



TESIS DOCTORAL

“Búsqueda de compuestos bioactivos de especies del género *Dalea* con influencia sobre enzimas relacionadas a la Melanogénesis”

Farm. María Daniela Santi

Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. IMBIV-CONICET.

Directora de Tesis: Dra. María Gabriela Ortega

Comisión Asesora:

Dra. Belkys Maletto

Dra. Viviana Nicotra

Dr. José Luis Cabrera

Evaluadora externa:

Dra. María Inés Isla

A mis padres y hermano

Agradecimientos

“Un hombre del pueblo Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo. A la vuelta, contó. Dijo que había contemplado, desde allá arriba, la vida humana. Y dijo que somos un mar de fueguitos.

-El mundo es eso -reveló-. Un montón de gente, un mar de fueguitos.

Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás. No hay dos fueguitos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chiquitos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.”

El Mundo, Libro de los Abrazos, Eduardo Galeano.

Porque a cada uno de ustedes me he acercado y encendido, para ser una nueva persona cada vez, hoy en este ciclo que se cierra les agradezco:

A Gabriela, mi directora, por confiar en mí para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, por su sinceridad ante todo, por su empuje, predisposición, aguante y paciencia (estas dos últimas elevadas al número de Avogadro), y por sus constantes enseñanzas no sólo profesionales, sino también humanas.

A Mariana Peralta, por invitarme al Laboratorio de Farmacognosia, por ser mi “sensei” e iniciarme en este mundo de las plantas, tan hermoso y gratificante, por enseñarme a ser paciente, por estar ahí siempre con el manual de la *Dalea* en la mano.

Al Dr. José Luis Cabrera, por recibirme en el grupo, dejarme permanecer, por sus aportes en el desarrollo de esta tesis, consejos, aliento, por compartir su sabiduría y vivencias.

A las integrantes de mi comisión de tesis, Dra. Belkys Maletto y Dra. Viviana Nicotra, por aceptar ser parte de la evaluación de este trabajo, por sus contribuciones, correcciones, por el seguimiento y compromiso para conmigo y esta tesis, por su energía positiva y constantes enseñanzas.

Al Departamento de Farmacia, y cada uno de los integrantes, con los que he compartido todo este tiempo, de los que he aprendido, y con los que también he reído y han aguantado alguna ocurrencia de la que escribe. A los auxiliares, como siempre les digo, gracias por votarme.

A gente linda que me he cruzado por el pasillo, con la que he compartido un mate, una charla, un debate, una risa, una ocurrencia, reuniones agitadas e inolvidables de auxiliares: Sole G., Sergio, Octavio, July A., Mely C., Luchi, Juan Pablo, Mely Q., Sol M.,

Marina, Lina, Caro B. (x 2), Ale, Lily, Moni, Caro A., Cinthya, Vane, Jime, Noel, René, Esteban, Vivi C., Vivi B., Caro R., Dani Q., Naty V., Diame.

A Fernanda, Emilia y Laura por el apoyo, los abrazos y el cariño para conmigo.

Al grupo de Farmacognosia, por el aguante (de gritos, bailes, chistes, preocupaciones insólitas, malhumores, inquietudes esotéricas-holísticas, sensibilidad extrema), por los consejos (miles), consuelos en forma de abrazos, risas compartidas, contención económica (deberían estar dentro de entidades), alimentos en momentos críticos, refugio (mi bella etapa de nómada-ciruja), miradas cómplices, tolerancia, paciencia, conversaciones profundas, y otras que no llegaron a ningún lado, enseñanzas por doquier etc., etc., etc... A Gertrudis siempre presente en cada evento social, con el sudor en la frente para que todo salga bien.

A July, Pame, Laurita, Mica y Jesy, más que compañeras, amigas que he encontrado en esta etapa de mi vida, y que estando en esta instancia final, sé que nuestra amistad es eterna. Sin duda las que más me conocen, y más me han sufrido, estando presentes en los momentos de llantos de emoción y llantos de dolor, de felicidad, ansiedad, preocupación...mi apoyo afectivo en estos 5 años, mis confidentes, mis hermanas... para siempre...

A Mely Corti y Maribel, las mejores ayudantas del universo de las ayudantas, gracias por enseñarme a ser mejor persona, por contribuir en esta tesis y en mi vida con tanto.

Al Instituto de Virología, y en especial a Brenda, por su alegría que desborda, por esos besos de recibimiento con ruido más geniales del planeta, por su paciencia, por sus enseñanzas, por aceptarme allí. A Javier por su paciencia nivel extremo, por su colaboración, por sus consejos; a Florencia, por esos mates activadores, por brindarme su amistad, por los momentos compartidos allí y en la vida. A Pedro por su ayuda en aquel caluroso enero en el que hasta las células se querían tomar vacaciones. A todo el resto, Eli, Guille, Agustín, Adrián, Laura T. (otra amiga que me regaló la vida), Mauri, por su predisposición a ayudarme, aguante, y risas compartidas.

Al grupo de Investigación del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología de la Facultad de Medicina, Universidad de Murcia (España), en especial a mi tutor, el Investigador Principal - Catedrático Dr. José Carlos García-Borrón, por recibirme en su laboratorio, por enseñarme tanto y presentarme a las maravillosas personas que conocí en esa estancia, Conchi, Marta, Ana T., Ana L., Antonio, entre otros. A Dina y Karla, que hicieron de mis días en España una experiencia inolvidable.

A Gloria Bonetto y Romina Di Paola, por su apoyo en análisis de RMN y Masa de alta resolución, respectivamente, piezas fundamentales del desarrollo de este trabajo, que no podría haber sido posible sin su predisposición y continua ayuda.

Al Dr. Grougnet, el Dr. Puiatti y la Dra. Moyano junto con su tesista Lourdes Sciu, por confiar en mí y Gabriela para trabajar en equipo.

A los olímpicos, pilares fundamentales en estos últimos años, por aceptarme así, todo terremoto y llanto a flor de piel, por la confianza, el amor en múltiples formas, por hacerme volar, por enseñarme a trabajar en equipo, a luchar por lo que uno quiere, ...por hacerme sentir que nunca estoy sola...

A mis compañeros del Cursillo, por compartir conmigo esto tan lindo que es recibir a estos niños de secundario que sueñan con ingresar a la facu con todo el amor del mundo, ahí pendientes de sus necesidades, haciendo todo lo posible por verlos brillar.

A mis padres, que me dieron la vida, que me enseñaron de valores y persistencia, de sacrificio y confianza, siempre a mi lado en todo momento, apoyándome, aceptándome y amándome incondicionalmente. Si no fuera por ellos, hoy no estaría aquí cumpliendo este sueño.

A mi pequeño hermanito, Diego por su ejemplo de fuerza, voluntad, disciplina, por estar siempre te agradezco. A Ana Julia por su cariño y apoyo, y a ambos por haberme dado el maravilloso regalo de ser tía y madrina de la luz de mis ojos, **Benjamín**.

A mis abuelos, mis antepasados, la sangre que corre por mis venas, la sabiduría transmitida en generaciones, mis defectos y virtudes, mis fortalezas y debilidades.

