras.

GÉNERO *HETEROPHYLLAEA*

Es un género sudamericano, perteneciente a la familia de las Rubiáceas, representado por dos especies: *Heterophyllaea pustulata* Hook f. autóctona del noroeste argentino, que habita especialmente la región montañosa de Salta y Jujuy, y se extiende hasta Bolivia; y *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith, autóctona de la región andina boliviana y sur de Perú (Fig. 1.8) (Sandwith, 1949; Bacigalupo, 1993; Brako y Zarucchi, 1993; Missouri Botanical Garden, 2016a).

Ambas especies fueron registradas como plantas fototóxicas, ya que producen ceguera progresiva en animales en casos agudos; por lo cual son comúnmente conocidas como “cegaderas” (Bacigalupo, 1993; Atauachi Burgos, 2005).

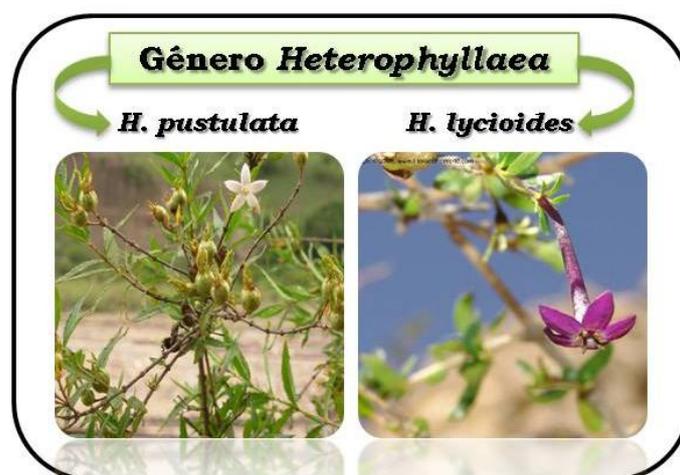


Figura 1. 8. Imagen de especies del género *Heterophyllaea* (Cabrera, 2014).

Antecedentes de *Heterophyllaea pustulata*

H. pustulata fue informada en 1967 por los médicos veterinarios Hansen y Martiarena como una planta fototóxica para el ganado (Hansen y Martiarena, 1967). Ellos observaron que la ingestión de diferentes partes de la planta en distintos períodos vegetativos y la exposición a la luz solar producía irritación dérmica y queratoconjuntivitis en animales que la ingieren, principalmente en aquellos de capas despigmentadas. En casos agudos, podían provocar ceguera, aunque se demostró que estos efectos son reversibles si el tóxico actuaba en cortos períodos de tiempo y eran atribuidos a principios activos fotosensibilizadores (Hansen y Martiarena, 1967; Aguirre & Neumann, 2001). Desde el punto de vista patológico, esta toxicidad se definió como una reacción de fotosensibilidad con ausencia de ictericia (Hansen y Martiarena, 1967).

Es así, que esta especie es conocida vulgarmente con los nombres de “cegada”, “ciegada” y “saruera” (Bacigalupo, 1993).

En la Fig. 1.6 y 1.7 (pág. 11) se encuentran formuladas las estructuras de las 10 AQs aisladas de *H. pustulata* donde se remarcan tres de ellas que fueron descritas por primera vez para esta familia de compuestos 5,5'-bisoranjidiol, heterofilina y pustulina (Núñez Montoya, 2002; Núñez Montoya *et al.*, 2006). Es de destacar que todas ellas son sintetizadas por la vía ácido shikímico/mevalonato, vía característica de las AQs de la familia de las Rubiáceas.

Además, estos derivados antraquinónicos fueron estudiados a través de métodos fotoquímicos, fotofísicos y fotobiológicos (Núñez Montoya *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007a). Estos estudios permitieron establecer que se trata de compuestos fotoactivos, ya que demostraron actividad fotodinámica a través de mecanismos Tipo I (generación de $O_2^{\bullet-}$) y/o Tipo II (generación de 1O_2).

Entre los estudios de actividad biológica realizados, algunas de ellas se destacan como agentes antimicrobianos (rubiadina, soranjidiol, damnacantal y 5,5'-bisoranjidiol) y anticancerígenos (rubiadina, 1-metil éter de rubiadina, soranjidiol y 1-metil éter de soranjidiol), a través del mecanismo de la TFD (Comini *et al.*, 2011a; Comini *et al.*, 2011b; Rumie Vittar *et al.*, 2014). Recientemente se comenzó con el estudio *in vitro* de estos derivados para el tratamiento de infecciones provocadas por virus (Konigheim *et al.*, 2012) y por hongos, específicamente *Candida tropicalis* (Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

Heterophyllaea lycioides

Es un arbusto de aproximadamente 1 m de altura, fuertemente ramificado, con ramas a veces rígidas. Hojas pequeñas, angostas, con puntitos negros en el envés. Flores tubulares de color violeta en el exterior y blanco en el interior. Frutos pequeños, redondos, cuando maduros de color amarillo pálido. Florece durante las lluvias pero principalmente en diciembre. Algo gregario y a veces se encuentra en colonias grandes. Frecuente entre los 2200 y 3300 m.s.n.m. en forma dispersa sobre laderas con pendientes pronunciadas, entre pocos arbustos (Atauachi Burgos, 2005).

Se conoce vulgarmente con el nombre de ceguera o Q`api (Atauachi Burgos, 2005). Al inicio de esta tesis, solo contaba con estudios botánicos y etnobotánicos en referencia a su actividad tóxica, sin antecedentes sobre otro tipo de estudios.

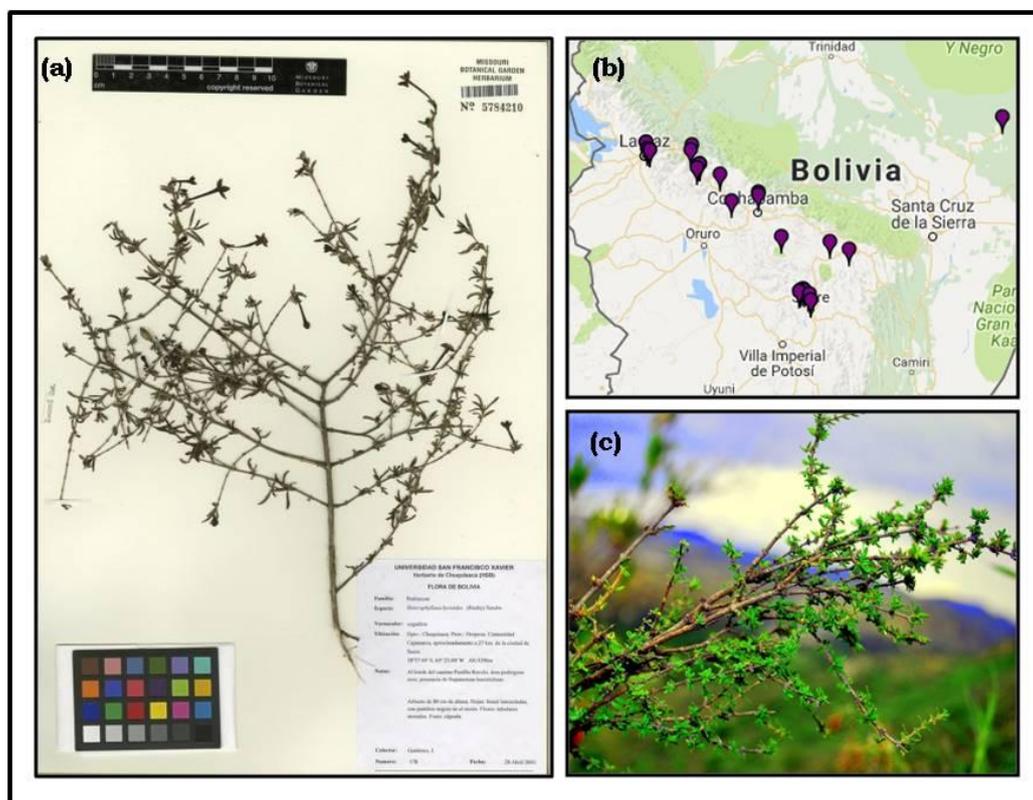


Figura 1. 9. (a) Herbario, distribución en Bolivia (Gutierrez Romero, 2001) (b) Distribución de *H. lycioides* en Bolivia (Missouri Botanical Garden, 2016b) (c) Fotografía de la especie *H. Lycioides* (Cabrera, 2014).

HIPÓTESIS

Se postula que *H. lycioides*, por motivos quimiotaxonómicos (pertenece al mismo género que *H. pustulata*) y por presentar efectos tóxicos en ganado, podría contener derivados antraquinónicos con potencial actividad fotosensibilizadora.

Al ser *H. lycioides* una especie autóctona boliviana, fue necesario solicitar autorización para su estudio. Para ello, se realizó un Convenio Específico de colaboración entre la Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca y Universidad Nacional de Córdoba (desde el año 2009 y firmado por ambos Rectores), siendo el Dr. J.L. Cabrera director del proyecto.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Búsqueda de nuevos agentes fotosensibilizadores naturales y sus posibles aplicaciones terapéuticas a través de terapia fotodinámica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar químicamente los metabolitos secundarios mayoritarios de *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith (Rubiaceae).
2. Individualizar a través de mediciones fotofísicas, fotoquímicas y fotobiológicas, las estructuras responsables del fenómeno de fotosensibilización, estableciendo el mecanismo a través del cual producen dicho fenómeno (mecanismo fotodinámico Tipo I y/o Tipo II).
3. Seleccionar aquellos compuestos que presenten propiedades fotosensibilizadoras y evaluarlos en ensayos biológicos que permitan determinar sus potenciales usos terapéuticos como agentes fotosensibilizadores fotodinámicos antimicrobianos.

REFERENCIAS

- Aguirre, D. H., Neumann, R. A., 2001. Intoxicación por “cegada” (*Heterophyllaea pustulata*) en caprinos del noroeste argentino. *Med. Vet.* 18, 487-490.
- Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J. H., Sibata, C. H., 2004. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1, 27-42.
- Atahuachi Burgos, M., 2005. La Guía “Darwin” de las flores de los valles bolivianos. Darwin Initiative, La Paz.
- Bacigalupo., N. M., 1993. Rubiaceae. En A. L. Cabrera. (Ed.), *Flora de la Provincia de Jujuy*, (p. 375-80). Buenos Aires, Argentina: Colección Científica INTA.
- Baptista, M., Cadet, J., Di Mascio, P., Ghogare, A., Greer, A., Hamblin, M., Lorente, C., Núñez, S. C., Ribeiro, M., Thomas, A., Vignoni, M., Yoshimura, T., 2017. Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochemistry and Photobiology*. En Prensa.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P., 1995. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia* 66, 43-68.
- Bombelli C., Bordi F., Ferro S., Giansanti L., Jori G., Mancini G., Mazzuca C., Monti D., Ricchelli F., Sennato S., Venanzi M., 2008. New cationic liposomes as vehicles of m-tetrahydroxyphenylchlorin in photodynamic therapy of infectious diseases. *Mol Pharm.* 5, 672-9.
- Brako, L., Zarucchi, J. L., 1993. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Peru. *Missouri Botanical Garden*, 45. 1029.
- Brancaleon, L., Moseley, H., 2002. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* 17, 173-186.
- Bruneton, J., 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Acribia, S.A.
- Bunting, J. R., 1992. A test of the singlet oxygen mechanism of cationic dye photosensitization of mitochondrial damage. *J. Photochem. Photobiol.* 55, 81-87.
- Cabrera J. L., 2014. Fotografía de las especies *Heterophyllaea pustulata* y *lycioides*.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R., 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1, 279-293.
- Comini, L. R., Núñez Montoya, S. C., Sarmiento, M., Cabrera, J. L., Argüello, G. A., 2007a. Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 188, 185-191.
- Comini, L. R., 2007b. Caracterización fisicoquímica de productos naturales (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Comini, L. R., Núñez Montoya, S. C., Páez, P. L., Argüello, G. A., Albasa, I., Cabrera, J. L., 2011a. Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 102, 108-114.
- Comini, L. R., Fernandez, I. M., Vittar, N. B. R., Núñez Montoya, S. C., Cabrera, J. L., Rivarola, V. A., 2011b. Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine* 18, 1093-1095.
- Dalla Vía, L., Magno Marciano, S., 2001. Photochemotherapy in the treatment of cancer. *Curr. Med. Chem.* 8, 1405-1418.

- Davids, L. M., Kleemann, B., Kacerovská, D., Pizinger, K., Kidson, S. H., 2008. Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 91, 67–76.
- De Smet, P. A., Nolen, W. A., 1996. St John's wort as an antidepressant. *British Medical Journal*, 313, 241–242.
- Eisenberg, W. C., Anand, J., Wang, S., Stevenson, R. J., 1992. Oxidation of phosphatidylcholine membranes by singlet oxygen generated in the gas phase. *Photochem. Photobiol.* 56, 441–445.
- Evans, W. C., 1991. *Trease y Evans Farmacognosia*. Interamericana, McGraw-Hill.
- Gallo, G., 1988. Plantas tóxicas para el ganado en el cono sur de América, Buenos Aires, Argentina, Hemisferio sur.
- Gilaberte, Y., Serra-Guillén, C., De Las Heras, M. E., Ruiz-Rodríguez, R., Fernández-Lorente, M., Benvenuto-Andrade, C., González-Rodríguez, S., Guillén-Barona, C., 2006. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* 97, 83-102.
- Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., Aggarwal, B., 2012. Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39, 283–299.
- Gutierrez Romero, J., 2001. Herbario *Heterophyllaea lycioides*. Tropicos.org. <http://tropicos.org/Image/100222968>.
- Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, Hasan T. J., 2002. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *Antimicrob Chemother.* 49, 941-51.
- Hamblin, M.R., 2016. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 33, 67–73.
- Hansen, E., Martiarena, C., 1967. Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook “cegadera” en el ganado. *Patol. Animal, Rev Inv Agropec (INTA)* 4, 81-113.
- Heger, M., van Golen, R. F., Broekgaarden, M., Michel, M. C., 2014. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer. *Pharmacol. Rev.* 66, 222–307.
- Höpfner, M., Maaser, K., Theiss, A., Lenz, M., Sutter, P., Kashtan, H., von Lampe, B., Riecken, E.O., Zeitz, M., Scherübl, H., 2003. Hypericin activated by an incoherent light source has photodynamic effects on esophageal cancer cells. *Int. J. Colorectal Dis.* 18, 239–47.
- Konigheim, B. S., Beranek, M., Comini, L. R., Aguilar, J. J., Marioni, J., Cabrera, J. L., Contigiani, M. S., Núñez Montoya, S. C., 2012. *In Vitro* antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Nat. Prod. Commun.* 7, 1025-1028.
- Korytowski, W., Bachowski, G. J., Girotti, A. W., 1992. Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5 alpha- and 6 beta-hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy. *Photochem. Photobiol.* 56, 1–8.
- Lindelöf, B., Sigurgeirsson, B., Tegner, E., Larkö, O., Johannesson, A., Berne, B., Christensen, O., Andersson, T., Törngren, M., Molin, L., Nylander-Lundqvist, E., Emtestam, L., 1991. PUVA and cancer: a large-scale epidemiological study. *Lancet* 338, 91–93.
- Lopez-Bazzocchi, I., Hudson, J. B., Towers G. H., 1991. Antiviral activity of the photoactive plant pigment hypericin. *Photochem Photobiol.* 54, 95–98.

- Lukšienė, Ž., 2005. New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization. *Food Technol. Biotechnol.* 43, 411–418.
- Marioni, J., Arce, J. E., Cabrera, J. L., Paraje, M. G., Núñez Montoya, S. C., 2016a. Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharm. Biol.* 3, 1-11.
- Marioni, J., Da Silva, M. A., Cabrera, J. L., Núñez Montoya, S. C., Paraje, M. G., 2016b. The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*; 23, 1321 – 1328.
- Missouri Botanical Garden, 2016a. *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith, Tropicos.org: <http://tropicos.org/Name/27909507>.
- Missouri Botanical Garden, 2016b. Distributions, Tropicos.org: <http://tropicos.org/Name/27909507?tab=distribution>.
- Nagy, E. M., Via, L. D., Ronconi, L., Fregona, D., 2010. Recent Advances in PUVA Photochemotherapy and PDT for the Treatment of Cancer 1863–1876.
- Núñez Montoya, S. C., 2002. Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas) (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Núñez Montoya, S. C., Comini, L. R., Sarmiento, M., Becerra, C., Albesa, I., Argüello, G. A., Cabrera, J. L., 2005. Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: Singlet oxygen and superoxide anion production. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 78, 77-83.
- Núñez Montoya, S. C., Agnese, A. M., Cabrera, J. L., 2006. Anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *J. Nat. Prod.* 69, 801-803.
- Núñez Montoya, S. C., Comini, L. R., Rumie Vittar, B., Fernandez, I. M., Rivarola, V. A., Cabrera, J. L., 2008. Phototoxic effects of *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *Toxicon* 51, 1409-1415.
- Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T., Kasprzak, K., 2016. The potential of photodynamic therapy (PDT) - Experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother.* 83, 912–929.
- Perni S., Prokopovich P., Pratten J., Parkin I. P., Wilson M., 2011. Nanoparticles: their potential use in antibacterial photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* 10, 712-20.
- Pröhl, M., Schubert, U. S., Weigand, W., Gottschaldt, M., 2016. Metal complexes of curcumin and curcumin derivatives for molecular imaging and anticancer therapy. *Coord. Chem. Rev.* 307, 32–41.
- Rumie Vittar, N. B., Comini, L. R., Fernandez, I. M., Agostini, E., Núñez-Montoya, S. C., Cabrera, J. L., Rivarola, V.A., 2014. Photochemotherapy using natural anthraquinones: Rubiadin and Soranjidiol sensitize human cancer cell to die by apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11, 182-192.
- Saddiqe, Z., Naeem, I., Maimoona, A., 2010. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* 131, 511–521.
- Sandwith, N., 1949. Contributions to the Flora of Tropical America: XLIX. Notes on Rubiaceae. *Kew Bulletin*, 253-264.
- Santezi, C., Tanomaru, J. M. G., Bagnato, V. S., Júnior, O. B. O., Dovigo, L. N., 2016. Potential of curcumin-mediated photodynamic inactivation to reduce oral colonization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15, 46–52.

- Seitz, M., Krause, R., Fuchs, J., Heitmann, H., Armeanu, S., Ruck, P., Warmann, S.W., 2008. *In vitro* photodynamic therapy in pediatric epithelial liver tumors promoted by hypericin. *Oncology Report* 20, 1277-1282.
- Sellera, F. P., Nascimento, C. L., Ribeiro, M. S., 2017. *Photodynamic therapy in veterinary medicine, from basics to clinical practice*. Springer International Publishing.
- Sharma, S. K., Mroz, P., Dai, T., Huang, Y., Denis, T. G. S., Hamblin, M. R., 2012. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference?. *Isr J Chem.* 52, 691–705.
- Taylor, O. V. M., Ríos, R. Y. K., León R. D. A., 2013. Plantas con actividad fotosensibilizadora y potencial terapéutico en leishmaniasis cutánea: hipericina, una alternativa prometedora. *Infectio* 17, 90–102.
- Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P, Janjua S, Gad F, Hamblin MR, 2006. Protease-stable polycationic photosensitizer conjugates between polyethyleneimine and chlorin(e6) for broad-spectrum antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 1402-10.
- Valenzeno, D.P., 1987. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 46, 147–160.
- Vecchio, D., Gupta, A., Huang, L., Landi, G., Avci, P., Rodas, A., Hamblin, M. R., 2015. Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by synergistic effect of potassium iodide. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5203-12.

CAPÍTULO 2

ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE PARTES AÉREAS DE *H. LYCIOIDES*

ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE PARTES AÉREAS DE *H. LYCIOIDES*

ANTECEDENTES QUÍMICOS

Si bien *H. lycioides* presenta estudios botánicos descriptivos de la especie y alguna referencia etnobotánica sobre toxicidad, carece de estudios relativos a constituyentes que definan un patrón químico que la caracterice y que justifiquen el efecto tóxico mencionado. En este sentido han sido de importancia los estudios químicos previos realizados sobre *H. pustulata*, única especie “hermana” de este limitado género. A fin de determinar diferencias y similitudes entre ambas especies, se realizaron en primera instancia, ensayos químicos generales para determinar sus principales familias de constituyentes.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

El material vegetal fue recolectado y procesado como se describe en la página 161. Con el objetivo de realizar una primera separación de la compleja matriz que significa el alto contenido de metabolitos presentes en el material bajo estudio, se prepararon cuatro extractos de polaridad creciente: hexánico (Hex), bencénico (Ben), acetato de etilo (AcOEt) y etanólico (EtOH). Este procedimiento permitió obtener por separado, compuestos de diferentes polaridades y características fisico-químicas. En la Fig. 2.1 se muestran los rendimientos obtenidos de cada extracto.

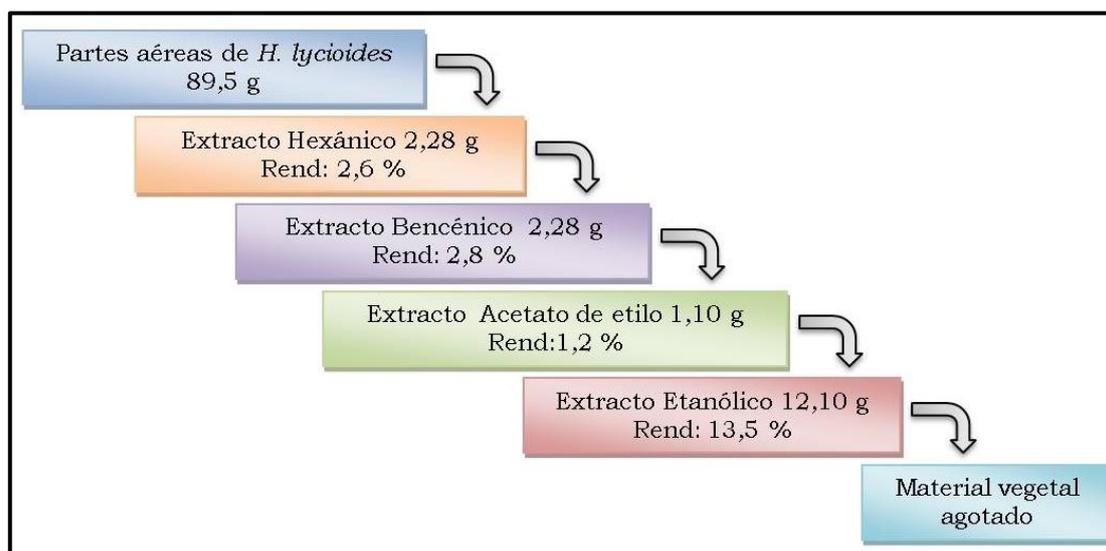


Figura 2. 1. Obtención de extractos de polaridad creciente

ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR

Este estudio consistió en un análisis fitoquímico cualitativo, mediante la aplicación de una serie de reacciones de coloración que brindan información acerca de la presencia o ausencia de metabolitos pertenecientes a distintas familias de compuestos. Para realizar esta determinación, los cuatro extractos, fueron sometidos a una marcha analítica cualitativa de acuerdo a procedimientos estándares desarrollados por Harborne (Harborne, 1984). En la página 162, se muestran los procedimientos realizados.

Como resultado de este análisis, se determinó la presencia de tres familias de compuestos: antraquinonas, flavonoides e iridoides, identificándose en particular el iridoide glicosilado denominado asperulósido (Fig. 2.2).

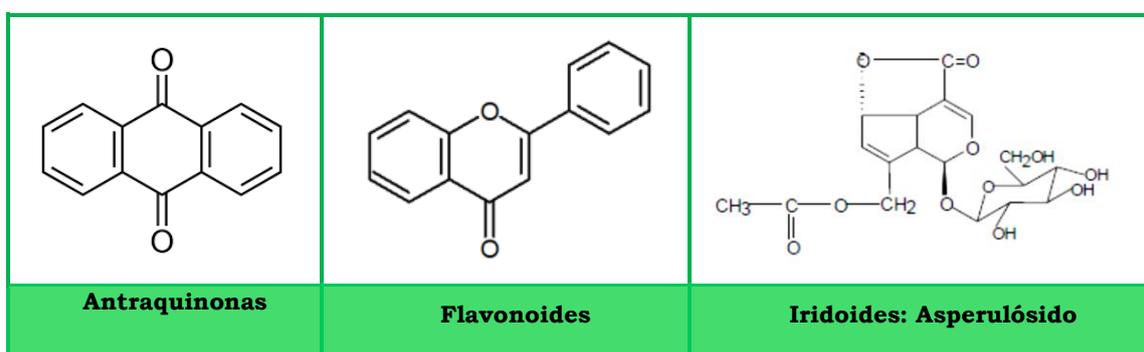


Figura 2. 2. Estructuras químicas de las principales familias de compuestos encontrados en *H. lycioides*.

El patrón químico preliminar de *H. lycioides* (Tabla 2.1, Fig. 2.3), mostró similitudes al de *H. pustulata* (Núñez *et al.*, 2003). Se observa predominancia de AQs en los extractos Ben y ACOEt, mientras que en los extractos polares prevalecen flavonoides junto a asperulósido en el extracto EtOH. De manera que se puede señalar a estas familias de compuestos como marcadores químicos que caracterizan al género *Heterophyllaea*. Incluso, AQs e iridoides, son considerados marcadores quimiotaxonómicos de la familia de las Rubiáceas (Martins y Núñez, 2015).

Tabla 2. 1. Reacciones de identificación de los principales metabolitos de las partes aéreas de *H. lycioides*.

Extractos	Antraquinonas	Flavonoides	Asperulósido
Hexánico	+	-	-
Bencénico	++	-	-
Acetato de Etilo	+++	-/+	-
Etanólico	+	+++	+++

Reacción positiva: +; Reacción negativa: -; Reacción dudosa: +/-

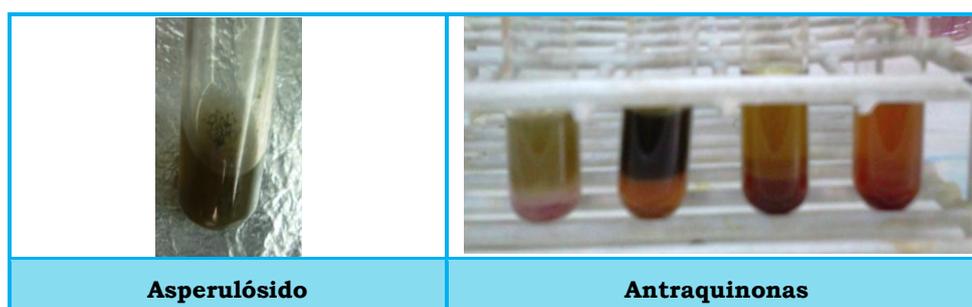


Figura 2. 3. Imágenes ilustrativas de las reacciones de identificación de las distintas familias de compuestos.

CONCLUSIONES PARCIALES

Debido a que el objetivo general de esta tesis es la búsqueda de nuevos agentes FS y teniendo en cuenta que las AQs estudiadas en *H. pustulata* presentan estas propiedades, se centró el estudio químico en esta familia de compuestos.

REFERENCIAS

- Harborne, J. B., 1984. *Phytochemical Methods – A guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 2^o ed. Chapman and Hall London.
- Martins, D., Núñez, C. V., 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules* 20, 13422-13495.
- Núñez Montoya, S. C., Agnese, A. M., Pérez, C., Tiraboschi, I. N., Cabrera, J. L., 2003. Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomedicine* 10, 569-574.

CAPÍTULO 3

PURIFICACIÓN Y
ELUCIDACIÓN
ESTRUCTURAL DE
ANTRAQUINONAS

PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTRAQUINONAS

ANTECEDENTES

Química de las antraquinonas

Las AQs son metabolitos secundarios derivados del antraceno, núcleo formado por tres anillos bencénicos condensados en forma lineal (Fig. 3.1, I). Del antraceno derivan nueve quinonas isómeras, de las cuales la más importante es la 9,10 AQ (Fig. 3.1, II) (Villar del Fresno, 1999).

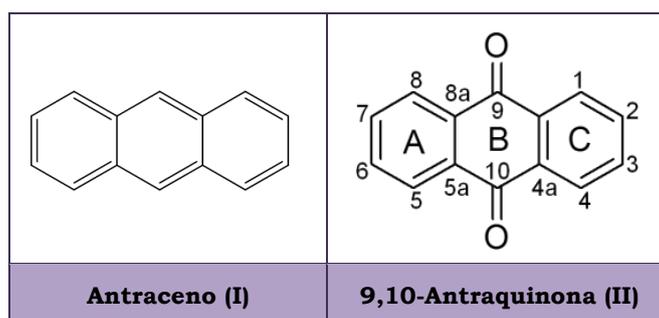


Figura 3. 1. Estructuras químicas del antraceno y estructura general de las antraquinonas.

Muchas de estas estructuras se encuentran en las plantas unidas a glúcidos (formando AQs glicosiladas), y en algunos casos son transformadas en aglicones por glicosidasas o procesos oxidativos (Seigler, 1998).

Se han identificado además dímeros de AQs, que pueden estar formadas por monómeros iguales, llamadas homo-biantraquinonas o diferentes, hetero-biantraquinonas. Las mismas se unen por cualquier posición diferentes a la 9 y 10 (Núñez Montoya, 2002).

Desde el punto de vista farmacognóstico, las AQs representan el grupo más ampliamente distribuido en la naturaleza e importante en la historia del hombre. Se destacan no sólo por sus propiedades medicinales, sino también como agentes tintóreos (Villar del Fresno, 1999; Koyama *et al.*, 2001). Entre los compuestos más frecuentes en la naturaleza se mencionan emodina, parietina, catenarina y reína.

De aproximadamente 700 compuestos descritos, 200 fueron aislados de plantas superiores y los restantes predominan en hongos y líquenes (Koyama *et al.*, 2001; Duval *et al.*, 2016). En las plantas superiores, se encuentran principalmente en las familias Fabaceae (*Cassia*), Liliaceae (*Aloe*),

Polygonaceae (*Rheum*, *Rumex*), Rhamnaceae (*Rhamnus*), Rubiaceae (*Asperula*, *Coelospermum*, *Coprosma*, *Galium*, *Morinda*, *Rubia*, *Heterophyllaea*), y Scrophulariaceae (*Digitalis*) (Wijnsma y Veerporte, 1986; Duval *et al.*, 2016). Estas estructuras, se pueden encontrar en distintas partes de la planta: raíces, rizomas, frutos, flores y hojas (Duval *et al.*, 2016).

De las AQs derivan una serie de compuestos que poseen propiedades diferentes, dependiendo de la posición que ocupen los sustituyentes (Evans, 1991).

Biosíntesis y actividad biológica de las antraquinonas

Las AQs pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo a su vía biosintética, originando así metabolitos con patrones de sustitución diferentes (Fig. 3.2). Es importante destacar, que estas rutas biosintéticas no ocurren simultáneamente en la misma planta, por el contrario se dan en forma particular en algunas familias, por lo cual poseen importancia desde el punto de vista quimiotaxonómico (Wijnsma y Veerporte, 1986).

Un grupo de AQs se caracteriza por poseer grupos hidroxilos (OH) en las posiciones 1 y 8, las cuales son ampliamente usadas en medicina por sus propiedades laxantes (Wijnsma y Veerporte, 1986; Bruneton, 1991; Dewick, 2009). Es conocido que estas estructuras, producen un aumento en el tono del músculo liso en la pared del intestino grueso (Duval *et al.*, 2016). Estos compuestos se forman a partir de acetato/malonato por la vía Policétidos.

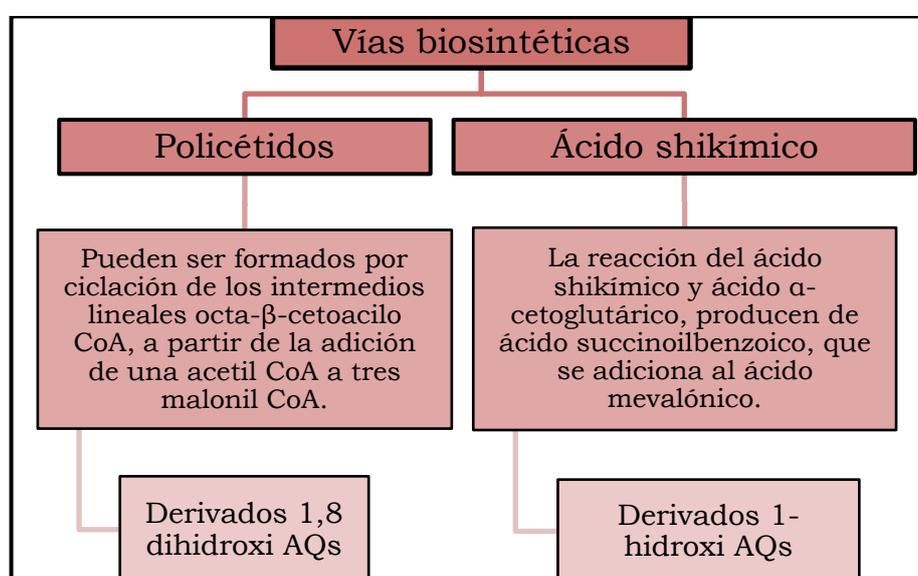


Figura 3. 2. Vías biosintéticas que dan origen a los distintos derivados antraquinónicos

Los derivados 1,8 dihidroxi pueden estar sustituidos en la posición 3 por grupos metilos (CH_3); hidroximetilos (CH_2OH), aldehídos (COH) y ácidos carboxílicos (COOH); y en la posición 6 por un OH fenólico libre, esterificado o glicosilado, sustituyentes que incrementan la actividad catártica. Algunas de las plantas medicinales más utilizadas en el área farmacéutica con estas propiedades son por ejemplo cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.), aloe (*Aloe barbadensis* Mill.), ruibarbo (*Rheum rhabarbarum* L.), sen (*Senna alexandrina* Mill.), entre otras (Seigler, 1998; Dewick, 2009). Además de la actividad catártica mencionada, algunas AQs exhiben otras actividades biológicas, entre las cuales se destacan aloe emodina por sus propiedades antibacterianas, antivirales, anticancerígenas, hepatoprotectoras, antiinflamatorias y antioxidantes (Chien *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015); y crisofanol que presenta actividad antitumoral, antidiabética y capacidad hipolipemiente y como protector neuronal (Chien *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2016).

El segundo grupo de AQs, halladas generalmente en la familia de las Rubiáceas entre otras familias, como Bignoniaceae, Verbenaceae y Scrophulariaceae, son sintetizadas a partir de la vía del ácido shikimico/mevalonato (Fig. 3.2) (Schripsema *et al.*, 1999). Estos derivados no exhiben propiedades catárticas, pero en cambio presentan importantes actividades biológicas como agentes antimicrobianos, anticancerígenos, antioxidantes, entre otras (Wijnsma y Veerporte, 1986, Duval *et al.*, 2016). Las AQs sintetizadas a partir de esta vía biosintética, en general, se caracterizan por poseer sustituyentes en ambos anillos A y C (Tabla 3.1), aunque existen algunas excepciones (Seigler, 1998; Schripsema *et al.*, 1999).

Antraquinonas en la familia de las Rubiáceas

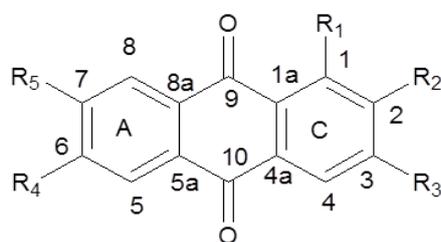
La familia Rubiaceae posee una amplia diseminación geográfica y cuenta con más de 10 mil especies distribuidas entre 500 y 700 géneros. Es una especie cosmopolita, pero principalmente tropical (Martins y Núñez, 2015; Taylor, 2016). Se caracteriza por la producción de metabolitos con potencial farmacológico, así como también colorantes que han sido utilizados desde la antigüedad, en muchas partes del mundo, para la tinción de textiles (Thomson, 1971).

Generalmente las AQs aisladas de esta familia, poseen un grupo CH_3 o un grupo metil oxidado (CH_2OH , CHO o COOH) en posición 2 o 6, debido al

precursor previo a la obtención de la AQ (Wijnsma y Veerporte, 1986; Chien *et al.*, 2015). En general, se obtienen derivados de 2-metil AQs, 1,3-dihidroxi-2-metil AQs y 1-hidroxi AQs y sus metil éteres (Núñez Montoya, 2002). Frecuentemente se encuentran sustituidas en posición 5, 6 y 7 y rara vez, en posición 8 (Wijnsma y Veerporte, 1986).

Estos patrones de sustitución se observan en las AQs obtenidas de *H. pustulata*, en donde como se puede observar en la Tabla 3.1 y Figura 3.3, en posición 1 estas AQs presentan sustituyentes como grupos OH, OCH₃ o hidrógeno (H) y a su vez, prevalecen los grupos CH₃ en la posición 2. Todas las estructuras obtenidas se encuentran sustituidas tanto en el anillo A como en el anillo C, destacándose la presencia de un OH en posición 6 en algunos de los metabolitos aislados (Núñez Montoya, 2002).

Tabla 3. 1. Derivados antraquinónicos monoméricos aislados de la especie *H. pustulata*



AQs	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
soranjidiol	OH	CH ₃	H	OH	H
1-metil éter de soranjidiol	OCH ₃	CH ₃	H	OH	H
rubiadina	OH	CH ₃	OH	H	H
1-metil éter de rubiadina	OCH ₃	CH ₃	OH	H	H
damnacantal	OCH ₃	CHO	OH	H	H
damnacantol	OCH ₃	CH ₂ OH	OH	H	H
heterofilina	OH	CH ₃	H	OH	OCH ₃
pustulina	H	OH	OCH ₃	H	CH ₃
2-hidroxi-3-metilantraquinona	H	OH	CH ₃	H	H

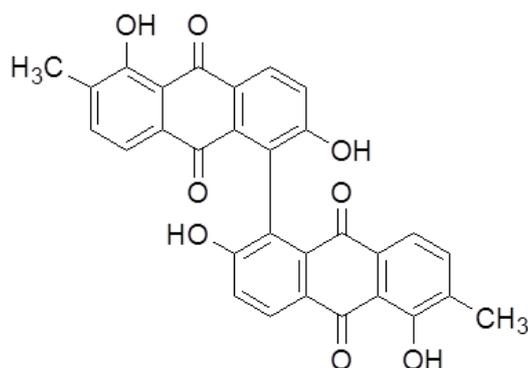


Figura 3. 3. Estructura dimérica aislada de *H. pustulata*, 5,5' bisoranjiol.

Para poder cumplimentar con el primer objetivo específico de esta tesis, se propuso realizar las siguientes actividades:

- Aislar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios de *H. lycioides*.
- Elucidar sus estructuras a través de técnicas espectroscópicas.

METODOLOGÍA DE PURIFICACIÓN

Los extractos de Ben y AcOEt obtenidos como se explicó en el capítulo 2, pág. 23, se evaporaron a presión reducida para obtener los extractos secos y fueron purificados como se detalla a continuación.

Purificación del extracto bencénico

El extracto Ben seco, fue sometido a una serie de particiones, realizando variaciones de pH, como se muestra en la Figura 3.4. De esta forma se eliminaron otros componentes presentes en los extractos, como hidrocarburos y clorofilas que interfieren en la purificación, y como resultado, se obtuvo un extracto enriquecido en AQs (Núñez Montoya *et al.*, 2006).

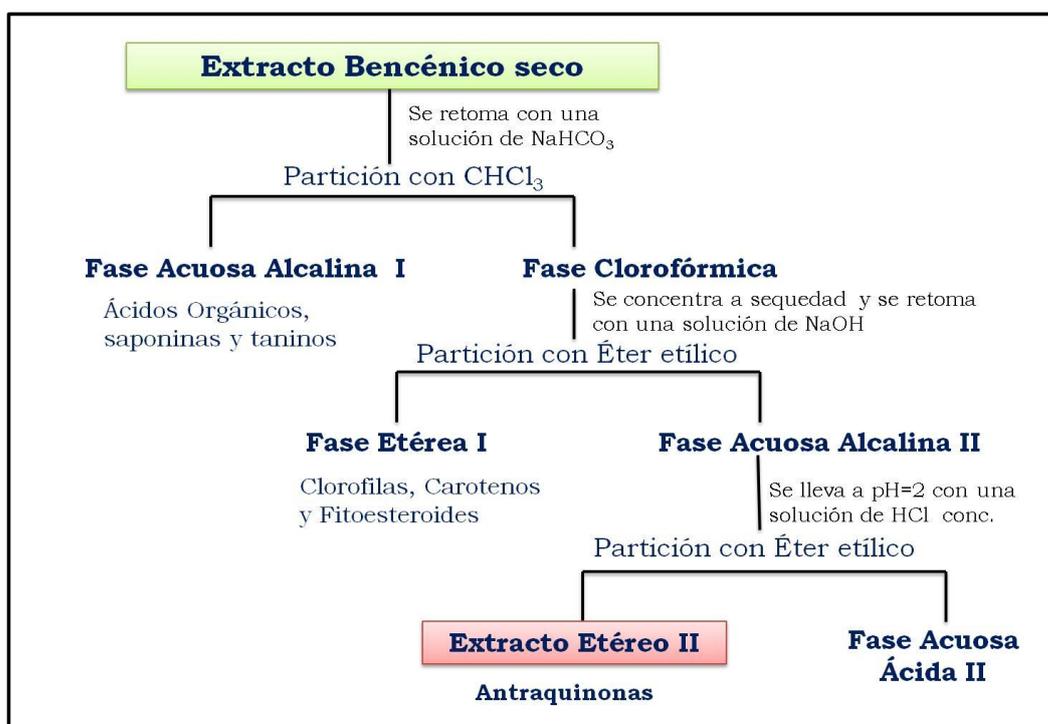


Figura 3. 4. Esquema del procesamiento preliminar del extracto bencénico

Una porción del Ext. etéreo II (1,25 g) fue sometido a cromatografía en columna (CC), utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria (FE) y gradientes de fase móvil (FM) de CHCl_3 -AcOEt; AcOEt-Acetona; Acetona-EtOH (100:0, 8:2, 1:1, 2:8, 0:100). Las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante cromatografía en capa delgada analítica (CCD) utilizando Ben-AcOEt (8:2) y (1:1) como FM. Las fracciones con similares perfiles cromatográficos se reunieron para obtener finalmente 5 fracciones (A-E).

La fracción A (60 mg) fue sometida a CC utilizando en esta ocasión, Sílica gel (FE) y gradientes de FM de Ben-AcOEt y AcOEt-EtOH (100:0, 8:2, 1:1, 2:8, 0:100, respectivamente). Luego del análisis por CCD, por similitud de perfiles cromatográficos, se obtuvieron 4 fracciones, designadas como A1-A4. La fracción A2 (8 mg) fue purificada mediante cromatografía en capa delgada preparativa (CCD-p) utilizando CHCl_3 como FM, obteniendo así dos compuestos: AQ-6 (3 mg) y AQ-7 (1,2 mg). Los compuestos AQ-1 (2,5 mg) y AQ-4 (4 mg), fueron aislados de la fracción A3 (11 mg) utilizando CCD-p y Ben-AcOEt (95:5) como FM. Finalmente, empleando CCD-p y Ben-AcOEt (1:1), fueron purificados los compuestos AQ-3 (3 mg) y AQ-5 (5 mg) de la fracción A4 (25 mg). En la Fig. 3.5 se muestra el esquema de purificación.

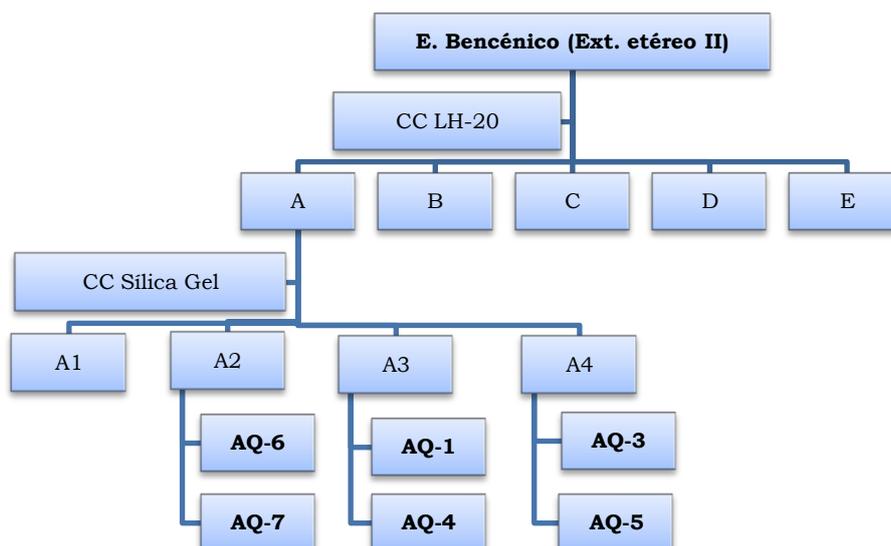


Figura 3. 5. Purificación del extracto bencénico

Purificación del extracto acetato de etilo

El extracto AcOEt, fue procesado del mismo modo que el extracto Ben, para obtener un extracto etéreo II (Fig. 3.4). Una porción del mismo (0,85 g) fue sometido a CC empleando Sílica gel y gradientes de las siguientes combinaciones de solventes: Ben – AcOEt y AcOEt – EtOH (100:0, 8:2, 1:1, 2:8, 0:100). Luego de ser analizadas mediante CCD, se obtuvieron cuatro fracciones: A-D (Fig. 3.6). La fracción B (45 mg) fue purificada mediante CC empleando como FE Sephadex LH-20 y gradientes de CHCl_3 -EtOH (100:0, 8:2, 1:1, 2:8, 0:100). Por comparación de los perfiles cromatográficos, se unificaron las distintas fracciones para obtener finalmente 5: B1-B5. El compuesto AQ-4 (3 mg) fue purificado de la fracción B2 utilizando CCD-p y CHCl_3 como FM. Finalmente, se purificaron los compuestos AQ-2 (5 mg) y AQ-5 (12 mg) de la fracción B3 (23 mg), empleando CCDp en fase reversa y MeOH-ácido fórmico (100:0,62) como FM. En la Fig. 3.6 se resume la metodología descrita anteriormente.

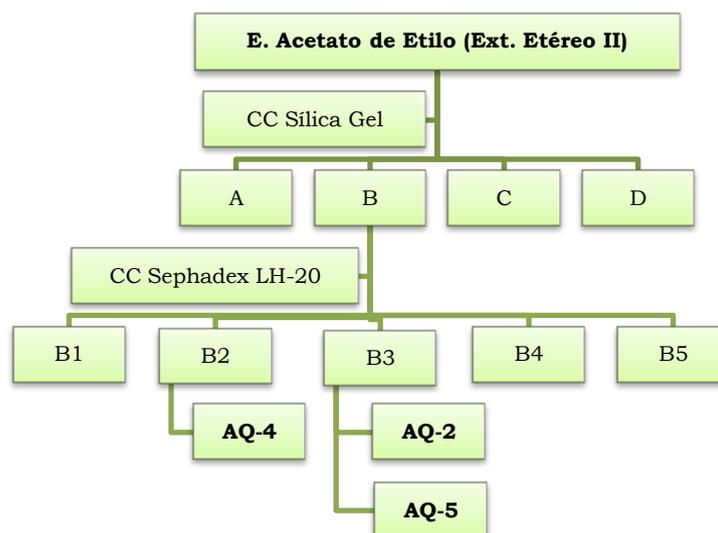


Figura 3. 6. Purificación del extracto acetato de etilo

A partir de la purificación por métodos cromatográficos, se obtuvieron 7 AQs. Las mismas fueron caracterizadas de acuerdo a sus relaciones de frente (Rf) en distintas FM, color en el UV (254 nm) y al visible (Tabla 3.2).

Tabla 3. 2. Caracterización de las AQs obtenidas por métodos cromatográficos

AQs	Fases Móviles			Color al UV	Color al visible
	Ben-AcOEt (95:5)	Ben-AcOEt (8:2)	CHCl ₃ -AcOEt (9:1)		
1	0,50	0,65	0,40	rosa fucsia	naranja
2	0,10	0,30	0,10	rosa fucsia	naranja
3	0,00	0,15	0,00	naranja opaco	amarillo
4	0,40	0,55	0,35	naranja flúor	amarillo
5	0,10	0,25	0,10	opaco	amarillo
6	0,60	0,90	0,45	opaco	amarillo
7	0,70	0,80	0,50	opaco	amarillo

ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS ANTRAQUINONAS DE H. LYCIOIDES

Las nuevas estructuras aisladas y purificadas fueron dilucidadas empleando los siguientes métodos espectroscópicos y espectrofotométricos: Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C), Resonancia Magnética Nuclear en dos dimensiones: COSY, HMBC y HSQC, espectrofotometría infrarrojo (IR) y ultravioleta-visible (UV-Vis), espectrometría

de masas de alta resolución (HRMS) y dicroísmo circular (DC). Estas técnicas se detallan en la página 164.

Nuevas antraquinonas aisladas de *H. lycioides*

AQ-1

Espectro UV-Visible

El espectro UV-Vis muestra el perfil característico de una AQ: una banda alrededor de los 250 nm que corresponde al sistema bencenoide y otras bandas entre 410-490 nm, característica de las AQs que poseen OH- α en su estructura (Fig. 3.7) (El Ezaby *et al.*, 1970). La **AQ-1** en estado sólido, presenta coloración naranja y es de aspecto amorfo.