A mis familiares, amigos de la vida, y personas que ya no están junto a mí, que me acompañaron durante estos años, algunos desde siempre, otros que encontré a la mitad del camino, que me apoyaron, contuvieron y compartieron conmigo innumerables momentos en este tiempo.

A mi matriz de Biodanza, soporte afectivo-emocional fundamental de estos últimos años.

A las entidades que han confiado en este proyecto siendo el sostén económico mediante Becas Doctorales y subsidios, SeCyT, CONICET, FONCyT.

A mis queridas Universidad Nacional de Córdoba y Facultad de Ciencias Químicas a las que espero de alguna manera seguir contribuyendo con mi granito de arena por tanto brindado durante mi carrera de grado y posgrado.

Al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), al cual pertenezco por su apoyo en el desarrollo de esta tesis.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen.....	9
Abstract.....	11
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	13
CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	17
2.1. El género <i>Dalea</i>	19
2.1.1. Características botánicas del género.....	19
2.1.2. Usos en la medicina tradicional.....	20
2.1.3. <i>Dalea</i> L. en Argentina y Bolivia.....	21
2.1.4. Flavonoides en el género <i>Dalea</i> L.: Estudios químicos y de actividad biológica.....	22
2.1.4.1. Flavonoides: química y bioactividad.....	22
2.1.4.2. Género <i>Dalea</i> L.: Estudios químicos y de actividad biológica.....	26
CAPÍTULO 3: OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo General.....	37
3.2. Objetivos Específicos.....	37
CAPÍTULO 4: ESTUDIOS QUÍMICOS EN ESPECIES DEL GÉNERO <i>Dalea</i>	39
4.1. Antecedentes.....	41
4.1.1. <i>Dalea elegans</i>	41
4.1.2. <i>Dalea pazensis</i>	41
4.2. Estudios de flavonoides en <i>D. elegans</i> Gillies ex Hook. et Arn. var. <i>elegans</i>	41
4.2.1. Obtención y procesamiento del material vegetal.....	41
4.2.2. Preparación de los extractos.....	41
4.2.3. Aislamiento, separación y purificación de los principios activos.....	41
4.2.4. Determinación estructural de flavonoides de <i>D. elegans</i>	41
4.2.4.1. Determinación estructural del compuesto 1.....	42
4.2.4.2. Determinación estructural del compuesto 2.....	45
4.2.4.3. Determinación estructural del compuesto 3.....	48
4.2.4.4. Determinación estructural del compuesto 4.....	55
4.2.4.5. Determinación estructural del compuesto 5.....	62
4.2.4.6. Determinación estructural del compuesto 6.....	70
4.3. Estudios de flavonoides en <i>D. pazensis</i> Rusby.....	78
4.3.1. Obtención y procesamiento del material vegetal.....	78
4.3.2. Preparación de los extractos.....	78
4.3.3. Aislamiento, separación y purificación de los principios activos.....	78
4.3.4. Determinación estructural de flavonoides de <i>D. pazensis</i>	78
4.3.4.1. Determinación estructural del compuesto 1.....	79
4.3.4.2. Determinación estructural del compuesto 2.....	87
4.3.4.3. Determinación estructural del compuesto 3.....	95
4.3.4.4. Determinación estructural del compuesto 4.....	102
4.4. Conclusiones.....	103
CAPÍTULO 5: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FLAVONOIDES AISLADOS, SOBRE LA MELANOGÉNESIS	105
5.1. Melanogénesis.....	107
5.1.1. La piel. Estructura y tipos celulares.....	107
5.1.2. Melanocitos y el Melanosoma.....	108
5.1.3. Melaninas: tipos, biosíntesis, características y función.....	109
5.1.3.1. Ruta de Raper-Mason. Biosíntesis y estructura de eumelaninas	109
5.1.3.2. Función de las melaninas.....	110

5.1.4. Tirosinasa	110
5.1.4.1. Actividad Monofenolasa	112
5.1.4.2. Actividad Difenolasa.....	113
5.1.5. Regulación de la melanogénesis.....	113
5.1.5.1. Aplicación de los inhibidores.....	114
5.1.5.2. Aplicación de los estimuladores.....	116
5.1.6. Principales flavonoides moduladores de la melanogénesis.....	116
5.1.6.1. Flavanonas y chalconas como inhibidores de tirosinasa.....	117
5.1.6.2. Flavanonas y chalconas como estimuladores de tirosinasa.....	120
5.2. Evaluación de flavonoides obtenidos de <i>D. elegans</i> y <i>D. pazensis</i> sobre tirosinasa aislada de hongos.....	121
5.2.1. Metodología.....	121
5.2.2. Efecto de flavonoides aislados de <i>D. elegans</i> sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa.....	121
5.2.3. Efecto de flavonoides aislados de <i>D. elegans</i> sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa.....	125
5.2.4. Determinación de la cinética enzimática de compuestos activos de <i>Dalea elegans</i>	126
5.2.5. Efecto de flavonoides aislados de <i>D. pazensis</i> sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa.....	130
5.2.6. Efecto de flavonoides aislados de <i>D. pazensis</i> sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa.....	132
5.3. Evaluación de flavonoides activos obtenidos de <i>D. elegans</i> sobre tirosinasa aislada de células de melanoma de ratón B16.....	134
5.3.1. Metodología.....	135
5.3.2. Evaluación de 8PP y triangularina.Tirosinasa aislada de células B16.....	135
5.4. Actividad de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16: Influencia sobre la melanina extracelular y tirosinasa intracelular.....	136
5.4.1. Metodología.....	136
5.4.2. Determinación de Viabilidad Celular y evaluación sobre la melanogénesis.....	136
5.5. Conclusiones.....	140
CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE LA COMBINACIÓN DE FLAVONOIDES ACTIVOS DEL GÉNERO <i>Dalea</i> Y ÁCIDO KÓJICO SOBRE TIROSINASA.....	143
6.1. Antecedentes.....	145
6.2. Evaluación de las combinaciones flavonoides/ác. Kójico sobre tirosinasa de hongos.....	148
6.2.1. Metodología.....	148
6.2.2. Evaluación de las combinaciones sobre actividad Monofenolasa.....	148
6.2.3. Evaluación de las combinaciones sobre actividad Difenolasa.....	152
6.3. Evaluación de las combinaciones flavonoides/ác. kójico sobre células de melanoma de ratón B16.....	154
6.3.1. Metodología.....	154
6.3.2. Evaluación de la combinación de 8PP y triangularina con AK sobre actividad Difenolasa de tirosinasa intracelular.....	154
6.4. Conclusiones.....	157
CAPÍTULO 7: MATERIALES Y MÉTODOS.....	159
7.1. Procesamiento del material vegetal.....	161
7.1.1. Recolección e identificación.....	161
7.1.2. Desecado, selección y molienda.....	161
7.1.3. Obtención de extractos vegetales.....	161
7.1.4. Determinación cualitativa de la presencia de flavonoides.....	162

7.2. Metodología para la purificación y determinación estructural de los flavonoides obtenidos de especies del género <i>Dalea</i>	162
7.2.1. <i>Dalea elegans</i>	162
7.2.2. <i>Dalea pazensis</i>	163
7.2.3. Métodos cromatográficos.....	163
7.2.4. Métodos espectroscópicos.....	163
7.3. Ensayos farmacológicos.....	164
7.3.1. Ensayo de inhibición y estimulación <i>in vitro</i> de tirosinasa aislada de hongos.....	164
7.3.2. Evaluación del mecanismo cinético de acción sobre tirosinasa aislada de hongos.....	165
7.3.3. Evaluación de actividad inhibidora de 8PP y triangularina sobre tirosinasa aislada de células de melanoma de ratón B16F0.....	165
7.3.4. Viabilidad de células de melanoma de ratón B16F0 tras tratamiento con 8PP, triangularina y AK.....	167
7.3.5. Evaluación de 8PP y triangularina sobre el contenido de melanina extracelular en células de melanoma de ratón B16F0.....	168
7.3.6. Actividad inhibidora de tirosinasa intracelular de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16F0.....	168
7.3.7. Cuantificación de proteínas.....	169
7.3.8. Evaluación de la combinación de flavonoides activos del género <i>Dalea</i> y AK sobre tirosinasa.....	169
7.4. Otro equipamiento utilizado.....	170
CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES.....	171
8.1. Conclusiones generales.....	173
8.2. Proyecciones.....	175
8.3. Trabajos científicos publicados.....	176
CAPÍTULO 9: REFERENCIAS.....	177
9.1. Referencias Bibliográficas.....	179
9.2 Referencias de Figuras y Fotografías.....	189

Abreviaturas

α	Posición alfa
β	Posición beta
γ	Posición gamma
δ	Corrimiento químico
λ	Longitud de onda
θ	Elipticidad molar
ϵ	Absortividad molar
$\Delta\text{Abs}/\text{min}$	Actividad enzimática por minuto
μg	Microgramo
μM	Micromolar
μL	Microlitro
$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$	Ángulo α de rotación óptica específica de la luz polarizada medido a temperatura de 25 °C, en la línea D del sodio cerca de los 589 nm de longitud de onda
$1/v$	Inversa de la velocidad de reacción
$1/[S]$	Inversa de la concentración de sustrato
6P	6-prenilpinocembrina
6PP	2',4'-dihidroxi-6-prenilpinocembrina
8P	8-prenilpinocembrina
8PF	(-)-(2S)-5,7,2'-trihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilflavanona
8PP	2',4'-dihidroxi-8-prenilpinocembrina
ABC	ATP-binding cassette
$\text{Abs}_{\text{control}}$	Absorbancia del control
$\text{Abs}_{\text{muestra}}$	Absorbancia de la muestra
a.C.	Antes de Cristo
acetona- d_6	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico

AK	Ácido kójico
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análisis de Varianza
AREC	Cepas de <i>Escherichia coli</i> resistentes a amoxicilina
ax	Axial
AZM	Azitromicina
br	Del inglés broad (ancho)
BSA	Albúmina de Suero Bovino
°C	Grados centígrados
c	Concentración
CaMDR1	Gen de la resistencia múltiple a drogas de <i>Candida albicans</i>
CaR	Cepa de <i>Candida albicans</i> resistente a fluconazol
CaS	Cepa de <i>Candida albicans</i> sensible a fluconazol
CAT	Enzima catalasa
CAZ	Ceftazidima
CC	Cromatografía en Columna
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CDR	Del inglés <i>Candida</i> drug resistance
CE ₅₀	Concentración estimuladora media
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CI ₅₀	Concentración inhibidora media
CI ₉₀	Concentración inhibidora al 90% de inhibición
Cl ₃ CH	Cloroformo
Cl ₃ CD	Cloroformo deuterado
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros cúbicos
CO ₂	Dióxido de carbono
CONICET	Consejo Nacional de Investigación en Ciencia y Técnica
CORD	Museo botánico de la Universidad Nacional de Córdoba
COSY	Del inglés, correlated spectroscopy
D	O-difenol

d	Doblete
DC	Dicroísmo Circular
d.C	Después de Cristo
dd	Doble doblete
DEPT	Del inglés, distortionless enhancement by polarization transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	(-)-(2S)-7-hidroxi-5-metoxi-6,8-dimetilflavanona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPF	(-)-(2S)-5,7,2'-trihidroxi-8,3'-diprenilflavanona
[E]	Concentración de enzima
Ed	Deoxi-tirosinasa
EdD	Complejo oxi-tirosinasa/o-difenol.
EdM	Complejo deoxi-tirosinasa/monofenol
EdO ₂	Complejo deoxi-tirosinasa/oxígeno
EE.UU	Estados Unidos
EM	Espectrometría de masas
Em	Met-tirosinasa
EmD	Complejo met-tirosinasa/o-difenol
EmM	Complejo met-tirosinasa/monofenol
Eox	Oxi-tirosinasa
EoxD	Complejo oxi-tirosinasa/o-difenol.
EoxM	Complejo oxi-tirosinasa/monofenol
eq	Ecuatorial
ESI	Del inglés, electrospray ionization
EtOH	Etanol
Fa	Fracción de actividad (% actividad/100)
FE	Fase estacionaria
FLZ	Fluconazol
FM	Fase móvil
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico

HRMS	Del inglés, High Resolution Mass Spectroscopy
HMBC	Del inglés, Heteronuclear Multi Bond Correlation Spectroscopy
Hemn	Melanocitos epidérmicos humanos
hs	Horas
HSQC	Del inglés, Heteronuclear Simple Quantum Coherence
Hz	Hertz
[I]	Concentración de inhibidor
IAA	Iodoacetamide
IC	Índice de combinación
IMBIV	Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento en resonancia magnética nuclear
KBr	Bromuro de potasio
KCl	Cloruro de potasio
K ₂ HPO ₄	Fosfato monoácido de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio
K _i	Constante de inhibición
K _{iap}	Constante de inhibición aparente
K _m	Constante de Michaelis-Menten
lag	Período de retardo
LEV	Levofloxacin
log	Logaritmo en base 10
LDL	Del inglés low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad)
M	Monofenol
[M-H] ⁻	Ión molecular de masa del compuesto menos masa de hidrógeno
[M+Na] ⁺	Ión molecular de masa del compuesto más masa de sodio
m	Multiplete
m ²	Metro cuadrado
M ⁺	Ión molecular

máx	Máxima
MBTH	3-metil-2-benzotiazolinona
MCNC	Mínima concentración No citotóxica
MDR	Del inglés, Multidrug resistance (Resistencia Múltiple a Drogas)
Me	Metilo
MeO	Metoxi
MeOH	Metanol
MFS	Del inglés, Mayor Facilitator Superfamily (Familia mayor de facilitadores)
mg	Miligramos
MHz	Mega Hertz
MITF	Del inglés, melanogenesis associated transcription factor
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
m/z	Relación masa/carga eléctrica
MRSA	Meticilina
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico
NaCl	Cloruro de sodio
Na ₂ HPO ₄	Fosfato monoácido de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de sodio
n.d	No determinado
nm	Nanómetros
NM	Neuromelanina
NO	Óxido nítrico
NorA	Transportador de membrana que lleva a resistencia de <i>Stafilococcus aureus</i>
P.A.	Pro-análisis
PBS	Del inglés, Phosphate buffered saline
PCR-RT	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