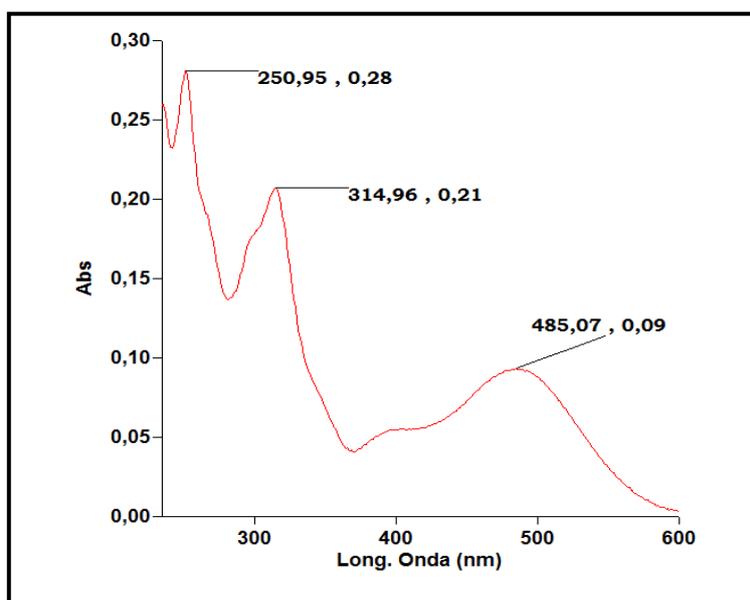


Figura 3. 7. Espectros UV-Vis de **AQ-1** en MeOH.

Espectro HR-ESI-MS

El espectro HR-ESI-MS (Fig. 3.8) en modo negativo muestra el ion quasi-molecular a m/z 287,0149, así como también un pico isotópico a 289,0115 correspondiente al $[M-H+2]^-$ en una proporción 1:3 respecto al ion quasi-molecular. Esto permitió establecer la presencia de un sustituyente Cl en esta AQ, por lo cual se determinó que la fórmula molecular de este compuesto es $C_{15}H_9ClO_4$ (calculado para $C_{15}H_8ClO_4$, 287,0106).

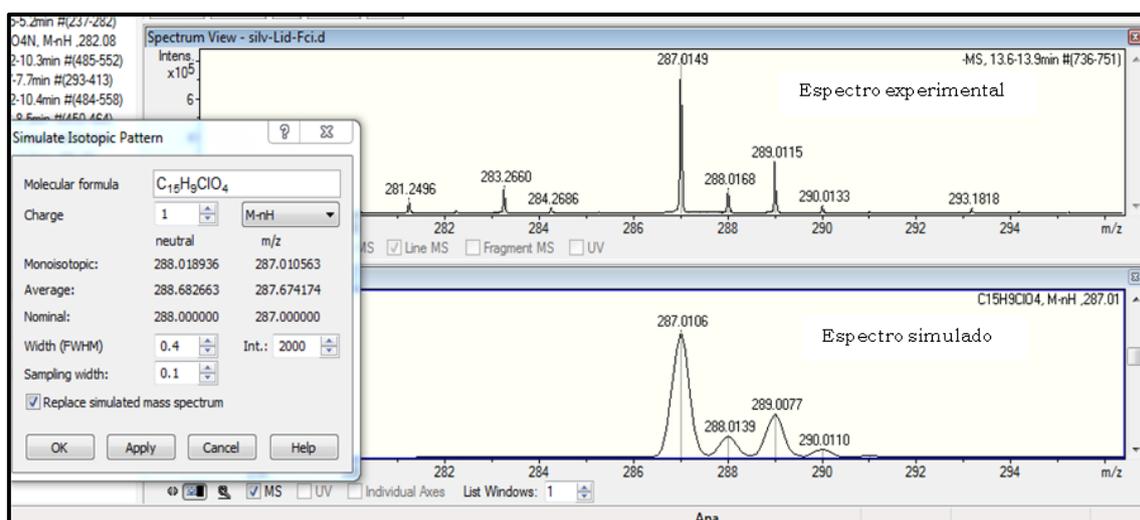


Figura 3. 8. Espectro HRMS de AQ-1.

Espectro IR

En la figura 3.9, correspondiente al espectro IR, se observa una banda a aproximadamente 3614 cm^{-1} que corresponde al estiramiento de un OH libre. Debido a la presencia de la señal de un C=O (carbonilo) no quelado a 1664 cm^{-1} , podemos intuir que el OH previamente mencionado, podría situarse en posición β a dicho C=O (Bloom *et al.*, 1959; Wijnsma y Veerporte, 1986).

Por otro lado, el espectro exhibe una intensa banda de absorción a 1627 cm^{-1} , correspondiente a un C=O quelado (Fig. 3.9). Esto indicaría la posibilidad de que AQ-1 presente un OH en posición α al grupo carbonilo, con el cual establece una unión puente hidrógeno.

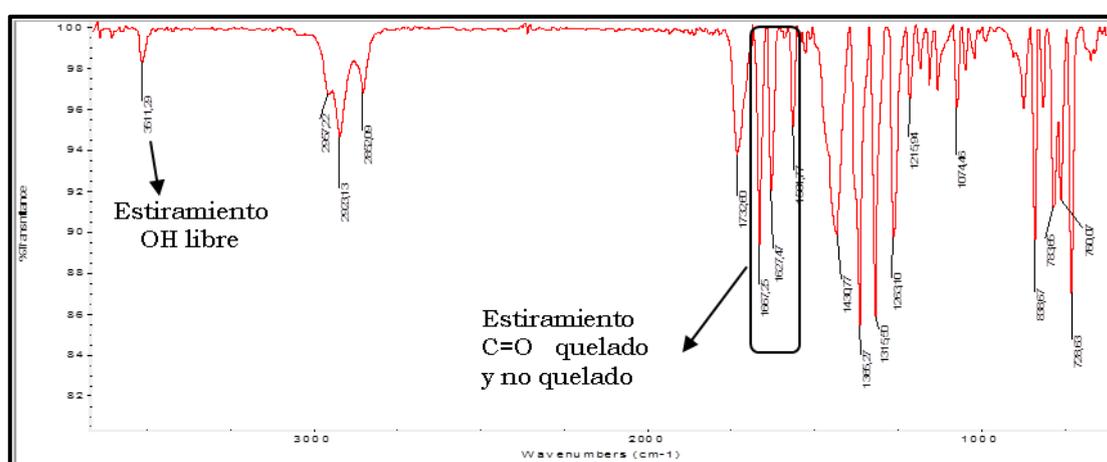


Figura 3. 9. Espectro IR de AQ-1.

Espectro de RMN-¹H

El espectro de RMN-¹H (Fig. 3.10) de esta AQ señala la presencia de 4 protones aromáticos con acoplamientos de tipo vecinal (Fig. 3.11). La similitud de los corrimientos de H, con aquellos informados para AQ-4 (pág. 70), permitió realizar una posible asignación. Dos dobletes con $J = 7,7$, se asignaron al H-3 (δ_H 7,64) y al H-4 (δ_H 7,55), y dos dobletes con $J = 8,6$ al H-7 (δ_H 7,27) y al H-8 (δ_H 8,11) (Fig. 3.11).

Además se observó un singlete a δ_H 2,28 característico del grupo CH₃ (Fig. 3.12, I), que podría estar en la posición 2 de acuerdo a la vía biosintética, y otro singlete a δ_H 13,06 (Fig. 3.12, II). Esta última señal es característica de grupos OH que forman uniones puente hidrógeno con grupos C=O, es decir, ubicados en posición α , lo cual también fue observado en el IR. De esta forma, las posiciones 1 y 5, podían ser ocupadas de manera indistinta por este OH (Fig. 3.12) (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Schripsema y Dagnino, 1996).

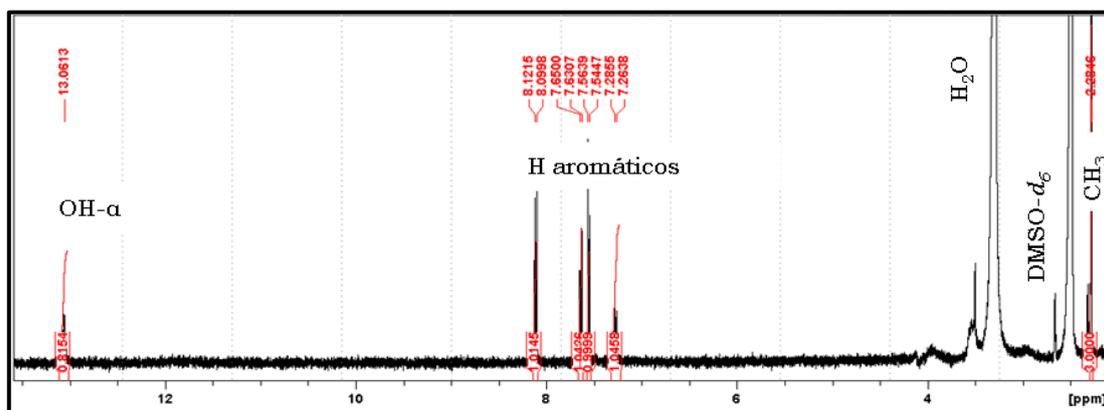


Figura 3. 10. Espectro de RMN-¹H en DMSO-*d*₆ de la **AQ-1** con ampliación en la zona característica de los protones aromáticos.

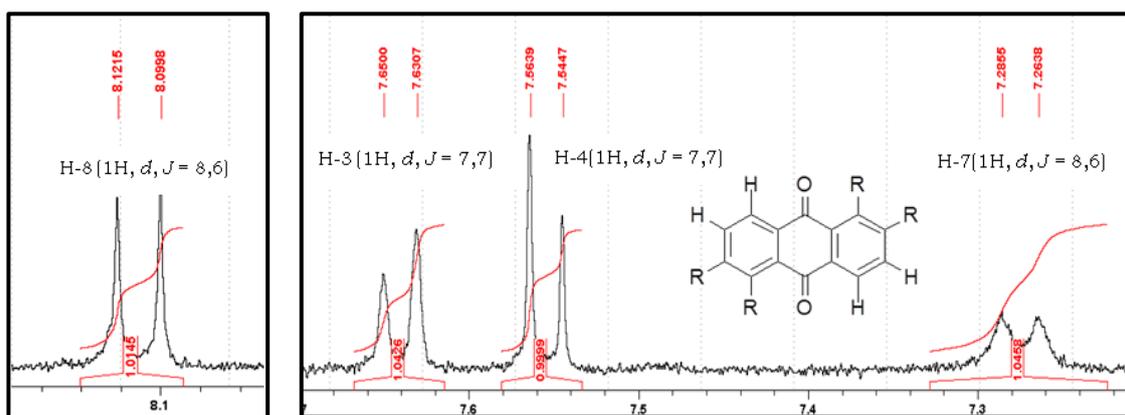


Figura 3. 11. Espectro de RMN-¹H en DMSO-*d*₆ de la **AQ-1** con ampliación en la zona característica de los protones aromáticos.

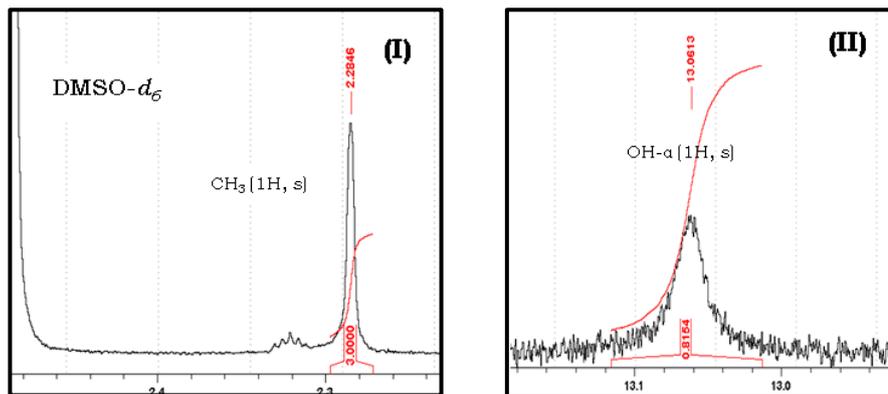


Figura 3. 12. Ampliación del espectro de RMN-¹H de **AQ-1** en la zona de los OH fenólicos y de los metilos.

Espectro COSY

Las correlaciones homonucleares observadas en el COSY (Tabla 3.3; Fig. 3.13) entre H-3/CH₃, H-3/H-4 y H-7/H-8, permitieron confirmar la presencia de dos sistemas de spin y la posición del grupo CH₃ en el C-2 del núcleo de la AQ.

Tabla 3. 3. Correlaciones del espectro COSY (H-H) en DMSO-*d*₆.

Posic. H	δ _H	Posic. H	δ _H
H-3	7,64	H-4	7,55
H-7	7,27	H-8	8,11
CH ₃ -2	16,0	H-3	7,64

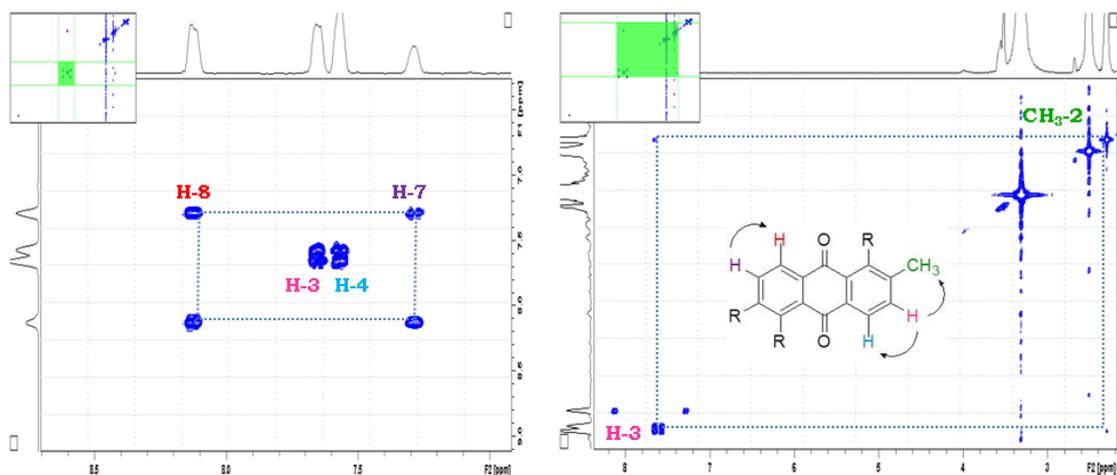


Figura 3. 13. Ampliación del espectro COSY (H-H) de **AQ-1** (DMSO-*d*₆).

Luego de realizar la asignación del CH₃, se asignó al OH-β (observado en el IR) en posición 6 por ser la única opción posible para este sustituyente. De manera que se trataba de una 6-hidroxi-2-metil-antraquinona (Fig. 3.14).

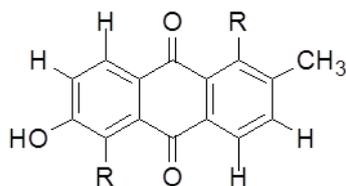


Figura 3. 14. Estructura química de 6-hidroxi-2-metil-antraquinona (**AQ-1**)

Espectro HSQC

El análisis del HSQC, que muestra los acoplamientos C-H a un enlace, permitió asignar los carbonos unidos directamente a H. Estas asignaciones se muestran en la Tabla 3.4 y Fig. 3.15.

Tabla 3. 4. Correlaciones del espectro HSQC (C-H) en DMSO-*d*₆.

Posic. H	δ_H	δ_C
H-3	7,64	137,3
H-4	7,55	119,0
H-7	7,27	121,2
H-8	8,11	128,6
CH ₃ -2	2,28	16,0

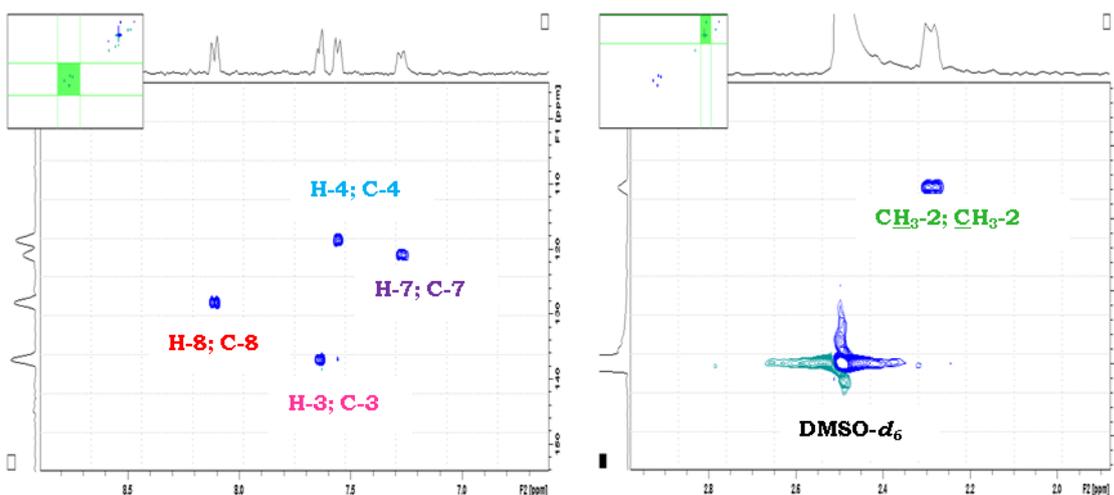


Figura 3. 15. Espectro HSQC de **AQ-1** (DMSO-*d*₆).

Espectro HMBC

Para poder culminar con la asignación de los sustituyentes de esta estructura, se recurrió a los acoplamiento C-H a largo alcance. Se analizaron los espectros 2D, tanto en DMSO- d_6 como en $CDCl_3$, ya que de este modo se pudieron establecer todas las correlaciones. En la Tabla 3.5 se muestran todas las correlaciones observadas.

Tabla 3. 5. Correlaciones del espectro HMBC (H-C) en DMSO- d_6 .

Posic. H	δ_H	Posic. C (δ_C)
H-3	7,64	C-1 (159,8); C-4a (132,8)
H-4	7,55	C-1a (114,1); C-2 (135,7); C-10 (180,1)
H-7	7,27	C-5 (132,9); C-8a (119,5)
H-8	8,11	C-5a (131,5); C-6 (158,5); C-9 (189,3)
OH-1	13,06	C-1a (114,1); C-2 (135,7)
CH ₃ -2	2,28	C-1 (159,8); C-2 (135,7); C-3 (137,3)

La correlación del OH- α con el C1a y C-2, sumadas a las correlaciones del CH₃-2 y el H-3 (Fig. 3.16 y 3.17), que correlacionan con un carbono con corrimiento a campos bajos (δ_C 159,8), permitieron concluir que finalmente, el OH- α estaba ubicado en posición 1 (Bloom *et al.*, 1959; Wijnsma y Veerporte, 1986). En consecuencia, el sustituyente Cl, que previamente había sido detectado en el HRMS, se encontraría en la posición 5. Esta asignación, fue corroborada además por la correlación del H-7 con el carbono 5, lo cual permitió además determinar el corrimiento del C unido a Cl (Fig. 3.17).

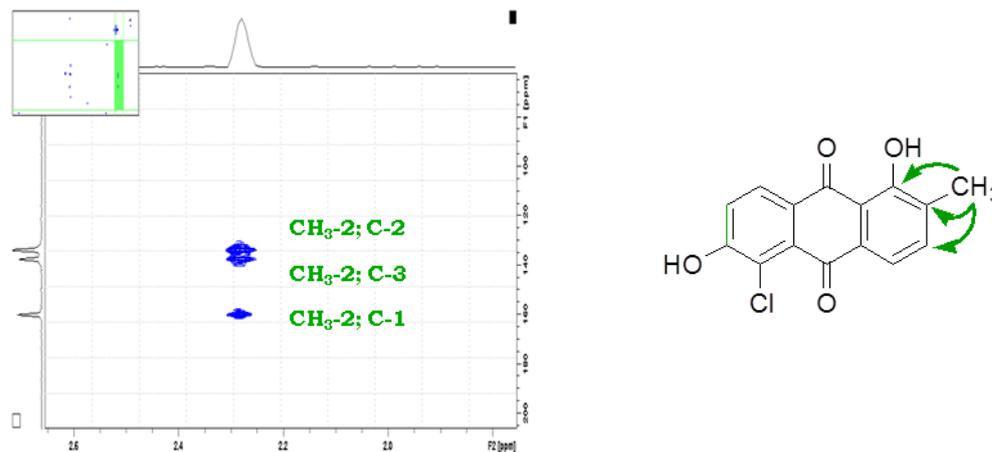


Figura 3. 16. Correlaciones de HMBC del grupo CH₃ de la **AQ-1** en DMSO- d_6 .

Por otra parte, la correlación observada entre el H-8 y un carbono con δ_c 158,5, permitió ratificar la posición del OH en posición 6 (Fig. 3.17).

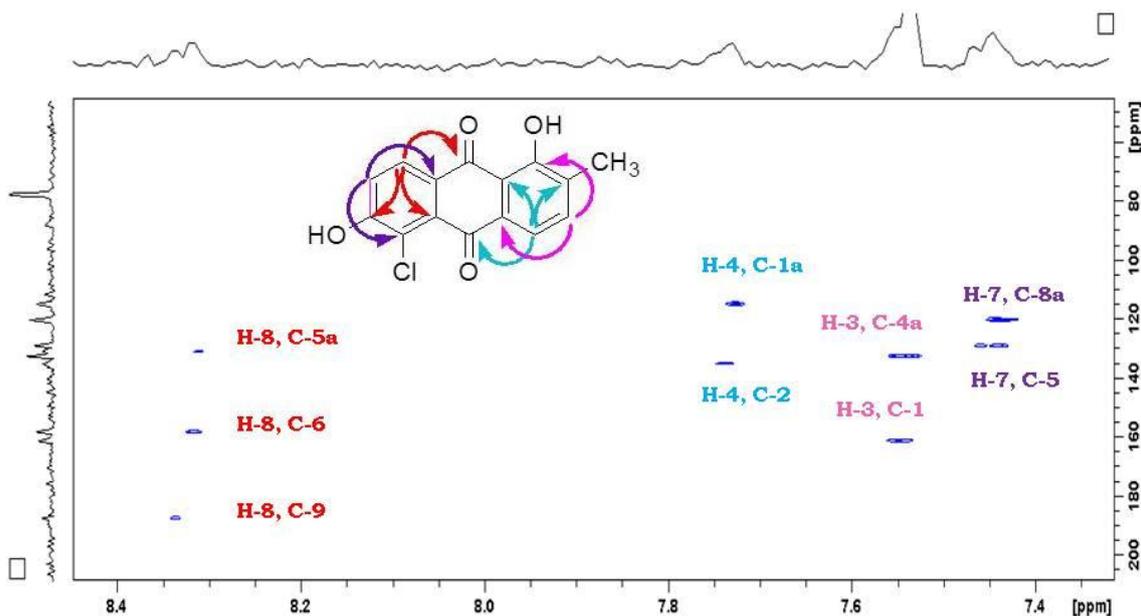


Figura 3. 17. Correlaciones de HMBC de los protones aromáticos de **AQ-1** en CDCl_3 .

Espectro RMN^{-13}C

Los corrimientos obtenidos del HMBC y HSQC, junto al espectro de RMN^{-13}C (Fig. 3.18), fueron empleados para realizar la asignación de todos los carbonos, puesto que en el espectro de ^{13}C no es posible observar todos los carbonos cuaternarios de esta estructura. En la Tabla 3.6 se muestran los corrimientos de cada carbono.

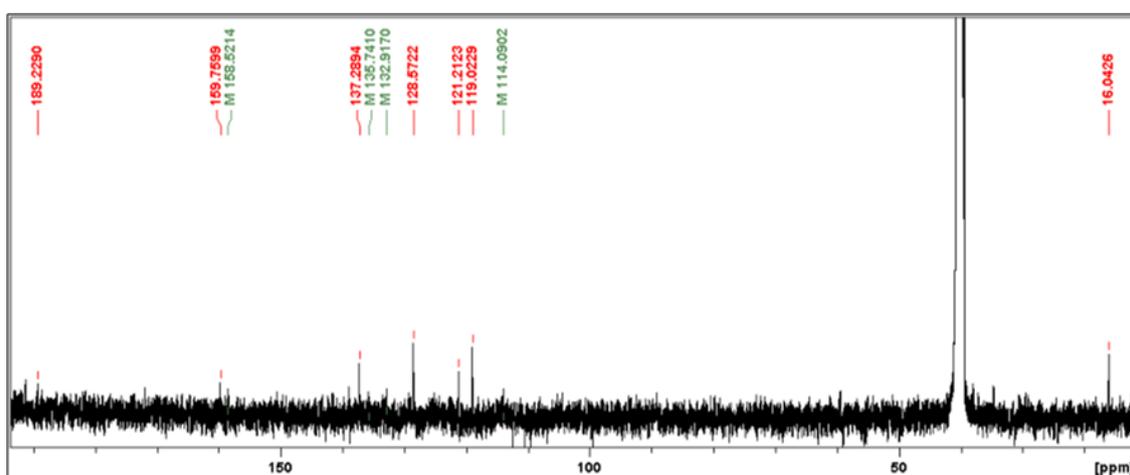
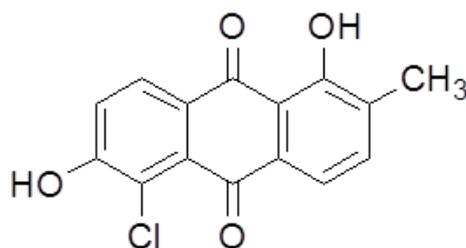


Figura 3. 18. Espectro de ^{13}C de la **AQ-1**

Tabla 3. 6. Asignación de los carbonos de la **AQ-1** en DMSO-*d*₆.

Posición	δ _c , tipo	Posición	δ _c , tipo
1	160,6; C	6	157,7; C
1a	114,5; C	7	120,3; CH
2	134,7; C	8	128,2; CH
3	137,3; CH	8a	119,5; C
4	119,5; CH	9	187,1; C
4a	132,2; C	10	180,1; C
5	128,2; C	<u>CH</u> ₃ -2	16,1; CH ₃
5a	130,6; C		

Teniendo en consideración los estudios anteriormente detallados se concluye que **AQ-1** es un nuevo derivado antraquinónico monomérico halogenado al que identificamos como **5-cloro-1,6-dihidroxi-2-metil-antraquinona** (5-clorosoranjidiol) (Fig. 3.19).


Figura 3. 19. Estructura química de la **AQ-1**: 5-cloro-1,6 dihidroxi-2-metil antraquinona.

Semisíntesis de AQ-1

Se realizó empleando el método descrito por Cohen y Towers con modificaciones (Cohen y Towers, 1995; Koyama *et al.*, 2001). Los procedimientos de la misma se detallan en la en la página 166.

La cloración de soranjidiol (AQ-4, Fig. 3.20) utilizando N-clorosuccinamida (N-clsor) permitió obtener **AQ-1** con un rendimiento del 75% (Fig. 3.20). Asimismo, se determinó la pureza de esta AQ mediante la técnica cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, HPLC) obteniendo un 99,3% de pureza (Fig. 3.21).

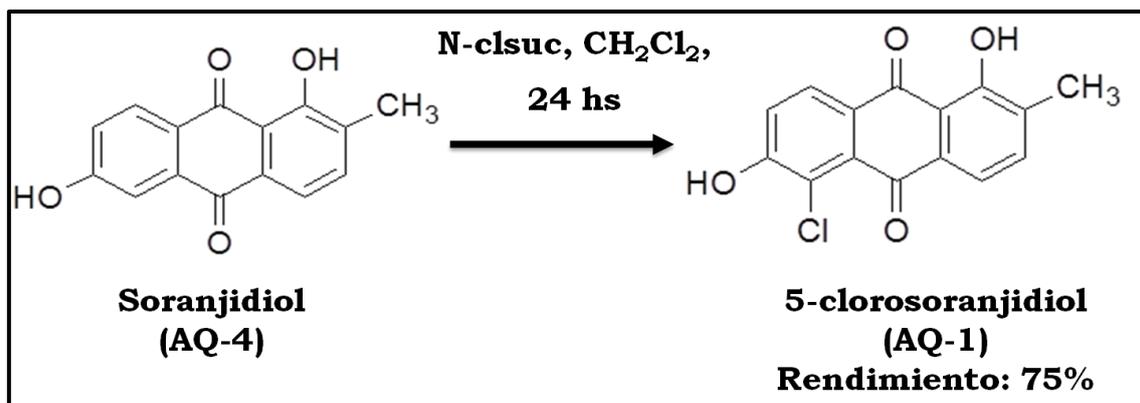


Figura 3. 20. Reacción de halogenación para obtener **AQ-1**.

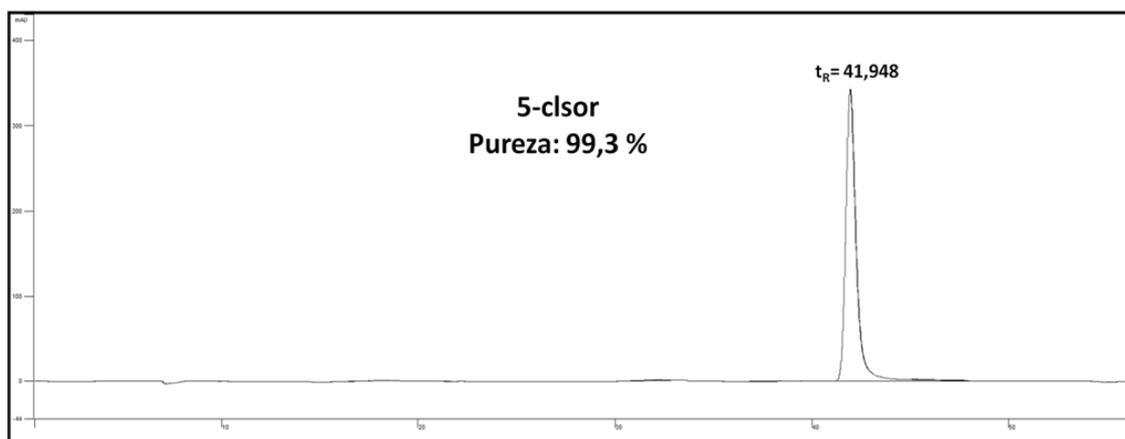


Figura 3. 21. Cromatograma obtenido por HPLC de la **AQ-1** obtenida por semisíntesis.

Los datos espectroscópicos del RMN-¹H de la AQ obtenida de *H. lycioides* (natural, N), fueron coincidentes con los corrimientos de la estructura obtenida en forma semisintética (S) (Tabla 3.7). Este resultado permitió confirmar la estructura propuesta.

Tabla 3. 7. Comparación de espectros de RMN-¹H de la **AQ-1** N y S.

Posición	5-ClSor N	5-ClSor S
	δ_H , mult. (JHz)	δ_H , mult. (JHz)
1	-	-
3	7,64; <i>d</i> (7,7)	7,66; <i>d</i> (8,1)
4	7,55; <i>d</i> (7,7)	7,56; <i>d</i> (8,0)
5	-	-
6	-	-
7	7,27; <i>d</i> (8,6)	7,33; <i>d</i> (8,6)
8	8,11; <i>d</i> (8,6)	8,14; <i>d</i> (8,6)
OH-1	13,06; s	12,99; s
<u>C</u> H ₃ -2	2,28; s	2,29; s
OH-6	-	-

AQ-2

Espectro UV-V

El espectro UV-Vis de la **AQ-2** que se observa en la Fig. 3.22, presenta un máximo alrededor de 260 nm (sistema bencenoide) y otros dos a 412 y 506 nm (α -OH), característicos de las AQs. La **AQ-2** presenta coloración naranja y es de aspecto amorfo en estado sólido.

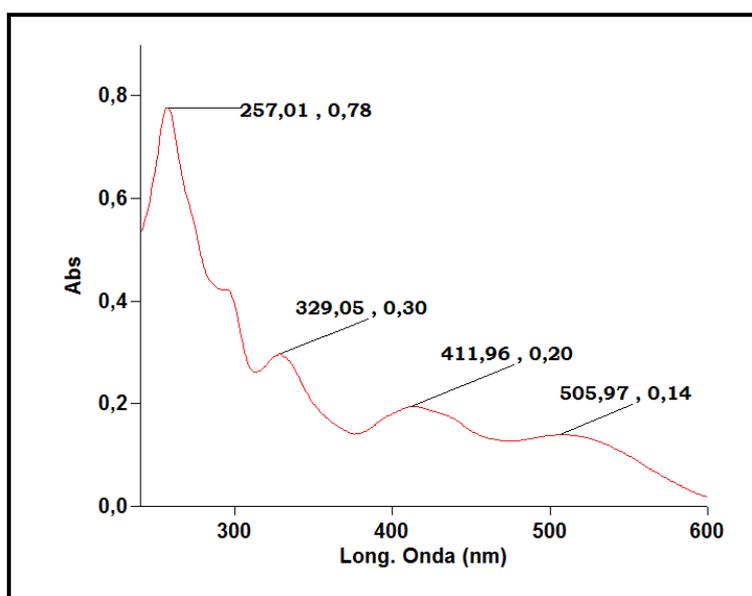


Figura 3. 22. Espectros UV-Vis de **AQ-2** en MeOH.

Espectro HRMS

El espectro observado en la Fig. 3.23 muestra un pico del ion cuasi-molecular a m/z 539,0562, correspondiente a $[M-H]^-$, que presenta 35 unidades más que bisoranjidiol (AQ-5) (Pág. 71). Un pico isotópico de $[M-H+2]^-$ a 541,0553 m/z , con intensidad 1:3 respecto al ion quasimolecular, confirmó la presencia Cl en la estructura, por lo cual se estableció la fórmula molecular de esta estructura como $C_{30}H_{17}ClO_8$ (calculado para $C_{30}H_{16}ClO_8$, 539,0528).

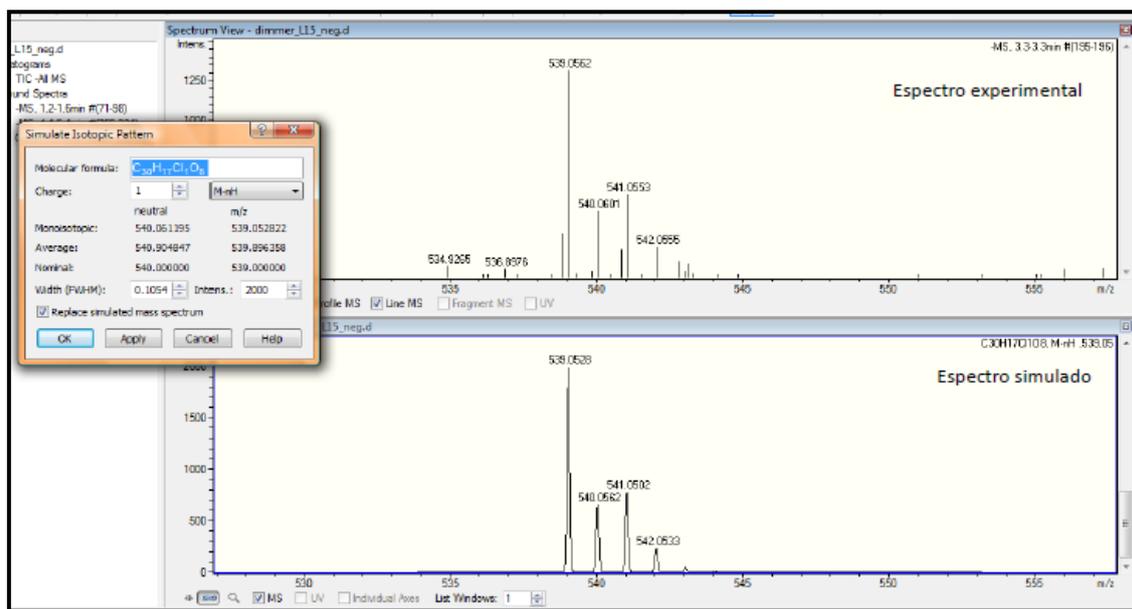


Figura 3. 23. Espectro HRMS de **AQ-2**.

Espectro IR

En el espectro IR, se observan dos bandas correspondientes a C=O quelados a 1627 cm^{-1} y 1620 cm^{-1} (Fig. 3.24), lo cual permite inferir que los mismos pertenecen a diferentes entornos químicos. Se observa también una banda característica del estiramiento de C=O no quelado a 1653 cm^{-1} (Fig. 3.24) y el estiramiento del OH libre a 3400 cm^{-1} . Por lo tanto, probablemente esta estructura presentaría OH en posición β .

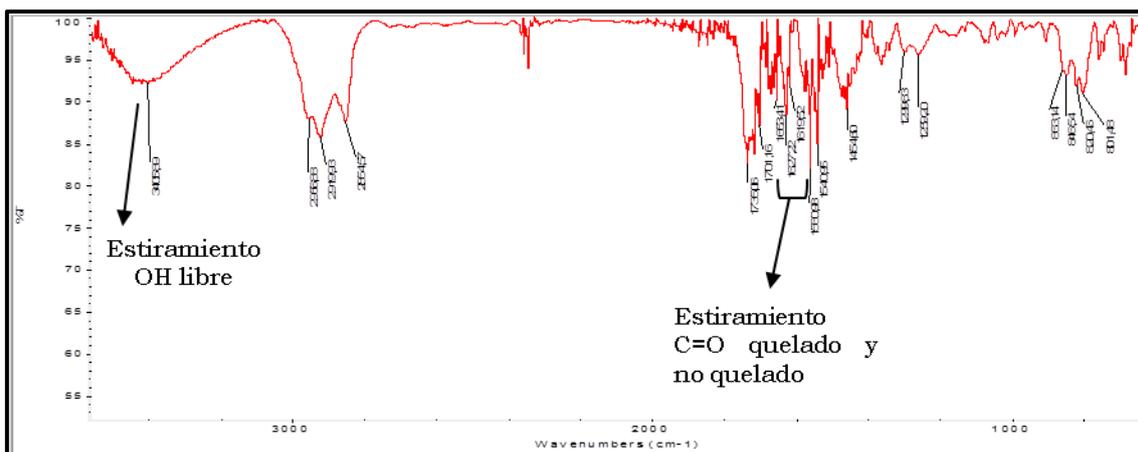


Figura 3. 24. Espectro IR de AQ-2.

Espectro de RMN-¹H

El espectro de RMN-¹H (Fig. 3.25) muestra una señal a δ_H 2,32 correspondiente a dos grupos CH₃ dado que la señal integra para 6 protones (Fig. 3.26, I). Estos sustituyentes podrían asignarse a la posición 2, debido al corrimiento similar que muestra el mismo grupo en la AQ-5 (pág. 71). Además se observan dos señales de singletes que corresponden a OH en posición α al C=O a δ_H 13,17 y 12,98 (Fig. 3.26 II). Estas señales se relacionan con las señales observadas en el IR, que muestran la presencia de dos C=O quelados con diferente entorno químico.

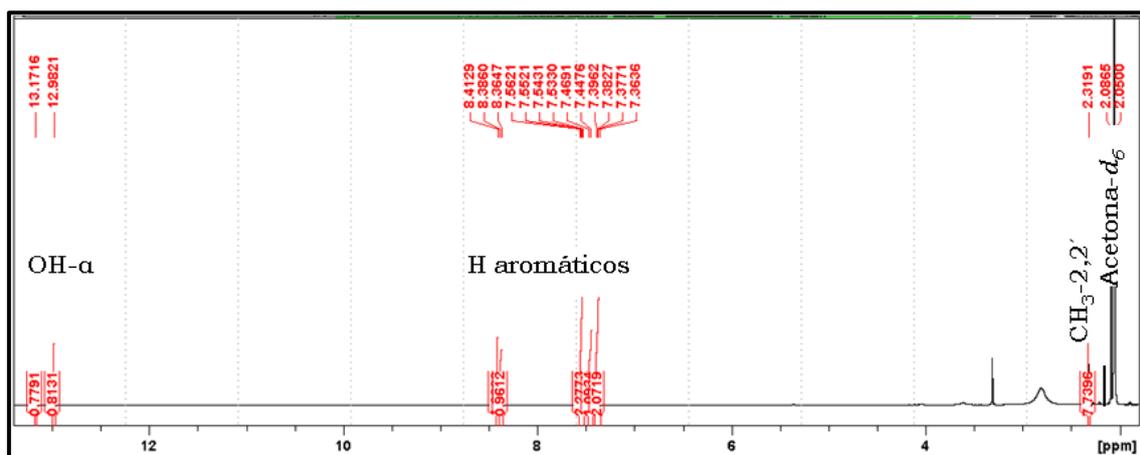


Figura 3. 25. Espectro de RMN-¹H en acetona-*d*₆ de AQ-2.

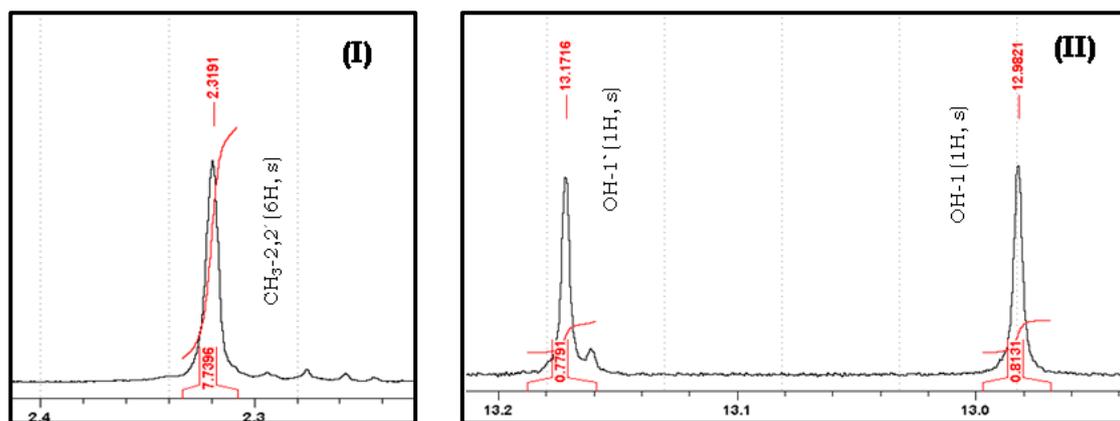


Figura 3. 26. Ampliación del espectro de RMN-¹H en acetona-*d*₆ de **AQ-2**. Grupo CH₃(I) y OH en posición α (II).

Por otro lado, este espectro presenta dos bandas anchas a δ_H 10,54 y 10,92, señales típicas de OH libres (Fig. 3.27). Con frecuencia, estas señales sólo se observan en algunos de los solventes empleados en el RMN-¹H, ya que corresponden a señales de protones intercambiables. Para esta estructura, las señales fueron observadas solo en el espectro de RMN-¹H realizado en DMSO-*d*₆. Se postuló que los mismos podrían estar en posición 6.

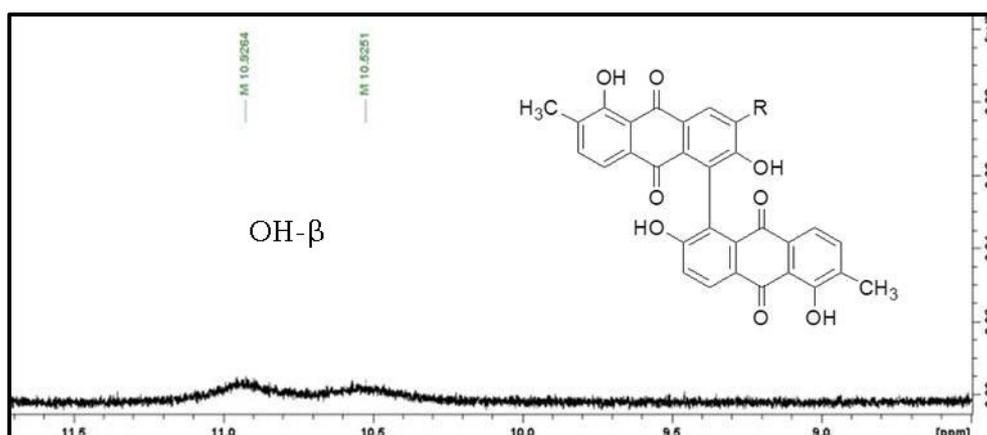


Figura 3. 27. Ampliación de RMN-¹H en la región de los OH en posición β en DMSO-*d*₆ de **AQ-2**.

La presencia de seis señales de dobletes en el espectro de RMN-¹H se atribuyó a protones aromáticos en posición *orto*: H-3 (7,55; *d*; *J*=7,6)/H-4 (7,39; *d*; *J*=7,6), H-3' (7,54; *d*; *J*=7,6) /H-4' (7,37; *d*; *J*=7,6) y H-7' (7,46; *d*; *J*=8,6)/H-8' (8,38; *d*; *J*=8,6) (Fig. 3.28). Además se observó un singlete con δ_H de 8,41, que se asignó en posición 8.

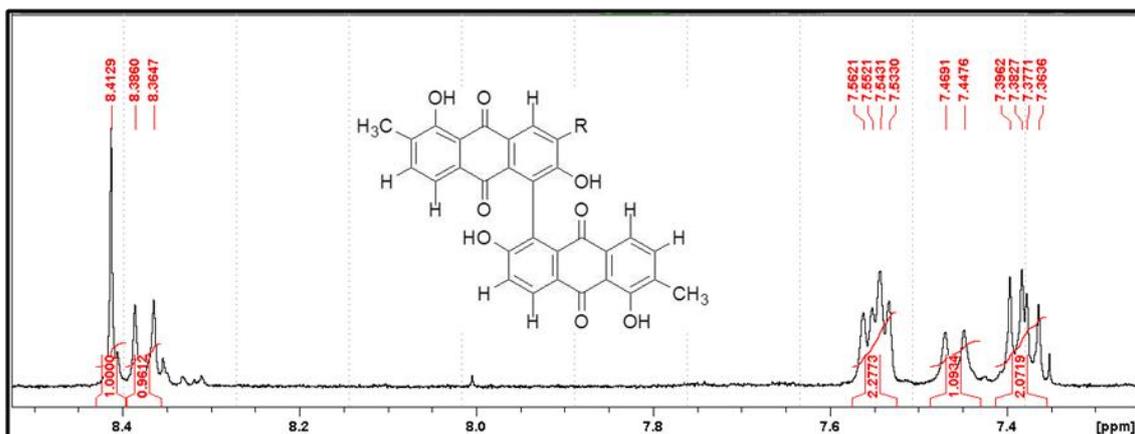


Figura 3. 28. Ampliación zona de protones aromáticos del espectro en Acetona- d_6 de **AQ-2**.

Estos resultados permitieron suponer, que la biantraquinona no estaba formada por dos monómeros iguales, dada las diferencias observadas en los protones aromáticos y en los OH- α , cuyos corrimientos son susceptibles a la variación en el patrón de sustitución de las AQs (Schripsema y Danigno, 1996). Por lo tanto, se propuso la estructura que se muestra en la Fig. 3.29, en la cual el monómero A presenta un sustituyente Cl y el monómero B, presenta estructura similar a sor.

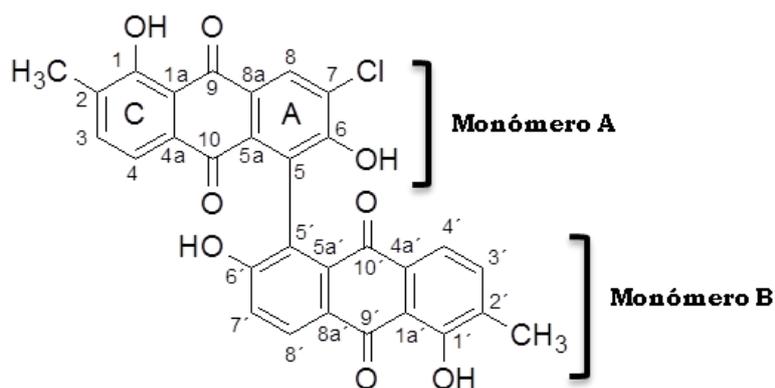


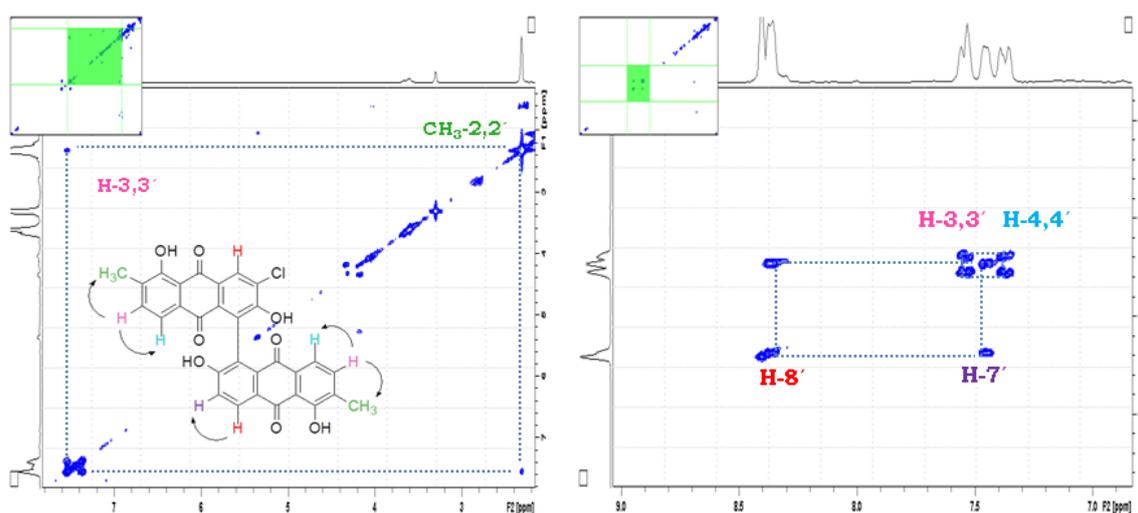
Figura 3. 29. Estructura propuesta de la AQ-2

Espectro COSY

Los datos obtenidos del espectro COSY (Tabla 3.8; Fig. 3.30), confirmaron que el patrón de sustitución del anillo C era similar en ambos monómeros, con CH_3 en posición 2, mientras que la diferencia se encontraba en el patrón de sustitución del anillo A.