	(RT-PCR del inglés Reverse transcription polymerase chain reaction)
PF	(-)-(2S)-5,2'-dihidroxi-6'',6''-dimetilcromeno-(7,8:2'',3'')-3'-prenilflavanona
p.f.	Punto de fusión
Pi	Fosforo inorgánico
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluorid
PPO	Polifenoloxidasas
PUVA	Psoraleno más rayos ultravioleta A
Q	O-quinona
R6G	Rodamina 6G
Rf	Relación de frente
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
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SAR	Relación estructura-actividad
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana
sh	Del inglés, shoulder ("hombro" en el espectro UV de un compuesto)
SNC	Sistema Nervioso central
SOD	Enzima superóxido dismutasa
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TPisol	Tampón fosfato solubilizante
TyRPs	Del inglés tyrosinase related proteins (proteínas relacionadas a

	tirosinasa)
U/mL	Unidades por mililitro
UNC	Universidad Nacional de Córdoba
UV	Ultravioleta
UVA	Rayo ultravioleta A
UVB	Rayo ultravioleta B
UV-Vis	Ultravioleta Visible
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
$V_{\text{máx}}$	Velocidad máxima de reacción

RESUMEN

El objetivo de esta tesis se ha centrado en la búsqueda de productos naturales que posean actividad como inhibidores o estimuladores de tirosinasa, enzima responsable de catalizar dos reacciones involucradas en la biosíntesis de melanina, con el propósito de optimizar el tratamiento de desórdenes hiperpigmentantes o hipopigmentantes, teniendo en cuenta que los agentes despigmentantes o repigmentantes empleados actualmente, poseen numerosos y graves efectos adversos.

Continuando con el estudio químico-farmacológico de las partes aéreas y raíces de la especie autóctona argentina *Dalea elegans*, fueron aisladas e identificadas tres C-metil flavanonas y una metil-chalcona informadas por primera vez en esta especie, junto a dos flavanonas preniladas ya informadas para la misma.

Por otra parte, fueron iniciados los estudios químico-farmacológicos de raíces de la especie autóctona boliviana *Dalea pazensis* Rusby, aislando e identificando cuatro prenil-flavanonas, dos de ellas informadas por primera vez en la naturaleza, y dos informadas por primera vez para esta especie.

A dichos flavonoides se les determinó, mediante estudios *in vitro*, la actividad inhibidora/estimuladora de tirosinasa aislada de hongos. Para aquellos que resultaron ser más activos, fueron determinados sus mecanismos cinéticos de acción.

Además, se les evaluó la actividad inhibidora sobre tirosinasa aislada de células de melanoma de ratón B16F0, su acción sobre la melanina extracelular y sobre la enzima tirosinasa a nivel intracelular.

Adicionalmente, fue evaluado el efecto de la combinación de los productos naturales más activos de estas especies con ácido kójico, blanqueador empleado actualmente en el tratamiento de desórdenes hiperpigmentantes e inhibidor de referencia empleado en los experimentos de actividad biológica.

Los resultados significativos obtenidos permitirían presentar a estos compuestos como importantes reguladores de la melanogénesis, pudiendo tras estudios posteriores, poder ser utilizados para el tratamiento de desórdenes que cursen con hiperpigmentación, como así también en cáncer de piel.

ABSTRACT

The aim of this thesis has been focused on the search of natural products with activity as inhibitors or stimulators of tyrosinase, enzyme responsible for catalyzing of two reactions involved in melanin biosynthesis, in order to optimize the treatment of hyperpigmenting or hypopigmenting disorders considering that the depigmenting or repigmenting agents currently employed have numerous and serious adverse effects.

On the chemical-pharmacological study of the aerial parts and roots of the Argentine autochthonous species of *Dalea elegans*, three C-methyl flavanones and a methyl chalcone were isolated and identified for the first time in this species, together with two prenylated flavanones already reported for this species.

On the other hand, the chemical-pharmacological studies of roots of the Bolivian autochthonous species *Dalea pazensis* Rusby were initiated, isolating and identifying four prenyl flavanones, two of them reported for the first time in nature, and two reported for the first time for this species.

The inhibitory/stimulatory activity of tyrosinase isolated from mushroom was evaluated for the flavonoids and the kinetic mechanisms of action were determined for the most active compounds.

In addition, the inhibitory activity of tyrosinase isolated from B16F0 mouse melanoma cells, as well as on the extracellular melanin production and the enzyme tyrosinase at the intracellular level were evaluated.

Furthermore, the effect of the combining the most active natural products of these species with kojic acid, bleaching agent currently used in the treatment of hyperpigmenting disorders and the reference inhibitor employed in biological activity experiments was evaluated.

The significant results obtained would allow presenting these compounds as important modulators of the melanogenesis. Further studies, would be necessary to perform in order to these compounds be able to use for the treatment of hyperpigmentation disorders, as well as in skin cancer.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

Farmacognosia fue por primera vez definida como una disciplina farmacéutica en 1815 por Seidler (Tschirch A., 1909). Durante el siglo XIX fue la disciplina farmacéutica más importante, la “madre” de todas las disciplinas farmacéuticas actuales. Actualmente es considerada como un área multidisciplinar fundamental para la farmacología y la medicina moderna. Centrada en la búsqueda de nuevas moléculas farmacológicamente activas obtenidas de fuentes naturales, en la actualidad se ha logrado comprender que farmacognosia es una de varias disciplinas científicas que tienen una posición estratégica inimitable en la conexión de la biología con la química y fundamentalmente con la medicina. Ampliamente ligada con el reino vegetal, la farmacognosia ha llevado al descubrimiento de nuevas drogas vegetales de uso terapéutico que cumplen un rol importante en el tratamiento de diversas patologías.

Nuestro país conlleva una extensa variedad climática y topográfica que permiten el hábitat de una vasta fuente de distintas especies vegetales, siendo muchas de ellas, utilizadas históricamente en la cura y tratamiento de diversas dolencias por los habitantes nativos de nuestra región. Es así, que nuestra flora nos impulsa, como farmacognostas, al estudio químico de especies autóctonas bioactivas, llevando al hallazgo de distintas estructuras químicas y al estudio farmacológico de las mismas.

Bajo el proyecto de investigación “Estudios químicos y farmacológicos de plantas autóctonas bioactivas”, nuestro grupo de investigación de Farmacognosia, propone la búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos a partir de especies nativas de nuestro país. En el marco de este proyecto, se llevaron a cabo estudios químicos y de actividad biológica en especies del género *Dalea*.

El presente trabajo de tesis doctoral comprende una profundización en el estudio químico y farmacológico de especies vegetales de dicho género, abarcando el estudio de *Dalea elegans* e introduciendo además a *Dalea pazensis*, una especie del género con hábitat en Bolivia, aportando así nuevos conocimientos en cuanto a la flora autóctona sudamericana.

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1. El género *Dalea*

Dalea L., es un género que pertenece a la familia de las Fabáceas y comprende 172 especies (Estrada *et al.*, 2011), distribuidas desde Canadá hasta Argentina y Chile, muy abundante en Estados Unidos, México y Bolivia (Tropicos.org); sus especies se encuentran distribuidas principalmente en zonas de desiertos, pastizales, matorral espinoso, bosque seco tropical, y áreas forestales tropicales de montaña.