Tabla 3. 8. Correlaciones del espectro COSY (H-H) en acetona- d_6

Posic. H	δ_H	Posic. H	δ_H
H-3	7,55	H-4	7,39
H-3'	7,54	H-4'	7,37
H-7'	7,46	H-8'	8,38
CH ₃ -2,2'	2,32	H-3	7,55


Figura 3. 30. Espectro COSY (H-H) en acetona- d_6 de AQ-2

Espectro HSQC

El análisis del espectro 2D no permitió asignar los carbonos unidos directamente a los protones (Tabla 3.9 y Fig. 3.31).

Tabla 3. 9. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) en acetona- d_6 .

Posic. H	δ_H	δ_C	Posic. H	δ_H	δ_C
H-3	7,55	137,5	H-4'	7,37	118,7
H-4	7,39	119,1	H-7'	7,46	120,8
H-8	8,41	128,2	H-8'	8,38	128,2
H-3'	7,54	137,5	CH ₃ -2,2'	2,32	16,1

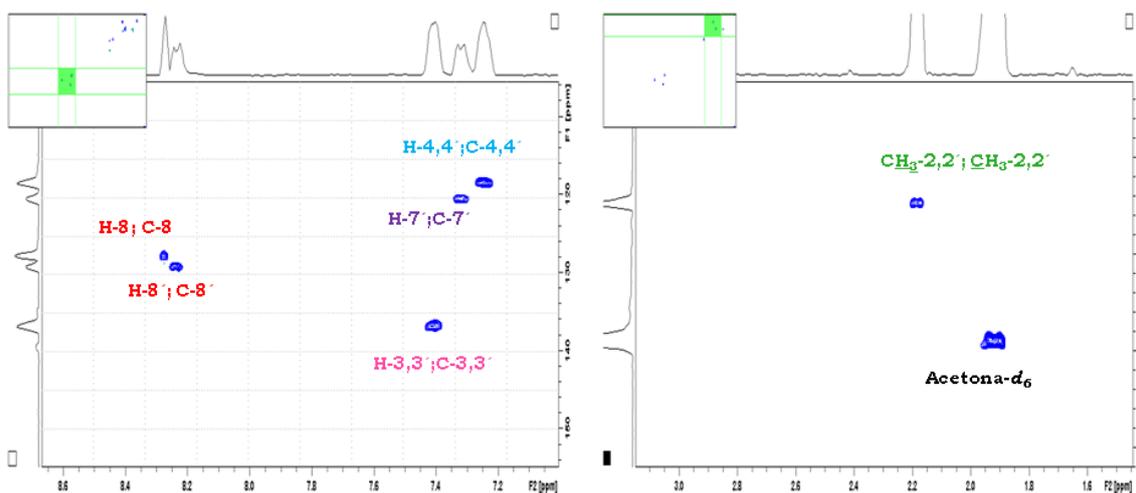


Figura 3. 31. Espectro HSQC en Acetona- d_6 de **AQ-2**.

Espectro HMBC

Las correlaciones observadas en el HMBC, resultaron de suma importancia para poder confirmar la estructura planteada. Las mismas se observan en la Tabla 3.10.

Tabla 3. 10. Correlaciones del espectro HMBC (H-C) en acetona- d_6 .

Posición H	δ_H	Posición C (δ_c)
H-3	7,55	C-1 (162,0); C-4a (132,0); 2-CH ₃ (16,1)
H-4	7,39	C-1a (114,8); C-2 (134,1); C-10 (182,9)
H-8	8,41	C-5a (131,3); C5 (125,8); C-6 (156,8); C-9 (188,3)
H-3'	7,54	C-1' (160,1); C-4a' (132,4); 2'-CH ₃ (16,1)
H-4'	7,37	C-1a' (114,8); C-2' (134,0); C-10' (183,0)
H-7'	7,46	C5' (125,8); C8a' (126,6)
H-8'	8,38	C-5a' (133,4); C-6' (160,1); C-9' (188,3)
OH-1	12,98	C-1 (162,0); C-1a (114,8); C-2 (134,1)
OH-1'	13,17	C-1' (160,1); C-1a' (114,8); C-2' (134,0)
CH ₃ -2,2'	2,32	C-1,1' (162,0; 160,4); C-2,2' (134,1; 134,0); C-3,3' (137,5)

Las señales a δ_H 8,41 asignada al H-8 y a δ_H 8,38 correspondiente al H-8', presentaron correlaciones en el espectro HMBC con los C5a, C6 y C-9, las mismas correlaciones observadas para el H-8 de la AQ-5 (Núñez *et al.*, 2006). Esto confirmó la presencia de dos grupos OH en posición 6 y 6' y la presencia de dos C=O quelados, con δ_C de 188,3 (Fig. 3.32).

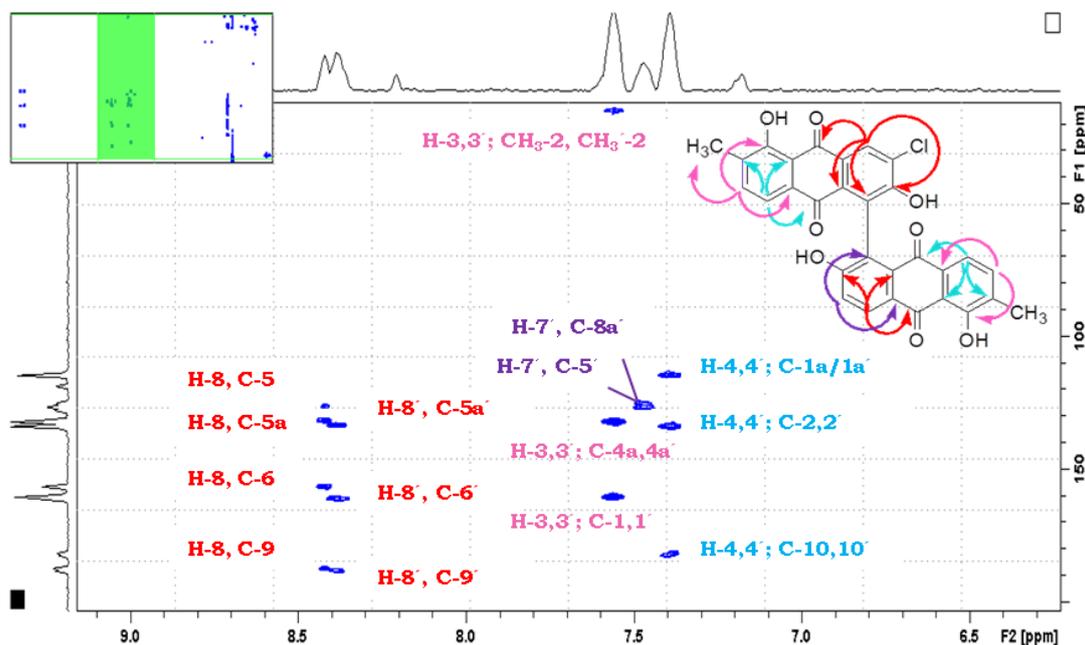


Figura 3. 32. Espectro HMBC en Acetona- d_6 de AQ-2.

En la Fig. 3.33 se puede observar las correlaciones de los OH en posición 1 y 1', por lo cual podemos afirmar que ambos monómeros están igualmente sustituidos en el anillo C y que los δ_H de los mismos, son claramente influenciados por sustituyentes en el anillo A (Schripsema y Dagnino, 1996).

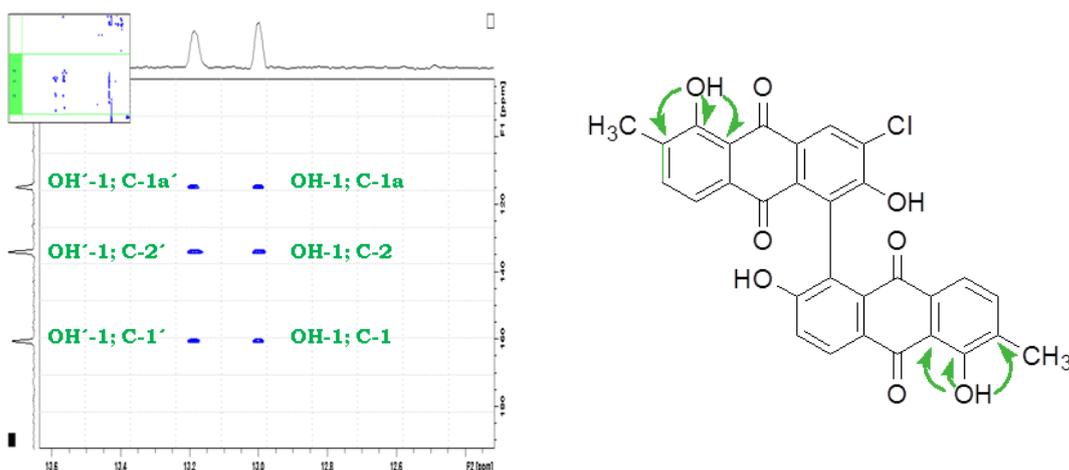


Figura 3. 33. Espectro HMBC en Acetona- d_6 de AQ-2.

Esta evidencia, sumada a las correlaciones entre el H-7' y la señal del C-5' en el espectro HMBC, permitió determinar que este compuesto es un dímero de soranjidiol unido en posición 5-5' con sustituyente clorado en posición 7 de uno de los monómeros.

Espectro RMN-¹³C

Finalmente se realizó la asignación de los carbonos (Tabla 3.11), teniendo en cuenta tanto la información obtenida de los RMN-2D como del espectro de RMN-¹³C (Fig. 3.34).

Tabla 3. 11. Asignación de carbonos a la estructura **AQ-2** en acetona-*d*₆.

Posición	δ _c , tipo	Posición	δ _c , tipo
1	162,0; C	1'	160,1; C
1a	114,8; C	1a'	114,8; C
2	134,1; C	2'	134,0; C
3	137,5; CH	3'	137,5; CH
4	119,1; CH	4'	118,7; CH
4a	132,0; C	4a'	132,4; C
5	125,8; C	5'	125,8; C
5a	131,3; C	5a'	133,4; C
6	156,8; C	6'	160,1; C
7	134,6; C	7'	120,8; CH
8	128,2; CH	8'	128,2; CH
8a	126,6; C	8a'	129,3; C
9	188,3; C	9'	188,3; C
10	182,9; C	10'	183,0; C
<u>CH</u> ₃ -2	16,1; CH ₃	<u>CH</u> ₃ -2'	16,1; CH ₃

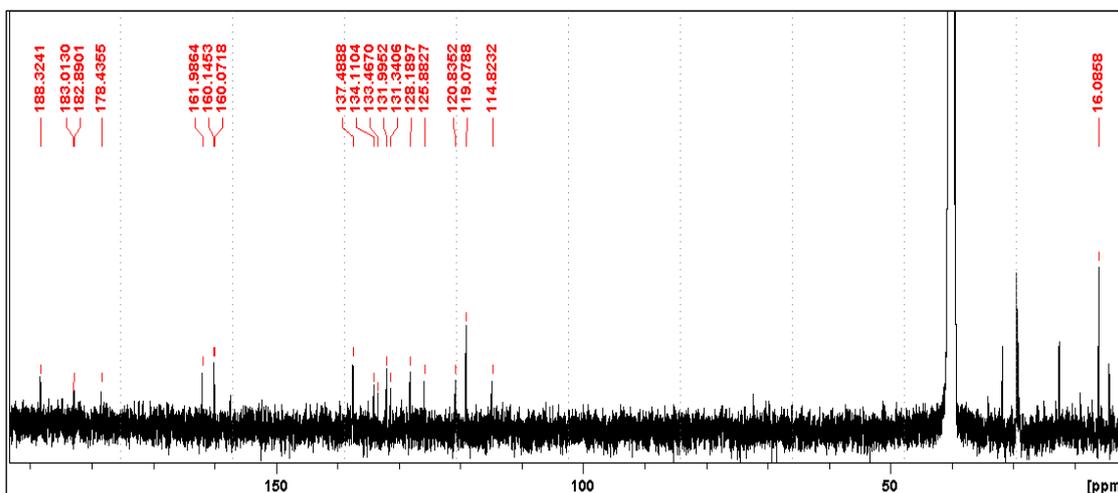


Figura 3. 34. Espectro de RMN-¹³C **AQ-2** en acetona-*d*₆.

Dicroísmo circular

La unión C5-C5' del bifenilo es un centro estereogénico quiral. El espectro de DC obtenido (Fig. 3.35) revela un efecto Cotton positivo centrado a 258 nm, que se correlaciona con una intensa absorción UV del enlace π - π^* . Esto indica quiralidad (*P*)-axial y por ende una configuración *R* del enlace bifenilo (Bringmann *et al.*, 2005; Talapatra y Talapatra, 2015).

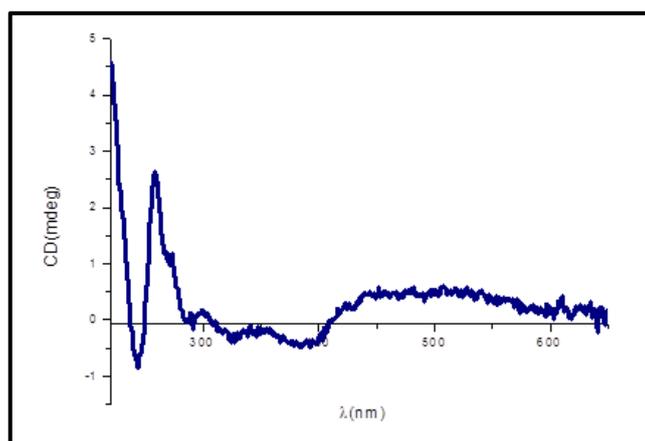


Figura 3. 35. Espectro de Dicroísmo Circular y estructura química de **AQ-2**.

Por lo anteriormente expuesto, podemos concluir que la estructura estudiada es un nuevo derivado antraquinónico dimérico al que identificamos como **(*R*)-7-cloro-2,2'-dimetil-1,1',6,6'-tetrahidroxi-5,5'-biantraquinona** (7-clorobisoranjidiol) (Fig. 3.36).

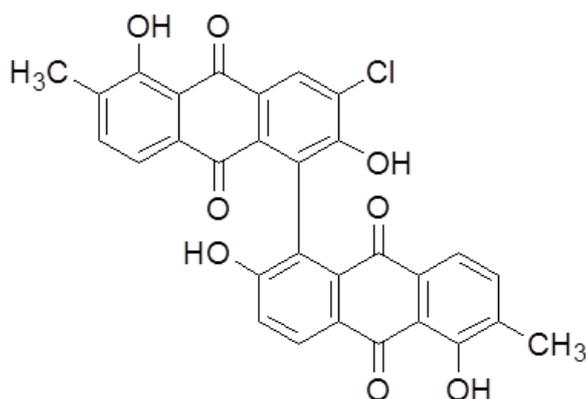


Figura 3. 36. Estructura química de **AQ-2**: (*R*)-7-cloro-2,2'-dimetil-1,1',6,6'-tetrahidroxi-5,5'-biantraquinona

Semisíntesis de 7-clorobisoranjidiol

La cloración de AQ-5 utilizando N-clsuc se realizó del mismo modo que para **AQ-1** (pág.166). La misma permitió obtener **AQ-2** con un rendimiento del 40% (Fig. 3.37) y una pureza del 87,4% determinada por la técnica HPLC (Fig. 3.38).

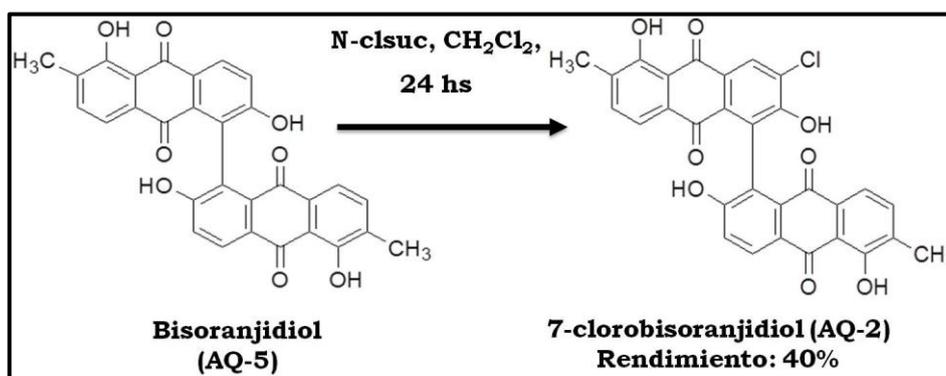


Figura 3. 37. Reacción de halogenación para obtener la **AQ-2**.

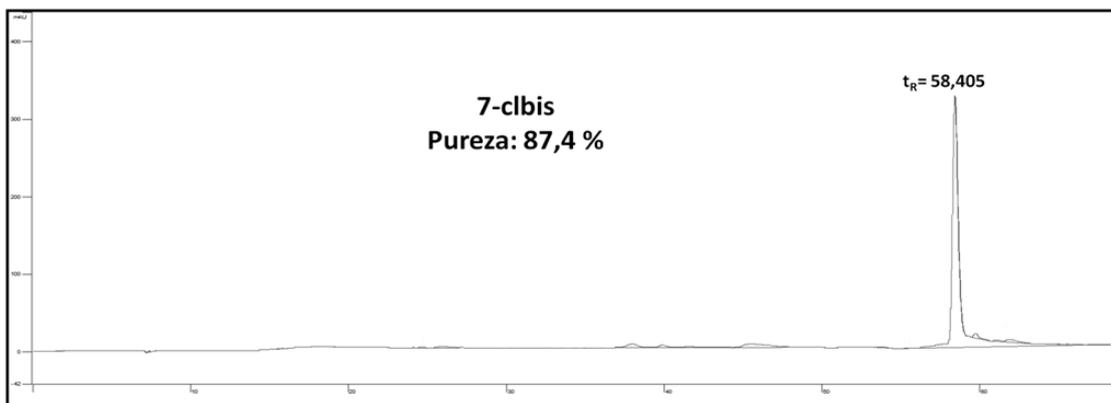


Figura 3. 38. Cromatograma obtenido por HPLC de la AQ-2 obtenida por semisíntesis.

La similitud de los espectros RMN- ^1H (Tabla 3.12) entre la estructura obtenida de la naturaleza (N) comparada con la obtenida en forma semisintética (S), confirmando la estructura propuesta.

Tabla 3. 12. Comparación de espectros de RMN- ^1H de AQ-2 natural (N) y semisintética (S) en acetona- d_6 .

Posición	7-clbis N	7-clbis S
	δ_{H} , mult. (JHz)	δ_{H} , mult. (JHz)
3	7,55; <i>d</i> (7,6)	7,55; <i>d</i> (7,8)
4	7,39; <i>d</i> (7,6)	7,39; <i>d</i> (7,8)
8	8,41; <i>s</i>	8,41; <i>s</i>
3'	7,54; <i>d</i> (7,6)	7,55; <i>d</i> (7,8)
4'	7,37; <i>d</i> (7,6)	7,36; <i>d</i> (7,8)
7'	7,46; <i>d</i> (8,6)	7,46; <i>d</i> (8,6)
8'	8,38; <i>d</i> (8,6)	8,37; <i>d</i> (8,6)
OH-1	12,98	13,14; <i>s</i>
CH ₃ -2	2,32; <i>s</i>	2,32; <i>s</i>
OH-6	(10,54-10,92); <i>br</i>	10,42; <i>br</i>
OH'-1	13,17	13,21; <i>s</i>
CH ₃ -2'	2,32; <i>s</i>	2,32; <i>s</i>
OH'-6	(10,54-10,92); <i>br</i>	10,42; <i>br</i>

AQ-3

Espectro UV-Visible

Los espectros de la AQ-3 que se observan en la Fig. 3.39, mostraron similitud con aquellos observados para AQ-5 (bisoranjidiol) motivo por el cual se postuló que esta estructura se correspondería con la de una biantraquinona (Koyama *et al.*, 2001; Núñez *et al.*, 2006). Este compuesto tiene la propiedad de precipitar en forma de un sólido amorfo de color amarillo.

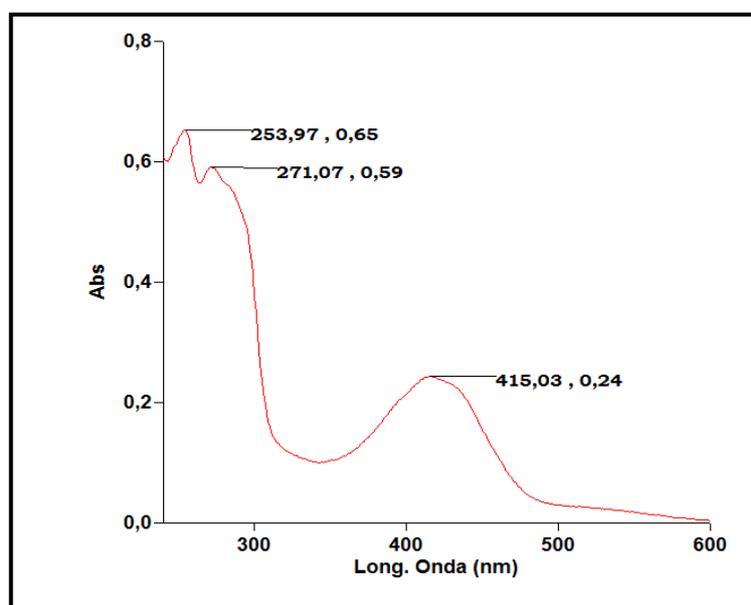


Figura 3. 39. Espectros UV-Vis de **AQ-3** en MeOH.

Espectro HRMS

El espectro HRMS (Fig. 3.40) también indicó que posiblemente la AQ-3 sería una biantraquinona, ya que el pico del ion quasi-molecular se observa a 521,0899 m/z $[M-H]^-$, indicando una diferencia de 16 unidades de masa respecto a la AQ-5 (pág. 71). Por lo tanto, se estableció que la fórmula molecular de esta estructura es $C_{30}H_{18}O_9$ (calc. para $C_{30}H_{17}O_9$, 521,0867).

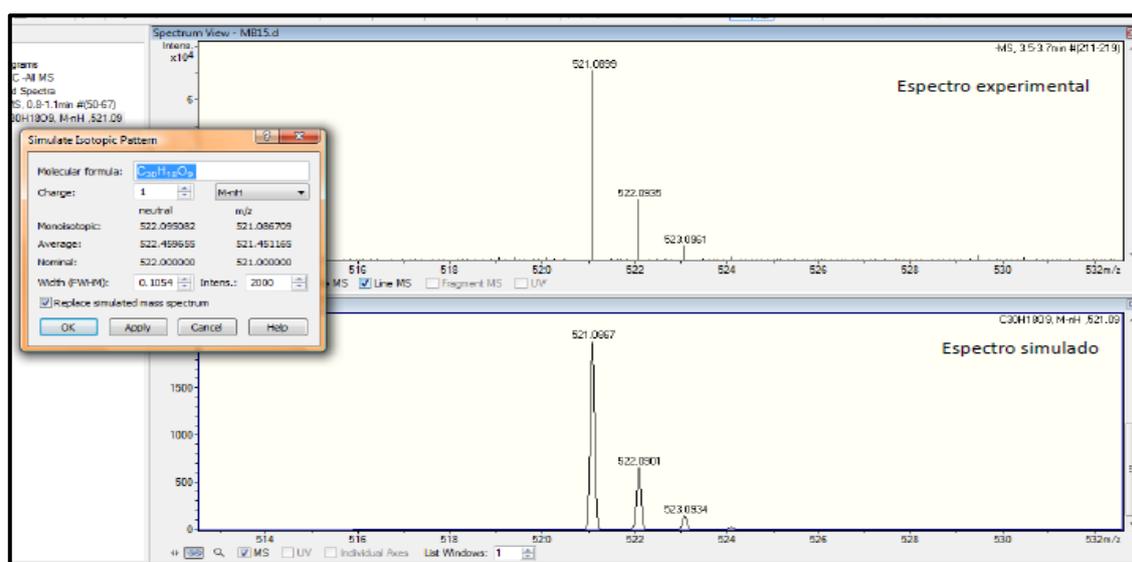


Figura 3. 40. Espectro HRMS de **AQ-3**.

Espectro IR

El espectro IR (Fig. 3.41) presentó tres bandas correspondientes al estiramiento del C=O: a 1673 cm⁻¹ (C=O libre), 1630 y 1625 cm⁻¹ (C=O quelado). Esto indica, como en la AQ-2, la presencia de dos carbonilos con diferente entorno químico.

Además podemos observar una banda de intensidad media y ancha correspondiente al estiramiento del OH a 3290 cm⁻¹.

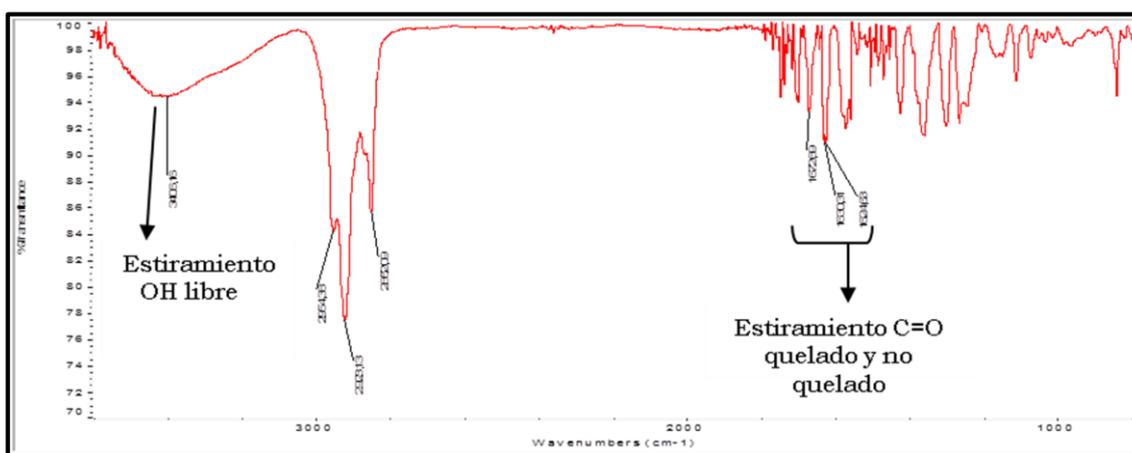


Figura 3. 41. Espectro IR de AQ-3.

Espectro de RMN-¹H

El espectro de RMN-¹H que se muestra en la Fig. 3.42, reveló la presencia de 8 protones aromáticos. Todas las señales son dobletes con una constante de acoplamiento característica de la posición *orto*: H-3 (7,75; *d*; *J*=7,8)/H-4 (7,43; *d*; *J*=7,8); H-7 (7,29; *d*; *J*=8,3)/H-8 (8,23; *d*; *J*=8,6); H-3' (7,56; *d*; *J*=7,4)/H-4' (7,32; *d*; *J*=7,6); H-7' (7,29; *d*; *J*=8,3)/H-8' (8,24; *d*; *J*=8,7). Este patrón de sustitución, permitió confirmar que efectivamente se trataba de una antraquinona formada por dos monómeros diferentes, como se observó para la AQ-2.

Dado que se observaron diferencias en los valores de δ_H entre H-3/H-3' y H-4/H-4', las cuales no fueron observadas entre H-7/H-7' y H-8/H-8', pudimos intuir que en el caso de la AQ-3, el patrón de sustitución era diferente en el anillo C.

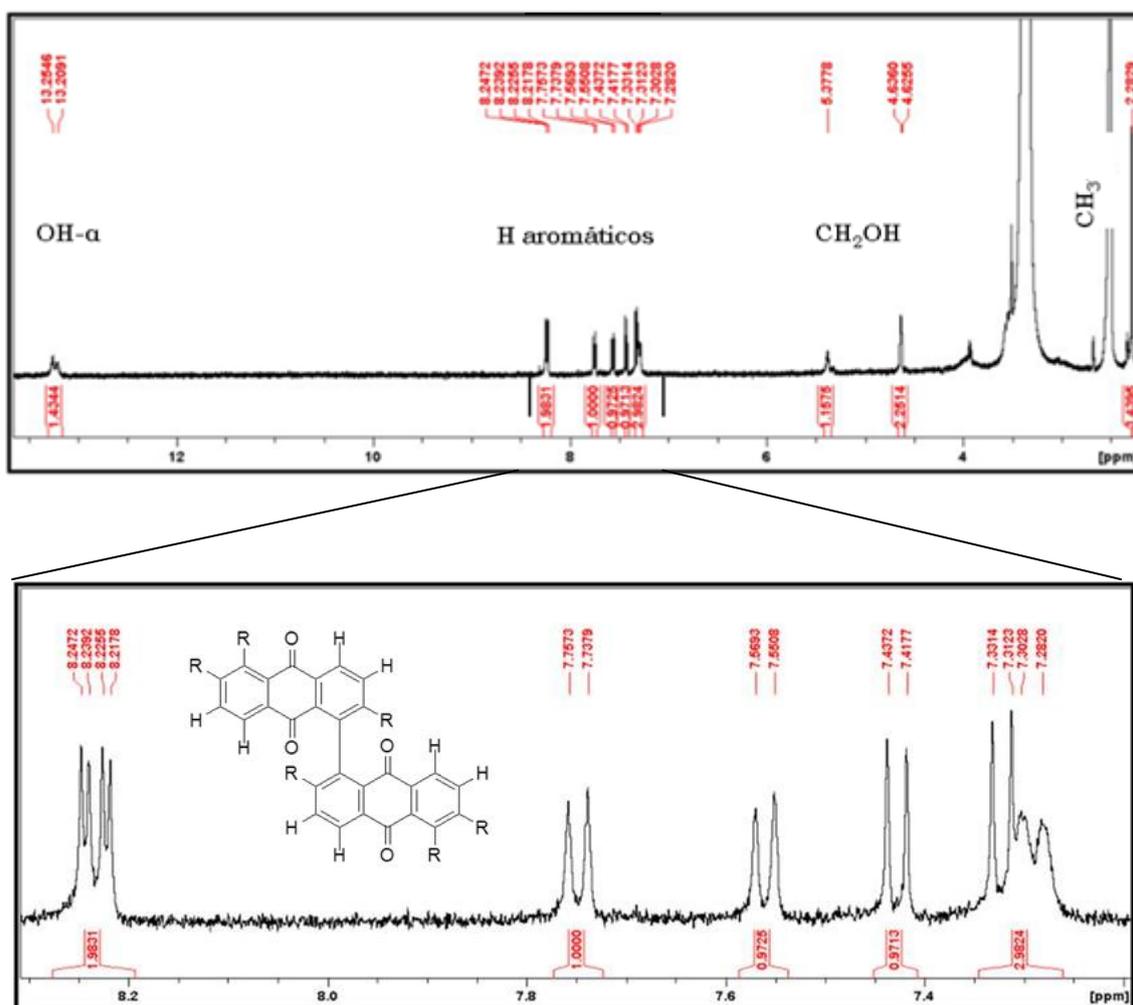


Figura 3. 42. Espectro de RMN-¹H en DMSO-*d*₆ de AQ-3, con ampliación en el rango correspondiente a los protones aromáticos

Se observó además en este espectro la presencia de dos sustituyentes: dos señales correspondientes al grupo hidroximetilo (CH₂OH, δ_H 5,38 y 4,63 con $J=4,2$) (Fig. 3.43 I) y un singlete con δ_H 2,28 característico de un grupo CH₃ (Wijnsma y Veerporte, 1986) (Fig. 3.43 II).

Para realizar una asignación inequívoca, la señal del grupo CH₂OH se verificó con el RMN en acetona-*d*₆, en donde se observan con mayor resolución las señales. En la Fig. 3.44 se observa claramente un doblete correspondiente a la señal del metilo y un triplete correspondiente al OH de este mismo sustituyente con una J de 5,4 y 5,3 respectivamente.

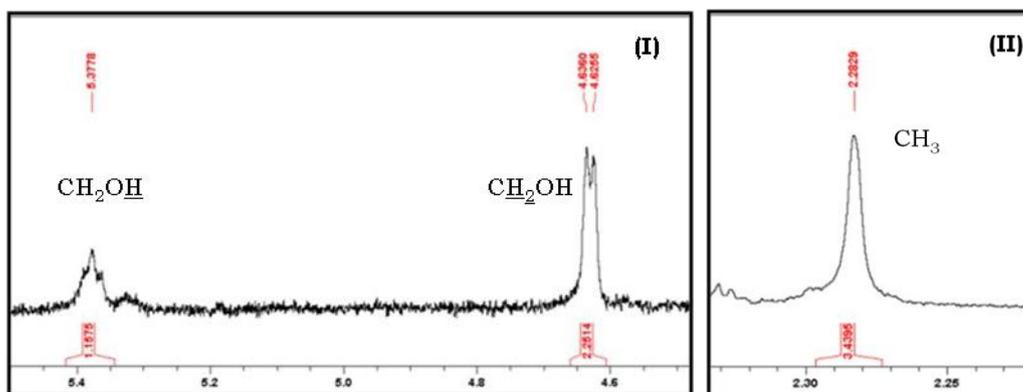


Figura 3. 43. Ampliación del grupo CH₂OH (I) y del CH₃ (II) del espectro de RMN-¹H en DMSO-*d*₆ de **AQ-3**.

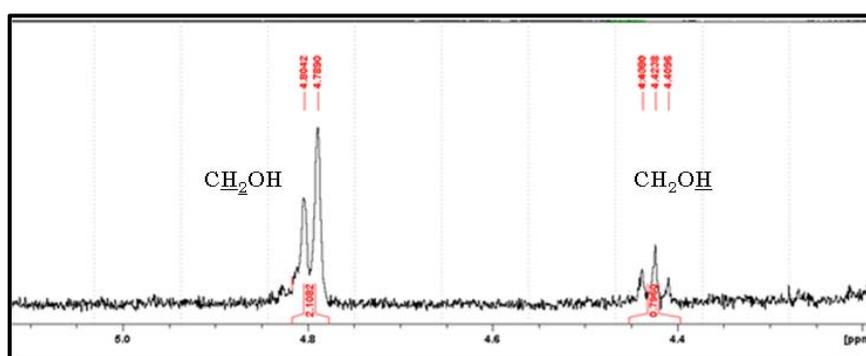


Figura 3. 44. Ampliación del espectro de RMN-¹H en acetona-*d*₆ de **AQ-3**.

A campos bajos, se observó la presencia de dos singletes a 13,21 ppm y 13,25 ppm que pueden asignarse a dos OH en posición α, adyacentes a grupos carbonilos. Estos corrimientos se pueden visualizar en las ampliaciones de los espectros de la Fig. 3.45 I y II, en acetona-*d*₆ y en DMSO-*d*₆ respectivamente. Además se observó una señal ancha (*browner*) a δ_H 9,56 indicando la presencia de grupos OH en posición β (Fig. 3.45, III).

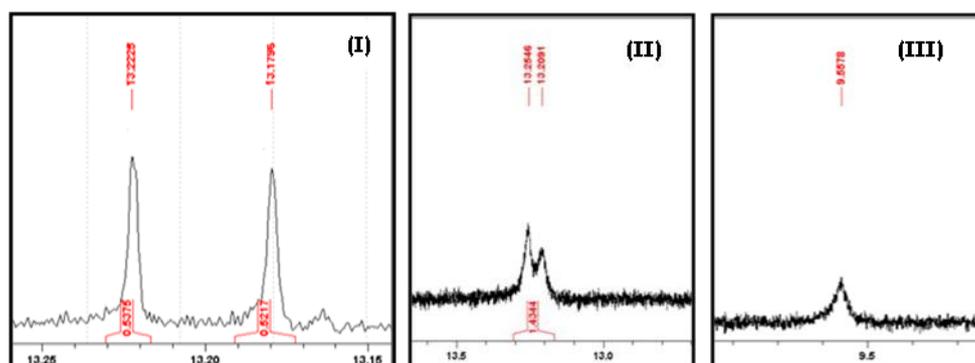


Figura 3. 45. Ampliación del espectro de RMN-¹H de **AQ-3**. (I) OH-α en Acetona-*d*₆; (II) OH-α en DMSO-*d*₆; (III) OH-β en DMSO-*d*₆.

Espectro COSY

En la Tabla 3.13 se resumen todas las correlaciones obtenidas del análisis del RMN-2D COSY.

Tabla 3. 13. Correlaciones del espectro COSY (H-H) en DMSO-*d*₆.

Posic. H	δ_H	Posic. H	δ_H
H-3	7,75	H-4	7,43
H-7	7,29	H-8	8,23
H-3'	7,56	H-4'	7,32
H-7'	7,29	H-8'	8,24
CH ₂ OH-2	5,38	H-3	7,75
CH ₂ OH-2	5,38	2-CH ₂ OH	4,63
CH ₃ -2'	2,28	H-3'	7,56

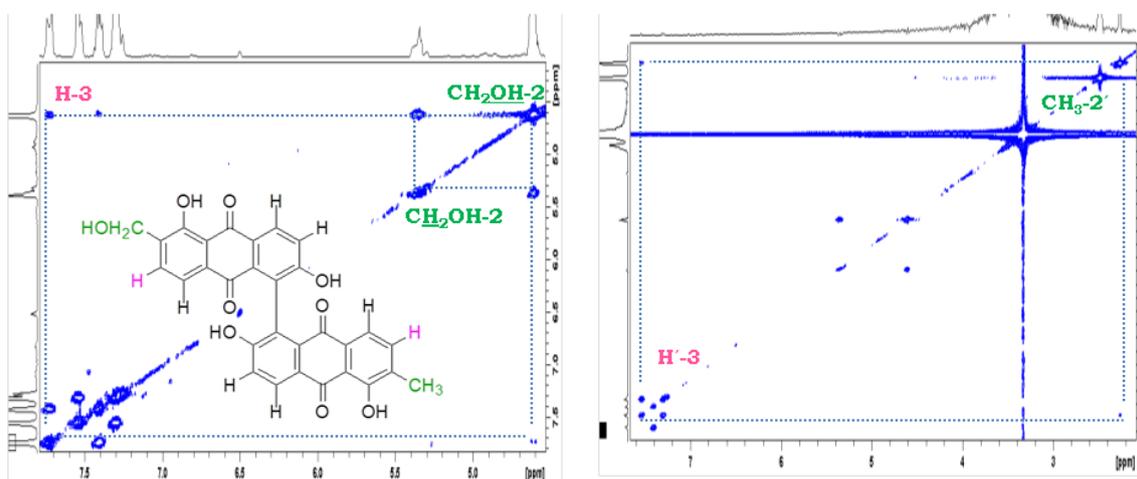


Figura 3. 46. Ampliación del espectro COSY en DMSO-*d*₆ de los sustituyentes CH₃ y CH₂OH de AQ-3.

Las señales observadas permitieron asignar al grupo CH₂OH en posición 2 y al grupo CH₃ en posición 2', teniendo en cuenta las correlaciones observadas para la AQ-5 (pág. 71). Simultáneamente, esto también permitió presuponer que los β-OH ocuparían la posición 6 y 6' de esta AQ, ya que luego de asignar los grupos CH₂OH y CH₃, eran las únicas posiciones probables.

En adición, se confirmó que efectivamente la variación en el patrón de sustitución se encontraba en el anillo C, ya que se observaron las mismas

correlaciones para los protones H-7 y H-7' con sus respectivos protones vecinos (Fig. 3.47 y Tabla 3.13).

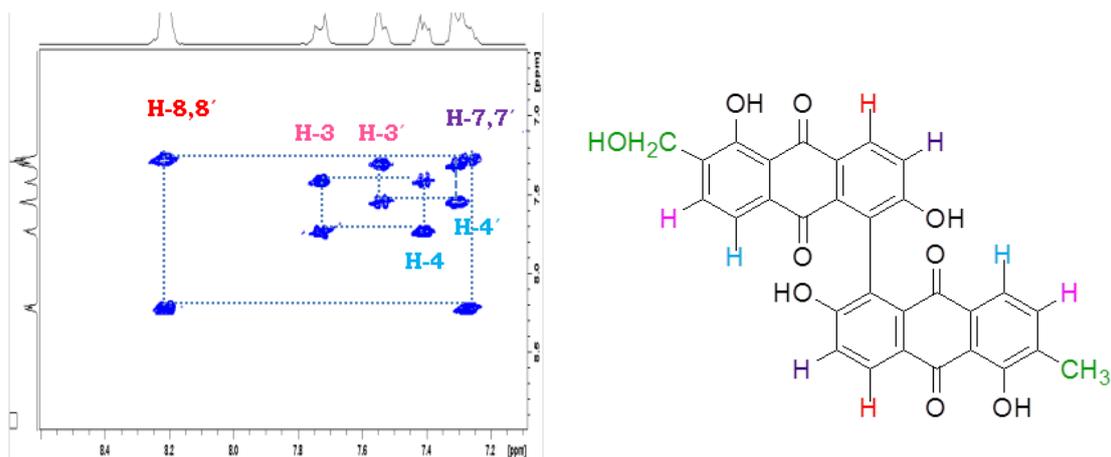


Figura 3. 47. Ampliación del espectro COSY en DMSO-*d*₆ de los protones aromáticos de **AQ-3**.

Espectros HSQC

Luego de la asignación de protones, se establecieron los corrimientos de carbonos que estaban unidos directamente a H. Los resultados se muestran en la Tabla 3.14, Fig. 3.48 y 3.49.

Tabla 3. 14. Correlaciones del espectro HSQC (C-H) en DMSO-*d*₆.

Posic. H	δ_H	δ_C	Posic. H	δ_H	δ_C
H-3	7,75	132,9	H-4'	7,32	118,3
H-4	7,43	118,3	H-7'	7,29	120,1
H-7	7,29	120,1	H-8'	8,24	128,7
H-8	8,23	128,7	CH ₂ OH-2	4,63	58,0
H-3'	7,56	136,5	CH ₃ -2'	2,28	15,0

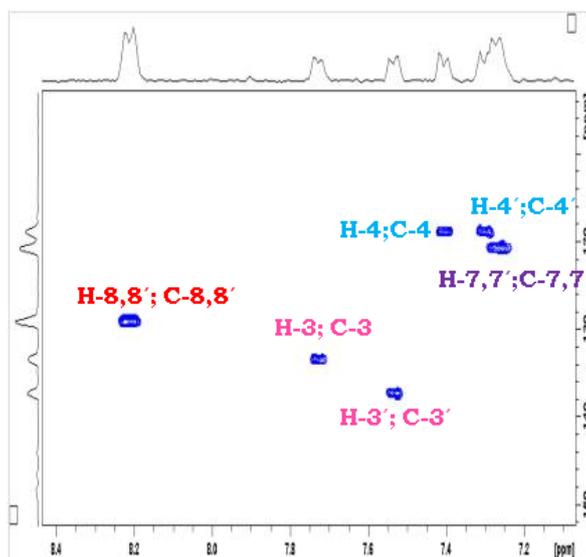


Figura 3. 48. Ampliación del espectro HSQC de protones aromáticos de **AQ-3** en DMSO- d_6 .

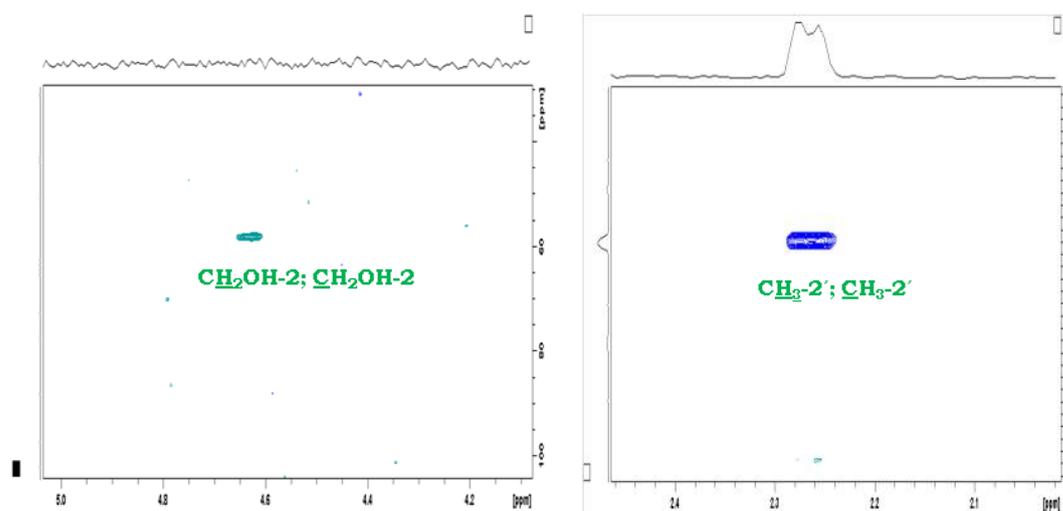


Figura 3. 49. Ampliación del espectro HSQC de los grupos CH₃ y CH₂OH de **AQ-3**.

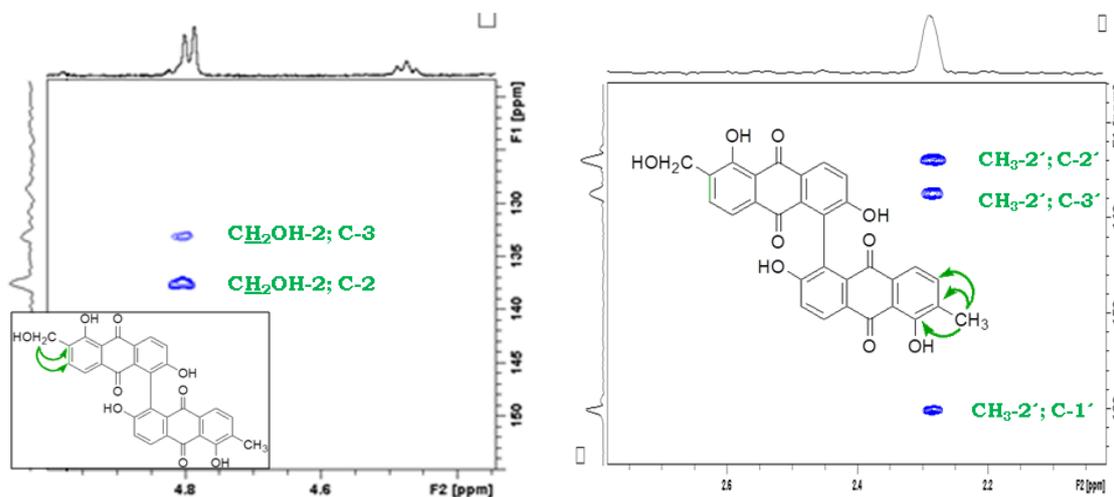
Espectros HMBC

Para culminar con la elucidación estructural de este compuesto, se recurrió al espectro HMBC, a fin de establecer las correlaciones de C-H a más de un enlace. Los resultados se resumen en la Tabla 3.15.

Tabla 3. 15. Correlaciones de HMBC (C-H) de AQ-3 en DMSO-*d*₆

Posic. H	δ_H	Posic. C (δ_C)
H-3	7,75	C-1 (158,8); C-4a (132,4)
H-4	7,43	C-1a (114,3); C-2 (137,8)
H-7	7,29	C5' (126,7)
H-8	8,23	C-5a (133,3); C-6 (160,2-161,3); C-9 (188,4)
H-3'	7,56	C-1' (160,4); C-4a' (132,1)
H-4'	7,32	C-1a' (114,3); C-2' (132,2); C-10' (182,6)
H-7'	7,29	C5' (126,7)
H-8'	8,24	C-5a' (133,3); C-6' (160,2-161,3); C-9' (188,4)
OH-1	13,21	C-1a (114,3); C-2 (137,8)
OH-1'	13,25	C-1a' (114,3); C-2' (132,2)
CH ₂ OH-2	4,63	C-2 (137,8); C-3 (132,9)
CH ₃ -2'	2,28	C-1' (160,4); C-2' (132,2); C-3' (136,5)

Las señales que se muestran en la ampliación del espectro HMBC (Fig. 3.50) permiten corroborar la ubicación de los grupos en las posiciones 2 y 2', puesto que el grupo CH₂OH se correlaciona con el C-2, que se encuentra más desapantallado que el C'-2, por encontrarse unido a un grupo alcohol. Mientras que el grupo metilo presenta las mismas correlaciones que la AQ-5 (Núñez *et al.*, 2006). Esta afirmación se sustenta además en la correlación de los protones en posición 4 y 4' (Fig. 3.51).


Figura 3. 50. Espectro HMBC en DMSO-*d*₆ de los grupos CH₂OH y CH₃ de la AQ-3.

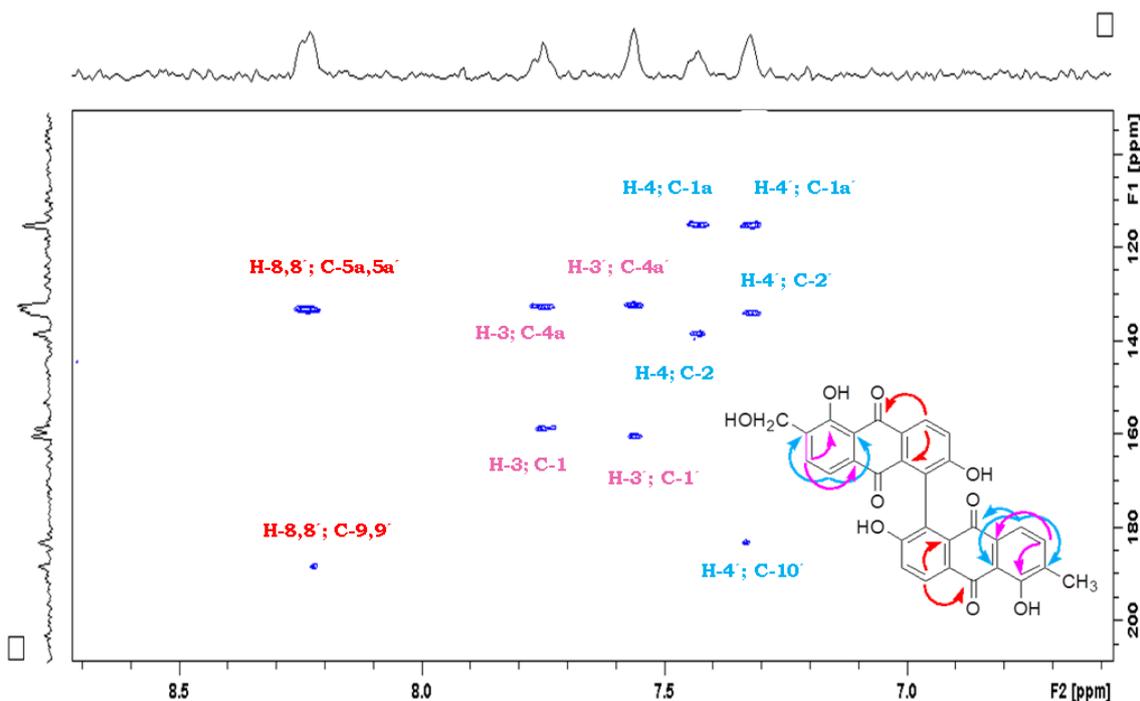


Figura 3. 51. Espectro HMBC en DMSO- d_6 de los protones aromáticos de la **AQ-3**.

Las señales pertenecientes a la correlación entre el H-8,8' y el C=O en posición 9 y 9' (Fig. 3.51), contribuyeron a confirmar la presencia de C=O quelados (como se observó en el IR) y por ende la presencia de OH en posición 1 y 1'. Una vez más, se observa como los corrimientos de los OH en posición 1 son ampliamente influenciados por la presencia de sustituyentes tanto en el anillo A, como se observó para la AQ-1 y AQ-2, como en el anillo C en esta AQ (Schripsema y Dagnino, 1996).

Si bien, empleando DMSO- d_6 se observaron la mayoría de las correlaciones, se realizaron los mismos experimentos empleando acetona- d_6 . Este estudio permitió observar las correlaciones del OH-1,1', del H-8,8' con el C-6-6', confirmando los OH en posición β y las correlaciones entre H-7/C-5 y H-7'/C-5', que respaldan la unión de los monómeros a través del enlace 5-5'. En la Fig. 3.52, se muestran algunas de estas correlaciones.

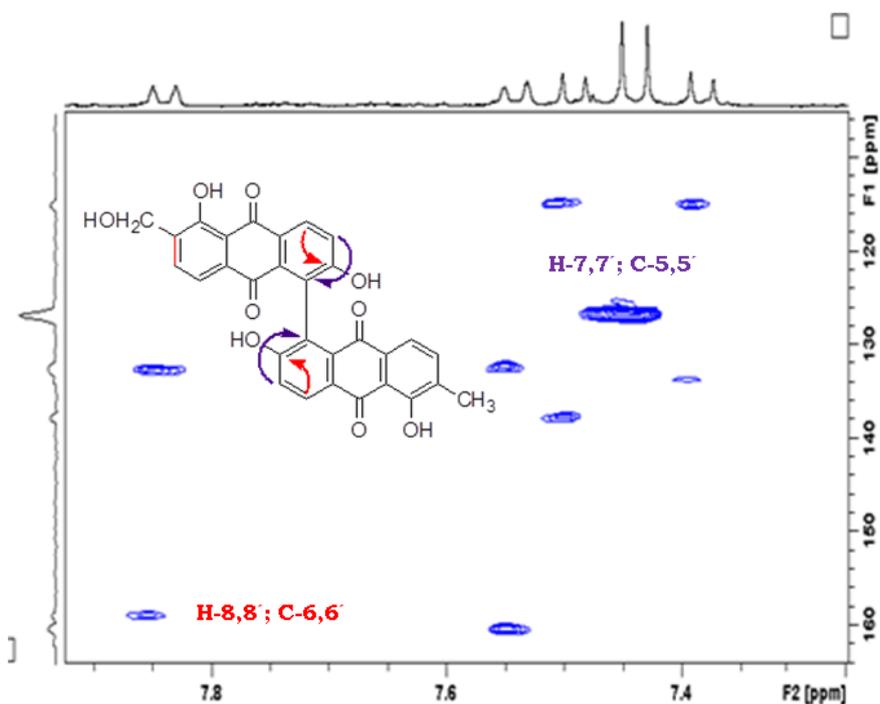


Figura 3. 52. Espectro HMBC en acetona- d_6 de los protones aromáticos de la **AQ-3**.

Espectro RMN- ^{13}C

Finalmente se realizó la correcta asignación de todos los carbonos de la estructura de la AQ-3, como se muestra en la Tabla 3.16. En el caso particular de esta estructura, los RMN-2D fueron de gran utilidad ya que resultó muy difícil realizar el RMN- ^{13}C . Para este tipo de experimento, se requiere de mucha cantidad de muestra y tiempo de adquisición lo que implica un mayor costo. En la Fig. 3.53 se muestra una proyección del HMBC en acetona- d_6 que fue de gran utilidad para realizar la asignación de carbonos.

Tabla 3. 16. Asignación de los carbonos de **AQ-3**.

Posición	δ_c , tipo	Posición	δ_c , tipo
1	158,8; C	1'	160,4; C
1a	114,3; C	1a'	114,3; C
2	137,8; C	2'	132,2; CH
3	132,9; CH	3'	136,5; CH
4	118,3; CH	4'	118,3; CH
4a	132,4; C	4a'	132,1; C
5	126,7; C	5'	126,7; C
5a	133,3; C	5a'	133,3; C
6	(160,2-161,3); C	6'	(160,2-161,3); C
7	120,1; CH	7'	120,1; CH
8	128,7; CH	8'	128,7; CH
8a	130,7; C	8a'	129,5; C
9	188,4; C	9'	188,4; C
10	182,6; C	10'	182,6; C
$\underline{C}H_2OH-2$	58,0; CH_2	$\underline{C}H_3-2'$	15,0; CH_3

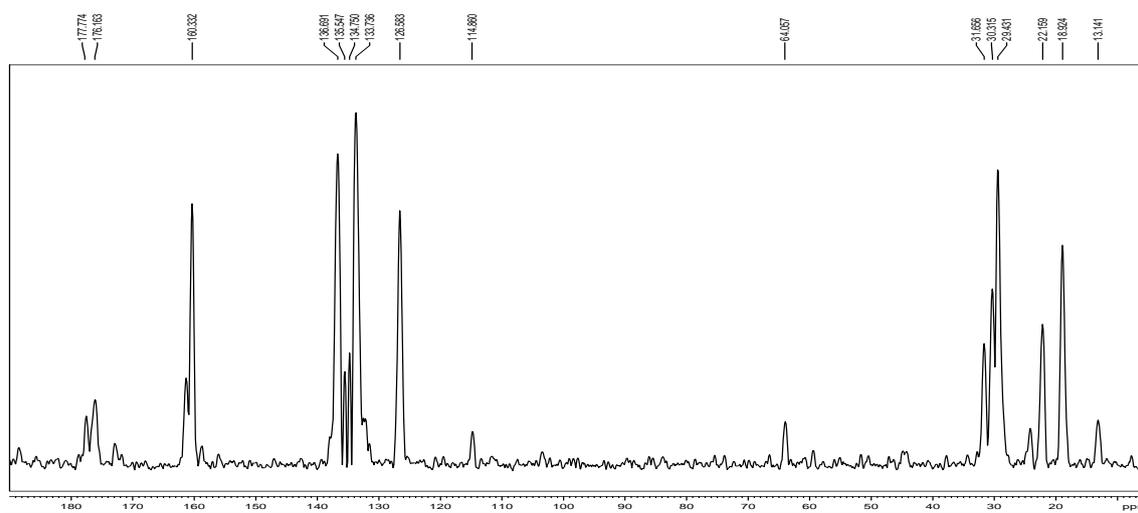


Figura 3. 53 Espectro RMN- ^{13}C en acetona- d_6 **AQ-3**.

Dicroísmo circular

Del mismo modo que para AQ-2, se estudió la configuración de la AQ-3. El espectro de DC reveló un efecto Cotton positivo centrado a 255 nm (Fig. 3.54),

lo que determinó que AQ-3, al igual que AQ-2, presenta una configuración *R* en el centro estereogénico dado por la unión de los C-5/C-5'.

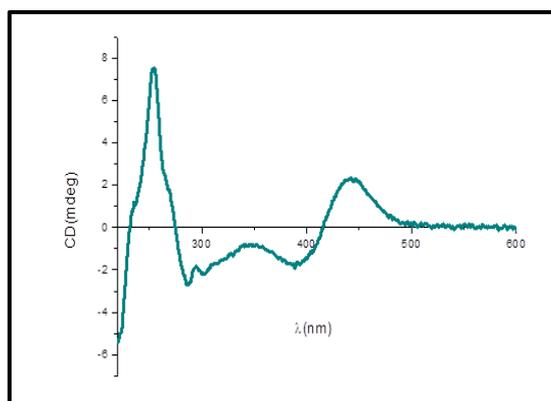


Figura 3. 54. Espectro DC y estructura química de **AQ-3**.

Por lo tanto, la **AQ-3** fue identificada como **(*R*)-2-hidroxi metil-2' metil-1,1',6,6' tetrahidroxi-5,5' biantraquinona**, a la que denominamos “lycionina”, debido a la especie de la cual fue obtenida (Fig. 3.55).

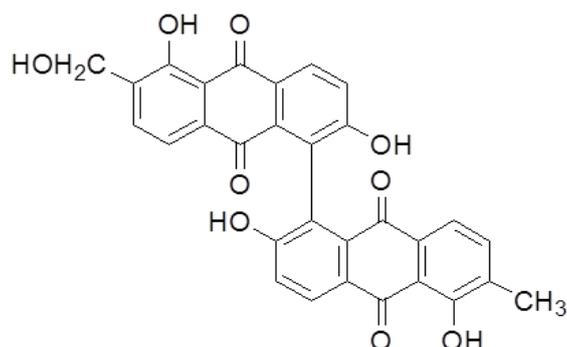


Figura 3. 55. Estructura química de **AQ-3**: (*R*)-2-hidroxi metil-2' metil-1,1',6,6'-tetrahidroxi-5,5'-biantraquinona(lycionina)

Identificación de antraquinonas informadas para otras especies

Aquellas que resultaron ser estructuras ya conocidas, fueron identificadas empleando RMN-¹H y espectrofotometría UV-Vis, comparando dichos resultados con datos informados en la literatura (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Núñez Montoya *et al.*, 2006). Las mismas se detallan a continuación.

AQ-4: Soranjidiol

La AQ-4 fue aislada tanto del extracto bencénico como del extracto acetato de etilo (Fig. 3.56). Se realizó espectrofotometría UV-Visible, IR, RMN-1D y COSY (RMN-2D). Se obtuvo en estado sólido en forma de cristales de aguja de color naranja.

UV-V $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH) nm (log ϵ): 269 (0,70), 289 (sh) (0,45), 336 (0,10), 401 (sh) (0,12), 410 (0,13), 424 (sh) (0,11). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3403 (OH libre), 2957, 2917, 2849, 1733, 1667 (C=O libre), 1633 (C=O quelado), 1454, 1383, 1258. Los espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C, se resumen en la Tabla 3.17. COSY: CH₃-2/H-3, H-3/H-4, H-7/H-8.

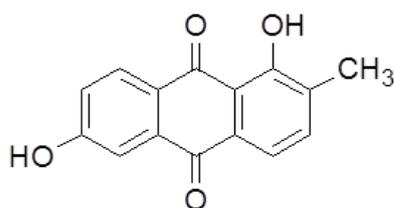


Figura 3. 56. Estructura química del soranjidiol (AQ-4).

Tabla 3. 17. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C de la AQ-4 en DMSO-*d*₆.

RMN- ¹³ C				RMN- ¹ H	
Posición	δ_c , tipo	Posición	δ_c , tipo	Posición	δ_H , mult. (<i>J</i> en Hz)
1	160,5; C	6	164,6; C	3	7,67; <i>d</i> (7,6)
1a	115,3; C	7	122,0; CH	4	7,62; <i>d</i> (7,6)
2	134,7; C	8	130,3; CH	5	7,48; <i>d</i> (2,5)
3	137,3; CH	8a	136,1; C	7	7,24; <i>d</i> (8,6; 2,5)
4	119,1; CH	9	188,1; C	8	8,13; <i>d</i> (8,6)
4a	131,7; C	10	182,4; C	OH-1	13,15; <i>s</i>
5	113,1; C	CH ₃ -2	16,1; CH ₂	CH ₃ -2	2,30; <i>s</i>
5a	124,8; C			OH-6	-

AQ-5: Bisoranjidiol

Esta AQ fue aislada del extracto bencénico y acetato de etilo, siendo la AQ que se aisló en mayor proporción de ambos extractos. Se corroboró la estructura (Fig. 3.57) mediante una reacción de ruptura reductora, en la cual se produce la ruptura del enlace C-C, originando dos monómeros de soranjidiol. En la página 166 se detallan los procedimientos de dicha reacción. Se obtuvo como sólido amorfo de color naranja.

UV-V $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH) nm (log ϵ): 255 (0.88), 273 (0.83), 282 (sh) (0.77), 292 (sh) (0.71), 398 (sh) (0.32), 418 (0.39), 428 (sh) (0.37). IR (KBr) $\nu_{\text{máx}}$ 3436 (OH libre), 2954, 2916, 2844, 1720, 1666 (C=O libre), 1627 (C=O quelado), 1577, 1425, 1267 cm^{-1} . Los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C se resumen en la tabla 2.21. COSY: CH_3 -2,2'/H-3,3', H-3,3'/H-4,4', H-7,7'/H-8,8'. HR-ESI-MS m/z 505,0907 (calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{17}\text{O}_8$, 505,0918).

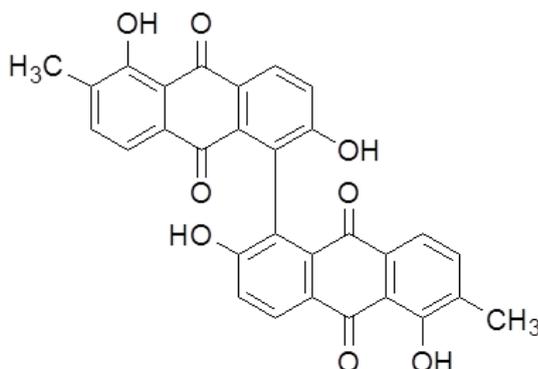


Figura 3. 57. Estructura química de 5-5'-bisoranjidiol (AQ-5).

Tabla 3. 18. Datos de RMN-¹H y RMN-¹³C de la AQ-5 en acetona-*d*₆.

RMN- ¹³ C				RMN- ¹ H	
Posición	δ _c , tipo	Posición	δ _c , tipo	Posición	δ _H , mult. (<i>J</i> en Hz)
1	160,4; C	1´	160,4; C	3	7,55; <i>d</i> (7,8)
1a	114,8; C	1a´	114,8; C	4	7,39; <i>d</i> (7,6)
2	133,6; C	2´	133,6; C	7	7,45; <i>d</i> (8,6)
3	136,8; C	3´	136,8; C	8	8,25; <i>d</i> (8,6)
4	118,4; C	4´	118,4; C	3´	7,55; <i>d</i> (7,8)
4a	133,4; C	4a´	133,4; C	4´	7,39; <i>d</i> (7,6)
5	126,7; C	5´	126,7; C	7´	7,45; <i>d</i> (8,6)
5a	133,6; C	5a´	133,6; C	8´	8,25; <i>d</i> (8,6)
6	161,2; C	6´	161,2; C	OH-1	13,23; <i>s</i>
7	120,2; C	7´	120,2; C	CH ₃ -2	2,29; <i>s</i>
8	128,8; C	8´	128,8; C	OH-6	9,60; <i>br</i>
8a	132,3; C	8a´	132,3; C	OH-1´	13,23; <i>s</i>
9	188,5; C	9´	188,5; C	CH ₃ -2´	2,29; <i>s</i>
10	182,5; C	10´	182,5; C	OH-6´	9,60; <i>br</i>
CH ₃ -2	15,0; C	2´-CH ₃	15,0; C		

AQ-6 y AQ-7: Pustulina y Heterofilina

Fueron aisladas en menor proporción en esta especie, ambas en la primera fracción del extracto bencénico (A2-I y A2-II respectivamente). Para estas dos AQs, se realizaron estudios de espectrofotometría UV-Visible, RMN-1D, espectroscopia de masas de alta resolución y polarimetría. Los datos de los espectros de RMN-¹H y ¹³C, que fueron coincidentes con bibliografía.

2-hidroxi-7-metil-3 metoxi antraquinona (pustulina): sólido amarillo en forma de agujas (acetona). Rotación óptica específica $[\alpha]_D^{25}$: -1,5 (c 0,18; CHCl₃). UV-V $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH) nm (log ϵ): 285 (0,81), 309 (sh) (0,23), 326 (sh) (0,15), 389 (0,07). HR-ESI-MS m/z 267,0656 (calculado para C₁₆H₁₁O₄, 267,0652) (Fig. 3.58 y Tabla 3.19).

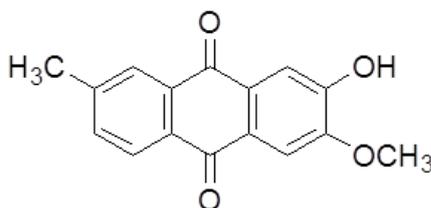


Figura 3. 58. Estructura química de pustulina (AQ-6).

1,6-dihidroxi-2-metil-7 metoxi antraquinona (heterofilina): sólido cristalino amarillo (acetona). Rotación óptica específica $[\alpha]_D^{25}$: + 13.8 (c 0.06, MeOH). UV-V $\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH) nm (log ϵ): 284 (0,72), 300 (sh) (0,38), 396 (sh) (0,14), 409 (0,15), 426 (sh) (0,13). HR-ESI-MS m/z 283,0605 (calculado para C₁₆H₁₁O₅, 283,0601) (Fig. 3.59 y Tabla 3.19).

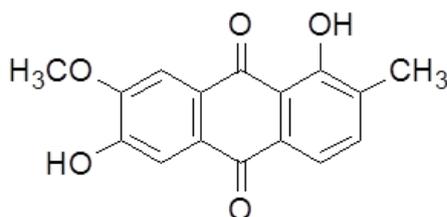


Figura 3. 59. Estructura química de heterofilina (AQ-7).

Tabla 3. 19. Asignación de protones y carbonos de AQ-6 y AQ-7 en Acetona- d_6

RMN- ^{13}C			RMN- 1H		
Posición	Pustulina	Heterofilina	Posición	Pustulina	Heterofilina
	δ_c , tipo	δ_c , tipo		δ_H , mult. (<i>J</i> en Hz)	δ_H , mult. (<i>J</i> en Hz)
1	112,3; C	159,8; C	1	7,52; s	-
1a	126,6; C	112,2; C	3	-	7,59; <i>d</i> (7,7)
2	152,8; C	133,6; C	4	7,61; s	7,65; <i>d</i> (7,7)
3	152,5; C	137,0; C	5	8,05; <i>d</i> (7,9)	7,59; s
4	108,7; C	114,9; C	6	7,68; <i>dd</i> (7,6; 1,5)	-
4a	127,9; C	131,3; C	7	2,52; s	-
5	126,6; C	118,5; C	8	7,94; <i>d</i> (1,2)	7,56; s
5a	130,9; C	127,5; C	OH-1	-	12,92; s
6	134,6; C	152,6; C	CH ₃ -2	-	2,30; s
7	144,6; C	153,4; C	OH-2	10,77; <i>br</i>	-
8	126,4; C	109,0; C	OCH ₃ -3	4,09; s	-
8a	132,9; C	126,8; C	OCH ₃ -7	-	3,99; s
9	181,9; C	188,1; C			
10	181,2; C	180,8; C			
CH ₃ -2	-	15,7; CH ₂			
OCH ₃ -3	55,9; CH ₃	-			
CH ₃ -7	21,2; CH ₂	-			
OCH ₃ -7	-	56,1; CH ₃			

CONCLUSIONES PARCIALES

Desde el punto de vista fenotípico y quimiotaxonómico, *H. lycioides* se presenta como una especie muy cercana a *H. pustulata* (Fig. 3.60) (Bacigalupo, 1993). Químicamente, ambas especies presentan derivados antraquinónicos con pequeñas variaciones en el esqueleto estructural de sus moléculas, pero en *H. lycioides* se destacan especialmente los compuestos clorados (**AQ-1** y **AQ-2**) (Dimmer *et al.*, 2017). Estas AQs pertenecen a un grupo de compuestos halogenados que rara vez se encuentran en plantas superiores. Entre los derivados orgánicos halogenados naturales, las AQs cloradas son más comunes en hongos y líquenes, con un patrón de sustitución dictado por la ruta de biosíntesis acetato/malonato (1,8-dihidroxi-AQ) (Gribble, 2010). Por el contrario, las AQs halogenadas aisladas de *H. lycioides* muestran un patrón de sustitución diferente, resultante de la vía del ácido shikímico/mevalonato, que es la vía biosintética presente en la familia de las Rubiáceas (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Martins y Núñez, 2015). En nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se describen AQs halogenados para una especie de esta familia taxonómica.

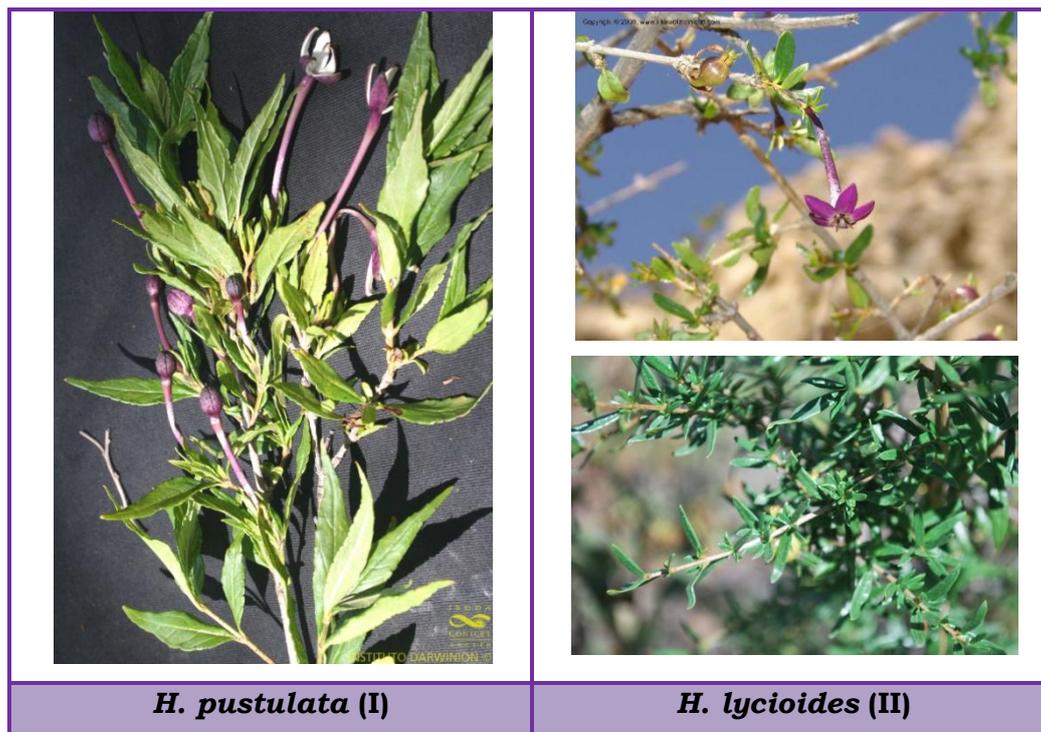


Figura 3. 60. Comparación del fenotipo de las dos especies que conforman el género (a- adaptada de Instituto de botánica Darwinion, 2016; b-Cabrera, 2011).

La razón de que esta particularidad sólo se encuentre en *H. lycioides*, podría ser, entre otras, la intervención de un microorganismo endófito en el desarrollo co-evolutivo de éste junto a la especie vegetal, u otros factores externos, que pudieron modificar la síntesis metabólica de sus compuestos.

En la actualidad, los microorganismos endófitos están siendo estudiados como potenciales fuentes de obtención de metabolitos secundarios de uso farmacéutico. Los microorganismos endófitos son principalmente hongos y bacterias que permanecen dentro de los tejidos de una planta huésped sin tener ningún impacto negativo en ella (Golinska *et al.*, 2015). Se sabe que son capaces de biosintetizar algunos de los mismos compuestos químicos que su planta huésped, posiblemente como una adaptación al microambiente (Martinez-Klimova *et al.*, 2016). Se han reportado antecedentes en la familia Rubiáceas indicando la presencia de β -proteobacterias simbióticas del género *Burkholderia* (Verstraeten *et al.*, 2013).

Por otro lado, existen numerosas fuentes de halógenos en nuestro planeta. No sólo los océanos, sino también la alta concentración y dispersión de cloruro en minerales, suelos y plantas da como resultado una multitud de compuestos organoclorados biogénicos y abióticos en estos ambientes terrestres (Gribble, 2010).

Esta y otras especulaciones al respecto, merecen ser estudiadas en profundidad para encontrar una respuesta consistente.

REFERENCIAS

- Bacigalupo, N. M., 1993. Rubiaceae. En A. L. Cabrera. (Ed.), Flora de la Provincia de Jujuy, (p. 375-80). Buenos Aires, Argentina: Colección Científica INTA.
- Bloom, H., Briggs, L. H., Cleverley, B., 1959. Physical properties of anthraquinone and its derivatives, Part I Infrared spectra. J. Chem. Soc. 178-185,
- Bringmann, G., Mortimer, A. J. P., Keller, P. A., Gresser, M. J., Garner, J., Breuning, M., 2005. Atroposelective synthesis of axially chiral biaryl compounds. Angew. Chem. Int., Ed. 44, 5384-5427,
- Bruneton, J., 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Acribia, S.A.
- Chien, S., Wu, Y., Chen, Z., Yang, W., 2015. Naturally Occurring Anthraquinones: Chemistry and Therapeutic Potential in Autoimmune Diabetes, Evidence-Based Complement. Altern. 1-13.
- Cohen, P. A., Neil Towers, G. H., 1995. The anthraquinones of *Heterodermia obscurata*, Phytochem, 40, 911-915,
- Dewick, P. M., 2009. Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons Ltd.
- Dimmer, J. A., Núñez Montoya S. C., Mendoza C. S., Cabrera J. L, 2017. Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae). Phytochemistry, en Prensa.
- Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., Lesellier, E., 2016. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. Ind. Crops Prod., 94, 812-833.
- El Ezaby M. S., Salem, T. M., Zewail A. H., Issa R., 1970. Spectral studies of some hydroxy-derivatives of anthraquinones. J. Chem. Soc, 1293-1296.
- Evans, W. C., 1991. Trease y Evans Farmacognosia. Interamericana, McGraw-Hill.
- Furumoto, T., Iwata, M., Hasan, A. F. M. F., Fukui, H., 2003. Anthrasesamones from roots of *Sesamum indicum*. Phytochemistry 64, 863-866.
- Gribble, G. W., 2010. Naturally occurring organohalogen compounds-a comprehensive update. Springer-Verlag, Wien.
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H., Rai, M., 2015. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. Antonie Van Leeuwenhoek.
- Instituto de botánica Darwinion.
<http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=pustulata&genero=Heterophyllaea&espcod=5131>
- Koyama, J., Morita, I., Tagahara, K., Aqil, M., 2001. Bianthraquinones from *Cassia siamea*, Phytochemistry 56, 849-851.
- Liu J., Wu, F., Chen, C., 2015. Design and synthesis of aloe-emodin derivatives as potent anti-tyrosinase, antibacterial and anti-inflammatory agents. Bioorg Med Chem Lett. 25, 5142-6.
- Martins, D., Núñez, C. V., 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. Molecules 20, 13422-13495.
- Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K., Sánchez, S., 2017. Endophytes as sources of antibiotics. Biochem. Pharmacol. En Prensa.
- Núñez Montoya, S. C., 2002. Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas) (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

- Núñez Montoya, S. C., Agnese, A. M., Cabrera, J. L., 2006. Anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *J. Nat. Prod.*, 69, 801-803,
- Seigler, D., 1998, *Plant secondary metabolism*, Springer science+business media, LLC.
- Schripsema, J., Dagnino, D., 1996. Elucidation of the substitution pattern of 9, 10-anthraquinones through the chemical shifts of peri-hydroxyl protons. *Phytochem*, 42, 177-184.
- Schripsema, J., Ramos-Valdivia, A., Verpoorte, R., 1999. Robustaquinones, novel anthraquinones from an elicited *Cinchona robusta* suspension culture. *Phytochem*, 51, 55-60.
- Talapatra, S. K., Talapatra, B., 2015. *Chemistry of plant natural products: stereochemistry, conformation, synthesis, biology and medicine*. Springer, Berlin, pp 184.
- Taylor, C. M., 2016. <http://www.tropicos.org/Name/42000315?projectid=7>.
- Thomson, R. H., 1971. *Naturally occurring quinones*. London y Nueva York, Academic Press.
- Villar del Fresno, A. M., 1999. *Farmacognosia General*. Madrid, Sintesis S.A.
- Verstraete, B., Janssens, S., Smets, E., & Dessein, S., 2013. Symbiotic β -proteobacteria beyond legumes: *Burkholderia* in Rubiaceae. *PloS one*, 8(1).
- Wijnsma, R., Verpoorte, R., 1986, Anthraquinones in the Rubiaceae, in: R,A, Hill; H,Ch, Krebs; R, Verpoorte and R, Wijnsma, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, Wien, pp, 79-149.
- Zhao, Y., Fang, Y., Li, J., Duan, Y., Zhao, H., Gao, L., Luo, Y., 2016. Neuroprotective effects of Chrysophanol against inflammation in middle cerebral artery occlusion mice. *Neuroscience Letters*, 630, 16-22.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE *H. LYCIOIDES*

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE *H. LYCIOIDES*

ANTECEDENTES

La purificación de extractos de *H. lycioides* permitió obtener dos estructuras cloradas que resultaron ser estructuras nuevas para esta familia de compuestos. Al someter al material vegetal a procesos de extracción y purificación se pueden originar nuevas estructuras, que no están precisamente en el material vegetal en estudio. Por lo tanto, se propuso realizar una caracterización química de los extractos para determinar si efectivamente, las AQs eran compuestos naturales, o si por el contrario eran productos resultantes de procesos de purificación.

La técnica HPLC es adecuada para el análisis de los extractos de plantas medicinales. Sin embargo, la combinación de la capacidad de separación del HPLC y el poder de identificación de la espectrometría de masas, proporcionan una valiosa herramienta para el análisis de extractos de plantas y la identificación inequívoca de sus constituyentes (Duval *et al.*, 2016). Este equipamiento dispone de un software con una herramienta llamada Smart Formula® que se utiliza para obtener la composición elemental de los compuestos en estudio. Esto proporciona una lista de fórmulas moleculares potenciales mediante la combinación exacta de la masa y la distribución isotópica, que se refleja en sus valores de error y mSigma®, respectivamente. El error muestra la desviación entre la masa medida y la masa teórica del pico en cuestión. El valor mSigma es una comparación numérica exacta entre los patrones de isótopos teóricos y medidos y se utiliza para reducir el número de posibles fórmulas a partir de las mediciones de masa exactas. Cuanto menores son los valores de error y mSigma, más certera será la asignación (Gomez-Romero *et al.*, 2010; Armada *et al.*, 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para llevar a cabo la identificación de las AQs en los extractos, en primera instancia se desarrolló un método empleando HPLC tendiente a lograr cromatogramas con una buena resolución de los picos. Se inyectaron los testigos, para determinar sus tiempos de retención (t_R) y así luego poder realizar una primera identificación de cada pico en cada extracto (Tabla 4.1).

Tabla 4. 1. Identificación de las AQs en los extractos por comparación de los t_R (min) con testigos puros.

AQ	Testigos	Ext. Hx	Ext. Ben	Ext. AcOEt	Ext. EtOH
1-Me-sor	23,47 ± 0,06	-	-	-	-
1-Me-rub	24,15 ± 0,04	-	-	-	-
dam	24,28 ± 0,07	-	-	-	-
lyc	24,74 ± 0,04	-	24,81 ± 0,05	24,70 ± 0,08	24,62 ± 0,05
pus	27,05 ± 0,04	27,10 ± 0,05	27,07 ± 0,04	26,86 ± 0,05	26,85 ± 0,07
2-OH-3-Me-AQ	27,78 ± 0,05	27,92 ± 0,04	27,84 ± 0,08	27,75 ± 0,05	27,64 ± 0,05
het	37,64 ± 0,08	38,09 ± 0,08	37,89 ± 0,04	37,51 ± 0,07	37,53 ± 0,08
sor	40,36 ± 0,07	40,68 ± 0,07	40,47 ± 0,04	40,09 ± 0,04	40,24 ± 0,04
rub	41,03 ± 0,06	-	-	-	-
5-clsor	41,85 ± 0,06	-	42,13 ± 0,08	-	-
bis	45,67 ± 0,08	44,42 ± 0,05	44,41 ± 0,07	43,72 ± 0,05	43,82 ± 0,05
7-clbis	58,54 ± 0,07	-	-	57,52 ± 0,05	57,45 ± 0,05

heterofilina (het), pustulina (pus), 1-metil eter de soranjidiol (1-Me-sor-, 6-hidroxi-1-metoxi-2-metil AQ), rubiadina (rub, 1,3-dihidroxi-2-metil AQ), 1-metil eter de rubiadina (1Me-rub-, 3-hidroxi-1-metoxi-2-metil AQ).

En la Fig. 4.1 y 4.2 se muestran los cromatogramas de los extractos Ben y AcOEt respectivamente, identificando cada pico con el correspondiente nombre de cada AQ.

El análisis de los extractos empleando HPLC contra testigos, permitió detectar aquellas AQs que habían sido previamente aisladas de la especie *H. pustulata*, e incluso se determinó la presencia de 2-OH-3-Me AQ que no había sido aislada por métodos cromatográficos convencionales, posiblemente debido a que se encuentra en baja proporción.

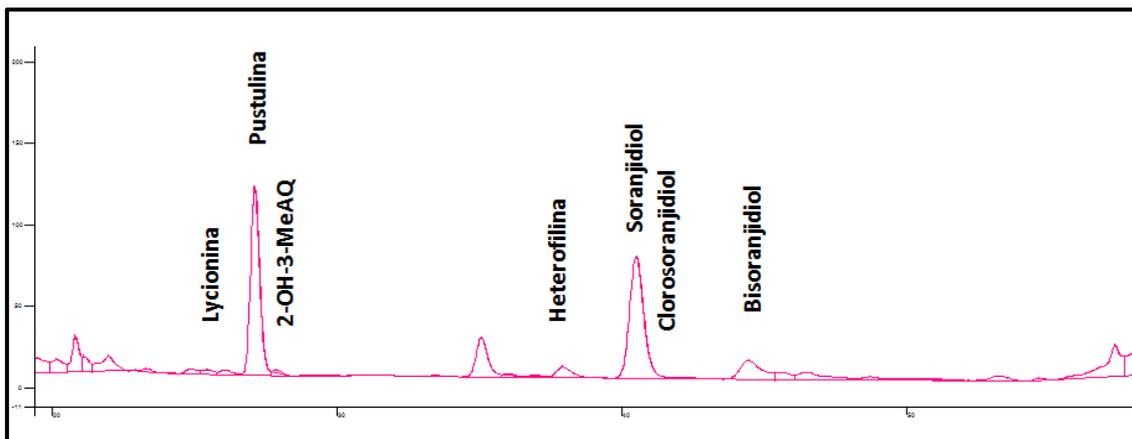


Figura 4. 1. Cromatograma del extracto Bencénico

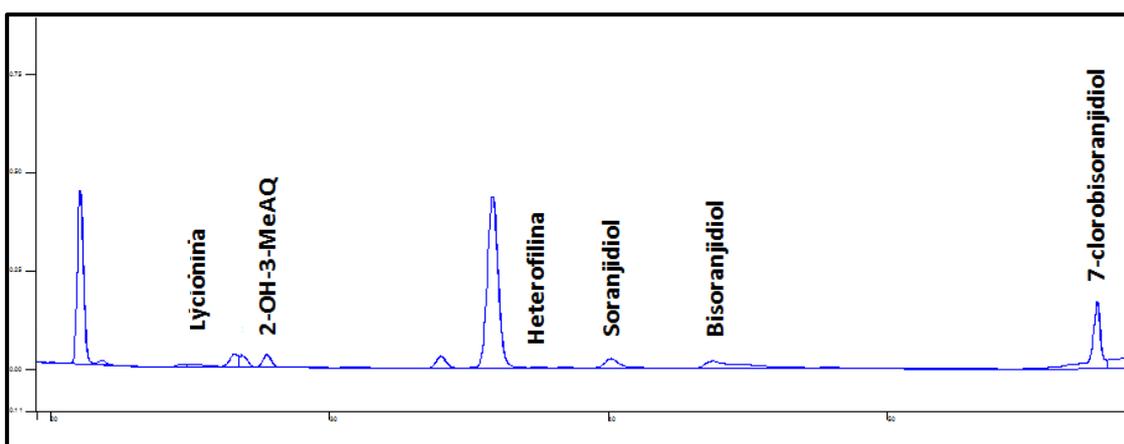


Figura 4. 2. Cromatograma del extracto Acetato de Etilo

Sin embargo es necesario emplear la técnica de HPLC acoplado a masa para poder realizar una identificación inequívoca de los compuestos presentes. Los parámetros empleados para realizar la identificación fueron el t_R , el espectro UV-Vis y el masa de alta resolución. Además se tuvieron en cuenta parámetros como mSigma y el error en ppm, que proveen un resultado confiable en la asignación de una estructura. Se realizó en primera instancia la inyección de los testigos (Tabla 4.2), para luego corroborar la presencia de estas AQs en los extractos (Tabla 4.3 y 4.4).

Tabla 4. 2. AQS testigos analizadas por HPLC-Masa.

AQ	Testigos					
	F.M. neutra	t _R	UV-Vis (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	mSigma	error (ppm)
lyc	C ₃₀ H ₁₈ O ₉	24,8	260(sh), 274, 387, 426	521,0998	19,3	-23,0
pus	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	27,0	255(sh), 284, 339(sh), 393(sh)	267,0707	15,6	16,4
2-OH-3- Me-AQ	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	27,8	278, 338, 384	237,0592	30,5	14,7
het	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	37,6	283,307(sh),324(sh), 410, 428(sh)	283,0670	5,9	-20,5
sor	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	41,4	270, 291(sh),393(sh), 411, 432(sh)	253,0550	10,4	-17,1
5-clsor	C ₁₅ H ₉ O ₄ Cl	44,2	270, 280(sh), 293(sh), 334, 404(sh), 413, 432 (sh)	287,0174	11,5	-20,0
bis	C ₃₀ H ₁₈ O ₈	47,9	261, 274, 285(sh), 424	505,1035	3,9	-21,0
7-clbis	C ₃₀ H ₁₇ O ₈ Cl	57,5	261, 274, 285(sh), 424	539,0675	26	-25,3

Tabla 4. 3. Identificación de las AQS en el extracto bencénico empleando HPLC-Masa.

AQ	Ext. Ben					
	F.M. neutra	t _R (min)	UV-Vis (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	mSigma a	error (ppm)
lyc	C ₃₀ H ₁₈ O ₉	24,7	260(sh), 273, 386, 432	521,0869	9,5	1,8
pus	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	26,7	257 (sh), 284, 339 (sh), 389(sh)	267,0639	14,6	9,3
2-OH-3- Me-AQ	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	27,7	277, 324, 378, 437	237,0536	4,2	9,0
het	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	38,8	283, 305 (sh), 392, 400, 430 (sh)	283,0601	15,9	4,0
sor	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	41,3	270, 291(sh), 392 (sh), 413, 430	253,0512	1,5	-2,1
5-clsor	C ₁₅ H ₉ O ₄ Cl	44,0	270, 280(sh), 290 (sh), 331, 384 (sh), 412, 436 (sh)	287,0106	1,9	0,8
bis	C ₃₀ H ₁₈ O ₈	48,1	261, 272, 280 (sh), 290 (sh), 422	505,0929	8,3	-0,1

Tabla 4. 4. Identificación de las AQs en el extracto acetato de etilo empleando HPLC-Masa.

AQ	Ext. AcOEt					
	F.M. neutra	t _R (min)	UV-Vis (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	mSigma	error (ppm)
lyc	C ₃₀ H ₁₈ O ₉	24,8	266(sh), 273, 382, 441	521,0865	9,6	-2,6
pus	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	27,1	255(sh), 284, 338(sh), 386(sh)	267,0599	23,4	23,9
2-OH-3- Me-AQ	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	27,7	-	237,0515	18,4	17,9
sor	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	42,1	270, 282, 291(sh), 337, 382(sh), 440	253,0500	2,5	2,6
bis	C ₃₀ H ₁₈ O ₈	48,4	263, 272 (sh), 281 (sh), 342, 380, 442	505,0932	6,7	0,7
7-clbis	C ₃₀ H ₁₇ O ₈ Cl	57,3	-	539,0505	104,2	6,4

Por un lado, se observaron las coincidencias entre los espectros UV-Vis de las AQs testigo y aquellas presentes en los extractos. Por otro lado, la alta sensibilidad del Masa confirmó la presencia de aquellas AQs que por su baja concentración, no fueron detectadas con el UV-Visible. Para afirmar la presencia de las AQs en los extractos, se aceptó un mSigma menor a 20. Sin embargo, en la Tabla 4.4, observamos que pus y 7-clbis, presentan valores por encima de 20. Esto puede deberse a que dichas AQs se encuentran en baja proporción en los extractos, lo cual modifica el mSigma, algoritmo dependiente de la concentración y de la intensidad del ión molecular.

Asimismo, este método estableció que las AQs cloradas, efectivamente se encuentran en esta especie (Fig. 4.3 y 4.4), ya que han sido identificadas en los cromatogramas de los extractos mediante HPLC-Masa y por lo tanto, no son originados por los métodos de aislamiento y purificación. En adición, los extractos analizados, no fueron extraídos previamente con solventes clorados, lo cual respalda esta afirmación.

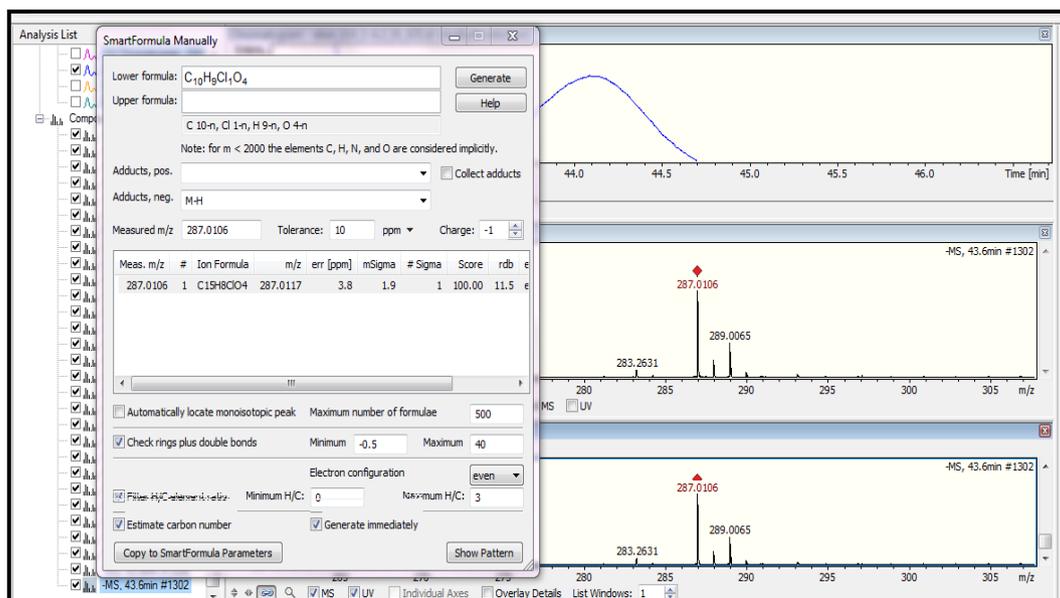


Figura 4. 3. Determinación de la presencia de 5-clor en el extracto bencénico.

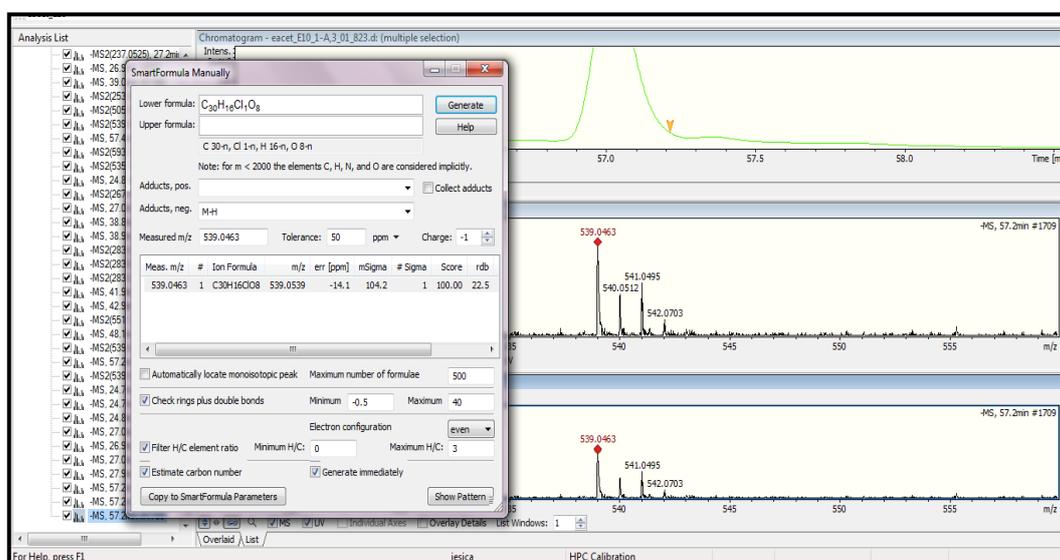


Figura 4. 4. Determinación de la presencia de 7-clbis en el extracto acetato de etilo.

CONCLUSIONES

El análisis por HPLC y HPLC-MS confirmó la presencia de todas las AQs previamente aisladas de los extractos Ben y ACOEt. Además, permitió informar la presencia de una AQ conocida que no había sido aislada previamente por métodos cromatográficos convencionales. En adición, pudimos determinar que las AQs cloradas, efectivamente se encuentran naturalmente en esta especie, y que no son originadas por los métodos de aislamiento y purificación.

REFERENCIAS

- Armada, I., Hachero-cruzado, I., Mazuelos, N., Luis, J., Manchado, M., Pedro, J., 2013. Phytochemistry Differences in betaine lipids and fatty acids between *Pseudoisochrysis paradoxa* VLP and *Diacronema vlkianum* VLP isolates (Haptophyta). *Phytochemistry* 95, 224–233.
- Duval, J., Pecher, V., Poujol, M., Lesellier, E., 2016. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind. Crops Prod.* 94, 812–833.
- Gómez-romero, M., Segura-carretero, A., Fernández-gutiérrez, A., 2010. Phytochemistry Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit 71, 1848–1864.

CAPÍTULO 5

CARACTERIZACIÓN DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES TIPO I

CARACTERIZACIÓN DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES TIPO I

ANTECEDENTES

Como se detalló en el Capítulo 1, la TFD implica el empleo de FS fotodinámicos que en presencia de luz y oxígeno molecular originan la producción de ERO. Para que esto ocurra, el FS debe primero absorber luz a una determinada longitud de onda (λ) y pasar del estado basal (FS_0) al estado singulete excitado ($^1FS^*$). En ese estado tienen lugar, entre otros, dos procesos que poseen relevancia en la clínica. Por un lado, el $^1FS^*$ retorna al estado fundamental en un proceso llamado Fluorescencia, que tiene importancia diagnóstica en la localización de tumores (Oniszczyk *et al.*, 2016). Por otro lado, el $^1FS^*$ pasa al estado triplete excitado $^3FS^*$, en donde pueden ocurrir dos reacciones. En la *reacción fotodinámica Tipo I*, el $^3FS^*$ puede reaccionar directamente con un sustrato, como la membrana celular o biomoléculas, donde ocurre la transferencia de protones o electrones para formar radicales anión o catión del FS. Estos radicales reaccionan con oxígeno para producir ERO, principalmente radical anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$. Por otro lado, en la *reacción fotodinámica tipo II*, el $^3FS^*$ transfiere directamente su energía al oxígeno molecular (3O_2), para formar oxígeno singulete (1O_2). Ambas reacciones puede ocurrir simultáneamente y la prevalencia de una u otra reacción depende del FS utilizado, y la concentración de sustrato y oxígeno (Castano *et al.*, 2004 Nagy *et al.*, 2010).

Mecanismo fotodinámico tipo I

Esta reacción generalmente ocurre con concentraciones de oxígeno bajas y requiere de un sustrato para que se lleve a cabo (Oniszczyk *et al.*, 2016). Principalmente, involucra la producción de $O_2^{\bullet-}$ por transferencia de electrones del $^3FS^*$ al oxígeno molecular (reducción monovalente) (Castano *et al.*, 2004). El $O_2^{\bullet-}$ posee un tiempo de vida medio de milisegundos, no difunde fácilmente a través de membranas biológicas y no es particularmente reactivo con biomoléculas. Sin embargo, es precursor de agentes oxidantes altamente reactivos, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se genera mediante una reacción de dismutación catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 5.1) (González-Torres *et al.*, 2000).

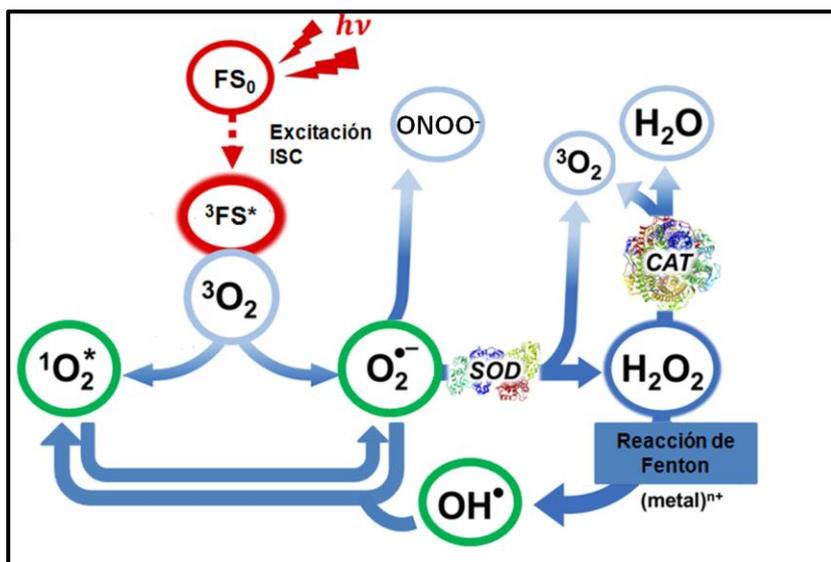


Figura 5 1. ERO generadas a partir de los mecanismos fotodinámicos tipo I y II. (Adaptado de Sellera *et al.*, 2017).