Figura 2.1. Distribución geográfica del género *Dalea* L. (Tropicos.org).

2.1.1. Características botánicas del género

El género *Dalea* L. incluye plantas de follaje fino y flores vistosas de color violáceo, son hierbas perennes, rara vez anuales, glandulosas, hojas imparipinadas, estípulas subuladas libres, inflorescencias terminales u opuestas a las hojas, en espigas densas y vellosas, brácteas ovalacuminadas, caducas (Burkart, 1952).

Flores: cáliz 5-dentado, glanduloso e hirsuto, con lóbulos agudos, corola muy caduca, pétalos azul-violáceo con partes blancas, largamente unguiculados, tenues, obtusos, glabros; estambres 10 diadelfos, todos unidos en una breve cúpula basal, anteras redondeadas uniformes, a veces azuladas; ovario ovalado, sécil, 2-ovulado, óvulos opuestos, es decir, insertos a igual nivel en la placenta, estilo filiforme, poco encorvado, persistente en el fruto, con pelos en la base, estigma apical, globoso, pequeño.

Fruto: obovoide, membranoso, uniseminado, incluido en el cáliz, semilla reniforme con radícula sobresaliente (Burkart, 1952).



Dalea coerulea (L. f.) Schinz & Thell.



Dalea purpurea Vent.



Dalea emoryi A. Gray



Dalea boliviana Britton



Dalea elegans Gillies ex. Hook. & Arn.



Dalea pazensis Rusby

Figura 2.2. Algunas especies del género *Dalea* [Dick Culbert (2013), Richard Thomas (1971), Anza-Borrego (1995), Cabrera José Luis (2005, 2011, 2013)].

2.1.2. Usos en la medicina tradicional

Estudios etnobotánicos informan que especies de América del Norte han sido empleadas por comunidades aborígenes como los *Apache* y los *Wanaliha*: *Dakotas*, para diversas dolencias. Así por ejemplo, los tallos de *Dalea enneandra* Nutt. *Nineanther* han sido empleados por los *Apache*, quienes quemaban sobre su piel los tallos de dicha especie para tratar dolores de cabeza, reumatismo y neumonía. Por su

parte, los *Dakota* utilizaban *Dalea purpurea* Vent. para afecciones cardíacas [Moerman, D.E. (1998); Densmore, F. (2005); Moerman, D.E. (2009)].



Fotografía Nativo Dakota. [Autor desconocido (2012)].

En América del Sur, más precisamente en Ecuador, fue informado el uso de tallo, hojas, flores de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell. en el tratamiento de dolencias estomacales (R. Ansaloni, *et al.*, 2010). Dichas aplicaciones en medicina tradicional son datos que nos aportan las investigaciones etnobotánicas y etnomédicas, algunos de los cuales aún no han sido validados mediante estudios de actividad biológica.

2.1.3. *Dalea* L. en Argentina y Bolivia

En nuestro país, se han informado tres especies y una variedad endémica pertenecientes a este género, que tienen su hábitat en Argentina: *Dalea elegans* Gillies ex Hook. et Arn., que crece en las provincias de Córdoba, Salta, San Luis y Jujuy; *D. elegans* Gillies ex Hook. et Arn. var. *onobrychiodes* (Griseb) Barneby, que se encuentra en Tucumán y Salta; *D. leporina* (Aiton) Bullock, que habita en Salta, Jujuy y Tucumán, y *D. boliviana* Britton, con hábitat en Catamarca, Jujuy, Salta y Tucumán (Zuloaga y Morrone, 1999).

En Bolivia, se han hallado catorce especies: *Dalea alopecuroides* Willd, *Dalea boliviana* Britton, *Dalea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr., *Dalea carthagenensis* var. *brevis* (J.F. Macbr.) Barneby, *Dalea carthagenensis* var. *pilocarpa* (Rusby) Barneby, *Dalea elegans* Gillies ex Hook. & Arn., *Dalea elegans* var. *onobrychioides* (Griseb.) Barneby, *Dalea exilis* DC., *Dalea kuntzei* Harms ex Kuntze, *Dalea leporina* (Aiton) Bullock, *Dalea microphylla* Kunth, *Dalea pazensis* Rusby, *Dalea pectinata* Kunth y *Dalea tapacariensis* Harms ex Kuntze (Tropicos.org).

La extensa aplicación de especies de este género en América del Norte, nos llevó a valorar la posibilidad de que las especies de este género que habitan en

Argentina y Bolivia podrían poseer principios activos con actividad biológica y potenciales usos terapéuticos.

Para poder acceder a especies originarias de Bolivia, se llevó a cabo un Convenio Específico de colaboración entre la Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca, Bolivia y la Universidad Nacional de Córdoba (desde el año 2009 y firmado por ambos Rectores), siendo el Dr. J.L Cabrera director del proyecto.

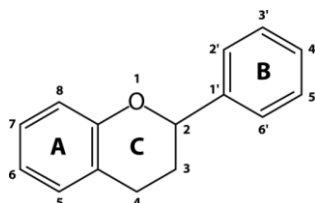
2.1.4. Flavonoides en el género *Dalea* L.: Estudios químicos y de actividad biológica

Antecedentes en el estudio químico de este género muestran a los flavonoides como uno de los metabolitos secundarios más relevantes presentes en el mismo.

A continuación, se muestra una breve reseña en cuanto a las características químicas de este grupo de metabolitos secundarios y sus estudios de bioactividad, con el objeto de introducir sobre el conocimiento e importancia de esta temática.

2.1.4.1. Flavonoides: química y bioactividad

Los flavonoides son compuestos fenólicos de bajo peso molecular, metabolitos secundarios que se encuentran en frutas, verduras, nueces, semillas, hierbas, especias, tallos y flores, así como en té y vino tinto (Middleton *et al.*, 2000). Dichos compuestos se producen tanto en el estado libre y como glucósidos y están presentes desde las plantas más primitivas hasta las más avanzadas angiospermas, las cuales invierten significativas cantidades de energía metabólica en la producción de éstos. (Gould & Lister, 2006). Esta familia de compuestos ejerce varias acciones farmacológicas importantes de potencial interés clínico. La primera evidencia de actividad farmacológica de los flavonoides fue presentada por el fisiólogo húngaro Albert Szent-Gyorgyii en 1938 (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1937), que informó la eficacia sobre la prevención de la hemorragia capilar y la fragilidad asociada con el escorbuto producida por flavonoides presentes en la cáscara de los cítricos (Romano, B. *et al.*, 2013). Desde entonces, un gran número de efectos biológicos les han sido atribuidos (Prasad *et al.*, 2010; Amado *et al.*, 2011; Hanrahan *et al.*, 2011; Procházková *et al.*, 2011; Dajas, 2012, Da-Song Yang *et al.*, 2015; Sony George *et al.*, 2015; Whyte *et al.*, 2015, entre otros). Presentan en su estructura grupos hidroxilo en anillos aromáticos, por lo que se los incluye en el amplio grupo de los compuestos fenólicos. La estructura básica de los flavonoides es el núcleo 2-fenil-benzo [α] pirano o núcleo flavano, el cual consiste en dos anillos aromáticos (llamados A y B), unidos a través de tres átomos de carbono, que en la mayoría de las subclases de flavonoides, se ciclan en un anillo heterocíclico llamado C. La estructura formada constituye un sistema C6-C3-C6, de quince átomos de carbono (C15).