El H₂O₂, presenta mayor tiempo de vida media y difunde libremente a través de las membranas. Es poco reactivo a bajas concentraciones y es eliminado por uno de los mecanismos antioxidantes presentes en la célula, que consiste en reducir H₂O₂, mediante una reacción catalizada por la enzima catalasa (CAT) que genera H₂O y O₂ (Fig. 5.1). También puede ser eliminado por la enzima peroxidasa (González-Torres *et al.*, 2000).

A su vez, el H₂O₂ puede originar radical hidroxilo (HO[•]), un radical altamente reactivo con biomoléculas como ADN, proteínas y lípidos (Fig. 5.1) (González-Torres *et al.*, 2000). En este caso, el H₂O₂ actúa como un agente reductor, ya que dona un electrón para reducir iones metálicos como el Fe o Cu, que están presentes en las células. Los mismos actúan como catalizadores de la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno para producir HO[•] y anión hidroxilo (OH⁻), en la llamada reacción de Fenton (Castano *et al.*, 2004).

El HO[•] atraviesa fácilmente las membranas, tiene un tiempo de vida media corta y es el oxidante más activo. El daño que produce es limitado debido a su corta distancia de difusión. Puede adicionarse a sustratos orgánicos como los ácidos grasos o puede oxidar sustratos donando o tomando electrones. Los organismos vivos no han desarrollado sistemas enzimáticos para su detoxificación (González-Torres *et al.*, 2000).

Asimismo, el O₂^{•-} puede reaccionar con HO[•], actuando como agente reductor, donando el electrón desapareado al sustrato para formar ¹O₂ o con otro

radical, óxido nítrico (NO^-) para producir peroxinitrito (OONO^-), otra especie oxidante altamente reactiva (Fig. 5.1) (Castano *et al.*, 2004).

Los radicales que se originan preferentemente en reacciones fotodinámicas Tipo I, son más susceptibles a las defensas antioxidantes celulares enzimáticas y no enzimáticas (González-Torres *et al.*, 2000).

Mecanismo fotodinámico tipo II

Este mecanismo genera principalmente $^1\text{O}_2$ y es favorecido en tejidos con alto nivel de oxígeno (Oniszczyk *et al.*, 2016). Es un potente oxidante capaz de reaccionar con múltiples moléculas, posee un tiempo de vida media corto y baja difusión. De esta manera, genera un daño más controlado, evitando así el daño a células sanas cercanas (Nagy *et al.*, 2010). Por otro lado, a diferencia del mecanismo tipo I, no hay enzimas que sean capaces de inactivar eficientemente al $^1\text{O}_2$. En adición, dado que durante la TFD cada molécula de FS puede producir más de 10.000 moléculas de oxígeno singulete por segundo antes de ser destruida, las células fotosensibilizadas simplemente no poseen capacidad suficiente para tolerar el ataque intenso durante más de unos minutos (Sellera *et al.*, 2017).

El $^1\text{O}_2$ puede ser reducido a $\text{O}_2^{\bullet-}$, participando además del mecanismo tipo I (Fig. 5.1) (Sellera *et al.*, 2017).

Daño celular

Las diferentes ERO generadas son agentes oxidantes que pueden reaccionar directamente con las siguientes biomoléculas (González-Torres *et al.*, 2000; Castano *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2010):

- Lípidos de membranas produciendo peroxidación lipídica.
- Residuos de aminoácidos de las proteínas (cisteína, metionina, tirosina, histidina y triptófano), generando la pérdida de sus actividades.
- Carbohidratos, como ácido hialurónico, condroitina y dermatán sulfato, alterando sus funciones y desencadenando procesos inflamatorios.
- ADN, tanto a nivel de las bases como los azúcares.

Finalmente, estos mecanismos generan estrés oxidativo, desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad del sistema biológico de detoxificar rápidamente los intermediarios reactivos o reparar el daño resultante (Sies, 1985). Esto conlleva a la muerte celular, principalmente a través de dos mecanismos: necrosis o apoptosis. La necrosis es una muerte

celular rápida que involucra un grupo de células y desencadena procesos inflamatorios (Oniszczuk *et al.*, 2016). En general, se cree que aquellos FS que atacan la membrana celular o se acumulan en lisosomas causan necrosis (Nagy *et al.*, 2010).

La muerte por apoptosis es una forma de muerte celular programada que ocurre lentamente y sin generar procesos inflamatorios. Esto resulta beneficioso para el organismo, ya que se remueven selectivamente las células dañadas sin afectar a las células sanas (Oniszczuk *et al.*, 2016). Los FS que se acumulan en la mitocondrias o lisosomas pueden generar muerte por apoptosis (Nagy *et al.*, 2010).

Asimismo, se cree que, en general, el tipo de mecanismo de muerte se relaciona con la dosis de TFD, la cual se define como la energía entregada en un área determinada. Así, bajas dosis de TFD generan muerte por apoptosis y altas dosis favorecen la muerte por necrosis (Nagy *et al.*, 2010).

Este capítulo se centra en la caracterización fotobiológica, es decir en la reacción fotodinámica Tipo I, mientras que el mecanismo Tipo II y otros procesos de desactivación se evaluarán en el capítulo 6, para cumplimentar el segundo objetivo específico propuesto.

METODOLOGÍA

Ensayo del NBT

Se empleó un ensayo fotobiológico indirecto, que consiste en determinar la producción de $O_2^{\bullet-}$ en un sustrato biológico, en este caso neutrófilos. Estas células producen $O_2^{\bullet-}$ en su metabolismo basal, el cual puede modificarse en presencia de un agente oxidante, como las AQs.

Se trata de un ensayo colorimétrico que evalúa la reducción de nitroblue tetrazolium (NBT, Sigma Aldrich®) a azul de formazán, por acción del $O_2^{\bullet-}$ producido en neutrófilos humanos. Este ensayo se realiza bajo condiciones de oscuridad vs radiación, comparando estos resultados con la situación basal (Fig. 5.2) (Núñez *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007). La descripción de este ensayo se encuentra en materiales y métodos (pág. 168).

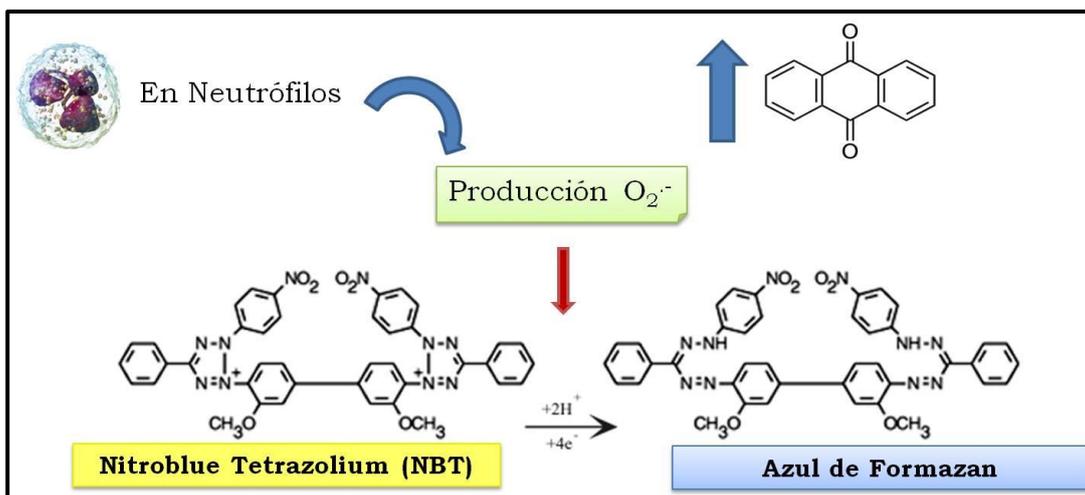


Figura 5 2. Ilustración de la reacción colorimétrica del NBT

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.1 y en la Fig. 5.3. Como se puede observar, la luz no influye sobre la producción de O₂^{•-} en los neutrófilos, ya que observamos la misma producción de este radical tanto en oscuridad como bajo condiciones de irradiación en las soluciones Control.

Tabla 5. 1. Incremento en la producción de radical anión superóxido.

	10 µg/ml		20 µg/ml	
	Oscuridad	Luz	Oscuridad	Luz
Control	10,0 ± 3,3	10,0 ± 1,4	10,0 ± 3,8	10,0 ± 3,6
5-clsor	10,0 ± 3,0	10,4 ± 4,5	10,5 ± 4,6	17,2 ± 1,9
7-clbis	11,7 ± 4,8	16,0 ± 2,2	14,0 ± 2,2	30,0 ± 3,3
lyc	10,0 ± 2,5	10,4 ± 1,7	11,0 ± 3,1	17,5 ± 2,9

A la menor concentración ensayada (10 µg/ml), no se observó generación de O₂^{•-} en ambas condiciones experimentales, ya que las diferencias entre las condiciones de oscuridad e irradiación no fueron estadísticamente significativas. A 20 µg/ml, en condiciones de oscuridad, no se observa incremento en la producción de O₂^{•-}, mientras que en condiciones de irradiación, las 3 estructuras nuevas producen un aumento en la producción de esta ERO. Este resultado permitió estimar que el metabolismo oxidativo es

dosis-dependiente, tal como fue informado anteriormente por Núñez *et al.*, 2005.

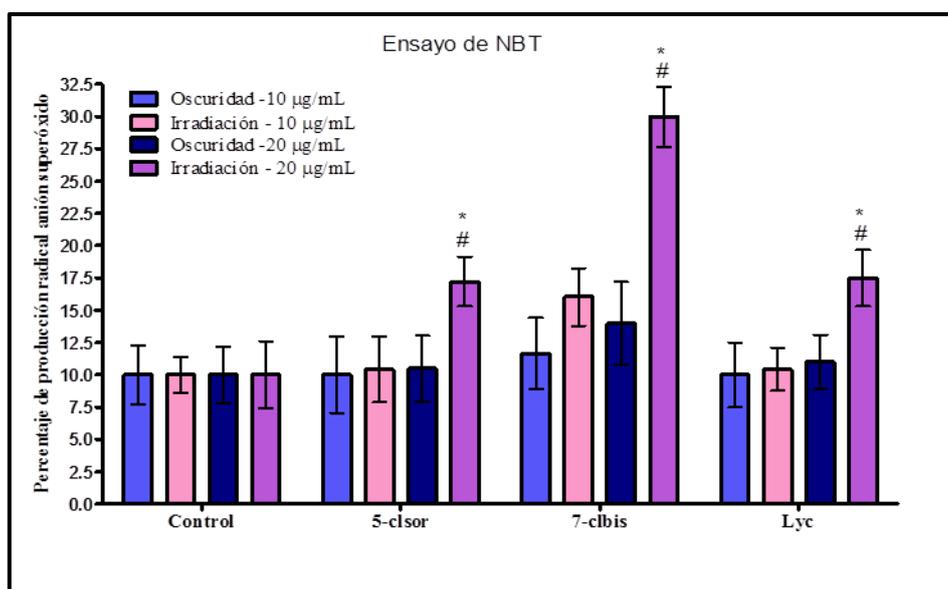


Figura 5.3. Estimulación de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en neutrofilos producido por las nuevas antraquinonas aisladas de *H. lycioides* en condiciones de oscuridad e irradiación. * $p < 0.05$ vs Irradiation at 10 µg/ml; # $p < 0.05$ vs Darkness 20 µg/ml.

De las AQs en estudio, 7-clbis resultó ser la que produce un mayor incremento con un porcentaje de aproximadamente un 20% respecto al control, mientras que 5-clsor y lyc, produjeron un incremento menor de aproximadamente 7 %.

Respecto a las otras 4 AQs aisladas de *H. lycioides* que también fueron obtenidas de *H. pustulata*, su caracterización fotobiológica fue llevada a cabo previamente por nuestro grupo de investigación (Comini *et al.*, 2007). Estos resultados se resumen en la Tabla 5.2.

Tabla 5. 2. Incremento en la producción de radical anión superóxido.

	10 µg/ml		20 µg/ml	
	Oscuridad	Irradiación	Oscuridad	Irradiación
Soranjidiol	0,0	6,8 ± 3,2	nt	nt
Bisoranjidiol	0,0	29,5 ± 2,9	0,0	32,5 ± 6,5
Heterofilina	27,9 ± 3,7	28,4 ± 3,0	33,0 ± 5,8	45,7 ± 8,1
Pustulina	0,0	32,7 ± 3,9	0,0	54,9 ± 9,4

nt=no testado

CONCLUSIONES PARCIALES

Por lo tanto, este ensayo, permitió concluir que las tres nuevas AQs producen un incremento de la producción de $O_2^{\bullet-}$ a la máxima concentración ensayada (20 $\mu\text{g/ml}$) y bajo condiciones de irradiación. Por lo tanto, las mismas contribuyen a la toxicidad que se le atribuye a la especie *H. lycioides*, sumadas al efecto que producen las AQs ya conocidas, que también han demostrado ser fotosensibilizadores tipo I.

REFERENCIAS

- Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R., 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1, 279-293.
- Comini, L. R., Núñez Montoya, S. C., Sarmiento, M., Cabrera, J. L., Argüello, G. A., 2007. Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 188, 185-191.
- González-Torres, M. C., Betancourt-Rule, M., Ortiz-Muñiz, R., 2000. Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica* 25, 3-9.
- Nagy, E. M., Via, L. D., Ronconi, L., Fregona, D., 2010. Recent Advances in PUVA Photochemotherapy and PDT for the Treatment of Cancer, 1863-1876.
- Núñez Montoya, S. C., Comini, L. R., Sarmiento, M., Becerra, C., Albesa, I., Argüello, G. A., Cabrera, J. L., 2005. Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: Singlet oxygen and superoxide anion production. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 78, 77-83.
- Oniszczyk, A., Wojtunik-Kulesza, K. A., Oniszczyk, T., Kasprzak, K., 2016. The potential of photodynamic therapy (PDT) - Experimental investigations and clinical use. *Biomed. Pharmacother.* 83, 912-929.
- Sellera, F. P., Nascimento, C. L., Ribeiro, M. S., 2017. *Photodynamic therapy in veterinary medicine, from basics to clinical practice.* Springer International Publishing.
- Sies, H., 1985. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, H. Sies, (Ed.) London: Academic Press Inc.

CAPÍTULO 6

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y FOTOSENSIBILIZADORAS TIPO II DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y FOTOSENSIBILIZADORAS TIPO II DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS

ANTECEDENTES

Los FS fotodinámicos en presencia de luz y oxígeno molecular, generan ERO mediante los mecanismos fotodinámicos tipo I y/o II. Para que se desencadenen dichas reacciones, previamente ocurre una serie de procesos que pueden ser explicados desde la “Fotoquímica”. Esta ciencia se ocupa del estudio de las reacciones químicas producidas por luz; su absorción por parte de una molécula puede llevar a esta, a un estado electrónicamente excitado donde será más probable originar una reacción química que en su estado fundamental (Levine, 1996).

Generalmente, en la oscuridad, los FS presentan un estado basal (FS_0) de menor energía, con un número apareado y opuesto de espín (Fig. 6.1). Cuando el FS absorbe luz UV o visible, pasa al primer estado singulete excitado ($^1FS^*$) debido a que uno de los electrones en estado basal S_0 , es impulsado al nivel S_1 , de mayor energía, conservando el spin (R1) (Fig. 6.1, **1**).

(R1)



El estado $^1FS^*$ posee un tiempo de vida media corta (10^{-9} - 10^{-6} s) y allí pueden ocurrir diferentes procesos que conducen a su desactivación (Levine, 1996; Skoog, 2001; Nagy *et al.*, 2010):

- **Procesos Fotoquímicos:** que incluyen disociación, isomerización, ionización del FS entre otros procesos, por los cuales pueden generarse nuevas especies moleculares.
- **Procesos Fotofísicos:** que producen una desactivación radiativa (Fluorescencia o fosforescencia) o no radiativa (Relajación vibracional, conversión interna y cruce entre sistemas) del FS.

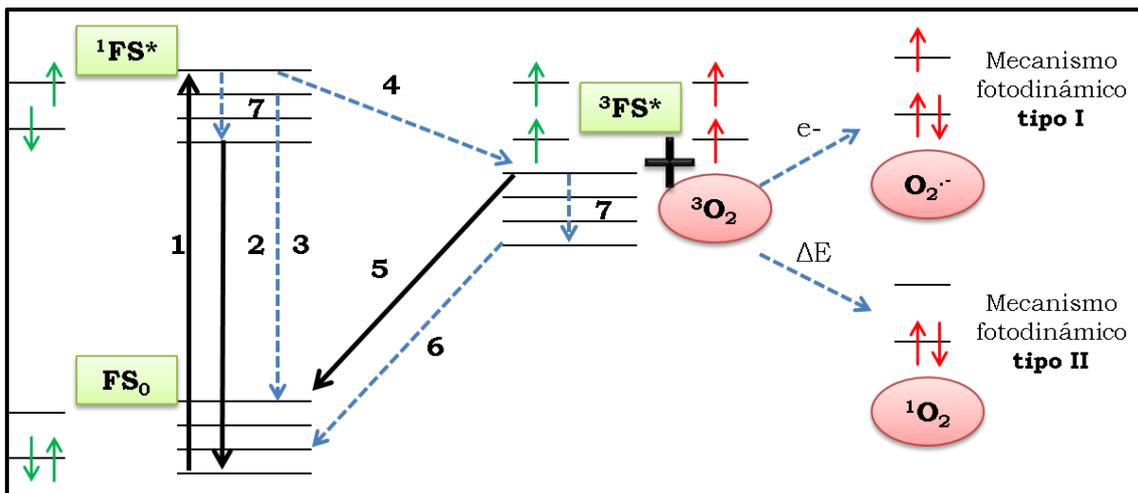


Figura 6. 1. Diagrama de Jablonski modificado. FS₀ - estado singlete basal, ¹FS* – primer estado singlete excitado, ³FS* – estado triplete, 1-absorción de un fotón, 2-fluorescencia, 3-conversión interna, 4-cruce entre sistemas, 5-fosforescencia, 6-decaimientos no radiativos, 7-relajación vibracional. (Oniszczyk *et al.*, 2016; Sellera *et al.*, 2017).

Dentro de los procesos fotofísicos, el ¹FS* puede sufrir desactivación radiativa por emisión de luz, mediante un mecanismo llamado *fluorescencia*, el cual no implica un cambio en el espín total electrónico ($\Delta S=0$, $S_1 \rightarrow S_0$) (Fig. 6.1, **2**).

Asimismo, el ¹FS* puede sufrir una desactivación no radiativa a un estado electrónico diferente, especialmente luego de sufrir una relajación vibracional (Fig. 6.1, **7**). A este proceso se lo denomina transferencia de energía intramolecular (R2).

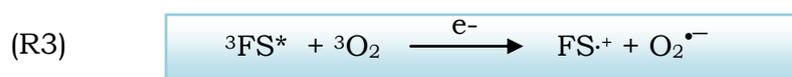


Se requiere que ¹FS* y ¹FS^A tengan energía similar. Generalmente, la segunda especie tiene una energía electrónica más baja, por lo que si la transición es resonante o cuasi resonante, el estado vibracional final alcanzado será mayor que el original (Levine, 1996). Estas transiciones sin radiaciones pueden ocurrir:

- a) Sin cambio de espín total electrónico ($\Delta S=0$, $S_1 \rightarrow S_0$), proceso denominado *conversión interna* (IC, Internal Conversion) (Fig. 6.1, **3**), por el cual el FS puede retornar al estado basal.
- b) Con cambio de espín total electrónico ($\Delta S \neq 0$, $S_1 \rightarrow T_1$) proceso denominado *cruce entre sistemas* (ISC, Intersystem crossing) (Fig. 6.1, **4**), que puede originar el estado triplete excitado (³FS*) (Turro, 1991).

Cuando el $^1\text{FS}^*$ por transferencia de energía intramolecular pasa al estado $^3\text{FS}^*$, se produce la inversión del espín, quedando ambos paralelos (Fig. 6.1). Este estado presenta un tiempo de vida media mayor respecto a $^1\text{FS}^*$ (10^{-3} - 10 s); y el FS puede perder energía para retornar al estado basal por emisión de luz, en un proceso llamado *fosforescencia* ($\Delta S \neq 0$, $T_1 \rightarrow S_0$) (Fig. 6.1, **5**) o por *ISC*, proceso no radiativo ($\Delta S \neq 0$, $T_1 \rightarrow S_0$) (Fig. 6.1, **6**) (Castano *et al.*, 2004, Sellera *et al.*, 2017). Los procesos de *IC* o *ISC* compiten con los procesos de *fluorescencia* y *fosforescencia* (Valeur, 2001).

Fosforescencia e *ISC* son procesos prohibidos según las reglas de selección (reglas de espín), por lo cual es poco factible que ocurran (Levine, 1996; Valeur, 2001). Como consecuencia, el FS en su estado triplete excitado ($^3\text{FS}^*$), tiene mayor probabilidad de colisionar y transferir su energía, electrones o átomos de hidrogeno a otra molécula aceptora. Así, en presencia de $^3\text{O}_2$ pueden ocurrir dos tipos de reacciones: Reacción fotosensibilizante fotodinámica Tipo I (R3) y Tipo II (R4).



Respecto al mecanismo FS fotodinámico tipo I, además de las reacciones que ya se han explicado en el capítulo 5, puede ocurrir que el $^3\text{FS}^*$ transfiera electrones al oxígeno molecular, lo que genera la oxidación del FS con formación de radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Por otro lado, por transferencia de energía directa desde el $^3\text{FS}^*$ al oxígeno molecular, se desencadena el mecanismo FS fotodinámico tipo II. En esta segunda reacción se produce oxígeno singulete, retornando el FS a su estado fundamental, a partir del cual puede absorber otro fotón comenzando el ciclo nuevamente. En la Fig. 6.1 se resumen todos los procesos mencionados.

En general, la mayoría de las moléculas en la naturaleza se encuentran en estado singulete basal, pero existen algunas excepciones, entre las cuales se destaca el O_2 , que existe en estado triplete basal. Esta molécula se define como un dirradical dado que posee dos electrones que ocupan dos orbitales diferentes en la misma molécula. Dicha propiedad, le permite interactuar física y/o

químicamente con otras moléculas, como los FS, en estado triplete excitado (Sellera *et al.*, 2017).

Para cumplimentar el segundo objetivo específico propuesto en esta tesis, se propusieron las siguientes actividades:

- Establecer si las AQs actúan mediante el mecanismo fotosensibilizante fotodinámico tipo II, al determinar el rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2 (\Phi_{\Delta})$.
- Estudiar las propiedades fluorescentes, dado su importancia desde punto de vista clínico.
- Determinar la fotoestabilidad de las AQs; un requisito necesario para ser aplicado en TFD.

El estudio de las propiedades fotofísicas y fotosensibilizadoras de las AQs se realizó en el Instituto de Bionanotecnología del noroeste argentino, INBIONATEC-CONICET, bajo la dirección del Dr. Claudio Borsarelli y el Dr. Eduardo Morán Vieyra.

Todos los ensayos abajo mencionados, se llevaron a cabo sobre las tres nuevas AQs aisladas de *H. lycioides*, cuyos resultados fueron comparados con sor y bis, debido a su similitud estructural con las nuevas AQs.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete

El rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2 (\Phi_{\Delta})$ se define como el número de moléculas de $^1\text{O}_2$ producidas por cada fotón absorbido por el FS (Nonell y Bravlavsky, 2000).

La determinación del Φ_{Δ} de cada AQ en estudio se llevó a cabo en CHCl_3 , empleando la técnica de luminiscencia infrarroja en tiempo resuelto (Ver materiales y métodos, pág. 172).

En la Fig. 6.2 se muestra como ejemplo el gráfico de Intensidad a tiempo cero (I_0) en función de las diferentes energías del láser (E_L), para las dos nuevas biAQs. Utilizando el valor de las pendientes de estos gráficos y empleando la Eq. 1 (pág. 172), se determinó el Φ_{Δ} para cada AQ en estudio. Los datos se resumen en la Tabla 6.1.

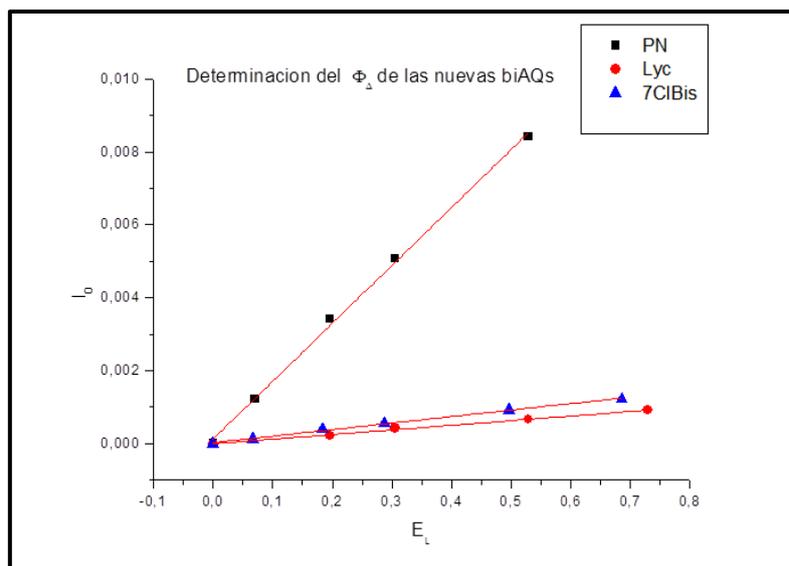


Figura 6. 2. Gráficos de Intensidad Inicial (I_0) en función de la Energía del Láser (E_L) de las nuevas biAQs estudiadas.

Tabla 6. 1. Determinación de rendimiento cuántico de oxígeno singlete.

Compuestos	Estructura Química	Φ_{Δ}
Perinaftenona		$0,95 \pm 0,05$
5-clsor		$0,28 \pm 0,03$
sor		$0,24 \pm 0,02$
7-clbis		$0,13 \pm 0,01$
bis		$0,10 \pm 0,01$
lyc		$0,08 \pm 0,01$

Los resultados indican que la presencia del átomo de cloro (-Cl) produce un incremento en el Φ_{Δ} respecto de las AQs no cloradas. Este incremento es del 17 % para 5-clsor respecto de sor. A su vez, estas dos AQs se destacan de las

restante por presentar Φ_{Δ} relativamente eficientes. En cuanto a las biAQs, la presencia del sustituyente Cl en posición 7, produjo un incremento del 30 % de Φ_{Δ} respecto a bis; mientras que la presencia del grupo CH_2OH en posición 2 en el caso de lyc, produce una disminución de un 20 % en Φ_{Δ} . En el caso de las biAQs, en general los Φ_{Δ} son menores, probablemente debido al movimiento vibro-rotacional inducido por el enlace covalente tipo sigma C5-C5' que une las dos unidades de AQs, el cual produce una eficiente desactivación no-radiativa de los estados excitados, disminuyendo significativamente Φ_{Δ} (Lackowics, 2006).

Podemos suponer que el incremento del Φ_{Δ} en las AQs cloradas respecto a las no cloradas, podría deberse a un efecto interno de átomo pesado. Los átomos pesados, incrementan la probabilidad de ISC debido a un acoplamiento spin/orbital que favorecen el cambio en el espín (Valeur, 2001; Skoog, 2001).

Es importante mencionar que los espectros UV-Vis no sufrieron modificación post-irradiación, por lo cual las muestras resultaron ser fotoestables frente a la radiación del láser (Fig. 6.3).

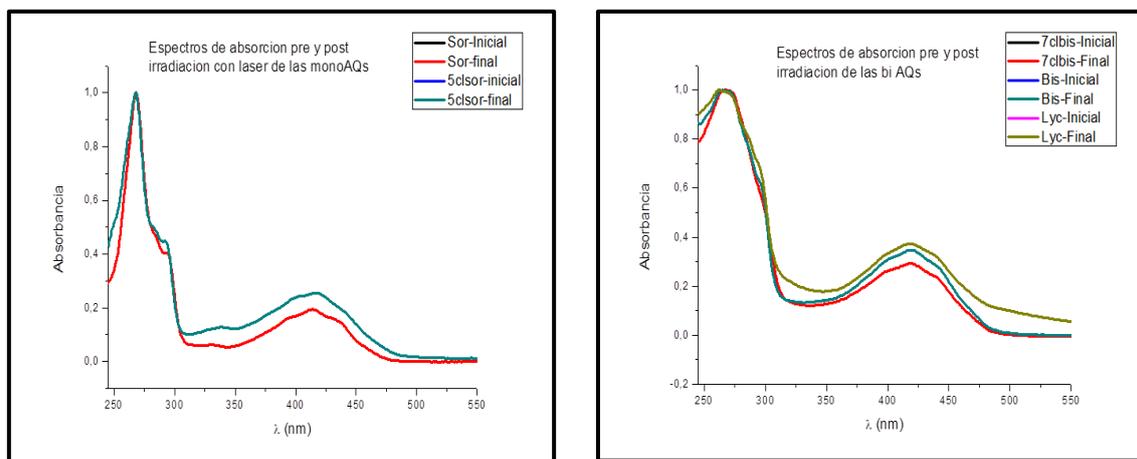


Figura 6. 3. Espectros UV-Vis de las AQs pre y post-irradiación con láser.

Estudio de las propiedades fluorescentes

Espectros de emisión y excitación

Se realizó la medición de los espectros de absorción y de emisión fluorescente, seleccionando dos λ de excitación: 355 nm, que corresponde a la longitud de onda excitación del láser a la cual se determinó el Φ_{Δ} , y 420 nm que corresponde a una de las bandas de absorción común a todas las AQs estudiadas (derivados 1,6-dihidroxi antraquinonas).

En la Fig. 6.4 se observa para todas las AQs estudiadas que en los espectros de emisión con excitación a 355 nm, existen dos especies emisoras con máximos a aproximadamente 440 (I) y 590 nm (II); mientras que excitando a 420 nm, se observa un espectro de emisión con sólo la banda II a 590 nm.

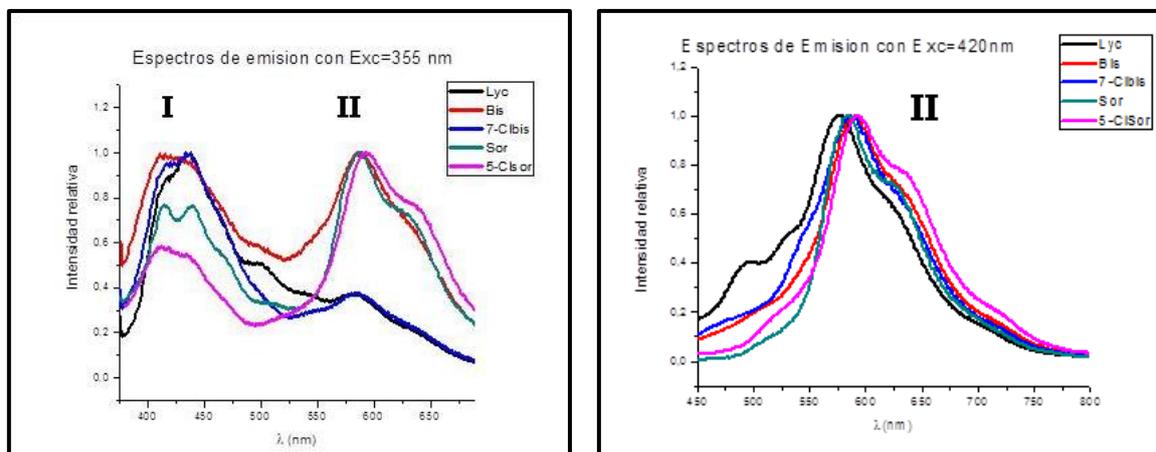


Figura 6. 4. Espectros de emisión con excitación a 355 nm y a 420 nm

Analizando los espectros de absorción, excitación y emisión de todas las AQs (Fig. 6.5) se obtuvo más información. Si bien, sólo bis es mostrado, todas las AQs en estudio se comportan de manera similar. De la Fig. 6.5 se puede deducir que, la especie emisora de la banda I (espectro azul, em 440 nm), presenta un espectro de excitación diferente al espectro de absorción de la misma AQ (espectro negro, abs). Sin embargo, la especie emisora correspondiente a la banda II, presenta un espectro casi similar al de absorción (espectro verde, em 590 nm).

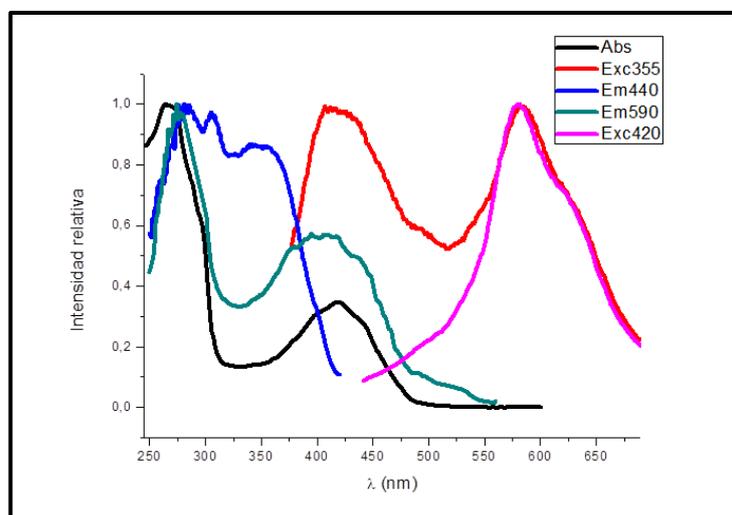


Figura 6. 5. Espectros de emisión y excitación de bisoranjidiol.

En general, siempre que exista una sola especie en el estado fundamental, se observa que el espectro de absorción es idéntico al espectro de excitación. En contraste, cuando varias especies están presentes, o cuando una única especie existe en diferentes formas (agregados, complejos, formas tautoméricas, entre otras), los espectros de excitación y de absorción ya no son superponibles (Valeur, 2001; Lakowics, 2006), como en el caso de las AQs en estudio.

Adicionalmente, del análisis de los espectros de absorción y emisión a 420 nm, se observó que estas AQs presentan un amplio corrimiento de Stokes ($\lambda_{em} - \lambda_{abs}$). Dicho corrimiento se define como la diferencia entre el máximo de emisión (λ_{em}^{max}) y el máximo de absorción (λ_{abs}^{max}) de una estructura (Valeur, 2001). Los mismos se muestran en la Tabla 6. 2.

Tabla 6. 2. Corrimiento de Stokes entre el máximo de absorción a 420 nm respecto del máximo de emisión fluorescente excitando a 420 nm.

Compuesto	λ_{abs}^{max} (nm)	λ_{em}^{max} (nm)	$\lambda_{em} - \lambda_{abs}$ (nm)
5-clsor	417	592	175
sor	414	583	169
7-clbis	418	586	168
lyc	420	587	167
bis	416	586	170

Para este tipo de moléculas, el amplio corrimiento de Stokes generalmente es producido por la transferencia intramolecular de protón en el estado excitado (ESIPT = excited state intramolecular proton transfer) de la forma tautomérica enólica, que es la predominante en el estado basal (Fig. 6.6) (Chen *et al.*, 2014). En el estado singulete excitado, la acidez del grupo -OH se incrementa y por tanto, se favorece la transferencia del H al grupo ceto adyacente (C=O), modificando notablemente la estructura y configuración electrónica respecto al estado basal (Seo *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2014). Los equilibrio ceto-enólicos producen cambios espectrales notorios, modificando tanto el tipo de color de fotones absorbidos como las propiedades de sus estados excitados, efectos críticos en el funcionamiento *in vitro* e *in vivo* de estos compuestos (Lee *et al.*, 2015). Este efecto varía significativamente de acuerdo a su entorno (solventes o

medios biológicos), ya que se modifican las interacciones que ocurren entre el fluoróforo y el solvente durante el proceso de solvatación. En consecuencia, se modifica significativamente la espectroscópica de estas moléculas orgánicas y, por ende su comportamiento fotofísico y fotoquímico (Lee *et al.*, 2015; Dey *et al.*, 2016).

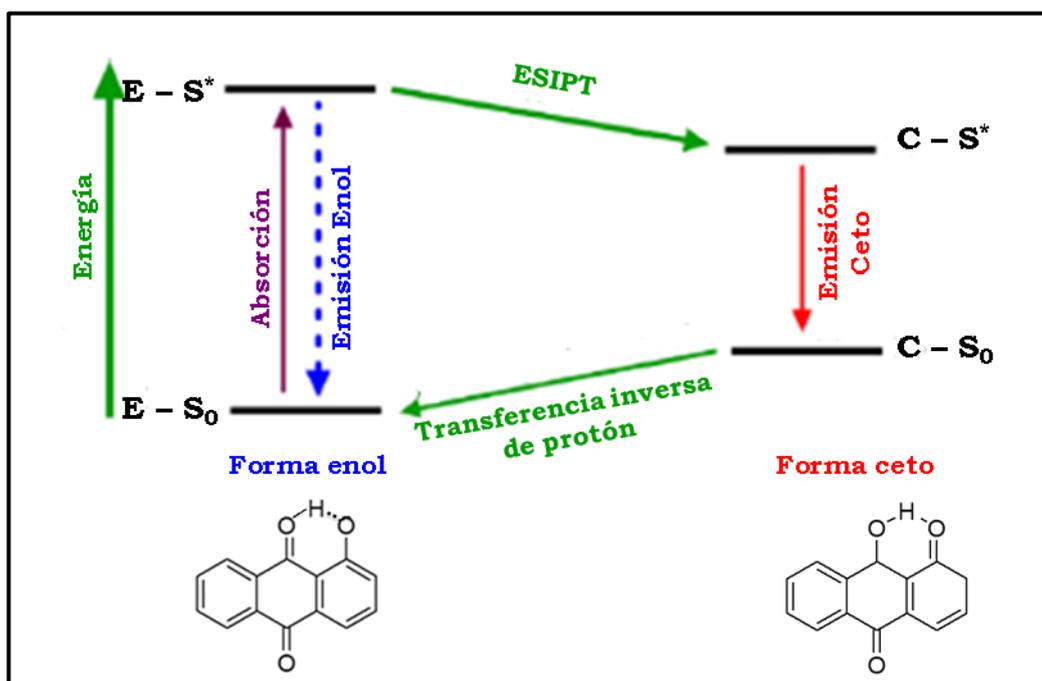


Figura 6. 6. Tautomerismo ceto-enol en derivados 1-hidroxi antraquinonas

Estas propiedades convierten a las AQs estudiadas, además, en estructuras interesantes para la elaboración de quimiosensores, moléculas que en presencia de distintos analitos sufren cambios de color y por lo tanto, en sus propiedades ópticas (Ghosh *et al.*, 2016). Además, pueden ser empleados para la obtención de imágenes en microscopía de fluorescencia, dispositivos emisores de luz, entre otras (Mitra *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2014; Mech *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). Este descubrimiento resulta interesante, ya que implica la aplicación de estas estructuras en un área diferente.

Rendimientos cuánticos relativos de fluorescencia (Φ_F) y tiempos de vida media de fluorescencia (τ_F^{AV})

En la Fig. 6.7 se muestra un ejemplo de los gráficos de del área de emisión fluorescente excitando a 420 nm en función de la absorbancia a 420 nm. Los Φ_F de sor y 5-clor se determinaron empleando como actinómetro de referencia a

fluoresceína (6.7, I). Sin embargo, puesto que los Φ_F de las biAQs resultaron ser muy bajos cuando se empleó fluoresceína como referencia, estos se calcularon empleando a sor como actinómetro de referencia, con el objetivo de reducir el error en la determinación (6.7, II).

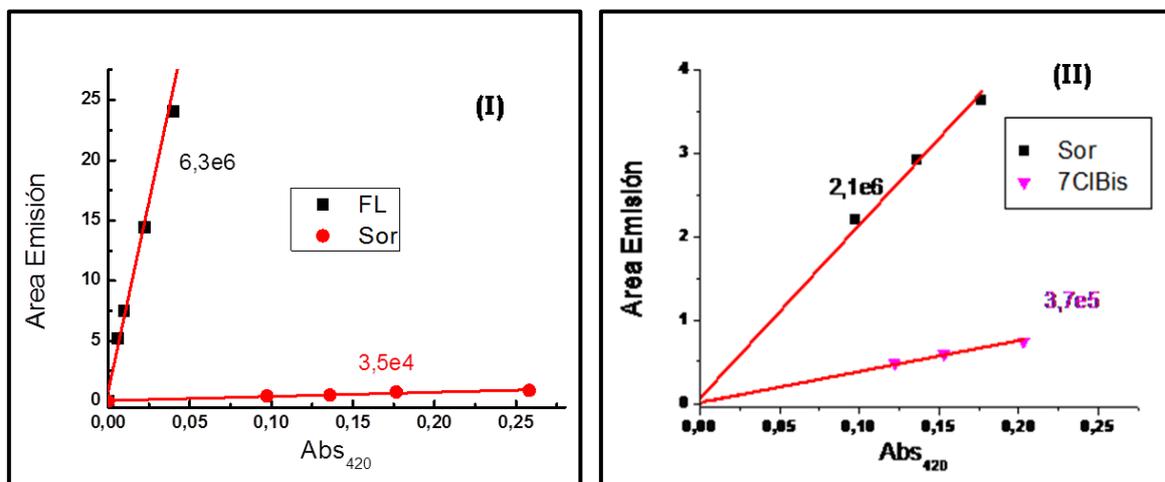


Figura 6. 7. (I) Gráfico realizado para la determinación del Φ_F de sor respecto a fluoresceína. (II) Gráfico realizado para la determinación del Φ_F de las biAQs respecto a sor.

Los resultados de los Φ_F se muestran en la Tabla 6.3. La presencia de Cl en posición 5, produce un incremento del 15 % en el Φ_F respecto a la AQ no clorada. En las biAQs, la presencia de un grupo CH_2OH en posición 2, produce un incremento del 193 % en el caso de lyc; mientras que la presencia de Cl en posición 7 produce un aumento del 157 % en comparación con bis, el cual posee la estructura básica sin sustituyentes.

Tabla 6. 3. Rendimientos cuánticos de producción de fluorescencia (Φ_F).

Compuesto	Solvente	Φ_F	τ_F^{AV} (ps)	Γ ($\times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$)
Fluoresceína	NaOH 0,1 M	0,925	-	-
5-clsor	CHCl_3	$7,0 \times 10^{-3}$	969	7,22
sor	CHCl_3	$6,1 \times 10^{-3}$	626	9,90
lyc	CHCl_3	$1,6 \times 10^{-3}$	719	2,23
7-clbis	CHCl_3	$1,3 \times 10^{-3}$	675	2,96
bis	CHCl_3	$8,3 \times 10^{-4}$	491	1,43

Estos aumentos de Φ_F demuestran un claro efecto inductor de los grupos CH_2OH y Cl sobre las propiedades de los estados excitados singulete y triplete de estas AQs, tal como lo demuestra el incremento en la constante radiativa (Tabla 6.3).

A pesar del efecto positivo de los sustituyentes tanto en las monoAQs como en las biAQs con respecto a sor y bis, estos aumentos de Φ_F no son significativos respecto a los valores de fluoresceína ($0,925 \pm 0,015$). Puesto que las mediciones se realizaron en CHCl_3 , el bajo Φ_F puede deberse a un efecto de átomo pesado externo: las interacciones espín orbital producen un incremento en la velocidad de formación del triplete y la correspondiente disminución de la fluorescencia (Skoog, 2001).

Los valores de τ_F^{AV} obtenidos indican que todas las AQs evaluadas presentan un decaimiento tri-exponencial de la fluorescencia. Esto confirma la presencia de varios estados de emisión, debido a la formación de especies tautoméricas en estado excitado (ESIPT), fenómeno explicado anteriormente (Palit *et al.*, 1990). Este dato permitió además obtener las constantes de velocidad radiativa (r) de cada AQ en CHCl_3 (Tabla 6.3). Estos valores resultaron ser bajos, en el orden de 10^{-6} , lo que afirma que en este tipo de estructuras prevalecen los procesos de desactivación no radiativos.

Estudio de la fotoestabilidad de las AQs: Fotólisis en estado estacionario

El estudio de fotoestabilidad de los monómeros, determinó que los mismos son estables tras ser irradiados durante 3 horas con LED azul, ya que sus espectros no se modifican (Fig. 6.8).

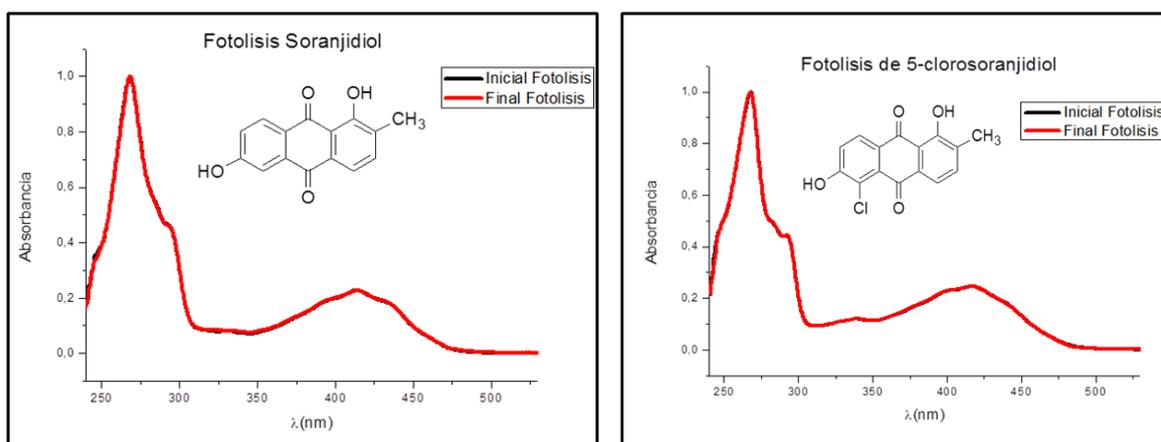


Figura 6. 8. Fotólisis en estado estacionario de las AQs monoméricas.

Respecto a las biAQs, el comportamiento fue diferente, observándose que el espectro de absorción permanece sin alteraciones hasta aproximadamente 15 minutos de irradiación. A partir de ese momento comienza a observarse un desplazamiento hipsocrómico de los dos máximos que presenta el espectro (Fig. 6.9, I y 6.10, I). Además, es importante mencionar que transcurridas las 3 horas de irradiación, las soluciones de las biAQs irradiadas, inicialmente amarillas, se tornaron incoloras. Sin embargo, cuando estas soluciones fueron dejadas en oscuridad durante 7 días, retornaron nuevamente a su coloración amarilla original, y mostraron el mismo espectro de absorción inicial (Fig. 6.9, II y 6.10, II).

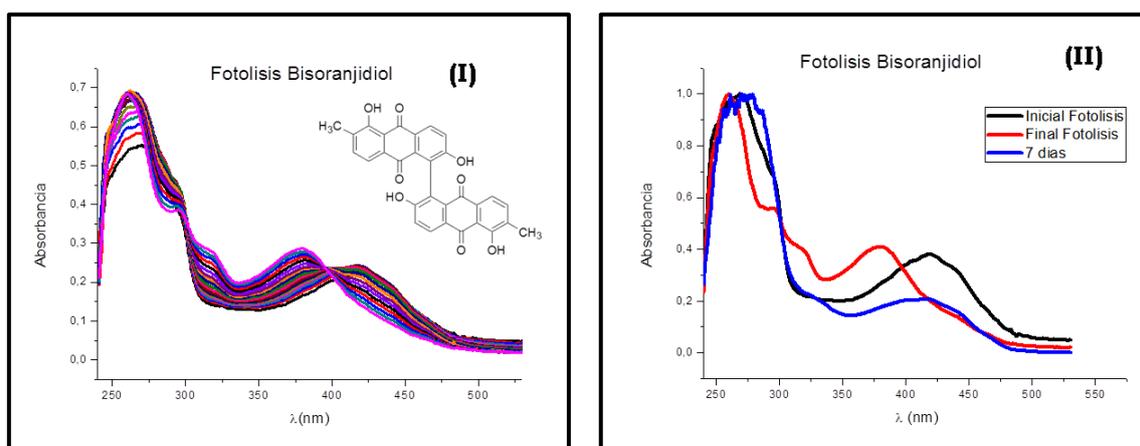


Figura 6. 9. (I) Fotólisis en estado estacionario de bis. (II) Comportamiento espectral de bis pre y post-irradiación.