Los flavonoides son biosintetizados mediante la vía de shikimato y la vía de acetato-malonato. Las chalconas, flavanonas, flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles, son tanto intermediarios de biosíntesis como productos finales que pueden acumularse en los tejidos vegetales. Otras clases de flavonoides son solo productos finales de biosíntesis, por ejemplo antocianidinas, proantocianidinas, flavonas y flavonoles. Otras dos clases de flavonoides son aquellos en los que la posición 2-fenilo de la cadena, isomeriza a la posición 3, dando los isoflavonoides. Los neoflavonoides son aquellos que se forman mediante la isomerización a la posición 4. La Figura 2.3 presenta las estructuras de los diferentes tipos de flavonoides (Barron & Ibrahim, 1996).

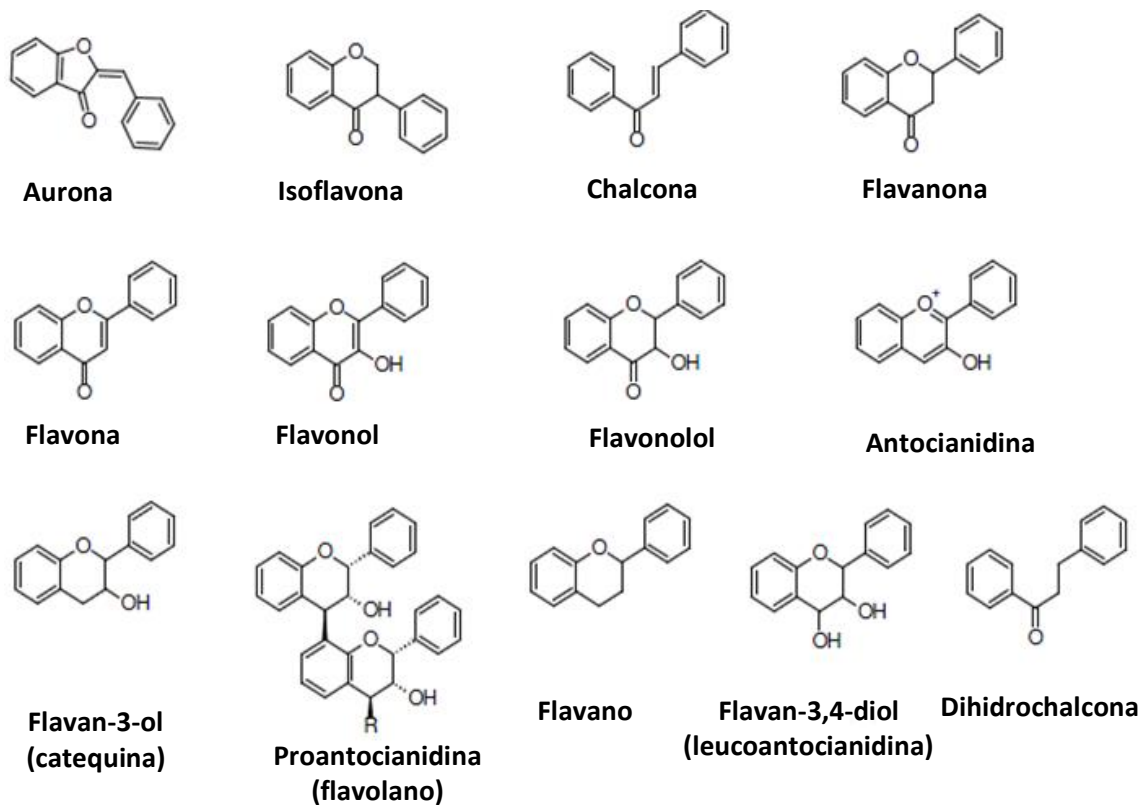


Figura 2.3. Estructura básica de las principales clases de flavonoides (Barron & Ibrahim, 1996).

En cuanto a las actividades farmacológicas de esta familia de compuestos, han sido reportadas numerosas, lo que ratifica la importancia de su estudio. Algunas de ellas se detallan a continuación, referenciando algunos de los vastos antecedentes bibliográficos sobre estudios de flavonoides para diversas patologías y/o sistemas.

Sistema Nervioso central: Algunos flavonoides actúan sobre el sistema nervioso central (SNC) a nivel del receptor GABA A, presentando, muchos de ellos, acción sedante, ansiolíticas, o anticonvulsivantes; otros pueden actuar como inhibidores de la monoamino oxidasa A o B, resultando ser antidepresivos o antiparkinsonianos (Choudhary *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2011; Herrera-Ruiz *et al.*, 2011; Jäger and Saaby, 2011; Jiang *et al.*, 2011; Can y Ozkay, 2012; Karim *et al.*, 2012; Zhang

et al., 2012, Zhang X.H. *et al.*, 2012, Wasowski *et al.*, 2012). También se han informado flavonoides con efectos neuroprotectores en células y modelos animales, a través de diferentes procesos biológicos como la atenuación del estrés oxidativo, de la excitotoxicidad y de la muerte neuronal por apoptosis, y la regulación de la cascada de señales quinasa (Campos-Esparza M y Torres-Ramos, 2010; Gutiérrez-Merino *et al.*, 2011; Hanrahan *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). Otros, por su parte, han demostrado ser inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, un objetivo clave para la terapia de la enfermedad de Alzheimer (Jung *et al.*, 2011; Uriarte-Pueyo; Calvo, 2011 y Habtemariam & Cowley, 2012). Spencer *et al.*, 2012 revelan a flavonoides como inhibidores de procesos neuroinflamatorios, que contribuyen a la patogénesis de trastornos neurodegenerativos.

Sistema cardiovascular: Flavonoides sulfatados han sido reportados como antitrombóticos (Guglielmone *et al.*, 2002, 2005, 2015; Agnese *et al.*, 2009). Además de la actividad antioxidante, se han descrito que ciertos flavonoides pueden regular la señalización de vías diferentes que intervienen en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Wallace, 2011). Aumentan la producción de óxido nítrico (NO) que conduce a la relajación dependiente del endotelio en condiciones como la hipertensión, accidente cerebrovascular o el síndrome metabólico (Andriantsitohaina *et al.*, 2012). Recientes investigaciones preclínicas han confirmado efectos beneficiosos de flavonoides en enfermedades cardiovasculares, demostrando proteger los cardiomiocitos, evitando así la muerte celular inducida por estrés oxidativo (Kim *et al.*, 2011), generando una disminución de factores antiangiogénicos (Ramesar *et al.*, 2012.), suprimiendo el aumento de la presión arterial relacionado con la edad, disminuyendo la tendencia trombótica y el aumento de la producción de metabolitos de NO en el accidente cerebrovascular (Ikemura *et al.*, 2012).

Cáncer: Se han informado que determinados metabolitos flavonoideos ejercen acciones contra el cáncer a través de una combinación de mecanismos tales como la inactivación del carcinógeno, antiproliferación, detención del ciclo celular, inducción de apoptosis, inhibición de la angiogénesis, actúan como antioxidantes y colaboran con la inversión de la resistencia a múltiples fármacos (Gibellini *et al.*, 2011; Chajar *et al.*, 2012). Los estudios epidemiológicos sugieren que la ingesta de flavonoides puede reducir el riesgo de tumores de mama, colon, pulmón, próstata y páncreas. Numerosos flavonoides han demostrado ejercer acción genoprotectiva, citotóxica, antiproliferativa y/o acciones pro-apoptóticas en diferentes líneas celulares tumorales (Awale *et al.*, 2011; Mansoor *et al.*, 2011; Marrassini *et al.*, 2011; Seito *et al.*, 2011; Shim, 2011; Yang, *et al.*, 2011; Aranganathan & Nalini, 2012; Argyropoulou *et al.*, 2012; Goh *et al.*, 2012; Hwang *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Zajc *et al.*, 2012). Otros promueven la apoptosis en células HeLa (Liu *et al.*, 2011); inhiben la angiogénesis y la metástasis a través de la regulación de múltiples vías de señalización (Mojzis *et al.*, 2008) o inhiben la proliferación de células de glioblastoma humano (Freitas *et al.*, 2011).

Tracto respiratorio: Algunos flavonoides son importantes en enfermedades del tracto respiratorio, exhibiendo efecto antiinflamatorio (Rogerio *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2012; Huang & Liou, 2012), antialérgico (Kulka, 2009; Li *et al.*, 2010), antioxidante (Guabiraba *et al.*, 2010a; Yan *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012) y antiespasmódico (Capasso *et al.*, 2009; Macêdo *et al.*, 2011). Otros flavonoides además, modulan la secreción de mucosidad. (Kim S.M. *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2012).

Diabetes: Numerosos compuestos flavonoideos han demostrado actuar sobre blancos biológicos en donde se ve involucrada la Diabetes mellitus tipo 2, por ejemplo, algunos actúan modulando la acción de α -glucosidasa, co-transportadores de glucosa o aldosa reductasa. Asimismo, dadas a sus propiedades antioxidantes, estos protegen del deterioro generado como efecto de la hiperglucemia y mejoran el metabolismo de la glucosa (Nicolle *et al.*, 2011; Qi *et al.*, 2011; Tang *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2011). Se han reportado además flavonoides sulfatados como inhibidores de aldosa reductasa, enzima involucrada en el desarrollo de cataratas en pacientes con diabetes clínica (Agnese *et al.*, 2009).

Dislipidemia y obesidad: Estudios han demostrado que ciertos flavonoides previenen la esteatosis hepática y dislipidemia mediante la inhibición de la síntesis de ácidos grasos y el incremento de la oxidación de los mismos (Cherniack, 2011; Assini *et al.*, 2013).

Tracto digestivo: Numerosos antecedentes informan a flavonoides como inhibidores de la motilidad/contractilidad gastrointestinal y la diarrea (Di Carlo *et al.*, 1993; Gálvez *et al.*, 1995; Gharzouli & Holzer, 2004; Capasso *et al.*, 2008; Borrelli *et al.*, 2012), atenuadores del dolor visceral (Gadotti *et al.*, 2005; Shi *et al.*, 2012) y la inflamación intestinal (Ocete *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2012). Otros, exhiben efectos hepatoprotectores (Jayaraj *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012) y acción antiulcerosa gástrica (Di Carlo *et al.*, 1994; Izzo *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1998; Borrelli & Izzo, 2000; Hariprasath *et al.*, 2012).

Antibacterianos y antiparasitarios: La mayoría de los flavonoides presentan actividad antimicrobiana, especialmente flavonoides prenilados e isoflavonas (Ortega *et al.*, 1996; Belofsky *et al.*, 2004a, 2006a; Mukne *et al.*, 2011; Belofsky *et al.*, 2014).

Antiinflamatorios: Se ha informado que determinados flavonoides actúan modulando numerosos intermediarios en el proceso inflamatorio, provocando por ejemplo la inhibición de la biosíntesis de prostanoideos, inhibición de la liberación de histamina, inhibición de la actividad de fosfodiesterasas, inhibición de proteín-quinasas, entre otros (Rathee *et al.*, 2009; Serafini *et al.*, 2010; Agrawal *et al.*, 2011; Parhiz *et al.*, 2014; entre otros).

Dermatología: Numerosos flavonoides son componentes multi-activos utilizados en dermatología principalmente por sus acciones como antioxidantes y antiinflamatorios (Arct & Pytkowska, 2008), como así también por su acción como despigmentantes o pigmentantes. Estudios han demostrado que los flavonoides podrían tener un papel fundamental en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel inducidas por radiación UV (Moon y Kim, 2012). Otro estudio encontró que algunos flavonoides reducen la síntesis de melanina comparable al tratamiento con AK, un agente de blanqueamiento demostrado (Goh *et al.*, 2012). Numerosas investigaciones han informado a flavonoides como importantes inhibidores y estimuladores de la melanogénesis (Chen *et al.*, 2015). Algunos flavonoides del género *Dalea* mostraron una interesante actividad como inhibidores de la enzima tirosinasa (Chiari *et al.*, 2011; Peralta *et al.*, 2011). Tirosinasa es una enzima clave en la coloración de la piel, los ojos y el cabello en mamíferos. Se la encuentra distribuída en mamíferos, plantas, hongos y bacterias y es una de las enzimas que regula la biosíntesis y metabolismo de la melanina. Existen condiciones fisiológicas y/o patológicas que pueden afectar la síntesis de la melanina. Mayores aspectos sobre la relevancia e

impacto que motivó al estudio de esta actividad biológica, serán plasmados en el Capítulo 5.

Habiendo introducido aspectos sobre la química y bioactividad de los flavonoides, se presentan los antecedentes de este tipo de metabolitos en el género, focalizando sobre el tipo estructural y su actividad biológica.

2.1.4.2. Género *Dalea* L.: Estudios químicos y de actividad biológica

En Estados Unidos y México, fueron iniciados los estudios químicos en tres especies originarias del género *Dalea*: *D. emoryi*, *D. polyadenia* F. Heller y *D. tinctoria* Brandegee, las cuales eran empleadas popularmente como tinctóreas, por las comunidades aborígenes de la región, para colorear las pieles de animales y las fibras usadas en la fabricación de canastas. A partir de extractos bencénicos de estas especies, fueron aislados diversos metabolitos oxigenados, entre ellos, una flavanona metoxilada llamada demetoximateucinol (**1**) y dos pigmentos rojos llamados dalrubona (**2**) y metoxidalrubona (**3**) (Figura 2.4). Estas últimas, son derivadas del sistema C6-C3-C6 de los flavonoides (Dreyer, *et al.*, 1975; 1978). Este es el primer reporte de flavonoides en el género.