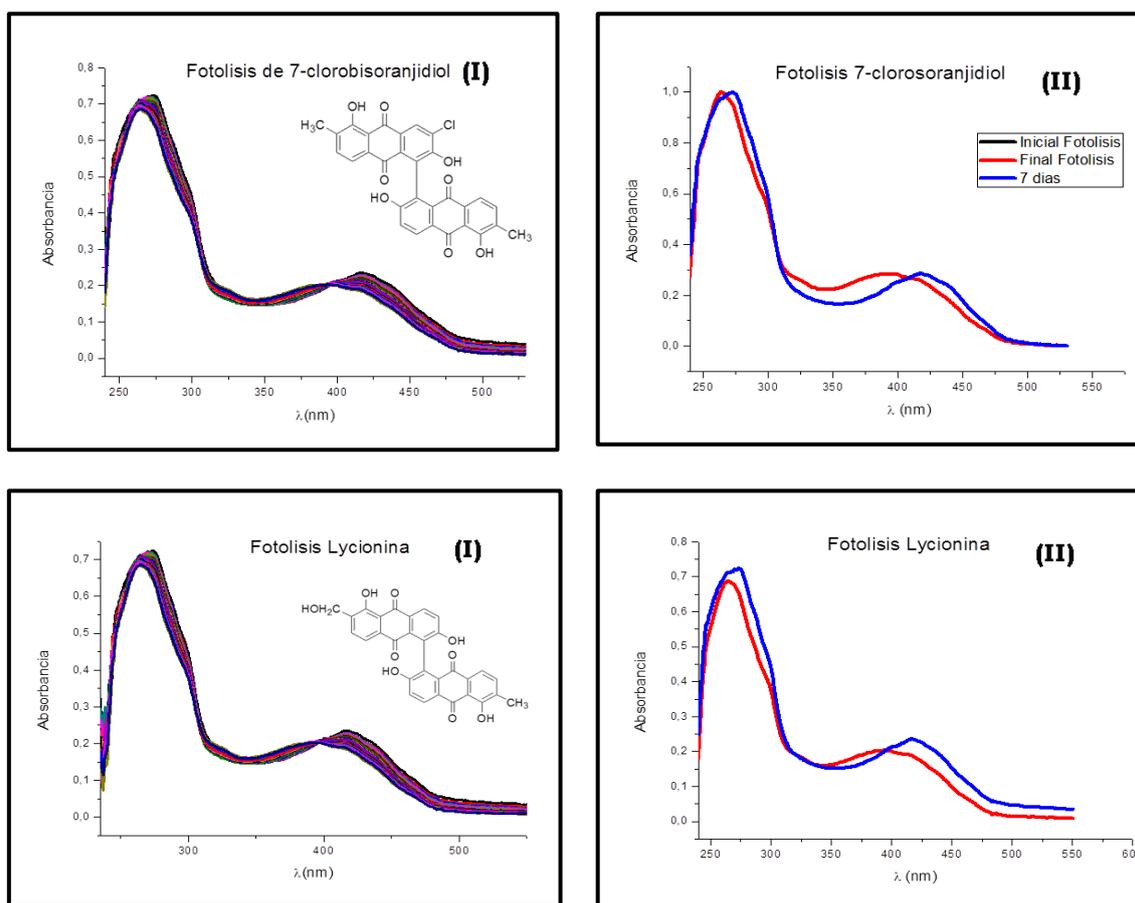


Figura 6. 10. (I) Fotólisis en estado estacionario de 7-clbis y lyc. (II) Comportamiento espectral de 7-clbis y lyc, pre y post-irradiación.

Este comportamiento permitió estimar que este fenómeno puede deberse a un cambio en la estructura de tipo reversible.

Se ha descrito que en los bifenilos, estructura que define a las biAQs, ocurre un fenómeno llamado “fotoracemización”, es decir una atropoisomerización en el estado excitado (singlete o triplete) (Bringman *et al.*, 2005). Sin embargo, solo un proceso de atropoisomerización no permitiría explicar el fenómeno observado bajo irradiación, ya que un cambio de ángulo, no produciría cambios en el espectro UV-Visible.

Como este fenómeno bajo irradiación solo se ve en los dímeros (bis, 7-clbis y lyc), no así en las estructuras monoméricas, podría estimarse que se trataría de un efecto combinado de una atropoisomerización de los bifenilos sumados a un ESIPT inter-monómeros (Fig. 6.11). Es decir, cuando las biAQs son irradiadas, las moléculas tienen la energía suficiente para cambiar el ángulo de rotación α y en ese caso, el OH en posición 6 del monómero 1, queda más cercano al grupo C=O del monómero 2, y viceversa, lo cual permitiría un ESIPT entre

monómeros. Este ESIPT, genera un cambio en la resonancia del anillo A de cada monómero, pudiendo explicar el cambio observado en el espectro de absorción y el cambio en la coloración de la solución.

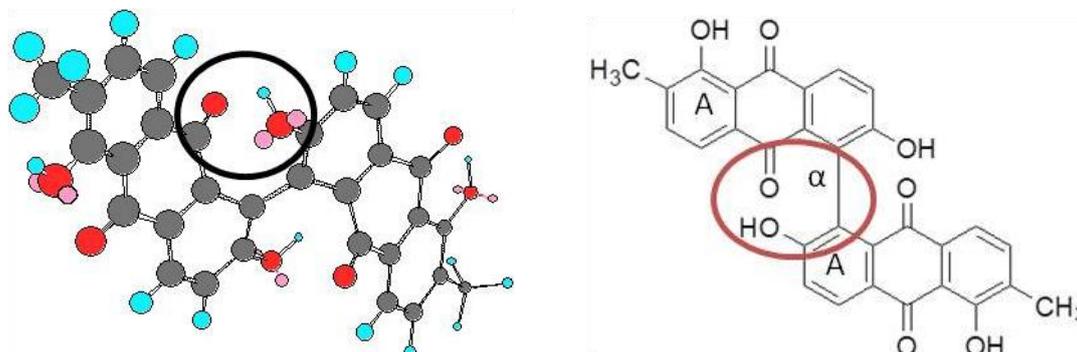


Figura 6. 11. Estructura 3D de bisoranjidiol y estructura plana.

En adición, se determinó Φ_{Δ} de una de las AQs fotolizadas (7-clbis, solución incolora) y se comparó con Φ_{Δ} de ésta AQ sin fotolizar, observándose una disminución en la producción de 1O_2 , tras ser sometida a irradiación (Fig. 6.12).

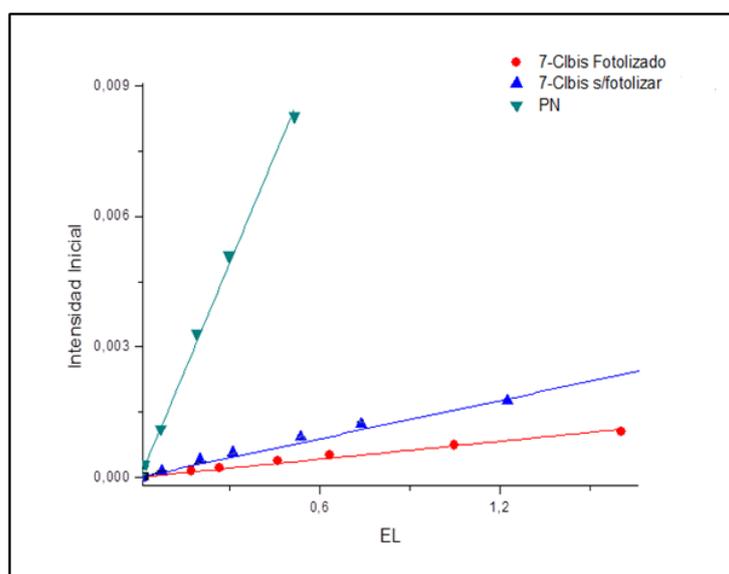


Figura 6. 12. Determinación del Φ_{Δ} de 7-clbis fotolizado y sin fotolizar.

Por lo tanto, sería de importancia realizar el mismo estudio en las otras biAQs, para poder establecer el tiempo límite de irradiación en el que el compuesto permanece sin fotolizarse, ya que una vez fotolizado disminuye el Φ_{Δ} , teniendo un efecto de protección. Este efecto inverso, podría disminuir la fotosensibilidad, efecto secundario que pueden generar los FS.

CONCLUSIONES PARCIALES

Estos ensayos permitieron demostrar que las nuevas estructuras cloradas presentan mayor rendimiento cuántico de producción de oxígeno singulete, respecto a las no cloradas, destacándose los monómeros por poseer un Φ_{Δ} relativamente eficiente en comparación a PN.

Si bien estas estructuras no presentan un alto Φ_F , todas ellas presentan ESIPT, efecto de gran interés científico y tecnológico. A nivel biológico, es de igual modo importante ya que influye en el funcionamiento *in vitro/in vivo* de estos compuestos. Un cambio en su entorno (solventes o medios biológicos) produce importantes modificaciones en el comportamiento fotofísico y fotoquímico de las AQs (Lee *et al.*, 2015; Dey *et al.*, 2016).

Asimismo, el estudio de este fenómeno posibilitaría la aplicación de estas estructuras en otras áreas, ya que las moléculas que exhiben ESIPT pueden presentar una amplia gama de aplicaciones, tales como el uso de los mismos en la elaboración de láseres, fotoestabilizadores ultravioletas, filtros Raman y UV, sondas para investigaciones en el entorno biológico, diodos de emisión de luz blanca, quimiosensores, entre otros (Chen *et al.*, 2014; Sidir y Sidir, 2016).

Por último, todas ellas son fotoestables hasta aproximadamente 15 minutos de irradiación, tiempo que usualmente se utiliza en los ensayos *in vitro* desarrollados en nuestro grupo de investigación (Comini *et al.*, 2011a; Comini *et al.*, 2011b; Rumie Vittar *et al.*, 2014; Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

REFERENCIAS

- Bringmann, G., Mortimer, A. J. P., Keller, P. A., Gresser, M. J., Garner, J., Breuning, M., 2005. Atroposelective synthesis of axially chiral biaryl compounds. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44, 5384–5427.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R., 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1, 279-293.
- Chen, K. Y., Tsai, H. Y., Lin, W. C., Chu, H. H., Weng, Y. C., Chan, C. C., 2014. ESIPT fluorescent dyes with adjustable optical properties: Substituent and conjugation effects. *J. Lumin.* 154, 168–177.
- Comini, L. R., Núñez Montoya, S. C., Páez, P. L., Argüello, G. A., Albesa, I., Cabrera, J. L., 2011a. Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 102, 108-114.
- Comini, L. R., Fernandez, I. M., Vittar, N. B. R., Núñez Montoya, S. C., Cabrera, J. L., Rivarola, V. A., 2011b. Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine* 18, 1093-1095.
- Dey, D., Sarangi, M. K., Ray, A., Bhattacharyya, D., Maity, D. K., 2015. Excited state hydrogen bonding fluorescent probe: Role of structure and environment. *J. Lumin.* 173, 105–112.
- Ghosh, A., Amilan, J., Kaushik, R., 2016. Anthraquinones as versatile colorimetric reagent for anions. *Sensors and Actuators B: Chem.* 229, 545–560.
- Lakowicz, J. R., 2006. Principles of fluorescence spectroscopy, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.
- Lee, S., Lee, J., Pang, Y., 2015. Excited state intramolecular proton transfer of 1,2-dihydroxyanthraquinone by femtosecond transient absorption spectroscopy. *Curr. Appl. Phys.* 15, 1492–1499.
- Levine, I. N., 1996. *Fisicoquímica*. McGraw-Hill.
- Marioni, J., Arce, J. E., Cabrera, J. L., Paraje, M. G., Núñez Montoya, S. C., 2016a. Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharm. Biol.* 3, 1-11.
- Marioni, J., Da Silva, M. A., Cabrera, J. L., Núñez Montoya, S. C., Paraje, M. G., 2016b. The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*; 23, 1321 – 1328.
- Mech, J., Grela, M. A., Szaciłowski, K., 2014. Ground and excited state properties of alizarin and its isomers. *Dye. Pigment.* 103, 202–213.
- Mitra, S., Singh, T. S., Mandal, A., Mukherjee, S., 2007. Experimental and computational study on photophysical properties of substituted o-hydroxy acetophenone derivatives: Intramolecular proton transfer and solvent effect. *Chem. Phys.* 342, 309–317.
- Nagy, E. M., Via, L. D., Ronconi, L., Fregona, D., 2010. Recent Advances in PUVA Photochemotherapy and PDT for the Treatment of Cancer 1863–1876.
- Nonell, S., Bravlavsky, S. E., 2000. Time-resolved singlet oxygen detection. *Methods Enzymol.* 319, 37-49.

- Palit, D. K., Pal H., Mukherjee T., Mittal, J. P., 1990. Photodynamics of the S1 state of some hydroxy- and amino-substituted naphthoquinones and anthraquinones. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 86, 3861-3869
- Rumie Vittar, N. B., Comini, L. R., Fernandez, I. M., Agostini, E., Núñez-Montoya, S. C., Cabrera, J. L., Rivarola, V. A., 2014. Photochemotherapy using natural anthraquinones: Rubiadin and Soranjidiol sensitize human cancer cell to die by apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 11, 182-192.
- Seo, J., Kim, S., Park, S. Y., 2004. Strong solvatochromic fluorescence from the intramolecular charge-transfer state created by excited-state intramolecular proton transfer. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11154-11155.
- Sellera, F. P., Nascimento, C. L., Ribeiro, M. S., 2017. Photodynamic therapy in veterinary medicine, from basics to clinical practice. Springer International Publishing.
- Sıdır, İ., Sıdır, Y. G., 2016. Solvatochromism and intramolecular hydrogen-bonding assisted dipole moment of phenyl 1-hydroxy-2-naphthoate in the ground and excited states. *J. Mol. Liq.* 221, 972-985.
- Skoog, D. A., Holler F. J., Nieman, T. A., 2001. Principios de análisis instrumental. McGraw-Hill.
- Turro, N. J., 1991. Modern molecular photochemistry. University science books.
- Valeur, B., 2001. Molecular fluorescence, Methods and Applications. Wiley-VCH Verlag.

CAPÍTULO 7

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

ANTECEDENTES

Resistencia antibacteriana

El problema generalizado de la resistencia a los antibióticos provocada por patógenos surgió a mediados del siglo XX y se ha convertido en un fenómeno global que ha contribuido sustancialmente a la carga económica del sistema sanitario (OMS, 2014; Hwang y Gums, 2016). Una serie de factores como prescripción médica inadecuada y excesiva de antibióticos, el uso de grandes cantidades de antibióticos en ganado, la expansión de la pobreza y el aumento de viajes internacionales posibilitaron una rápida diseminación de patógenos (Hamblin y Hasan, 2004; Núñez *et al.*, 2013; Hwang y Gums, 2016). Una “era post-antibiótica”, en la que las infecciones comunes y las heridas leves pueden matar, lejos de ser una fantasía apocalíptica, es en cambio una posibilidad muy real para el siglo XXI (OMS, 2014; Hwang y Gums, 2016).

En los últimos años se han desarrollado varias estrategias para frenar esta progresión y combatir la creciente preocupación por la resistencia a los antibióticos. Dichas estrategias se han centrado en la aplicación de programas de gestión antibacteriana, la prevención del uso indebido de antibióticos y la promoción del descubrimiento de nuevos fármacos antibacterianos (Hwang y Gums, 2016). Surgen entonces, una serie de investigaciones en busca de terapias antibacterianas alternativas a fin de combatir las infecciones incurables y resistentes a los antibióticos conocidos (Núñez *et al.*, 2013; Abd-El-Aziz *et al.*, 2017). Algunos ejemplos de terapias relativamente nuevas son bacteriófagos, péptidos antimicrobianos sintéticos o naturales, nanopartículas metálicas y terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA) (Hamblin y Hasan, 2004; Quinteros *et al.*, 2016).

Terapia fotodinámica antimicrobiana

La terapia fotodinámica (TFD) ha sido aplicada con éxito para el tratamiento de enfermedades locales como la degeneración macular, lesiones en la piel y el cáncer (Pelo *et al.*, 2011). Sin embargo, a mediados de 1990, los científicos comenzaron a estudiar la TFD por su potencial y potente efecto antimicrobiano (Hamblin, 2016). Así, surge una nueva aplicación de la TFD conocida como TFDA o Inactivación fotodinámica (IFD), en la cual se emplean

FS catiónicos o aniónicos, y luz para la inactivación de microorganismos (Maisch, 2007; Fu *et al.*, 2013) (Fig 7.1).

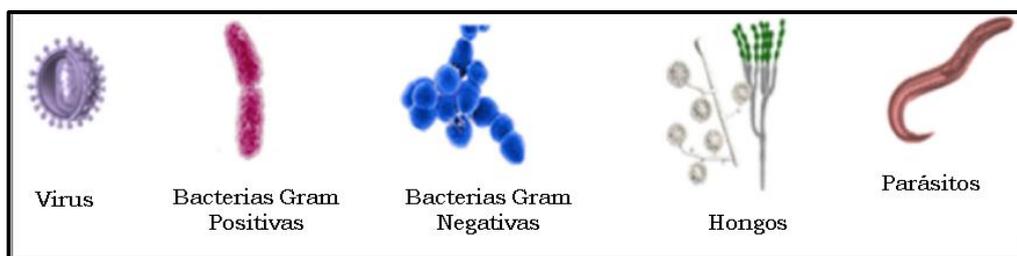


Figura 7. 1. Potenciales aplicaciones de la TFDA. (Adaptado de Hamblin, 2016).

Las ventajas de la TFDA como posible terapia antimicrobiana clínica se basa en que se obtienen buenos resultados independientemente del estado de resistencia a los antibióticos de las células microbianas y, además, no se ha demostrado que produzca resistencia (Craig *et al.*, 2014; Hamblin, 2016). Otra ventaja de la TFDA es que el FS se aplica tópica o localmente en el área infectada, garantizando la penetración del FS a la célula microbiana. La muerte de los microorganismos es rápida, evitando tanto el avance de la infección así como también los tratamientos prolongados con antimicrobianos convencionales (Hamblin, 2016).

Las plantas medicinales son recursos de probada eficacia para el desarrollo de nuevos fármacos y exhiben numerosas actividades biológicas interesantes (Kuete, 2010; Gavamukulya *et al.*, 2014). Generalmente, se comienza con el estudio de los extractos de las plantas, para luego poder llevar a cabo una purificación bioguiada de aquellos extractos que presentan actividad y hallar así los compuestos químicos activos.

Para cumplimentar el tercer objetivo específico de esta tesis, se propusieron las siguientes actividades:

- Estudiar la actividad antibacteriana de los extractos de *H. lycioides*, para luego realizar una purificación bio-guiada.
- Determinar la actividad de los compuestos puros aislados de los extractos más bioactivos.

METODOLOGÍA

Los procedimientos estándares elaborados bajo las normas del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), son adecuados para estudiar la

actividad antibacteriana. Estos proporcionan resultados cuantitativos, permiten el uso de pequeñas cantidades de compuestos o extractos de plantas, así como medio de cultivo, se aplican del mismo modo que se realiza para evaluar compuestos químicos puros sintéticos, y sus resultados finales, se obtienen en un tiempo máximo de 48 h (Rahman *et al.*, 2005; Kuete, 2010).

Los estudios de actividad antibacteriana se realizaron en colaboración con el laboratorio de microbiología del Depto. de Farmacia, bajo la dirección de la Dra. Paulina L. Páez.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antibacteriana en extractos de *H. lycioides*

Los resultados se muestran en la Tabla 7.1. Los extractos estudiados sobre cepas Gram positivas resultaron ser más activos en las cepas clínicas, *S. aureus* mr (metecilino resistente) y *S. aureus* ms (metecilino sensible), que en las cepas de referencia (ATCC), destacándose los extractos Ben y AcOEt.

Asimismo, el ensayo realizado sobre bacterias Gram negativas, determinó que sólo el extracto AcOEt inhibió el crecimiento de *P. mirabilis*. Estos resultados, pueden deberse a que esta clase de bacterias son por lo general más resistentes que las bacterias Gram positivas por la presencia de doble membrana celular (Vinoth *et al.*, 2012).

Tabla 7. 1. Determinación de CIM y CBM en extractos de *H. lycioides*.

	Especies bacterianas	Extractos							
		Hex		Ben		AcOEt		EtOH	
		CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Gram positivas	<i>S. aureus</i> mr cepa clínica	> 250	>250	250	250	250	>250	250	>250
	<i>S. aureus</i> ms 424 cepa clínica	> 250	>250	125	>250	15,6	62,5	> 250	> 250
	<i>S. aureus</i> ms 787 cepa clínica	> 250	>250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 250	>250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
Gram negativas	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	> 250	>250	> 250	> 250	> 250	>250	> 250	>250
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
	<i>E. coli</i> ATCC 35218	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
	<i>E. coli</i> cepa clínica	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
	<i>P. mirabilis</i> cepa clínica	> 250	> 250	> 250	> 250	250	> 250	> 250	> 250

Debido a que los extractos son mezclas complejas de compuestos químicos y que los mismos pueden estar en distintas proporciones, es necesario adoptar un criterio para poder determinar si se trata de un extracto activo o no. Se ha reportado que la actividad antibacteriana de extractos de una planta se considera significativa si la CIM < 100 µg/ml, moderada cuando 100 < CIM ≤ 625 µg/ml o débil para valores de CIM > 625 µg/ml (Sartoratto *et al.*, 2004; Kuete, 2010; Rubio-Moranga *et al.*, 2013). En este sentido, el extracto AcOEt presentó una actividad significativa sobre la cepa *S. aureus* ms, mientras que la actividad producida por los extractos Ben y AcOEt fue moderada sobre cepas de *S. aureus* mr y *P. mirabilis*.

Estos resultados son sumamente favorables, ya que los extractos poseen una composición química variada y, entre ellos, pueden ocurrir efectos tanto sinérgicos como antagónicos. Como se describió en el capítulo 3, de los extractos activos Ben y AcOEt, se aislaron e identificaron 7 AQs, las cuales podrían ser responsables del efecto observado.

Para recordar, en el caso del ext. bencénico se identificó lyc, pus, 2-OH-3-Me-AQ, het, sor, 5-clsor y bis. Y en el ext. AcOEt, determinamos la presencia de lyc, pus, 2-OH-3-Me-AQ, sor, bis y 7-clbis.

Estos resultados motivaron la realización de estudios de actividad antibacteriana sobre las nuevas AQs aisladas de *H. lycioides*, a fin de determinar si estos compuestos serían los responsables de la actividad observada en los extractos.

Actividad antibacteriana de compuestos puros

Determinación de CIM y CBM

En primera instancia, se determinó la CIM y CBM de las tres nuevas AQs aisladas: 5-clsor, 7-clbis y lyc. Como se puede observar en la Tabla 7.2, para cada AQ no se observan diferencias de CIM y CBM entre las cepas clínicas meticilino sensible y resistente.

Tabla 7. 2. Determinación de la CIM y CBM de las nuevas AQs

Compuesto	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		CBM ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>S. aureus ms</i>	<i>S. aureus mr</i>	<i>S. aureus ms</i>	<i>S. aureus mr</i>
lyc	31,25	31,25	62,5	62,5
7-clbis	125	125	250	250
5-clsor	62,5	62,5	125	125

Respecto a los valores de CIM observados, para compuestos puros se considera actividad significativa para una CIM por debajo de los 10 $\mu\text{g/ml}$, moderada entre 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ y baja cuando es mayor a 100 $\mu\text{g/ml}$ (Olivier *et al.*, 2016). Por lo cual, podemos decir que lyc y 5-clsor, presentaron actividad moderada sobre cepas de *S. aureus*, meticilino sensible y resistente, mientras que 7-clbis, tiene menor actividad respecto a los dos compuestos mencionados.

Estos resultados establecieron que la actividad observada en los extractos estaría estrechamente relacionada con la observada en compuestos puros. Previamente, en nuestro grupo de trabajo se estableció que sor y bis son compuestos activos frente *S. aureus* ATCC 29213, por lo cual podrían también estar contribuyendo al efecto observado, mientras que heterofilina y pustulina no presentan actividad sobre esta cepa bacteriana (Comini *et al.*, 2011).

Tratamiento de irradiación sobre cepas de *S. aureus ms*

En los capítulos 5 y 6, se demostró que las nuevas AQs son agentes FS que producen ERO mediante mecanismos Tipo I y II. Debido a que no se observan diferencias entre cepas sensibles y resistentes, se seleccionó *S. aureus ms* para realizar los primeros estudios de fotoinactivación de esta cepa. Para ello, se llevó a cabo un tratamiento de irradiación.

Durante este tratamiento, pudimos observar que la irradiación únicamente con lámpara actínica no tiene efecto sobre el desarrollo del microorganismo, ya que no existen diferencias significativas en el recuento realizado en ambas condiciones (Fig. 7.2 a 7.4). Respecto a los compuestos ensayados, el efecto bactericida de 7-clbis (Fig. 7.2) y lyc (Fig. 7.3) no fue fotoestimulado respecto al observado en oscuridad, mientras que 5-clsor, al finalizar el tratamiento de irradiación ($t=3$), logró una reducción de aproximadamente dos logaritmos en

las UFC/ml respecto del tratamiento en oscuridad (Rto. en luz: 6×10^4 UFC/ml; Rto. en osc: $4,4 \times 10^6$ UFC/ml) (Fig. 7.4).

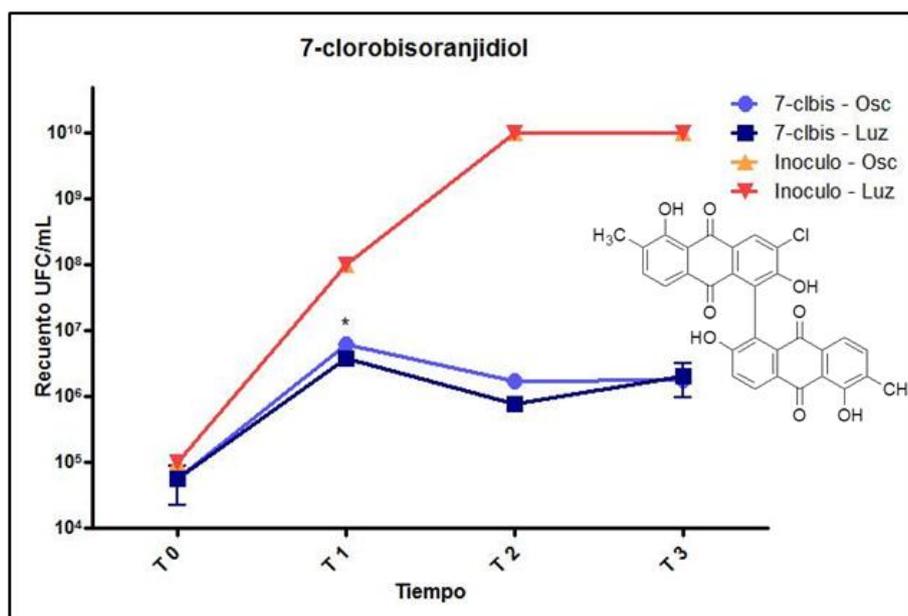


Figura 7. 2. Fotoinactivación de *S. aureus* ms empleando un tratamiento de irradiación con 7-clbis. * $p < 0,05$ vs 7-clbis Luz t1

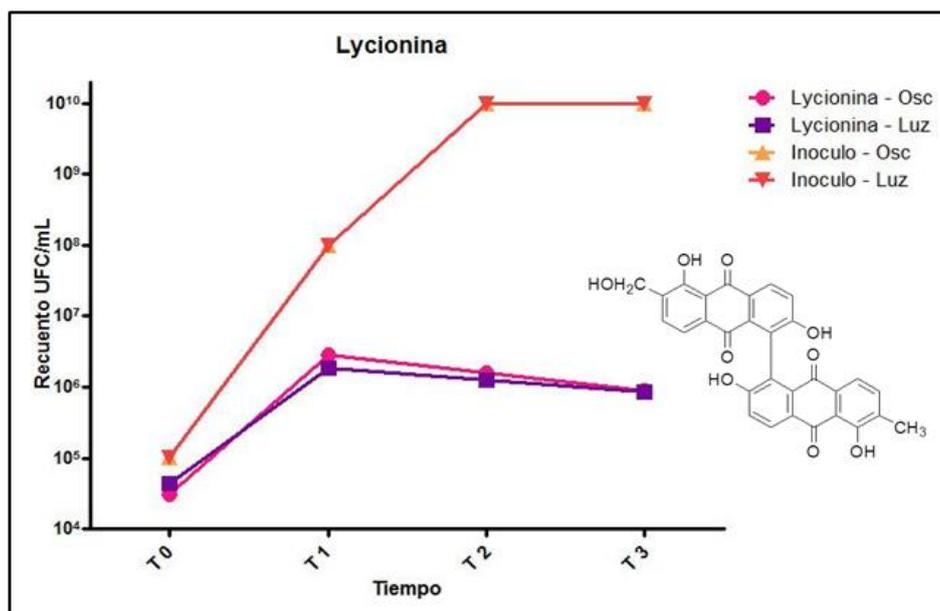


Figura 7. 3. Fotoinactivación de *S. aureus* ms empleando un tratamiento de irradiación con lyc.

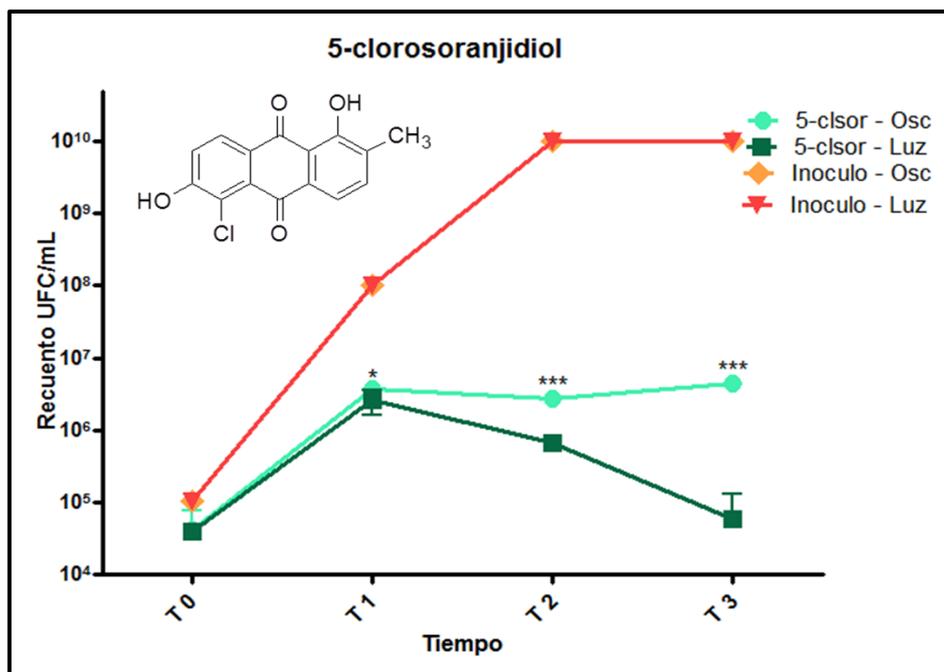


Figura 7. 4. Fotoinactivación de *S. aureus* ms empleando un tratamiento de irradiación con 5-clor.*<math>p < 0,05</math> vs 5-clor Luz t1; ***<math>p < 0,001</math> vs 5-clor Luz t2 y t3.

Existen diferentes mecanismos, por los cuales ciertas sustancias exhiben actividad antimicrobiana. Uno de ellos es la producción de ERO. Se realizaron mediciones de producción de estas especies durante el ensayo empleando el ensayo del NBT, en condiciones de oscuridad y luz, a fin de poder asociar los resultados obtenidos a la generación de ERO. El efecto observado para 5-clor, podría explicarse por un incremento en la producción de ERO, de aproximadamente 487 veces respecto de $t=0$ (Fig. 7.5), teniendo en cuenta que a $t=3$, el recuento disminuye aproximadamente dos logaritmos. La producción de ERO a $t=3$ es notablemente diferente en la condición de irradiación respecto a la observada en la oscuridad (**<math>p < 0,001</math> vs 5-clor osc), lo cual es un dato importante de destacar teniendo en cuenta que a este tiempo hay un reducción significativa del número de células viables.

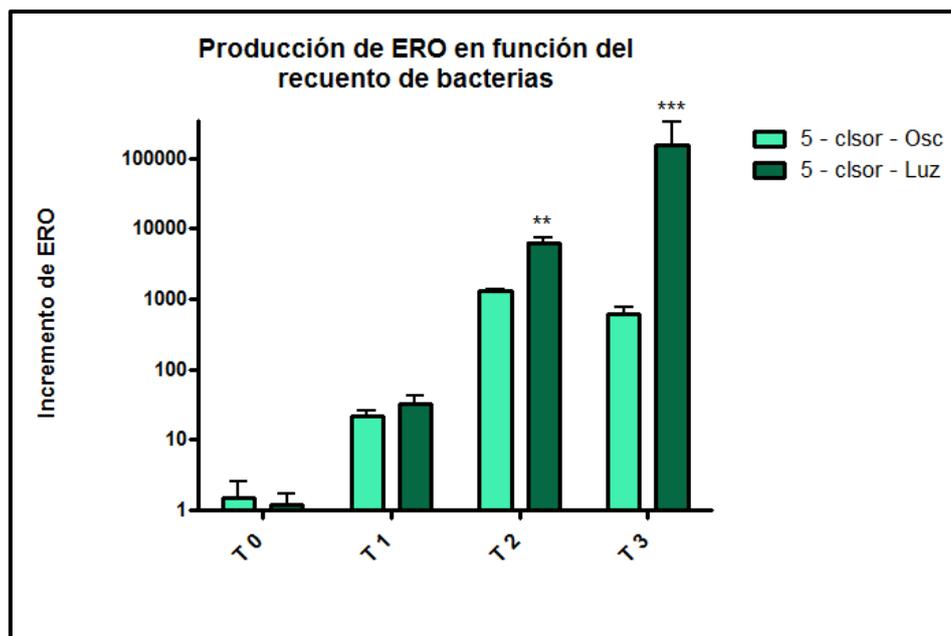


Figura 7. 5. Producción de ERO en función del recuento de bacterias. **p<0,01 vs 5-clsor osc; ***p<0,001 vs 5-clsor osc.

CONCLUSIONES PARCIALES

El estudio de la actividad antibacteriana de extractos permitió determinar que los extractos Bencénico y Acetato de Etilo resultaron ser los más bioactivos frente a tres cepas de todos los microorganismos ensayados, siendo sus principales constituyentes químicos los derivados antraquinónicos. De los mismos, se aislaron hasta el momento 7 AQs de las cuales tres resultaron ser estructuras nuevas.

Debido a que los extractos que poseen buena actividad antibacteriana *in vitro*, AcOEt y Ben, poseen una amplia variedad de AQs, podemos concluir que existe una fuerte relación entre la actividad antibacteriana y la composición de AQs en los extractos.

Respecto a los ensayos preliminares de actividad antibacteriana de AQs puras, podemos concluir que lyc es el compuesto más activo en oscuridad aunque no pudo ser fotoactivado en las condiciones de irradiación ensayadas. Por otro lado, el efecto antibacteriano de 5-clsor se vió incrementado notablemente al ser fotoestimulado, por lo que esta nueva AQ induce a nuevos estudios, modificando condiciones como la concentración, la fuente de luz o el tratamiento de irradiación, a fin de optimizar su actividad antibacteriana fotoestimulada. De las tres AQs ensayadas, 5-clsor se perfila como un buen agente FS aplicable en TFDA.

REFERENCIAS

- Abd-El-Aziz, A.S., Agatemor, C., Etkin, N., 2017. Antimicrobial resistance challenged with metal-based antimicrobial macromolecules. *Biomaterials* 118, 27–50.
- Comini, L. R., Núñez Montoya, S. C., Páez, P. L., Argüello, G. A., Albesa, I., Cabrera, J. L., 2011. Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 102, 108-114.
- Craig, R. a, McCoy, C.P., Gorman, S.P., Jones, D.S., 2014. Photosensitisers - the progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12, 85–101.
- Fu, X.-J., Fang, Y., Yao, M., 2013. Antimicrobial photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Biomed Res. Int.* 2013, 159157.
- Gavamukulya, Y., Abou-Elella, F., Wamunyokoli, F., AEl-Shemy, H., 2014. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). *Asian Pac. J. Trop. Med.* 7, S355–S363.
- Hamblin, M.R., Hasan, T., 2004. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 3, 436–50.
- Hamblin, M.R., 2016. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 33, 67–73.
- Hwang, A.Y., Gums, J.G., 2016. The Emergence and Evolution of Antimicrobial Resistance: Impact on a Global Scale. *Bioorg. Med. Chem.* 24, 1–6.
- Kuete, V., 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. *Planta Med.* 76, 1479–1491.
- Maisch, T., 2007. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future ? *Lasers Med. Sci.* 83–91.
- Núñez, S.C., Ribeiro, M., Garcez, A., 2013. PDT - Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia, São Paulo, Brasil, Elsevier.
- Olivier, M.T., Muganza, F.M., Shai, L.J., Gololo, S.S., Nemutavhanani, L.D., 2016. Phytochemical screening, antioxidant and antibacterial activities of ethanol extracts of *Asparagus suaveolens* aerial parts. *South African J. Bot.* 108, 41–46.
- Organización Mundial de la Salud, 2014. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. Organización Mundial de la Salud, France.
- Peloi, L.S., Biondo, C.E.G., Kimura, E., Politi, M.J., Lonardoní, M.V.C., Aristides, S.M.A., Dorea, R.C.C., Hioka, N., Silveira, T.G.V., 2011. *Exp. Parasitol.* 128, 353–356.
- Quinteros, M.A., Cano Aristizábal, V., Dalmaso, P.R., Paraje, M.G., Páez, P.L., 2016. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol. Vitro.* 36, 216–223.
- Rahman, A., Choudhary, I., Thomsen, W., 2005. *Bioassay Techniques for Drug Development*, Harwood Academic Publishers, Netherlands.
- Rubio-Moraga, Á., Argandoña, J., Mota, B., Pérez, J., Verde, A., Fajardo, J., Gómez-Navarro, J., Castillo-López, R., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J. Ethnopharmacol.* 148, 287–296.
- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., Rehder, V. L. G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 35, 275–280.

Vinoth, B., Manivasagaperumal, R., Rajaravindran, M., 2012. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of *Azadirachta Indica* a Juss. *Int. J. Res. Plant Sci.* 2, 50–55.

CAPÍTULO 8

FOTOINACTIVACIÓN DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

FOTOINACTIVACIÓN DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

ANTECEDENTES

Breve descripción de Leishmaniosis

Leishmaniosis es una enfermedad desatendida de mayor prevalencia en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Silva *et al.*, 2015; Stebut, 2015), provocada por un parásito del género *Leishmania*. Se la considera una enfermedad de la pobreza (Pace, 2014) y según la Organización Mundial de la Salud (OMS) más de 12 millones de personas en 88 países están infectadas y alrededor de 350 millones de personas están en riesgo (Pelo *et al.*, 2011).

Es una zoonosis común, cuyo reservorio se encuentra en animales domésticos (perros y gatos) y salvajes (roedores, marsupiales, entre otros) y es transmitida por la picadura de insectos (vectores), pertenecientes al género *Lutzomyia* (Nuevo Mundo: América) y *Phlebotomus* (Viejo Mundo: Europa, Asia y África) (Fig. 8.1.I) (Aureliano *et al.*, 2014). El agente etiológico pertenece al género *Leishmania*, subgénero *Leishmania* y *Viannia*, siendo las especies más comunes *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, y *L. amazonensis* (Pelo *et al.*, 2011). En Argentina, ésta enfermedad es endémica del noroeste, donde se encuentra ampliamente distribuida y es causada principalmente por *L. braziliensis* (OMS Argentina, 2010).

Leishmania spp. presenta dos morfologías que se relacionan con el ciclo biológico del parásito: amastigota (intracelular) (Fig. 8.1.II) y promastigota (extracelular) (Fig. 8.1.III) (Pace, 2014).

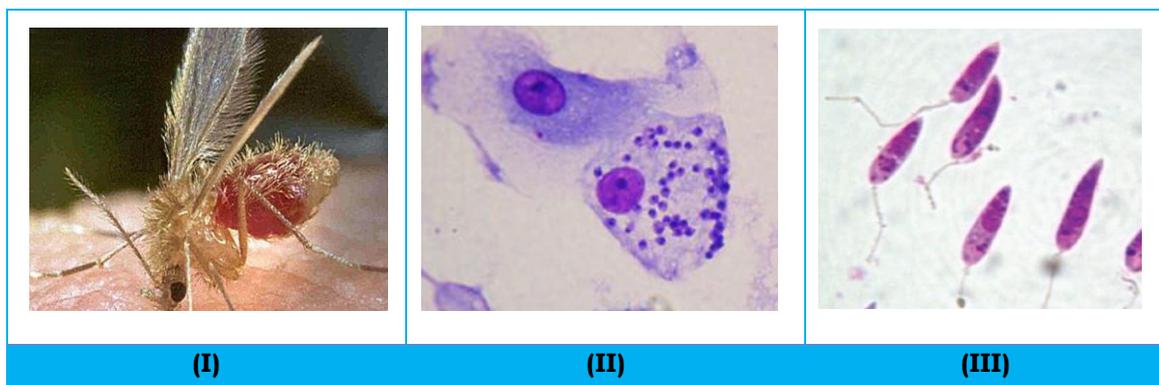


Figura 8. 1. (I) Imágenes del vector *Phlebotomus papatasi* (Gathany, 2006). (II) Formas amastigota, dentro del macrófago (Barreto, 2008). (III) Forma Promastigota (Gupta y Nishi, 2011).

Ciclo Biológico

Cuando una persona o animal son picados, el vector inocula desde la glándula salival la forma promastigota de *Leishmania spp.* Los parásitos son internalizados por células del sistema fagocítico mononuclear (SFM) donde obligatoriamente son transformados a la forma amastigote, especializada y perfectamente adaptada para sobrevivir en el fagolisosoma de la célula. Allí, los parásitos se multiplican y tras su liberación, infectan otras células (Stebut, 2015).

El ciclo biológico del parásito se completa cuando un mosquito vuelve a ingerir la forma amastigota a través de la picadura a una persona infectada, que luego se transforman de nuevo en la forma promastigota en los intestinos del insecto (Fig. 8.2) (Stebut, 2015).

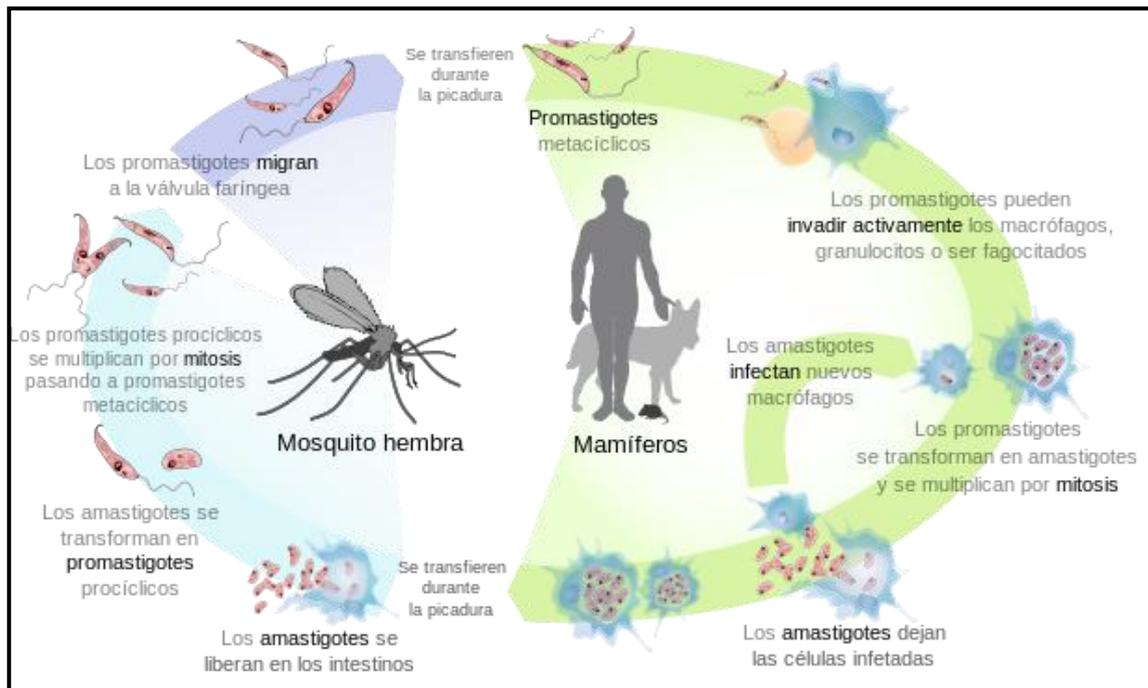


Figura 8. 2. Ciclo biológico de *Leishmania* (Villareal, 2008)

Manifestaciones clínicas

Las diversas manifestaciones clínicas de *Leishmania* dependen de la especie infectante y la respuesta del sistema inmune del huésped, afectando principalmente a niños y ancianos (Stebut, 2015).

Un tipo de Leishmaniosis se conoce como Visceral (LV), en la cual se ven afectados órganos internos como bazo, hígado, órganos linfáticos y médula ósea. Los pacientes pueden presentar fiebre, anorexia, pérdida de peso,

distensión abdominal y debilidad que progresa de semanas a meses. En la mayoría de los casos, es fatal (Pace, 2014).

Otra manifestación clínica es la Leishmaniosis Cutánea (LC) que puede producir lesiones de tipo ulcerosas con bordes elevados en áreas del cuerpo expuestas y accesibles a los flebótomos, como la cara, el cuello y las extremidades. La difusión de *Leishmania* proveniente de una infección cutánea puede conducir al desarrollo de Leishmaniosis mucocutánea, en donde meses a años más tarde se genera una desfiguración grave y destrucción de los tejidos de la cara y las mucosas (Hernandez *et al.*, 2012).

Medicamentos empleados en la actualidad

Los antimonios pentavalentes, la anfotericina B y la miltefosina han sido el tratamiento de elección para todas las formas de leishmaniosis. Sin embargo, desventajas como el alto costo, la duración del tratamiento y los efectos tóxicos asociados, promueven la falta de cumplimiento del tratamiento o su abandono, y en consecuencia, la aparición de cepas resistentes o poco sensibles al medicamento. Estos factores han estimulado la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean económicas, sin efectos adversos y con resultados cosméticos favorables (Taylor *et al.*, 2011).

Terapia fotodinámica antimicrobiana

Como se explicó previamente en el capítulo 7, la TFDA surge como una alternativa terapéutica para infecciones localizadas producidas por microorganismos, entre ellos, parásitos como *Leishmania* (Maisch, 2007; Hamblin y Hasan, 2014). Hasta el momento, se han estudiado algunos FS sintéticos obteniendo resultados satisfactorios como las porfirinas, FS catiónicos, como el azul de metileno, y aniónicos para la erradicación de *L. donovani* y *L. tropica*. Por otro lado, se han encontrado reportes de estudios empleando derivados de ftalocianinas utilizados contra *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. chagasi*. (Pelo *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2016), así como también fueron informados estudios que emplearon clorinas en promastigotes de *L. major* y *L. braziliensis* (Pinto *et al.*, 2016).

Por su parte, el reino vegetal constituye una fuente inagotable de compuestos bioactivos que merece ser indagada en la búsqueda de compuestos naturales con actividad leishmanicida. Si bien se han comenzado a realizar estudios en esta área, son pocos los FS obtenidos del reino vegetal que han sido

estudiados hasta el momento. Entre ellos, podemos mencionar hipericina, una molécula natural que genera eficientemente ERO, lo cual posiblemente la hace un buen agente leishmanicida al ser aplicado en los tejidos infectados (Taylor *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta que hemos comprobado que las AQS aisladas de *H. lycioides* son estructuras fotosensibilizadoras, se propuso estudiar la fotoinactivación de *L. amazonensis* empleando las siguientes AQS: sor, 5-clsor, bis, 7-clbis y lyc. Estos ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de terapia óptica del centro de Lasers y aplicaciones (LATO-CLA) perteneciente al Instituto de pesquisas energéticas y nucleares (IPEN), San Pablo, Brasil, bajo la dirección de la Dra. Martha Simões Ribeiro.

Para cumplimentar con el tercer objetivo específico propuesto en la tesis, se propusieron las siguientes actividades:

- Evaluar la fotoinactivación de *Leishmania amazonensis* empleando AQS purificadas de *H. lycioides*, bajo dos condiciones experimentales: oscuridad e irradiación, a fin de estudiar su efectividad para ser aplicados en TFDA.
- Estudiar la captación de las AQS por promastigotes de *L. amazonensis*.
- Realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro* de las AQS estudiadas en líneas celulares de fibroblastos.

METODOLOGÍA

Método de bioluminiscencia

Para determinar la actividad metabólica de *Leishmania amazonensis* luego de la irradiación con LED, se empleó el método de bioluminiscencia. El mismo se basa en reacciones bioquímicas que se producen en las células metabólicamente activas. Las enzimas involucradas en este proceso, llamadas luciferasas, son oxigenasas que utilizan oxígeno molecular y ATP para oxidar un sustrato (luciferina), con la formación de una molécula electrónicamente excitada que emite fotones cuando decae a un estado menor energía (Fig. 8.3) (Sabino *et al.*, 2014).

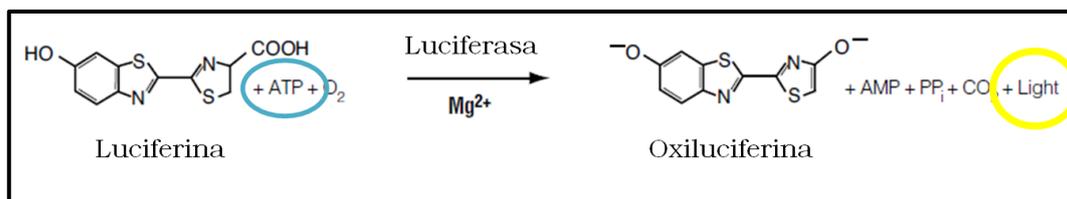


Figura 8. 3. Reacción química de bioluminiscencia

Para llevar a cabo este ensayo, se requiere el empleo de una especie de *Leishmania amazonensis* genéticamente modificada que exprese la enzima luciferasa. Se ha reportado en bibliografía, que tanto *L. amazonensis* Wild type (La-WT) y *L. amazonensis* transfectada (La-LUC) son igualmente sensibles a Anfotericina B. Además, el patrón clínico de desarrollo de la lesión luego de la infección con las líneas transgénicas (La-LUC) es similar a la lesión observada después de la infección con la cepa Wild type (La-WT) (Reimão *et al.*, 2013), por lo cual los resultados pueden ser extrapolados para líneas no transgénicas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de la concentración de las AQs a ensayar

A fin de determinar la concentración de AQ adecuada a ensayar, se empleó sor como FS de referencia, puesto que todas las AQs estudiadas son derivados de esta estructura. Se prepararon soluciones en un rango de concentraciones entre 2,5-40 μM . Se evaluó la actividad metabólica en condiciones de oscuridad y de irradiación empleando LED azul en una dosis de 27 J/cm².

Como podemos observar en la Fig. 8.4, la menor concentración ensayada 2,5 μM , presenta una actividad cercana al 100% en oscuridad, similar a la observada en el control negativo. Asimismo, se observa que bajo condiciones de irradiación, a la concentración mencionada, se logra una reducción de la actividad cercana al 90% y similar a la producida por el control positivo.

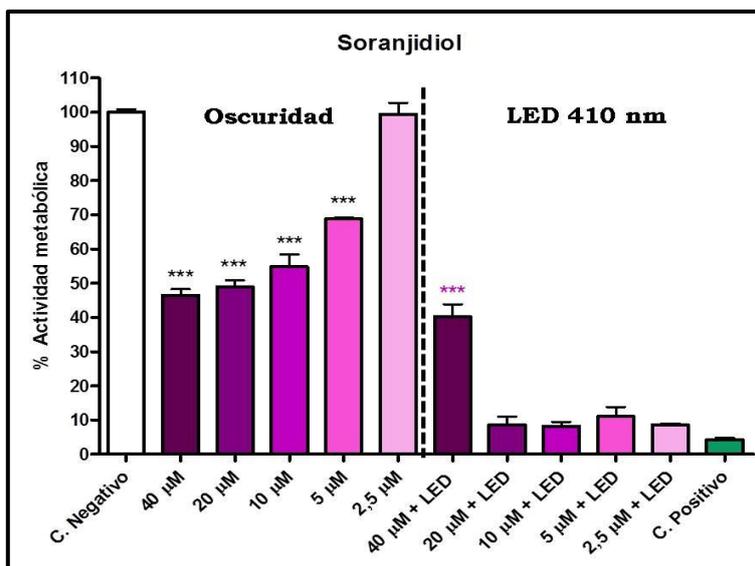


Figura 8. 4. Determinación de la concentración de Sor a la cual se obtiene la mayor reducción de la actividad metabólica. ***p<0,001 vs C. Negativo - *** p<0,001 vs C. Positivo

Estos resultados, permitieron estimar la concentración adecuada para estudiar la totalidad de las AQs. Se seleccionaron entonces dos concentraciones: 2,5 y 5 µM, a fin de determinar la toxicidad sobre el parásito en oscuridad, tendiente a que sea lo más cercana al control negativo.

Como se puede observar en la Fig. 8.5, todas las AQs presentan un porcentaje de actividad metabólica cercana al 90 % a 2,5 µM, a la menor concentración ensayada. Por lo cual, se seleccionó esta concentración para realizar las curvas de muerte de La-LUC.

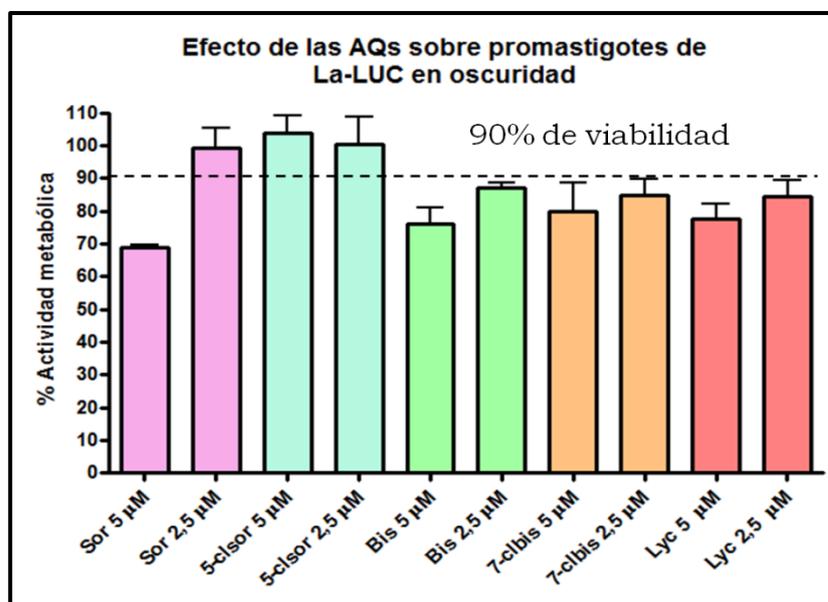


Figura 8. 5. Evaluación del efecto de las AQs sobre promastigotes de La-LUC en oscuridad

Fotoinactivación de La-LUC empleando LED azul y AQs

En la Fig. 8.6 se muestra el efecto de la fotoinactivación de La-LUC empleando las AQs monoméricas, sor y 5-clsor, a diferentes tiempos de irradiación (3, 6, y 9 min). Como se puede observar ambas tienen un comportamiento similar, ya que a medida que se incrementa el tiempo de irradiación, se logra reducir la actividad metabólica hasta alcanzar un porcentaje por encima del 90% y similar al del control positivo, transcurridos los 9 min de irradiación. El grupo LED 9 min de cada AQ y el control positivo no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

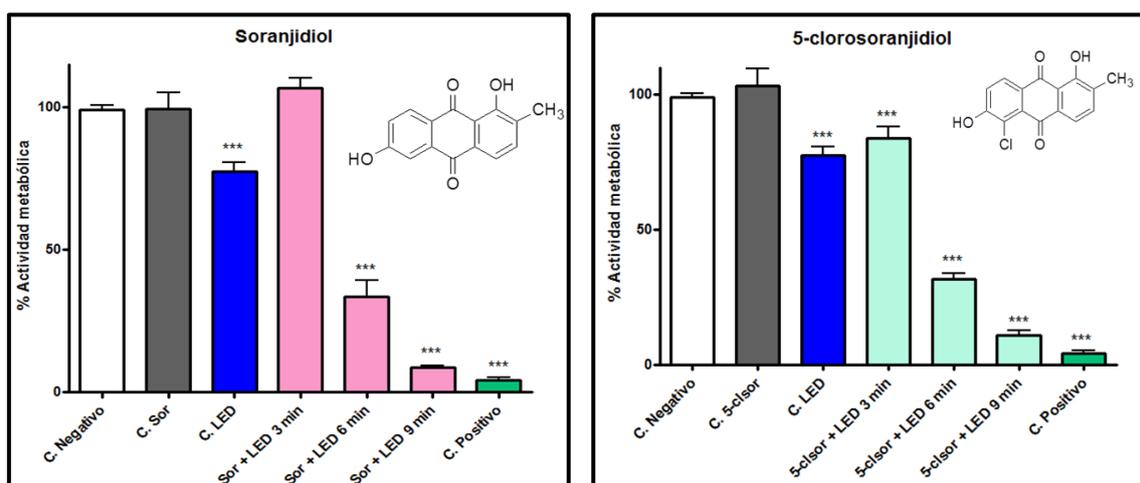


Figura 8. 6. Efecto fotodinámico de las AQs monoméricas sobre promastigotes de La-LUC.
***p<0,001 vs control negativo

El mismo comportamiento de las AQs monoméricas se observó sólo para una de las AQs diméricas, bis, AQ que logró reducir la actividad metabólica en un porcentaje similar (Fig 8.7).

Sin embargo, lyc y 7-clbis (Fig. 8.8) sólo lograron reducir la actividad metabólica en un porcentaje similar al obtenido con el grupo que fue tratado sólo con luz, control LED, tras ser irradiadas durante 9 min.

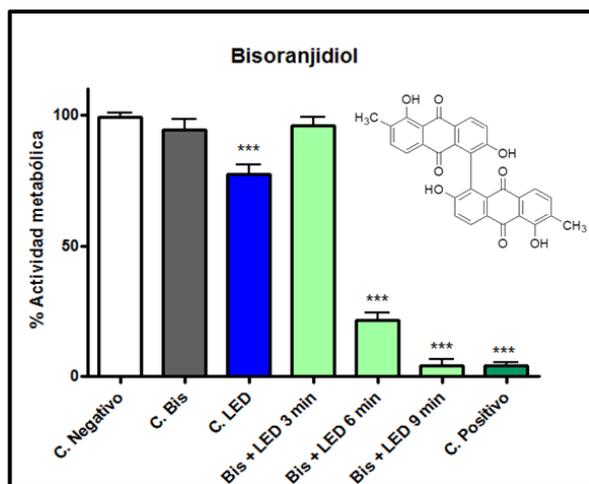


Figura 8. 7. Efecto fotodinámico de bis sobre promastigotes de La-LUC. ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ vs control negativo

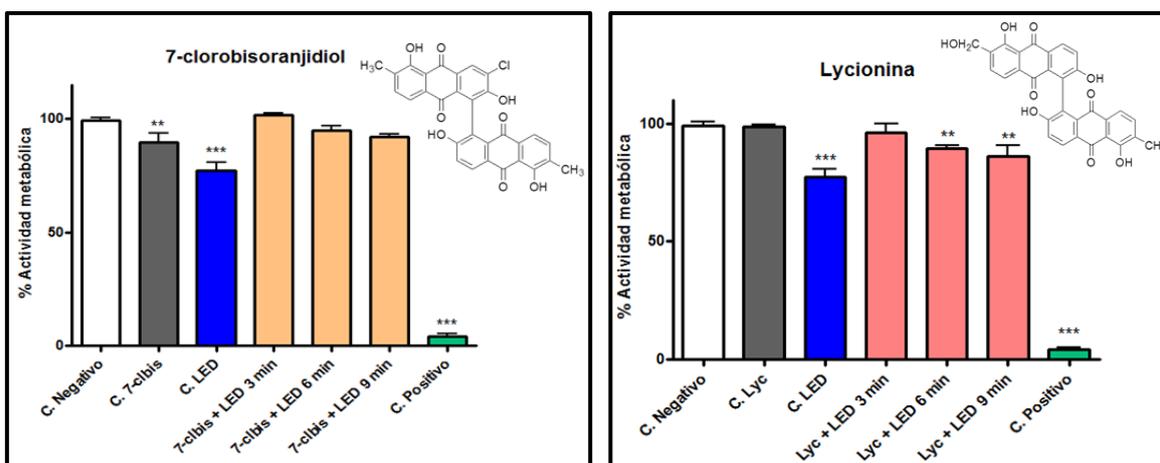


Figura 8. 8. Efecto fotodinámico de 7-clbis y lyc sobre promastigotes de La-LUC. ** $p < 0,01$ / *** $p < 0,001$ vs control negativo

Al comparar la actividad metabólica en función dosis de energía (Fig. 8.9), se pudo observar que con la aplicación de una dosis de 27 J/cm², se alcanzaron resultados similares que con 36 J/cm², ya que no existen diferencias estadísticas al comparar ambas dosis para las AQs que mostraron fotoinactivación de La-LUC (sor, 5-clsor y bis). Además, de este gráfico se desprende que si bien lyc y 7-clbis no muestran efecto de fotoinactivación como las demás AQs, lyc muestra una tendencia a la reducción de la actividad metabólica.

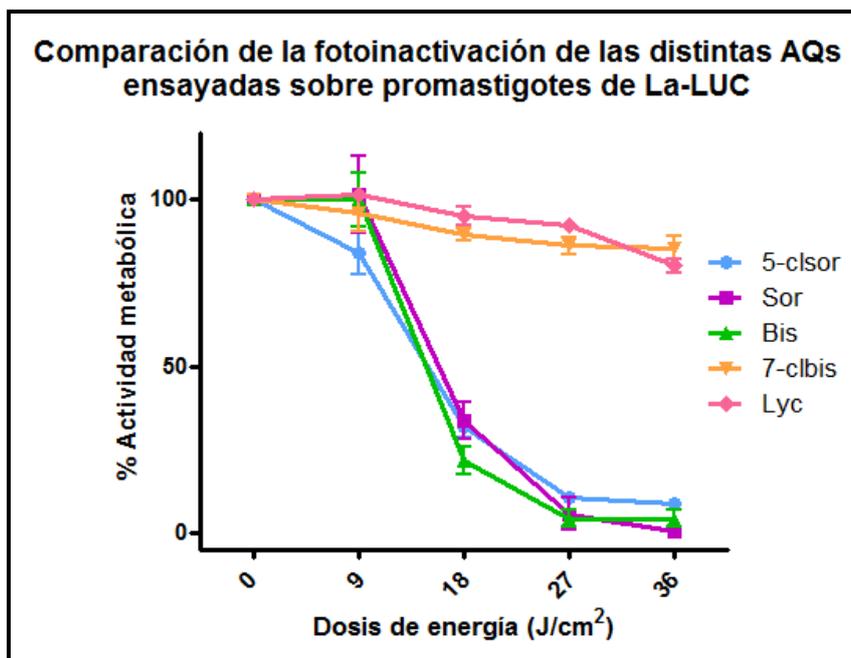


Figura 8. 9. Comparación de la fotoinactivación de La-LUC de las 5 AQs ensayadas en función de la dosis de energía aplicada.

Fotoinactivación de La-LUC empleando 5-clsor y LEDs diferentes

El estudio de los espectros UV-Vis en PBS de las AQs ensayadas (Fig. 8.10), reveló la presencia de un máximo entre 410 - 420 nm para 4 de las AQs en estudio: sor, bis, lyc y 7-clbis, mientras que 5-clsor, presentó un máximo a 480 nm, desplazado hacia el rojo y 7-clbis otro máximo a 520 nm.

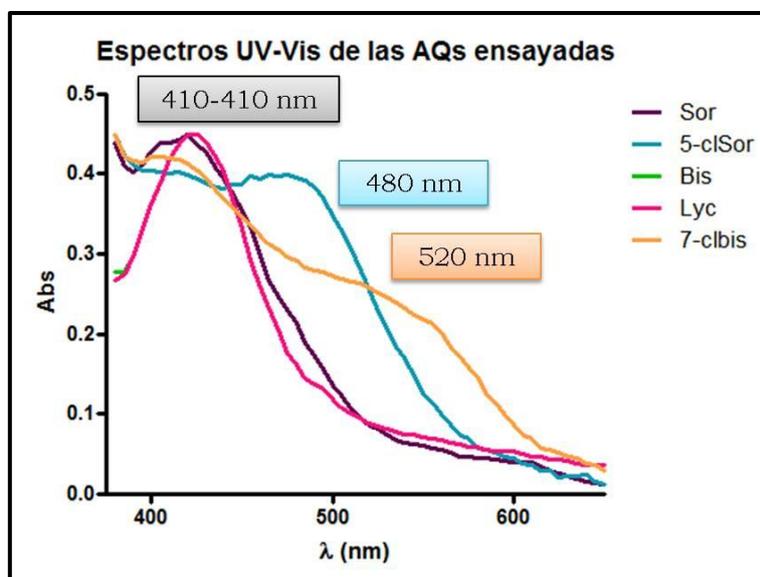


Figura 8. 10. Espectros UV-Vis de las 5 AQs ensayadas en PBS.

Se seleccionó 5-clsor, debido a que resultó ser una de las AQs activas, para realizar un estudio comparativo, en el cual se evaluó la fotoinactivación de La-LUC empleando 3 LEDs con diferentes máximos de emisión: LED (410 ± 10) nm, LED (450 ± 20) nm y LED (520 ± 20) nm.

Los resultados muestran que el empleo de LED con máximo de 450 nm no posee ningún efecto sobre la actividad metabólica de La-LUC, mientras que los LED con máximos a 410 y 520 nm, reducen aproximadamente entre 85 y 90 % la actividad de La-LUC respectivamente, respecto al control negativo (Fig. 8.11).

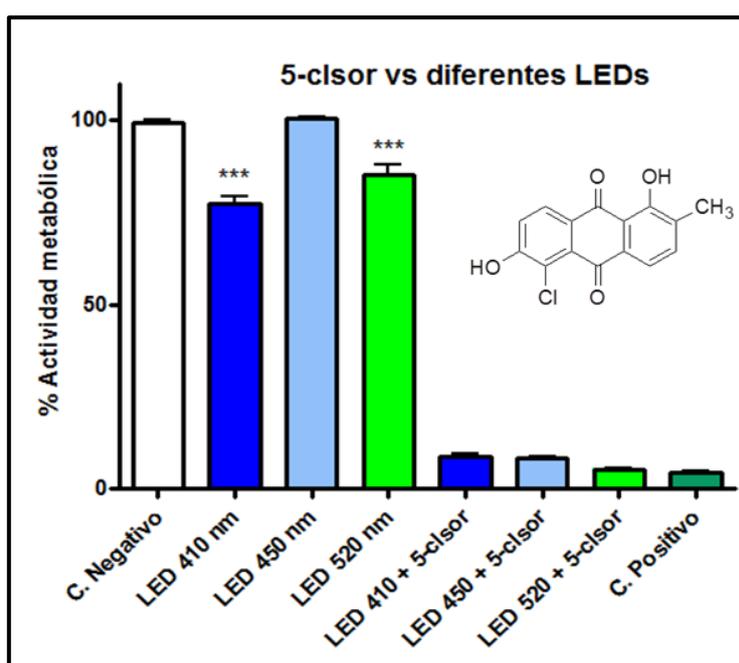


Figura 8. 11. Fotoinactivación de La-LUC empleando diferentes LEDs y 5-clsor. ***p<0,001 vs control negativo

La asociación de los diferentes LEDs con 5-clsor, mostró resultados interesantes, puesto que se logró reducir la actividad por encima del 90% en las tres condiciones estudiadas. Además, no existen diferencias estadísticamente significativas entre la asociación de 5-clsor a los diferentes LEDs y el control positivo.

Estos resultados posicionan a 5-clsor como un FS versátil, ya que se puede obtener similar efecto empleando cualquiera de los tres LEDs. Sin embargo, cabe destacar, que el empleo del LED verde (520 nm) es sumamente favorable puesto que presenta mayor poder de penetración en los tejidos vivos, respecto al LED azul (Castano *et al.*, 2004; Gilaberte., 2006). Cuando la luz ingresa en

un tejido vivo, pueden ocurrir fenómenos tanto de absorción como dispersión. La absorción está dada por cromóforos endógenos como hemoglobina, mioglobina y agua. Por otra parte, la dispersión es un factor importante ya que determina la penetración de la luz (Castano *et al.*, 2004). El empleo de este tipo de LED no sólo permite garantizar hasta 2,5 mm de penetración, sino también la posibilidad de ser utilizado en tejidos con pus (Arenas *et al.*, 2013).

Estudio de captación de las antraquinonas

A partir de los resultados obtenidos de la fotoinactivación de La-LUC, se postuló la hipótesis de que la diferencia de actividad observada en las AQs ensayadas, podría deberse a una diferencia en la captación de estos compuestos por parte del parásito.

El ensayo de captación muestra que a los 10 min de incubación (PIT: pre-irradiation time), se observa una mayor fluorescencia intracelular (IC-10 min) respecto a la extracelular (EC-10 min) en todas las AQs en estudio. Sin embargo, transcurridos los 22 min de incubación, la fluorescencia intracelular (IC -22 min) disminuye en todos los casos, mientras que la fluorescencia extracelular (EC-22 min) se incrementa para 7-clbis, sor y 5-clsor, resultado que es esperado, pero se mantiene igual para bis y lyc (Fig. 8.12).

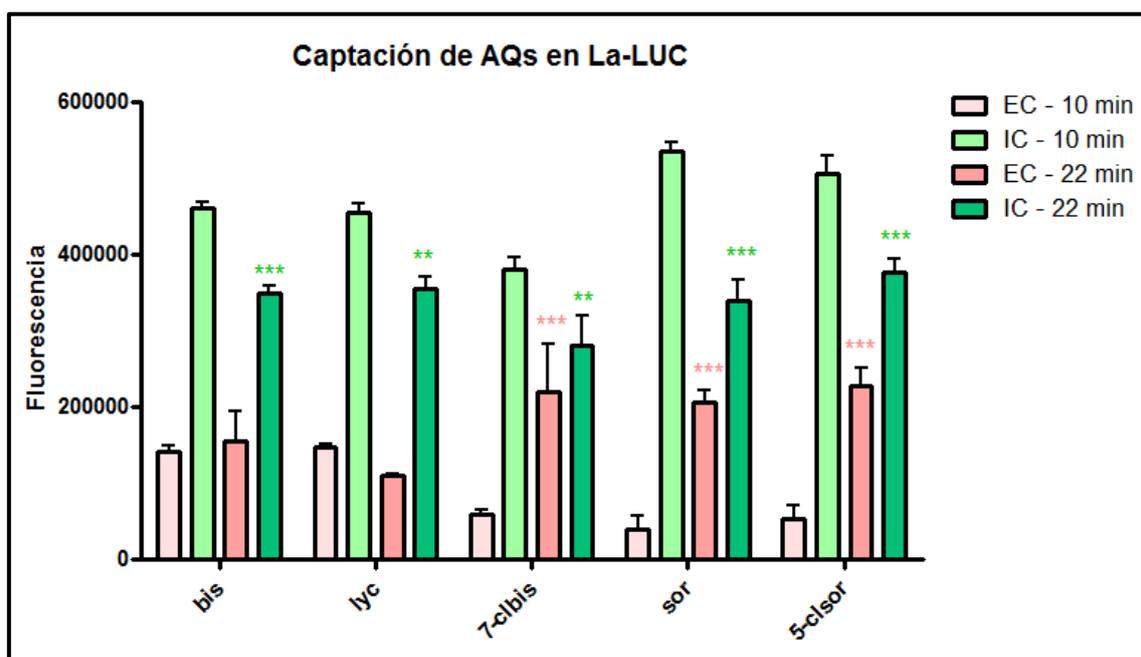


Figura 8. 12. Estudio de captación de AQs por La-LUC. ***p<0,001 vs EC 10 min. ***p<0,001 vs IC 10 min; **p<0,01 vs IC 10 min.

Esto indicaría que a los 10 min, se alcanza la mayor concentración intracelular de AQs (PIT) y luego, mediante algún mecanismo de resistencia, el

parásito comienza a liberar al FS al espacio extracelular. Además, podría indicar la interacción de lyc y bis con biomoléculas, ya que al disminuir la fluorescencia IC-22 min, debería incrementarse la EC-22 min y esto no sucede.

Por otro lado, podríamos pensar que la captación de las biAQs, es menor que la captación de las monoAQs. Sin embargo, los resultados obtenidos, se correlacionan con los Φ_F obtenidos mediante estudios fotofísicos (pág. 109), en los cuales las monoAQs presentan Φ_F mayores a los observados en las biAQs.

Por lo tanto, estos resultados permitieron determinar que a los 10 min de incubación, se alcanza una mayor concentración intracelular de AQs que a los 22 min, lo cual indica que el PIT empleado en el ensayo de fotoinactivación de La-Luc es el adecuado. Sin embargo, no se pudo correlacionar la captación de las AQs con la fotoinactivación observada, para lo cual deberán realizarse otros estudios.

Estudio de citotoxicidad de AQs en línea celular de fibroblastos FN1

En la búsqueda de nuevas estructuras bioactivas, es esencial establecer la toxicidad de las mismas en líneas celulares a fin de determinar la seguridad en su uso (Konigheim *et al.*, 2012). Las AQs serían potenciales agentes FS para ser aplicados en TFDA para el tratamiento de LC, por lo que se decidió evaluar la citotoxicidad de las AQs en líneas celulares de fibroblastos.

Como podemos observar en la Fig. 8.13, todas las AQs mantienen un porcentaje de actividad mitocondrial similar al que presenta el control negativo, ya que no se observan diferencias estadísticamente significativas, a excepción de 5-clsor que sí presenta diferencias estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

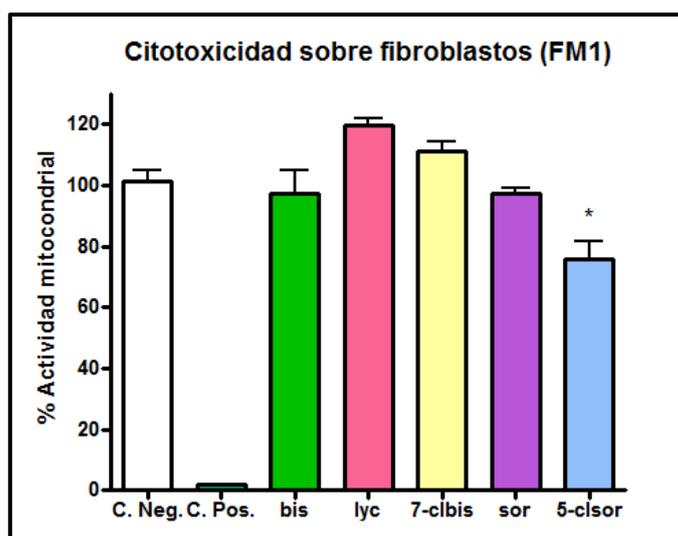


Figura 8. 13. Evaluación de la citotoxicidad de las AQs sobre líneas celulares de fibroblastos FN1. * $p < 0,05$ vs control negativo.

Teniendo en cuenta las estructuras que producen fotoinactivación de La-LUC, bis y sor son activas a una concentración que no resulta tóxica para la línea celular de fibroblastos. Sin embargo, 5-clsor presenta actividad a una dosis subtóxica, alrededor del 80% de actividad mitocondrial (Konigheim *et al.*, 2012). En el caso particular de esta última AQ, a fin de evitar efectos tóxicos, se deberían testear concentraciones menores de modo tal de lograr un efecto terapéutico a la máxima concentración no citotóxica (90% de actividad mitocondrial) (Liu *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES PARCIALES

Se desarrolló un nuevo protocolo de trabajo empleando la técnica de bioluminiscencia, la cual es favorable por su sensibilidad y rapidez en la lectura de los ensayos.

Tres de las 5 AQs estudiadas, sor, bis y 5-clsor, mostraron fotoinactivación de promastigotes de La-LUC, a una concentración de 2,5 μM , tras ser irradiadas con una dosis de 27 J/cm^2 . Además, 5-clsor presentó un efecto fotodinámico similar tras ser irradiada con diferentes LEDs, incluso LED verde, que presenta mayor poder de penetración en los tejidos vivos. Estos efectos se consiguen con tiempos de irradiación de 9 – 12 minutos (Fig. 8.9), período de irradiación en el que estas estructuras no presentan modificaciones en sus estructuras (fotoblanqueo), como se determinó en el capítulo 6.

El estudio de captación de las AQs en La-Luc, mostró que a los 10 min se alcanza la máxima concentración de AQ dentro del parásito. Sin embargo, no

se pudo correlacionar la diferencia en la actividad observada con la captación de las AQs ensayadas, para lo cual será necesario realizar otros estudios.

Además, se demostró que sor y bis no presentan citotoxicidad sobre las líneas celulares de fibroblastos FM1, en tanto que 5-clsor a la concentración ensayada mantiene un 80% de la actividad mitocondrial.

En conclusión, bis, sor y 5-clsor, serían potenciales agentes FS con potencial aplicación en la Inactivación Fotodinámica de *Leishmania amazonensis*, específicamente en el tratamiento de leishmaniosis cutánea.

REFERENCIAS

- Arenas, Y., Monro, S., Shi, G., Mandel, A., McFarland, S., Lilge, L., 2013. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Ru(II)-based type I/type II photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10, 615–625.
- Aureliano, D.P., Ribeiro, M.S., Lindoso, J.A.L., Pogliani, F.C., Sellera, F.P., Song, D., Baptista, M.S., 2014. Leishmaniasis - Trends Epidemiol. *Diagnosis Treat.* 1, 394 – 412.
- Barreto, V., 2008. <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=315&sid=32>.
- Castano, A. P., Demidova, T. N., Hamblin, M. R., 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1, 279-293.
- Gathany, J., 2006. <https://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=10277>
- Gilaberte, Y., Serra-Guillén, C., De Las Heras, M. E., Ruiz-Rodríguez, R., Fernández-Lorente, M., Benvenuto-Andrade, C., González-Rodríguez, S., Guillén-Barona, C., 2006. Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermosifiliogr.* 97, 83-102.
- Hamblin, M.R., Hasan, T., 2014. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci.* 3, 436–50.
- Hernández, I.P., Montanari, J., Valdivieso, W., Morilla, M.J., Romero, E.L., Escobar, P., 2012. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 117, 157–163.
- Konigheim, B.S., Comini, L.R., Grasso, S., Aguilar, J.J., Marioni, J., Contigiani, M.S., Núñez Montoya, S.C., 2012. Determination of non-toxic and subtoxic concentrations of potential antiviral natural anthraquinones. *Lat. Am. J. Pharm.* 31, 51–56.
- Liu, A., Shu, S., Qin, H., Lee, S. M. Y., Wang, Y., Du, G., 2009. In vitro anti-influenza viral activities of constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Med.* 75: 337-9.
- Maisch, T., 2007. Anti-microbial photodynamic therapy : useful in the future ? *Lasers Med. Sci.* 83–91.
- Organización mundial de la salud (OMS), 2010. ARGENTINA BASIC COUNTRY DATA Total Population. Disponible online en: www.who.int/leishmaniasis/resources/ARGENTINA.pdf
- Pace, D., 2014. Leishmaniasis. *J. Infect.* 69, S10–S18.
- Peloi, L.S., Biondo, C.E.G., Kimura, E., Politi, M.J., Lonardoní, M.V.C., Aristides, S.M.A., Dorea, R.C.C., Hioka, N., Silveira, T.G.V., 2011. *Exp. Parasitol.* 128, 353–356.
- Pinto, J.G., Pereira, A.H.C., de Oliveira, M.A., Kurachi, C., Raniero, L.J., Ferreira-Strixino, J., 2016. Chlorin E6 phototoxicity in *L. major* and *L. braziliensis* promastigotes—In vitro study. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 15, 19–24.
- Reimão, J.Q., Trinconi, C.T., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Miguel, D.C., Kalil, S.P., Uliana, S.R.B., 2013. Parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected mice: Validation of luciferase as a quantitative tool. *J. Microbiol. Methods* 93, 95–101.
- Ribeiro, J.B.P., Miranda-Vilela, A.L., Graziani, D., Gomes, M.R. de A., Amorim, A.A.S., Garcia, R.D., de Souza Filho, J., Tedesco, A.C., Primo, F.L., Moreira, J.R., Lima, A.V., Sampaio, R.N.R., 2016. Evaluation of the efficacy of systemic miltefosine associated with photodynamic therapy with liposomal chloroaluminium phthalocyanine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) amazonensis* in C57BL/6 mice. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 13, 282–290.

Sabino, C.P., Garcez, A.S., Núñez, S.C., Ribeiro, M.S., Hamblin, M.R., 2014. *Lasers Med. Sci.* 1657–1665.

Silva, A.V., López-Sánchez, A., Junqueira, H.C., Rivas, L., Baptista, M.S., Orellana, G., 2015. *Tetrahedron* 71, 457–462.

Stebut, E. V., 2015. *JDDG J. der Dtsch. Dermatologischen Gesellschaft* 13, 191–201.

Taylor, V.M., Cedeño, D.L., Robledo, S.M., 2011. *Phototherapy in treatment of cutaneous leishmaniasis* 15, 277–288.

Taylor, V.M., Ríos, Y.K., León, D.A., 2013. Plantas con actividad fotosensibilizadora y potencial terapéutico en leishmaniasis cutánea: hipericina, una alternativa prometedora. *Infectio* 17, 90–102.

Villareal, 2008.

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

El estudio químico de las partes aéreas de *Heterophyllaea lycioides*, condujo al aislamiento y elucidación estructural de 7 derivados antraquinónicos, de los cuales tres resultaron ser estructuras nuevas para esta familia de compuestos, y dos de ellas con la particularidad de ser cloradas. En nuestro conocimiento, por primera vez se informa sobre la presencia de derivados halogenados en la familia de las Rubiáceas, una familia de amplia distribución, conformada por numerosos géneros y especies.

H. lycioides y *H. pustulata*, las dos especies que pertenecen a este género, se presentan como especies muy cercanas desde el punto de vista fenotípico (similares morfológicamente) y quimiotaxonómico (esqueletos moleculares similares). Si bien ambas especies presentan derivados análogos, sólo *H. lycioides* contiene AQs cloradas. La razón de esta particularidad podría ser, entre otras, la intervención de un microorganismo endófito en el desarrollo co-evolutivo de éste, junto a la especie vegetal, u otros factores externos, que pudieron modificar la síntesis metabólica de sus compuestos. Este descubrimiento motiva el desarrollo de futuros estudios en una nueva área del conocimiento, que resulta sumamente interesante. Si bien se puede realizar la semisíntesis de compuestos clorados, como se ha determinado en esta tesis, el empleo de microorganismos endófitos tiene relevancia por su posible aplicación en la industria, por su potencial biotecnológico para la obtención de metabolitos activos (Golinska *et al.*, 2015; Deepica *et al.*, 2016; Martinez-Klimova *et al.*, 2016).

Los estudios fotofísicos, fotoquímicos y fotobiológicos determinaron que las nuevas estructuras presentan propiedades fotosensibilizadoras, destacándose 7-clbis como mayor productor $O_2^{\bullet-}$ y 5-clsor como mayor productor de 1O_2 . Por lo tanto, concluimos que las nuevas AQs aisladas de *H. lycioides* contribuyen a la toxicidad que se le atribuye a esta especie, sumadas al efecto que producen las AQs ya conocidas, que también han demostrado ser fotosensibilizadores tipo I y II.

Por otro lado, el estudio de las propiedades fluorescentes de los compuestos estudiados, establecieron que dichas estructuras presentan ESIPT, un efecto de gran interés científico y tecnológico, puesto que posibilitaría la aplicación de estas estructuras en electrónica orgánica para la elaboración de láseres,

fotoestabilizadores ultravioletas, filtros Raman y UV, sondas para investigaciones en el entorno biológico, diodos de emisión de luz blanca, quimiosensores, entre otras aplicaciones (Chen *et al.*, 2014; Sidir y Sidir, 2016). Esto amplía la utilización de estos compuestos en un área distinta a la que se ha estudiado hasta el momento en nuestro grupo de trabajo.

La capacidad de los derivados antraquinónicos de generar ERO en presencia de luz, motivó el desarrollo de ensayos biológicos para establecer su potencialidad como agentes fotosensibilizadores para su aplicación en TFDA. Se evaluó por un lado, la fotoinactivación de una cepa clínica de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible y por otro lado, la fotoinactivación de *Leishmania amazonensis*. Los resultados mostraron que, el efecto antibacteriano de 5-clsor sobre *S. aureus* ms se vió incrementado al ser fotoestimulado con luz actínica. Por otro lado, la fotoestimulación de 5-clsor, sor y bis empleando LED azul provocaron una reducción sgnificativa en la actividad metabólica de La-Luc, en un porcentaje similar al producido por el control positivo. El empleo de LED verde y 5-clsor, mostró un efecto similar al observado con LED azul, lo cual es beneficioso, ya que la luz a esta longitud de onda posee mayor poder de penetración en los tejidos vivos, incluso en aquellos que se encuentran con pus (Arenas *et al.*, 2013).

Para finalizar, es importante destacar que particularmente, en el tratamiento de Leishmaniosis cutánea, resulta sumamente interesante el efecto antimicrobiano que exhiben estas estructuras, ya que además de la fotoinactivación de *Leishmania*, estos compuestos reducirían la posibilidad de infección por bacterias durante la cicatrización de las úlceras tratadas (Taylor *et al.*, 2013).

REFERENCIAS

- Arenas, Y., Monro, S., Shi, G., Mandel, A., McFarland, S., Lilge, L., 2013. Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with Ru(II)-based type I/type II photosensitizers. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10, 615–625.
- Chen, K.Y., Tsai, H.Y., Lin, W.C., Chu, H.H., Weng, Y.C., Chan, C.C., 2014. ESIPT fluorescent dyes with adjustable optical properties: Substituent and conjugation effects. *J. Lumin.* 154, 168–177.
- Deepika, V.B., Murali, T.S., Satyamoorthy, K., 2016. Modulation of genetic clusters for synthesis of bioactive molecules in fungal endophytes: A review. *Microbiol. Res.* 182, 125–140.
- Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H., Rai, M., 2015. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie Van Leeuwenhoek.*
- Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K., Sánchez, S., n.d. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochem. Pharmacol.* En Prensa.
- Sıdır, İ., Sıdır, Y.G., 2016. Solvatochromism and intramolecular hydrogen-bonding assisted dipole moment of phenyl 1-hydroxy-2-naphthoate in the ground and excited states. *J. Mol. Liq.* 221, 972–985.
- Taylor, V.M., Rios, Y.K., León, D.A., 2013. Plantas con actividad fotosensibilizadora y potencial terapéutico en leishmaniasis cutánea: hipericina, una alternativa prometedora. *Infectio* 17, 90–102.

CAPÍTULO 10

PROYECCIONES

PROYECCIONES

Profundizar el estudio químico de las partes aéreas y raíces de *H. lycioides* a fin de aislar nuevos metabolitos secundarios, con especial interés en la búsqueda de compuestos halogenados.

Iniciar estudios tendientes a determinar la presencia de microorganismos endófitos en *H. lycioides*, para determinar si los mismos son los responsables de la presencia de AQs halogenadas en esta especie vegetal.

Continuar con los estudios fotofísicos de las AQs, ya que el ESIPT observado en las mismas, produce cambios espectrales notorios, considerados efectos críticos en el funcionamiento *in vitro* e *in vivo* de estos compuestos. En este sentido, el estudio de estas propiedades en diferentes solventes, permitiría arribar a resultados más concluyentes.

Respecto a la aplicación de las AQs en TFDA, se continuará con el estudio de dichas AQs en cepas de *S. aureus* y *Proteus mirabilis* modificando condiciones como la concentración de AQ, el tiempo de incubación, la fuente de luz y el tratamiento de irradiación, a fin de lograr una optimización del efecto antimicrobiano.

En cuanto a la aplicación para el tratamiento de Leishmaniosis cutánea (LC), se prevé evaluar la inactivación fotodinámica producida por AQs y LED azul o verde, según corresponda, en co-cultivos de la forma amastigota de *Leishmania amazonensis* en líneas de macrófagos. Asimismo, se buscará iniciar estudios *in vitro* para evaluar la fotoinactivación de *Leishmania brasiliensis*, la especie que produce mayor prevalencia en nuestro país.

Debido a que LC es considerada una enfermedad de la pobreza, se buscará evaluar la inactivación fotodinámica de promastigotes y amastigotas de *Leishmania spp.* empleando AQs naturales y luz solar (en inglés, Day light Photodynamic Therapy), con el fin de reducir los costos de la terapia y facilitar la aplicación en cada paciente, reduciendo la necesidad de concurrir a los hospitales.

Por último, aquellas AQs que logren una reducción significativa de las formas promastigotes y amastigotas de *Leishmania spp.*, serán evaluadas en ensayos *in vivo* en linajes de BALB/c.

CAPÍTULO 11

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2: ESTUDIO QUÍMICO PRELIMINAR DE PARTES AÉREAS DE *H. LYCIOIDES*

Procesamiento del material vegetal (MV)

Recolección del MV

H. lycioides fue recolectada en Abril de 2011 en la localidad de Yotala, Sucre, Bolivia (19°9'31" S y 65°15'51" E) (Fig. 11.1, I) e identificada por el Ing. Edwin Portales. Se depositó una muestra de herbario en el Herbario del Sur de Bolivia, con el código HSB 18608.



Figura 11. 1. (I) Material vegetal recolectado. (II) Extracción del material vegetal en aparato soxhlet.

Desecado y fragmentado del MV

El material fue desecado al abrigo de la luz, en lugar fresco y aireado. Con cierta frecuencia fue revuelto a fin de que las zonas intermedias obtuvieran una ventilación adecuada. Una vez seco, se descartó toda materia extraña y se llevo a cabo el fragmentado del MV.

Extracción del material vegetal

Se realizó empleando un aparato soxhlet como se muestra en la Fig. 11.1, II. La droga fragmentada se sometió a extracción empleando solventes de polaridad creciente: hexano, benceno, acetato de etilo y etanol. A continuación, los extractos obtenidos se evaporaron a sequedad en evaporador

rotatorio (Buchi, Suiza) para la eliminación del solvente y luego, se colocaron en desecadores para eliminar el agua remanente.

Análisis fitoquímico preliminar

Ensayo para detección de Flavonoides aglicones: Reacción de Shinoda

Se resuspendió cada uno de los extractos secos en 2 ml de agua destilada. Se le añadieron 10 gotas de HCl_(c) y limaduras de magnesio. La reacción transcurre con desprendimiento de H₂ y se considera positiva si se observa la formación de complejos coloreados: rojos, naranjas o amarillos (Geissman, 1962).

Ensayo para detección de antraquinonas aglicones: Reacción de Boerträger

Se disolvieron los extractos en 1 ml de benceno y se agregaron 5 gotas de amoníaco. Se agitó lentamente, para favorecer la partición de los compuestos en la fase bencénica hacia la fase acuosa. La reacción se considera positiva si aparece coloración rojiza en la fracción inferior (amoníaco) (Wagner *et al.*, 1984).

Detección de asperulósido

Se disolvió cada uno de los extractos en 2 ml de agua y se agregaron 5 gotas de HCl(C). A continuación, se calentó a la llama durante 3 minutos aproximadamente. La reacción es positiva si aparece una coloración verde con un precipitado oscuro (negro) (Briggs y Nicholls, 1954).

CAPÍTULO 3: PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTRAQUINONAS

Métodos Cromatográficos

Solventes

Los solventes empleados en las diferentes técnicas cromatográficas fueron previamente destilados para eliminar impurezas y restos de agua. Los solventes hexano y éter etílico empleados fueron de grado analítico (Sintorgan).

Cromatografía en columna (CC)

Se emplearon columnas de vidrio de diferentes tamaños, teniendo en cuenta el peso del extracto o fracción a purificar. Como fase estacionaria, se emplearon:

- Sílica gel 60 (Merck, Alemania) de 0,063-0,200 mm (Fundamento: adsorción).
- Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, EEUU) de 25-100 μm (Fundamento: exclusión molecular).

Cromatografía en capa delgada (CCD)

De acuerdo a la aplicación, se emplearon la técnica analítica (identificación) o preparativa (purificación).

A. Cromatografía analítica

Se utilizaron cromatofolios de aluminio sílica gel 60 sin indicador de fluorescencia (Macherey-Nagel, MN, Alemania) y cromatofolios de aluminio con sílica gel 60 RP-18 F₂₅₄S (Merck, Alemania). En general, el largo de los cromatofolios es de 5 cm de alto y el ancho de acuerdo a la cantidad de muestras a sembrar.

B. Cromatografía preparativa

Se llevó a cabo en placas preparadas en nuestro laboratorio, empleando una placa de vidrio de 20 x 20 cm con una capa de 0,5 mm de sílica gel 60 G (Merck) o en cromatofolios de iguales características a los del punto A, con un tamaño de 20 x 20 cm. Los compuestos purificados fueron desadsorbidos con acetona, excepto las AQs halogenadas que fueron eluidas con AcOEt o CHCl₃.

C. Revelado

Los cromatofolios, luego de realizar la corrida cromatográfica, se dejaron secar en camapana para eliminar el solvente y a continuación se emplearon tanto reveladores físicos como químicos para la detección de las AQs. Se empleó lámpara UV a 254 nm (revelado físico), o vapores de NH₃ (revelado químico) y a continuación luz UV a 254 nm.

D. Fases móviles empleadas en CCD y CCDp

Las fases móviles empleadas en ambos casos fueron:

- Ben-AcOEt (95:5)
- Ben-AcOEt (8:2)
- Ben-AcOEt (1:1)
- CHCl₃ -AcOEt (9:1)
- CHCl₃-AcOEt (8:2)
- MeOH-Ácido Fórmico (100:0,62)
- AcOEt-Acetona (1:1)

Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

La determinación de la pureza de las AQs semi sintetizadas se realizó mediante HPLC. Se llevó a cabo en un equipo Varian (Varian, Walnut Creek, CA), con inyector manual, sistema de bombeo por gradiente y detector de longitud de onda múltiple. Se empleó una columna Microsorb-MV 100-5 C18 (250 x 4,6 mm, Agilent). Se trabajó con dos fases móviles (FM): a) agua MiliQ y b) MeOH (ambos con 0,612 % V/V de ácido fórmico), con el gradiente que se muestra en la Fig. 11.2 y un flujo de 0,4 ml/min. Los solventes empleados fueron grado HPLC de la marca Sintorgan S.A. (Buenos Aires, Argentina). La detección UV de las AQs fue a 269 nm y se inyectaron 20 µl de cada muestra a analizar. Para procesar los cromatogramas se empleó el software Star Chromatography workstation versión 6.41.

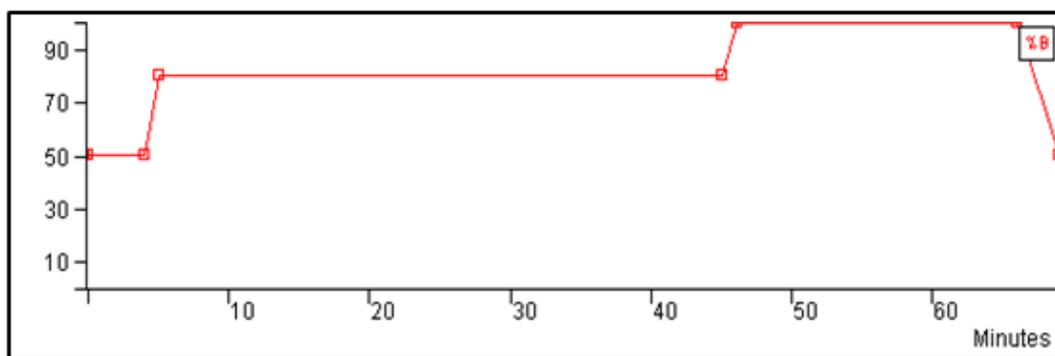


Figura 11. 2. Gradiente de fases móviles

Técnicas espectroscópicas

Espectrofotometría UV-Visible

Los espectros se midieron en un equipo Cary Win UV-VIS 50, en un rango de 240 a 700 nm por lo cual se emplearon celdas de cuarzo. Como solvente, se

utilizó MeOH de grado espectroscópico. Los valores de la longitud de onda de máxima absorción (λ) se expresan en nm.

Espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS)

Se realizó por infusión directa en un espectrómetro MicroTOF QII (Bruker Daltonics, USA) equipado con un analizador qTOF (*Time of flight*, tiempo de vuelo). Se empleó la técnica de ionización por electrospray (ESI) en modo negativo. Se utilizó el software Bruker Compass 1.3 SR1 para el análisis de los espectros.

Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros fueron medidos en un espectrofotómetro Nicolet 5-sxc-FTIR. Se prepararon las pastillas de KBr y se aplicó una solución del compuesto disuelto en acetona en forma de película, asegurando la completa eliminación del solvente con temperatura para evitar interferencias en los espectros. Los valores de frecuencia (ν) se expresan en cm^{-1} . Los datos obtenidos fueron procesados con el software OMNIC E.S.P. versión 5.1. (Copyright 1992-1999).

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de protones (RMN- ^1H) y de carbono (RMN- ^{13}C) en una y dos dimensiones se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Advance II 400; los espectros de ^1H se realizaron a una frecuencia de 400,16 MHz y los de ^{13}C a una frecuencia de 100 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Se emplearon solventes deuterados de grado espectroscópicos: CDCl_3 , Acetona- d_6 y DMSO- d_6 y se colocaron en tubos de vidrio 7 in. x 5 mm (Sigma-Aldrich).

Los experimentos bidimensionales se llevaron a cabo según protocolos del software estándar Bruker. Los espectros fueron procesados con el software Topspin versión 3.5 pl 5 de Bruker.

Dicroísmo circular (DC)

Los espectros de DC se realizaron en un polarímetro Jasco J-810, empleando MeOH grado HPLC para la realización de medidas. Previamente, las soluciones a medir se ajustaron a una absorbancia de 0,5. Los datos fueron procesados en Origin Pro 8 SR1.

Rotación óptica ($[\alpha]_D$)

La actividad óptica se midió en un polarímetro Jasco P-1010 y las medidas se tomaron usando la línea D de sodio (589 nm), a una temperatura de 25 °C. Las AQs se disolvieron en MeOH grado HPLC y se empleó una celda de 10 cm de longitud. Para disolver las muestras, se empleó MeOH grado HPLC.

Reacciones químicas

Ruptura Reductora

Se disolvieron 2 mg de bis en 2 ml de NaOH 5%. Luego se agregaron aproximadamente 15 mg de Na₂S₂O₄ (ditionito de sodio). La solución se tornó fucsia, ya que al agregar una base se deprotonan los grupos hidroxilos, cambiando la resonancia del anillo y por ende, la coloración de la solución. Posteriormente, se colocó en un baño de aceite, manteniendo la temperatura en un rango entre los 80-90 °C durante 4 horas.

Al cabo de este tiempo, se retiró del baño de aceite, se dejó enfriar y luego se colocó en un baño de hielo. Se agregó HCl_(c) hasta llegar a un pH de 7, observando que la solución se tornó de color amarillo. Luego se realizó una partición con AcOEt (Yenesew *et al.*, 1994).

La fracción AcOEt se purificó con CHCl₃-AcOEt (9:1) y se obtuvieron 2 fracciones: la de menor R_f perteneciente al compuesto inicial, bis y la de R_f mayor, perteneciente al monómero, que luego de ser sometido a técnicas espectroscópicas, se determinó que se trataba de sor.

Reacción de Cloración

Se disolvieron 2,5 mg de sor en 13 ml de CH₂Cl₂ anhidro a temperatura ambiente, con agitación continua hasta obtener una completa disolución. Se adicionaron 10,4 mg de N-clsuc y se continuó con agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se eliminó el solvente por evaporación a presión reducida y se obtuvo un sólido amorfo de color naranja que fue identificado por métodos espectroscópicos como 5-clsor.

Se procedió del mismo modo para la obtención de la 7-clbis. En este caso, se disolvieron 5 mg de bis en 6,25 ml de CH₂Cl₂ y se adicionaron 5 mg de reactivo.

CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE *H. LYCIOIDES*

Preparación de las muestras

Se pesaron 5 mg de los 4 extractos secos y se disolvieron en 2 ml de MeOH grado HPLC (MeOH-HPLC, Sintorgan). Por otro lado, se prepararon soluciones de testigos de 1 mg/ml en MeOH-HPLC. Las AQs utilizadas como testigo fueron las siguientes: 5-clsor, 7-clbis, lyc, sor, bis, heterofilina (het), pustulina (pus), 1-metil eter de soranjidiol (1-Me-sor-, 6-hidroxi-1-metoxi-2-metil AQ), rubiadina (rub, 1,3-dihidroxi-2-metil AQ) y 1-metil eter de rubiadina (1Me-rub, 3-hidroxi-1-metoxi-2-metil AQ) (pág. 11, Fig. 1.7). Todas fueron filtradas con membranas de 0,45 μm (Milipore).

Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

Se empleó el equipo y las mismas condiciones que se detallan en técnicas cromatográficas, pág. 164. Cada AQ presente en los extractos se identificó por comparación de su tiempo de retención (t_R) con el de la correspondiente AQ testigo, las cuales fueron previamente purificadas e inequívocamente identificadas por sus datos espectrales. Los t_R se expresaron como el t_R promedio y su desvío estándar de tres inyecciones de cada AQ testigo y extracto.

Cromatografía líquida de alta performance acoplado a Masas (HPLC-MS)

Para realizar este análisis se utilizó un equipo Agilent Series 1200 LC System (Agilent, USA). El sistema de HPLC consiste en un degasificador microvacuum, sistema de bombas binario con inyector automático (loop con capacidad de 40 μl), compartimiento para columna termostatizado y detector con arreglo de diodos (DAD) en un rango entre entre 200 y 600 nm. Se empleó una columna Hypersil ODS C18 (5 mm; 30 cm x 4,6 mm) de Varian®, utilizando el mismo flujo y fase móvil descrito para HPLC.

Este equipo se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas que posee ionización por electrospray (ESI) y un analizador de tiempo de vuelo MicrOTOF Q II (Bruker Daltonics, USA) utilizado en modo MS y MS/MS. El análisis se

realizó con una energía de 10 eV y en modo negativo debido a la presencia de grupos OH, ya que en este modo disminuye la formación de aductos.

La adquisición y el procesamiento de datos se realizaron utilizando el software Data Analysis Version 4.1 (Bruker Daltonics GmbH, EEUU).

CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS COMO FOTOSENSIBILIZADORES TIPO I

Obtención de neutrófilos

Este procedimiento se llevó cabo a partir de sangre obtenida de donantes sanos como se muestra a continuación. Luego de obtener la suspensión de células, se efectuaron diluciones para obtener una concentración de 10^6 céls/ml.

Materiales y equipamiento

- Sangre heparinizada (0,5 ml de heparina para 20 ml de sangre) extraída por punción de donantes voluntarios sanos.
- Dextrán 6%
- Buffer Hanks:
 - Se disuelven en agua destilada, las drogas que se detallan a continuación, en las cantidades especificadas y en el orden numerado:

1. NaCl	8 g
2. KCl	400 mg
3. Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	151,1 mg
4. KH ₂ PO ₄	60 mg
5. MgSO ₄ .7 H ₂ O	100 mg
6. CaCl ₂ .2 H ₂ O	140 mg
7. MgCl ₂ .6 H ₂ O	100 mg
8. Dextrosa	1 g
9. NaHCO ₃	350 mg
10. Agua destilada	1000 ml
 - Al finalizar, se ajusta el pH a 7 con HCl diluido y se conserva en heladera hasta su uso.
- Ficoll-Hypaque ($\delta=1,077$ g/ml): Histopaque-1077(SIGMA) 1 g/ μ l
- Agua destilada
- Tubos cónicos

- Centrifuga para tubos cónicos.
- Cámara de Neubauer y microscopio.

Procedimiento

Se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Bustos y colaboradores (Bustos *et al.*, 2016), como se describe a continuación:

1. Pesar en tubo de ensayo con tapa entre 0,50 y 0,55 g de dextrán y disolver en volumen necesario para obtener solución al 6% con buffer Hanks.
2. Agregar 3,66 ml de dextrán al 6% en cada tubo de ensayo y colocar 11 ml de sangre en cada uno (proporción 3/1 sangre/dextrán). Mezclar suavemente con pipeta de 5 ml.
3. Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 60 minutos. Al finalizar, se debe observar en el tubo la separación del plasma y los glóbulos rojos. Se debe trabajar con la fase superior (Fig. 11.3).
4. Colocar 2 ml de Ficoll-Hypaque en 3 tubos cónicos.
5. Separar cuidadosamente el SN de cada tubo de ensayo, cuidando de no extraer glóbulos rojos, y colocar en los tubos cónicos. (Proporción plasma/ficoll-Hypaque, 3/1). Al finalizar, tapar los tubos cónicos con parafilm.
6. Centrifugar a 400 g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Descartar el plasma con pipeta Pasteur (Fig. 11.3).
8. Separar los monocitos, que quedan en una interfase de color blanco (Fig. 11.3).
9. Descartar la siguiente fase que corresponde a Ficoll-Hypaque y dejar el pellet, que presenta un precipitado rojo (glóbulos rojos) con una lámina por encima (leucocitos) (Fig. 11.3).
10. Agregar 5 ml de buffer Hanks con albúmina al 0,01% al pellet (precipitado de células rojas) y homogeneizar con pipeta automática, a fin de realizar el lavado de las células.
11. Centrifugar a 400 g durante 10 min y a continuación descartar el SN, por inversión del tubo.
12. Lisar los eritrocitos con 1 ml de agua destilada, mezclando suavemente.
13. Agregar 5 ml de buffer Hanks con albúmina al 0,01% y centrifugar a 300 g durante 20 min.

14. Descartar el SN, por inversión del tubo. Agregar 500 µl de buffer Hanks con albúmina al 0,01% al pellet (neutrófilos), para ir resuspendiendo los neutrófilos en cada tubo. No superar los 2,5 ml de buffer.
15. Realizar el recuento de células en cámara de Neubauer.

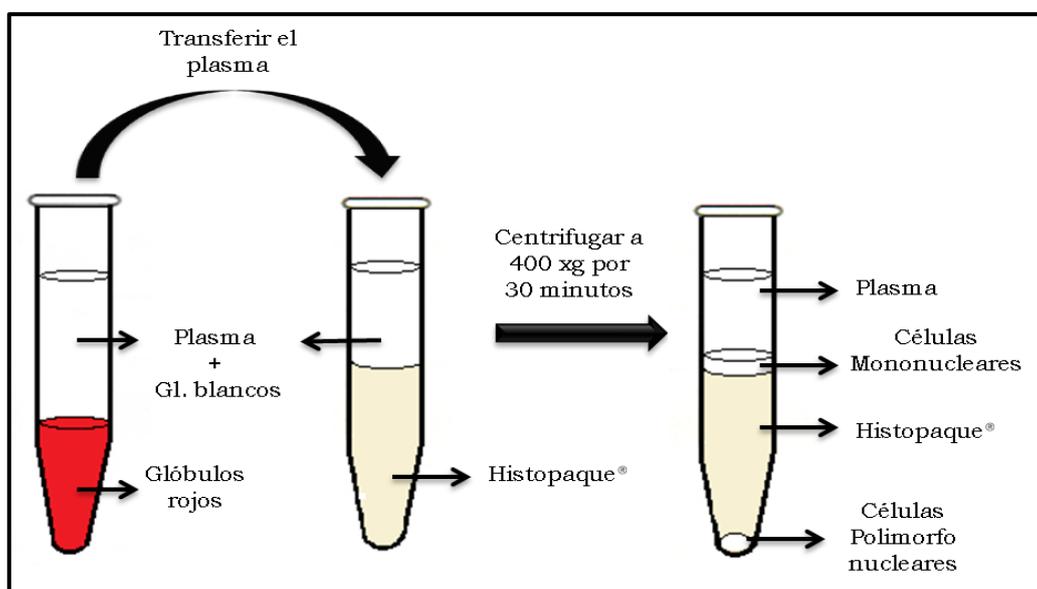


Figura 11. 3. Obtención de neutrófilos.

Soluciones de antraquinonas

Las AQs se disolvieron en buffer Hanks usando un 1% de DMSO como co-solvente. Se prepararon diluciones a partir de soluciones madres de cada AQ, tal que la concentración final en el ensayo fue de 10 y 20 µg/ml.

Ensayo colorimétrico

Se ensayó por triplicado cada AQ a las dos concentraciones en estudio, incluyendo a los controles, en 2 placas de 24 pocillos (Placa 1: luz; Placa 2: oscuridad) de acuerdo a lo que se detalla a continuación:

- a. CONTROL: 0,1 ml de buffer HBSS/DMSO + 0,1 ml de neutrófilos + 0,5 ml de NBT al 0,1% P/V.
- b. AQs: 0,1 ml de solución de AQs + 0,1 ml de neutrófilos + 0,5 ml de NBT al 0,1% P/V.

Ambas placas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. La placa 1 fue irradiada mientras que la placa 2, fue protegida de la luz para simular condiciones de oscuridad.

Luego de transcurrido ese tiempo, la reacción se detuvo con el agregado de 0,1 ml de HCl 0,1 M. Cada una de las soluciones fue homogeneizada y trasvasada a tubos Eppendorff de 1,5 ml, que fueron centrifugados a 6149 g durante 15 min.

A continuación, se descartó el sobrenadante y se agregó 0,5 ml de DMSO para permeabilizar las células y así permitir la salida del azul de formazán generado en el interior de los neutrófilos. Se transfirieron 250 μ l de cada tubo de Eppendorff a una placa de 96 pocillos y posteriormente, se midió la absorbancia de azul de formazán a 595 nm por espectrofometría utilizando un lector de placas (Tecan, sunrise).

Se calculó un promedio para cada AQ y control con su respectivo error. El incremento de $O_2^{\bullet-}$ respecto al basal, se expresó en porcentaje con respecto al control (100 %) mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Absorbancia promedio de AQ} - \text{Absorbancia promedio del basal}) \times 100}{\text{Absorbancia promedio del basal}}$$

Para una mejor interpretación de los gráficos, se asignó a los controles un valor arbitrario del 10 %, que representa la producción basal de $O_2^{\bullet-}$. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software GraphPad Prism 4.0., y se emplearon las pruebas de *t* de student para comparar, en las cuales un $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Sistema de irradiación

Consiste en una lámpara actínica Phillips de 20 w (380–480 nm, irradiancia=0,65 mW/cm²) con un máximo a 420 nm. Esta lámpara se colocó dentro de una caja negra a 20 cm sobre un baño termostatzado conteniendo las muestras.

CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FOTOFÍSICAS Y FOTOSENSIBILIZADORAS TIPO II DE LAS NUEVAS ANTRAQUINONAS

Determinación del rendimiento cuántico de producción de oxígeno singlete

La determinación del rendimiento cuántico de producción de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ) de cada AQ se realizó con la técnica de luminiscencia infrarroja en tiempo resuelto (TR). Consiste en la medición de la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ a 1270 nm producida por cada AQ disuelta en CHCl_3 , luego de ser irradiadas con un láser de energía variable (Nonell y Bravlavsky, 2000; Borsarelli *et al.*, 2007). Para ello, se utilizó un láser Q-switched Nd: YAG (Continuum Minilite II), con 5 mJ de potencia y pulsos de 10 ns. Un haz de 355 nm (tercer armónico) se guió para impactar en una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. A 90° de la fuente de excitación se colocaron filtros apropiados (Spectrogon BP-1260) para coleccionar la mayor cantidad de radiación fosforescente a 1270 nm, emitida por el $^1\text{O}_2$ generado. La señal de luminiscencia fue transformada por un detector de fotodiodo de germanio Judson J16TE2-66 G, Peltier enfriado a -30°C . Las curvas de caída de fosforescencia de $^1\text{O}_2$ a diferentes energías láser incidente se recogieron con un osciloscopio digital Tektronix TDS3032B y se analizaron con el software Microcal Origen 8.0.

El Φ_Δ se calculó empleando un método comparativo que utiliza Perinaftenona (PN) como FS de referencia ($\Phi_\Delta = 0,95 \pm 0,05$ en CHCl_3) (Oliveros *et al.*, 1991; Wilkinson *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1994). Todas las muestras ensayadas, PN y cada AQ, se solubilizaron en CHCl_3 de manera que todas exhibieran la misma absorbancia ($\text{abs}_{355}=0,45$), para así lograr que el mismo número de fotones sea absorbido en cada caso al ser irradiadas bajo las mismas condiciones. Para cada AQ y cada energía del láser se obtuvieron gráficos de decaimiento de $^1\text{O}_2$ en función del tiempo (Fig.11.4).

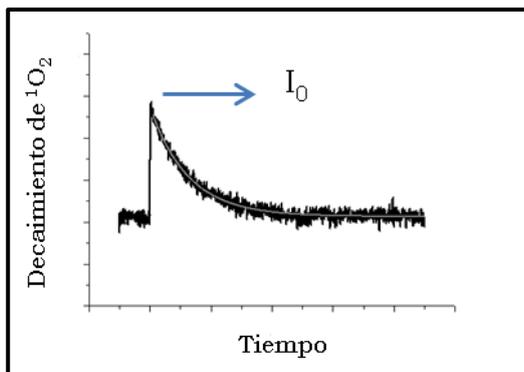


Figura 11. 4. Gráficos obtenidos empleando la técnica de luminiscencia infrarroja en tiempo resuelto.

A partir de estos datos, se graficó, para cada AQ, la Intensidad de fosforescencia Inicial (I_0) vs Energía del Láser (E_L). El cálculo del Φ_{Δ} fue llevado a cabo aplicando la ecuación 1 (Eq. 1) (Borsarelli *et al.*, 2007):

Eq. 1

$$\Phi_{\Delta(AQ)} = \Phi_{\Delta(PN)} \times (P_{\text{end}}(AQ) / P_{\text{end}}(PN)) \times (Abs_{(PN)} / Abs_{(AQ)})$$

Se realizó el espectro UV-Vis de cada AQ, pre y post irradiación, para corroborar que las estructuras no sean alteradas luego de ser sometidas a este proceso.

Estudio de las propiedades fluorescentes

Espectros de emisión y excitación

Para cada AQ, se midieron los espectros de absorción y emisión fluorescente con excitación a 355 y 420 nm. Se empleó un espectrofluorómetro Hitachi F-2500, equipado con un fotomultiplicador de detección Hamamatsu R928 extendido al rojo (200 - 800 nm). Para ello, se preparó una solución de cada AQ en CHCl_3 con una absorbancia de 0,2 a 420 nm.

Rendimientos cuánticos relativos de fluorescencia (Φ_F)

El rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) se define como el cociente entre los fotones emitidos y los fotones absorbidos por una molécula (Valeur, 2001; Lakowics, 2006).

El Φ_F de cada AQ en estudio se determinó en CHCl_3 , empleando fluoresceína como actinómetro de referencia (Φ_F en NaOH 0,1 M= $0,925 \pm 0,015$) (Madge

et al., 2002) y utilizando el equipo antes mencionado. Para cada AQ, se prepararon 3 soluciones en CHCl₃ con absorbancias a 420 nm de aproximadamente 0,10, 0,20 y 0,30. Para cada solución se tomó el espectro de emisión fluorescente con excitación a 420 nm. Posteriormente, se realizaron gráficos de área de emisión en función de las diferentes absorbancias. De las pendientes obtenidas de este gráfico, tanto para la referencia (R) como para cada AQ en estudio (S), y empleando la siguiente ecuación (Eq. 2), se calcularon los Φ_F:

Eq. 2
$$Q = Q_R \frac{B_S}{B_R} \frac{OD_R}{OD_S} \frac{n_S^2}{n_R^2}$$

donde *B* es la pendiente del gráfico, OD es la densidad óptica, *n* es el índice de refracción del solvente utilizado para la muestra (S) y la referencia (R) (Lakowics, 2006).

Determinación de los tiempos de vida media de fluorescencia (τ_F^{av})

El tiempo de vida media de fluorescencia es importante, ya que determina el tiempo disponible del fluoróforo en estado excitado para interactuar con su entorno. Tanto las constantes de velocidad Γ (decaimientos radiativos) como k_{nr} (decaimientos no radiativos) pueden despoblar el estado excitado y son, principalmente, los procesos responsables de retorno del FS al estado fundamental (Lakowics, 2006).

Para determinar los τ_F^{av} se emplearon las mismas soluciones de AQs mencionadas en el apartado anterior y se utilizó un espectrofluorómetro (Horiba) en modo time-correlated single photon counting (TCSPC). Como fuente de excitación se empleó un nanoled con excitación a 390 nm. El decaimiento de fluorescencia se analizó con el software Decay Analysis Software DAS6. Con los datos obtenidos y empleando la siguiente ecuación (Eq. 3) se calculó el τ_F^{av}:

Eq. 3
$$\tau_{av} = \frac{\sum_{i=1}^n f_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i}$$

donde n es el número de decaimientos exponenciales simples, con valores de tiempos de vida τ_i y amplitudes α_i , y f_i es la contribución fraccional de cada tiempo de decaimiento a la intensidad de fluorescencia en el estado estacionario (Valle *et al.*, 2012).

Además, estos datos permitieron calcular Γ (Constante de velocidad radiativa) (Eq. 4), que representa la velocidad de desactivación del estado excitado por emisión de fluorescencia (Lakowics, 2006):

Eq. 4

$$\Gamma = \Phi_F / \tau_F^{AV}$$

Estudio de la fotoestabilidad de las AQs: Fotólisis en estado estacionario

Se prepararon soluciones de cada AQ en CHCl_3 con una absorbancia de 0,2 a 420 nm, y las mismas se irradiaron durante 3 horas con un LED Royal Blue con máximo de emisión a 444 nm ($\Delta\lambda = 27$ nm). Los cambios espectrales en función del tiempo de irradiación se siguieron por espectrofotometría UV-Visible, utilizando un espectrofotómetro de arreglo de diodos (Ocean Optics) guiados por fibras ópticas. En la figura 11.5, se muestra la superposición de espectros del LED Royal Blue y del máximo de las AQs estudiadas.

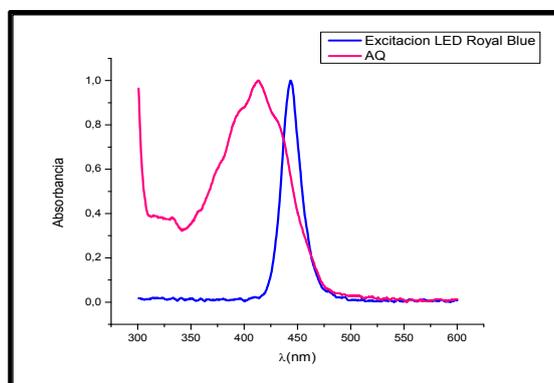


Figura 11. 5. Comparación de los espectros del LED Royal Blue con el espectro de absorción de las AQs.

CAPÍTULO 7: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Preparación de Buffer PBS

Pesar los siguientes componentes:

Composición	(g/l)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	1,15
KH ₂ PO ₄	0,2
Agua destilada c.s.p.	

Ajustar el pH a (7,0 ± 0,2) y conservar a 4°C.

Actividad antibacteriana en extractos de *H. lycioides*

Preparación de soluciones de extractos de partes aéreas de *H. lycioides*

Se pesaron 5 mg de cada extracto seco: Hex, Ben, AcOEt y EtOH, y se disolvieron en 1000 µl de DMSO (Sintorgan). Al momento de realizar el ensayo, se tomaron 200 µL de esta solución y se llevó a volumen final de 1000 µl con buffer PBS, para preparar las soluciones madre (SM).

Cepas bacterianas

Se utilizaron bacterias Gram positivas y Gram negativas, empleando tanto cepas de referencia (ATCC) como cepas clínicas. Las mismas se detallan a continuación:

Gram positivas	Gram negativas
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente (mr) • <i>S. aureus</i> metilino sensible (ms) 424 • <i>S. aureus</i> ms 787 • <i>S. aureus</i> ATCC 29213 • <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 • <i>E. coli</i> ATCC 35218 • <i>E. coli</i> resistente a ciprofloxacina • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 • <i>Proteus mirabilis</i> sensible a ciprofloxacina.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Se llevó a cabo utilizando el método de macrodilución en caldo de acuerdo a las normas del CLSI (CLSI, 2012).



Figura 11. 6. Imagen ilustrativa de la metodología de macrodilución en caldo de acuerdo a las normas del CLSI

Se preparó una suspensión bacteriana resuspendiendo 4 o 5 colonias del cultivo incubado previamente durante 18 h en agar tripteína soya (Britania). La turbidez fue ajustada a 0,5 en la escala de McFarland, realizando diluciones hasta obtener 10^5 - 10^7 unidades formadoras de colonia (UFC)/ml en cada tubo. Con las SM de los extractos se realizaron, por duplicado, diluciones seriadas en un rango de 250 a 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Luego de la incubación de los tubos durante 18 h a 37 °C, se observó la turbidez de los mismos. La menor concentración de extracto a la cual no se observó turbidez, indica la CIM.

En aquellos tubos que no presentaron turbidez, se evaluó el efecto bactericida de los extractos. Para ello, se tomaron 100 μL de cada tubo y se sembraron en placas de Petri en agar Müller-Hinton (MH, Britania). Se incubaron durante 18 h a 37 °C y se realizó el recuento de las UFC/ml. La concentración de extracto en la placa para la cual el recuento es inferior al 99,9% del inóculo inicial corresponde a la CBM. En la Fig. 11.7 se muestra un esquema del procedimiento.

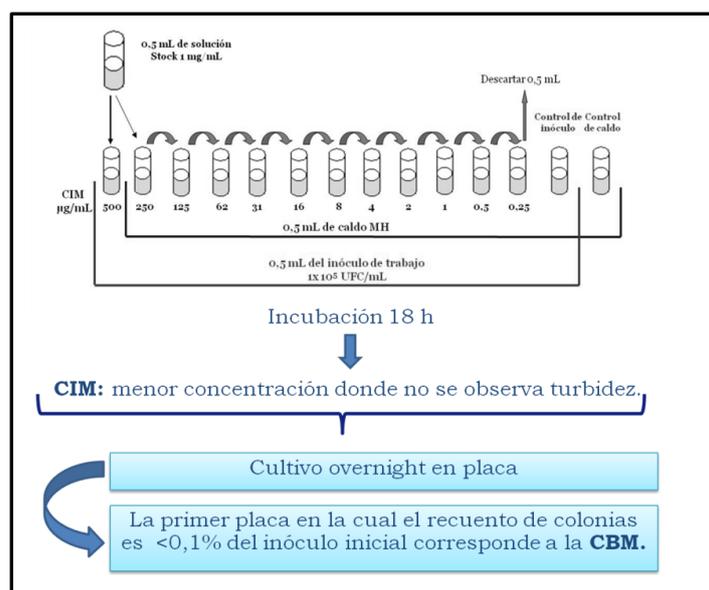


Figura 11. 7. Esquema de determinación de CIM y CBM.

Actividad antibacteriana de compuestos puros aislados de *H. lycioides*

Soluciones de antraquinonas

Se prepararon SM de las nuevas AQs: 5-clsor, 7-clbis y lyc, de una concentración de 500 µg/ml para un volumen final de 200 µl por pocillo. Las diluciones se prepararon en caldo MH (Britania), utilizando DMSO como co-solvente (no más del 2 %).

Cepas bacterianas

Se prepararon suspensiones bacterianas con una concentración de 10⁵-10⁷ UFC/ml de las siguientes cepas: *S. aureus* mr y *S. aureus* 424 ms.

Determinación de CIM y CBM

Se empleó el método de microdilución en caldo de acuerdo a las normas del CLSI (CLSI, 2012) (Fig. 11.8). Se emplearon placas de 96 pocillos, en las cuales se realizaron diluciones seriadas de las SM de cada AQ por duplicado, en un rango de 250 a 0,5 µg/ml. Se realizaron controles de esterilidad (Caldo MH) y de crecimiento (suspensión bacteriana).

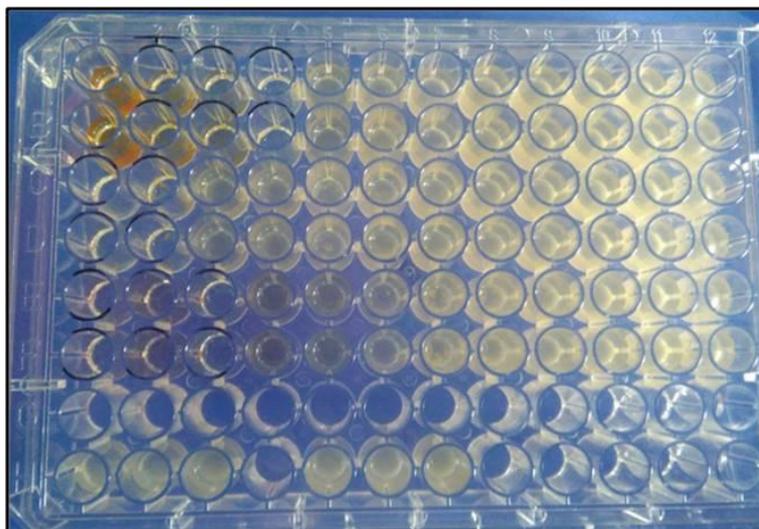


Figura 11. 8. Técnica microdilución en caldo según las normas del CLSI.

Las placas se incubaron en la estufa durante 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la turbidez en cada pocillo. La menor concentración a la cual no se observa turbidez, indica la CIM.

De aquellos pocillos que no presentaron turbidez, se tomaron 100 μl y se sembraron en placas de Petri con agar MH. Se dejaron incubar durante 18 h y se realizaron los recuentos de cada placa. La concentración de AQ en la cual el recuento disminuye un 99,9 % del inóculo inicial, indica la CBM.

Tratamiento de irradiación sobre cepas de *S. aureus* ms

Para realizar el tratamiento de irradiación, cada AQ fue incubada a su CIM por duplicado ($n=16$) con una suspensión de *S. aureus* ms durante 1 h. Luego, se irradió la mitad de una placa de 96 pocillos ($n=8$) con una lámpara actínica ($\lambda_{\text{máx.}}= 420 \text{ nm} - 0,65 \text{ mW/cm}^2$) durante 15 min ($t=0$). A continuación, se tomaron muestras para realizar el recuento de bacterias en placa y determinar la producción de ERO mediante el ensayo de NBT. La irradiación se repitió luego de 2 ($t=1$), 4 ($t=2$) y 6 h ($t=3$) de incubación. La otra mitad de la placa se mantuvo en oscuridad ($n=8$); y bajo ambas condiciones experimentales se incluyeron controles de inóculo y medio de cultivo. En la Fig. 11.9 se muestra el esquema de placa de este ensayo.

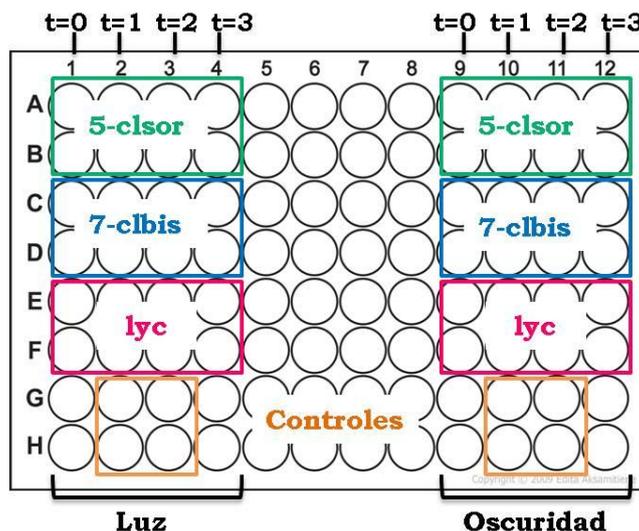


Figura 11. 9. Esquema de placas del ensayo empleando un tratamiento de irradiación

Recuento de bacterias y determinación de ERO

Para realizar el recuento de bacterias, se tomaron 100 µl de cada pocillo, se sembraron en placas de Petri en agar MH y se incubaron durante 18 h a 37 °C. Los resultados de recuentos se muestran en gráficos de recuento (UFC/ml) en función de los diferentes tiempos de irradiación. Los datos fueron analizados con el software Graph Pad 5.03 con el cual se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

Para la determinación de ERO, se tomaron 100 µl y se transfirieron a una nueva placa. Se añadieron 40 µl de una solución de NBT (1mg/ml, Sigma Aldrich), se incubó 30 min en estufa y luego se adicionaron 10 µl de HCl 0,1 M para detener la reacción. A fin de lograr la disolución del azul de formazán, se agregó 100 µl de DMSO y se realizó la medición espectrofotométrica en lector de ELISA a 595 nm (Tecan, sunrise). Los resultados de determinación de ERO se muestran en gráficos de incremento de ERO en función de los distintos tiempos de irradiación. Este valor se obtuvo de la diferencia entre los valores de producción de ERO de 5-clsor en luz y oscuridad respecto a la producción de ERO del inóculo en luz y oscuridad, respectivamente. Los datos fueron analizados con el software Graph Pad 5.03 con el cual se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

CAPÍTULO 8: FOTOINACTIVACIÓN DE LEISHMANIA AMAZONENSIS

Cultivo de *Leishmania amazonensis* transgénica

Las formas promastigotes metacíclicas infectantes se obtuvieron por medio del cultivo de la cepa de *L. amazonensis* recombinante que expresa el gen de luciferasa (La-LUC), obtenidas y caracterizadas de acuerdo con sus propiedades biológicas en relación a la línea Wild type (MHOM/BR/73/M2269). Estas, fueron cedidas gentilmente por el laboratorio de Leishmaniosis del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de São Paulo (ICB-USP), bajo la supervisión de la Prof. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana.

Las formas promastigotes fueron cultivadas en botellas roux de 25 cm³ con medio M199 suplementado con 10 % de suero fetal bobino (SFB), HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina 0,1 mM, hemina 0,005%, penicilina/estreptomicina 100 µg/ml. Las cepas se cultivaron a 25,5 °C durante 7 días, realizando repiques semanales.

Determinación de la linealidad del método

Se realizó con el fin de poner a punto las condiciones en el laboratorio y comparar el uso de dos reactivos: OneGlo® (reactivo recomendado para uso *in vitro*) y VivoGlo® (reactivo recomendado para uso *in vivo*), ya que sólo disponíamos del segundo reactivo. Para ello se realizaron diluciones de la suspensión del parásito a partir de una suspensión de 1.10⁷ céls/ml y luego se determinó la intensidad de luminiscencia (RLU).

Al comparar los resultados obtenidos con ambos reactivos, se observa que las curvas muestran un comportamiento similar, incluso VivoGlo® es aún más sensible que el reactivo para usos *in vitro* (Fig. 11.10, I). Por lo tanto, se determinó que empleando el reactivo VivoGlo® (Fig. 11.10, II), la técnica es lineal con un $r^2=0,9992$.

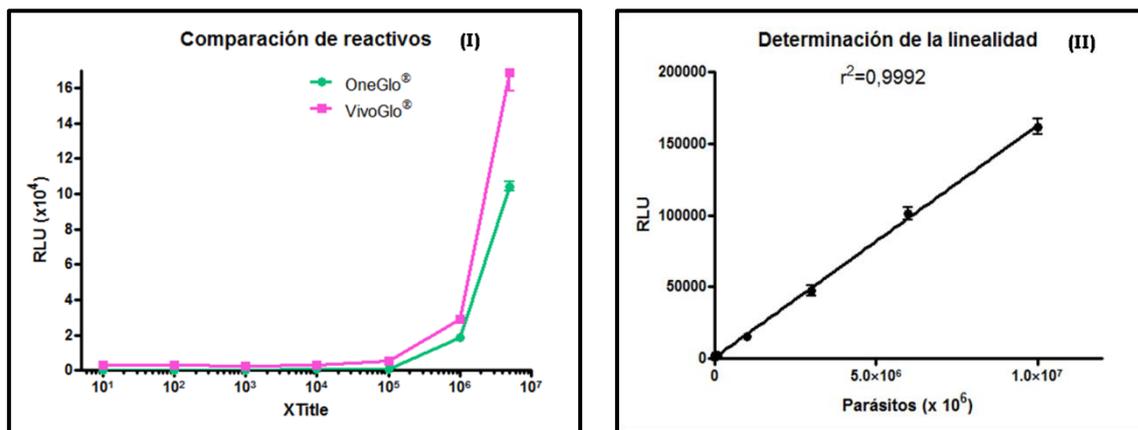


Figura 11. 10. Gráfico comparativo de los reactivos ensayados: OneGlo® y VivoGlo® (I). Gráficos de linealidad del método empleando VivoGlo® (II).

Fotoinactivación de La-LUC

Preparación del fotosensibilizador

Se preparó una solución madre de 1 mg/ml en DMSO de cada AQ. Luego, se realizaron las diluciones necesarias para cada ensayo utilizando buffer PBS estéril. A continuación, cada solución se filtró con una membrana estéril de 0,22 μm (Milipore).

Efecto fotodinámico en promastigotes de La-LUC

Para cada experimento, se realizó el recuento de parásitos en cámara de Neubauer, de modo tal de obtener una suspensión con una concentración final de $5 \cdot 10^6$ parásitos/ml por pocillo.

En una placa de 24 pocillos, se seleccionaron 3 pocillos equidistantes y se colocaron las suspensiones de La-Luc y la solución del FS. Las mismas fueron incubadas en oscuridad durante 10 min, PIT (Pre-irradiation time). Luego fueron irradiadas utilizando un LED azul, con un máximo de emisión a (410 ± 10) nm, cuya longitud de onda es coincidente con el máximo de absorción de las AQs utilizadas. El LED fue ajustado con un potenciómetro para irradiar con una potencia de 157 mW y una irradiancia de 50 mW/cm². Se irradió cada pocillo individualmente y se realizó desde arriba hacia el fondo del pocillo.

Se realizaron los blancos correspondientes para poder comparar condiciones de luz y oscuridad: control negativo (*L.a.* sin tratamiento, CN), control positivo (*L.a.* tratado con dodecilsulfato sódico (SDS), tensioactivo que incrementa la

permeabilidad de la membrana, CP), control AQ (*L.a.* con tratamiento de FS en oscuridad) y control LED (*L.a.* tratado con LED durante 12 min, CLED).

Se utilizó el método de bioluminiscencia para determinar la actividad metabólica. Luego de finalizar el tratamiento de irradiación, se transfieren 150 μ l de cada uno de los grupos estudiados por triplicado a una placa de 96 pocillos, y se adiciona una solución de 50 μ l de Luciferina. A continuación se realiza la lectura de la luminiscencia en un lector de placas (Spectramax) luego de un tiempo de incubación de 30 minutos.

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con el software Graph Pad Prism 5.03. Se utilizó un ANOVA de una vía para realizar el análisis estadístico, que resultó significativo con un $p < 0,05$.

Estudio de captación de antraquinonas

Para evaluar la captación de AQs por parte de promastigotes de La-LUC, se emplearon soluciones de todas las AQs en PBS de 2,5 μ M, utilizando DMSO como co-solvente. Se estudiaron dos tiempos de incubación: 10 minutos, correspondientes al PIT y 22 minutos, correspondientes al PIT y el máximo tiempo de irradiación con LED estudiado.

A continuación, las suspensiones fueron centrifugadas y se separaron el sobrenadante (SN) y el pellet (P). El SN fue transferido a una placa de 96 pocillos y se determinó la fluorescencia a 665 nm ($\lambda_{exc} = 420$ nm) en un lector de placas (Spectramax). El pellet fue incubado durante 24 horas con SDS al 1% para realizar la digestión de las células. Posteriormente se realizó la lectura de la fluorescencia a 665 nm ($\lambda_{exc} = 420$ nm) en un lector de placas.

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con el software Graph Pad Prism 5.03, empleando un ANOVA de dos vías para comparar la fluorescencia intracelular vs extracelular a 10 y a 22 min para cada AQ. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

Estudio de citotoxicidad de AQs en línea celular de fibroblastos FN1

Preparación del fotosensibilizador

Las soluciones se prepararon del mismo modo que para el ensayo de fotoinactivación de La-LUC.

Línea celular FN1

La línea celular de fibroblastos humanos FN1 fue amablemente cedida por la Dra. Maria Durvanei del laboratorio de Biofísica y Bioquímica del Instituto Butantã, San Pablo. Las células se almacenaron en nitrógeno líquido. Se descongeló un tubo cónico en un baño de agua a 37 °C y, luego las células se transfirieron a otro tubo cónico con medio de cultivo para la eliminación de DMSO (sustancia crioprotectora) por centrifugación. El sobrenadante se descartó y las células precipitadas se resuspendieron en 1 ml de medio de Eagle modificado (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Hyclone, Thermo Scientific), 1% de solución de antibiótico-antimicótico (Sigma) a pH 7,2. Las células se transfirieron a botellas de cultivo de células (75 cm³) con 10 ml de medio de cultivo y se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO₂ hasta que llegan a 100 % de confluencia. Para mantener la actividad mitocondrial, se realizó el cambio del medio de cultivo de los viales cada dos días.

Ensayo de MTT

Se basa en la capacidad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial en reducir la sal amarilla de bromato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), soluble en agua, en cristales de formazan en las células metabólicamente activas. Estos cristales de color azul oscuro son almacenados en el citoplasma y se disuelven en solventes orgánicos como dimetilsulfóxido (DMSO). La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas y se mide por espectrofotometría (Kierklo *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013).

Se colocaron 400 µL de suspensión de fibroblastos (FB) en medio RPMI con una concentración de 5.10⁶ céls/ml en cada pocillo de las placas a utilizar. Se incubaron durante 24 h a 37 °C con atmosfera de 5% CO₂ para favorecer la formación de la monocapa de células.

Se retiró el medio y se colocó la solución del FS a una concentración de 2,5 µM por triplicado. Las mismas fueron incubadas en la oscuridad durante 22 min= 10 min (PIT) + 12 minutos (tiempo máximo de irradiación con LED).

Durante el ensayo, se realizaron los siguientes controles: control negativo (FB sin tratamiento, CN) y control positivo (FB tratado con dodecilsulfato sódico (SDS), tensioactivo que incrementa la permeabilidad de la membrana, CP).

Finalizado el tratamiento, se eliminaron las soluciones utilizadas en cada tratamiento y se adicionó medio RPMI para ser incubadas en estufa a 37°C con atmosfera de 5% CO₂ durante 24 h. A continuación se retiró el medio y se colocaron 40 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) y 360 µl de PBS a fin de determinar la actividad mitocondrial. Las placas se incubaron durante 4 h, se retiró la solución de MTT y se colocó DMSO a fin de permeabilizar la membrana y permitir la disolución de los cristales. Nuevamente se incubaron las placas durante media hora y luego se transfirieron las soluciones a una placa de 96 pocillos para realizar la lectura en un lector de placas a 570 nm.

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con el software Graph Pad Prism 5.03. Para comparar el control negativo vs el tratamiento de los fibroblastos con cada AQ, se utilizó un ANOVA de una vía y se consideró una diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,05$.

REFERENCIAS

- Briggs, L. H., Nicholls, G. A., 1954. Chemistry of the Coprosma genus. Part VIII. The occurrence of asperuloside. *J. Chem Soc.*, 3940.
- Borsarelli, C. D., Mischne, M., Venia, A. L., Mora, F. E., 2007. UVA Self-Photosensitized Oxygenation of β -Ionone. *Photochem. Photobiol.* 1, 1313–1318.
- Bustos, P.S., Deza-Ponzio, R., Páez, P.L., Albesa, I., Cabrera, J.L., Virgolini, M.B., Ortega, M.G., 2016. Protective effect of quercetin in gentamicin-induced oxidative stress in vitro and in vivo in blood cells. Effect on gentamicin antimicrobial activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48, 253–264.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (formerly NCCLS), 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow aerobically; Approved standards – Seventh edition. CLSI document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- Geissman, A.T., 1962. The Chemistry of Flavonoid Compounds. Pergamon Press Inc., Oxford, London.
- Kierklo, A., Pawińska, M., Tokajuk, G., Popławska, B., Bielawska, A., 2012. Cytotoxicity evaluation of three light-cured dentin adhesive materials on human gingival fibroblasts, ex vivo. *Adv. Med. Sci.* 57, 385–90.
- Lakowicz, J. R., 2006. Principles of fluorescence spectroscopy, Principles of Fluorescence Spectroscopy.
- Magde, D., Wong, R., Seybold, P. G., 2002. Fluorescence Quantum Yields and Their Relation to Lifetimes of Rhodamine 6G and Fluorescein in Nine Solvents: Improved Absolute Standards for Quantum Yields. *Photochem. Photobiol.* 75, 327–334.
- Nonell, S., Bravlavsky, S. E., 2000. Time-resolved singlet oxygen detection. *Methods Enzymol.* 319, 37-49.
- Oliveros, E., Murasecco, P. S., Saghafi, T. A., Braun, A. M., Hansen, H. J., 1991. 1H-Phenalenone: Photophysical Properties and Singlet-Oxygen Production. *Helv. Chim. Acta.* 74, 79.
- Schmidt, R., Tanielian, C., Dunsbach R., Wolff, C., 1994. Phenalenone, a universal reference compound for the determination of quantum yields of singlet oxygen $O_2 (^1\Delta_g)$ sensitization. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 79, 11-17.
- Song, D.X., Zheng, L.W., Shen, S.M., Chen, X.M., 2013. Toxicology in Vitro Cytotoxicity of ammonium hexafluorosilicate on human gingival fibroblasts. *Toxicol. Vitr.* 27, 2149–2155.
- Valle, L., Morán Vieyra, F. E., Borsarelli, C. D., 2012. Hydrogen-bonding modulation of excited-state properties of flavins in a model of aqueous confined environment. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11, 1051 – 1061.
- Valeur, B., 2001. Molecular fluorescence, Methods and Applications. Wiley-VCH Verlag.
- Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E. M., 1984. Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag, Berlín.
- Wilkinson, F., Helman, W. P., Ross, A. B., 1993. Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 22, 113-262.
- Yenesew, A., Dagne, E., Muller, M., Steglich, W., 1994. An anthrone, an anthraquinone and two oxanthrones from *Kniphofia foliosa*. *Phytochem.* 37, 525-528.

PUBLICACIONES Y
CONGRESOS

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS CON REFERATO

- * **Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae).** Jesica A. Dimmer, Susana C. Núñez Montoya, Caterine S. Mendoza, José L. Cabrera. *Phytochemistry*. En Prensa. Disponible online en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.02.003>

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Nacionales

- * 44^a REUNIÓN ANUAL DE SOCIEDAD ARGENTINA DE FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL. Universidad de Mendoza. Mendoza, realizada el 31/11/12, 1-2/11/12. Argentina.
Actividad antimicrobiana de extractos de *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith. J.A. Dimmer; P.L. Paez; I Albesa; C.S. Mendoza; J.L. Cabrera. Modalidad póster.
- * VI JORNADAS DE POSGRADO. Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Córdoba, 5 y 6 de diciembre 2013. Argentina.
Avances en el estudio de la especie fototóxica *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith. Jesica A Dimmer, Susana C. Núñez Montoya, Caterine S. Mendoza, José Luis Cabrera.
- * XXX CONGRESO ARGENTINO DE QUÍMICA. Se realizó en Ciudad autónoma de Buenos Aires, desde el 22 al 24 de octubre de 2014, Argentina.
Dilucidación estructural de dos nuevas biantraquinonas de origen natural. JA Dimmer, SC Núñez Montoya, CS Mendoza, JL Cabrera. The Journal of the Argentine Chemical Society. Vol 101 (1-2) January-December 2014 ISSN: 1852-1207. Sección: Química organica.
- * 3^o JORNADAS DE INTEGRACIÓN DEL INSTITUTO MULTIDISCIPLINARIO DE BIOLOGÍA VEGETAL (IMBIV). Córdoba, 11 y 12 de agosto de 2015.
“Fotosensibilizantes fotodinámicos naturales y potenciales aplicaciones terapéuticas”. Exposición oral. Dimmer, Jesica; Cabrera, José Luis.
- * VI I JORNADAS DE POSGRADO Y I JORNADA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. Facultad de Ciencias Químicas, UNC. Córdoba, 6 al 8 de abril 2016. Argentina.
Chlorinated anthraquinones as type I photosensitizers.
Dimmer J., Comini L., Núñez Montoya S., Mendoza C., Cabrera J. Modalidad: Póster.
- * III REUNIÓN DE FOTOBIOLOGOS MOLECULARES ARGENTINOS. Realizado en la ciudad de San Miguel de Tucumán, Argentina, del 29 al 31 de Agosto de 2016.
Propiedades fotofísicas de bi-antraquinonas aisladas de *Heterophyllaea lycioides*.
J. Dimmer, L.R. Comini, F.E. Moran Vieyra, R.A. Mignone, S.C. Núñez Montoya, J.L. Cabrera, and C.D. Borsarelli. Modalidad: Póster.

Inactivación fotodinámica de promastigotas de *Leishmania amazonensis* por acción de Soranjidiol.

J. Dimmer, D. Picanço Aureliano, J. L. Cabrera, S. Núñez Montoya, M. Simões Ribeiro. Modalidad: Póster.

Inactivación fotodinámica de una cepa clínica de *Staphylococcus aureus* por acción de nuevas antraquinonas naturales.

J. Dimmer, P. Páez, S. Núñez Montoya, C. S. Mendoza, J. L. Cabrera. Modalidad: Póster.

- * XXXI Congreso Argentino de Química. Realizado en Ciudad autónoma de Buenos Aires, desde el 25 al 28 de octubre 2016.

Semisíntesis de antraquinonas cloradas a partir de agliconas naturales. Jesica Ayelen Dimmer, Susana C. Núñez Montoya, José Luis Cabrera.

Internacionales

- * XI SIMPOSIO ARGENTINO Y XIV SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTÁNICA. Se realizó en Rosario, desde el 20 al 22 de noviembre de 2013, Santa Fe, Argentina. Publicados en *Dominguezia* (2013), **29**, 99 y 61 respectivamente. ISSN: 1669-6859.

Evaluación de actividad antibacteriana de extractos de *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith sobre bacterias Gram negativas. JA Dimmer; PL Paez; I Albesa; SC Nuñez Montoya; CS Mendoza; JL Cabrera.

Avances en el estudio de la especie fototóxica *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith. JA Dimmer; SC Nuñez Montoya; CS Mendoza; JL Cabrera.

- * 16TH INTERNATIONAL CONGRESS ON PHOTOBIOLOGY. Se realizó del 8 al 12 de Septiembre de 2014, en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Photophysical and photosensitizing characterization of 5-chloro-soranjidiol obtained from *Heterophyllaea lycioides*.

J. Dimmer, L.R. Comini, F.E. Moran Vieyra, R.A. Mignone, S.C. Núñez Montoya, V. Rey, C.S. Mendoza, J.L. Cabrera, and C.D. Borsarelli.

- * 3^a REUNIÓN INTERNACIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS (RICIFA). Se realizó en la Ciudad de Córdoba, el 18 y 19 septiembre de 2014.

Identification and quantitation of anthraquinones by HPLC in bioactive extracts of *Heterophyllaea lycioides*. Dimmer J., Núñez Montoya S., Mendoza C., Cabrera J. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, disponible en <http://ijpsr.com/wp-content/uploads/2015/05/Proceedings-RICIFa2014-Cordoba-ARGENTINA.pdf>

- * XII ELAFOT - ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE FOTOQUÍMICA Y FOTOBIOLOGÍA. Se realizó en la ciudad de Maresías, Brasil desde el 26 al 30 de abril de 2015.

Chlorinated anthraquinones as type I photosensitizers.

Dimmer J., Comini L., Núñez Montoya S., Mendoza C., Cabrera J.
Modalidad: Póster y Flash Talk.

- * VI CONGRESO IBEROAMERICANO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS. Universidad Nacional de Córdoba. Del 4 al 6 de noviembre de 2015. Córdoba, Argentina.

Determinación de la actividad antibacteriana en extractos de raíces de *Heterophyllaea lycioides*. Dimmer JA; Páez PL; Nuñez Montoya SC; Comini LR; Mendoza CS; Cabrera JL. Modalidad póster.

AUTOBIOGRAFÍA

Mi nombre es Jesica Ayelen Dimmer. Nací el 2 de noviembre de 1985, conocido popularmente como el “día de los muertos”. Desde pequeña fui muy curiosa e inquieta, siempre quería saber todo. Parece que la etapa de los “porqués” sería eterna. Me gustaba ir a la escuela, hacía las tareas con gusto y me aburría en vacaciones. El colegio Inmaculada Concepción me dió las herramientas para poder ingresar a la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Córdoba. Fueron cinco años de mucho esfuerzo y sacrificio, mío y de mi familia, que se transformaron en el tan ansiado título de Farmacéutica.



Pero hubo un hecho que marco mi existencia. Fue la profe Cari del cursillo de ingreso que comentó sobre los laboratorios de investigación, y desde ahí esa idea comenzó a dar vueltas en mi cabeza. En segundo año de la carrera, dí mis primeros pasos en el laboratorio de Productos Naturales, donde el “Doc” Oberti y Vivi, me enseñaron sobre la química de las plantas.

Un día, Gaby, mi profe de Farmacognosia, me invitó a trabajar a su grupo, donde conocí al “Green team”. Durante más de dos años, me fui especializando en la química de las plantas medicinales. En el 2012, el “Doc” Cabrera, mi director, y CONICET me dieron la oportunidad de comenzar a estudiar a la “ceguera”, planta de Bolivia que obtuvimos gracias a la ayuda de Sonia Mendoza, una profe con muchas ganas de trabajar de la Universidad de Sucre, Bolivia. Hoy, 5 años después, estoy culminando la etapa del “Doctorado”, un camino difícil, lleno de desafíos, de aventuras, de incógnitas, pero con muchas satisfacciones y, una porción abundante de amigos.

En el futuro, anhelo poder continuar con mis tareas como investigadora y docente. Y en mi proyecto ambicioso, espero algún día no muy lejano poder desarrollar un tratamiento con compuestos químicos obtenidos de plantas para el beneficio de la sociedad.