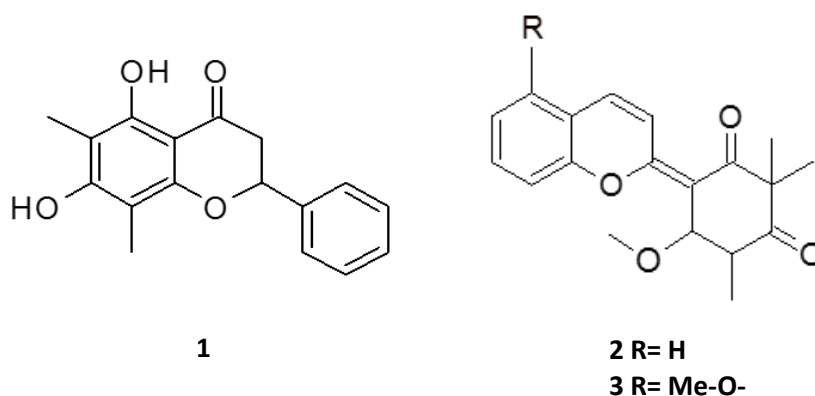


Figura 2.4. Estructuras del compuesto demetoximateucinol (**1**), y los pigmentos dalrubona (**2**) y metoxidalrubona (**3**).

Del extracto de éter de petróleo de la planta entera de la especie mexicana *D. scandens* var. *paucifolia* y *D. thyrsoiflora* A. Gray, fueron aisladas e identificadas una isoprenilflavanona llamada louisfieserona (**4**) y su 2R-estereoisómero isolouisfieserona (**5**), una chalcona llamada aurentiacina A (**6**) y la flavanona alpinetina (5-metoxi-7-hidroxi-flavanona, **7**) (Figura 2.5) (Dominguez X.A., *et al.*, 1980).

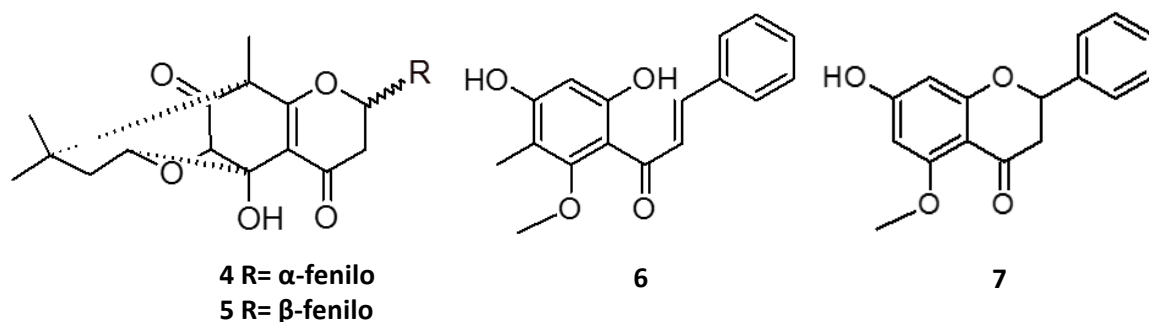


Figura 2.5. Estructuras de los compuestos lousifieserona (4), isolousifieserona (5), aurentiacina A (6) y alpinetina (7).

A partir de *D. coerulea*, especie colombiana con uso popular como insecticida, (Gonzalez *et al.*, 1992) fue aislada una C-metil chalcona, 4'6'-dihidroxi-3',5'-dimetil-2'-metoxichalcona (8) (Figura 2.6).

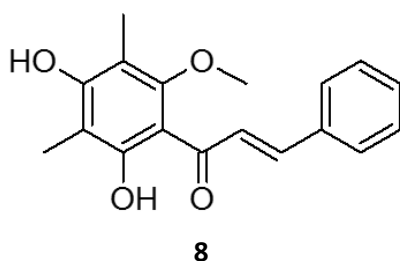


Figura 2.6. Estructura de 4'6'-dihidroxi-3',5'-dimetil-2'-metoxichalcona (8).

Asimismo, de esta especie, también fueron aisladas y descritas cuatro flavanonas preniladas: 5,7-dihidroxi-8-prenilflavanona (9); 5,7-dihidroxi-6-metil-8-prenilflavanona (10); 5-hidroxi-7-metoxi-8-prenilflavanona (11) y 5-hidroxi-7-metoxi-6-prenilflavanona (12) (Figura 2.7) (Arango y Gonzalez, 1994).

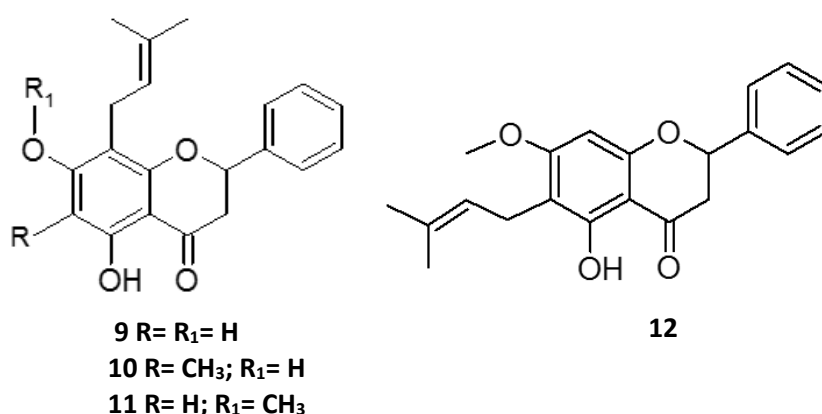


Figura 2.7. Estructuras de flavanonas preniladas aisladas de *D. coerulea*.

De la especie *D. elegans* con hábitat en Argentina, fueron aisladas dos flavanonas preniladas: 6-prenilpinocembrina (6P), a partir de las partes aéreas y 2',4'-

dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)- 6-prenilpinocembrina (**6PP**) (Figura 2.8), presente en las raíces (Cafaratti *et al.*, 1994). Estas flavanonas fueron evaluadas en cuanto a su actividad antimicrobiana, determinándose una potente actividad de **6PP** sobre cepas estándares de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Ortega *et al.*, 1996). Esta investigación cobra importancia por ser el primer estudio de actividad biológica en el género *Dalea*.

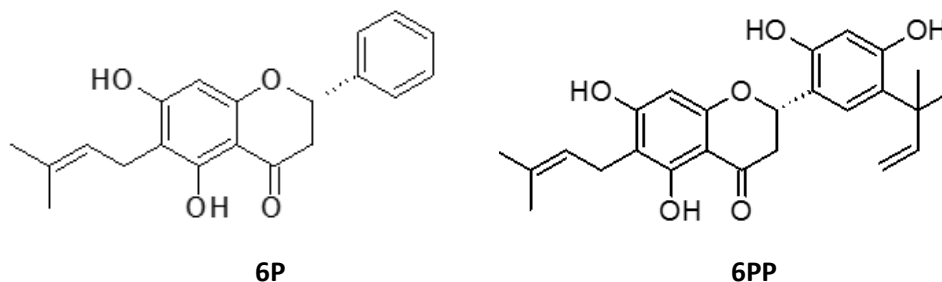


Figura 2.8. Estructuras de flavanonas preniladas (**6P** y **6PP**) aisladas de *D. elegans*.

Nanayakkara *et al.*, 2002, evaluaron la actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* susceptible y resistente a meticilina de dos flavanonas preniladas: 5,7,2', 4'-tetrahidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**13**) y 5,7,4'-trihidroxi-2'-metoxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**14**) y una flavona: 5,7,2',4'-tetrahidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilflavona (**15**) (Figura 2.9) aisladas de la especie mexicana *D. scandens* var. *paucifolia* y demostraron una importante actividad.

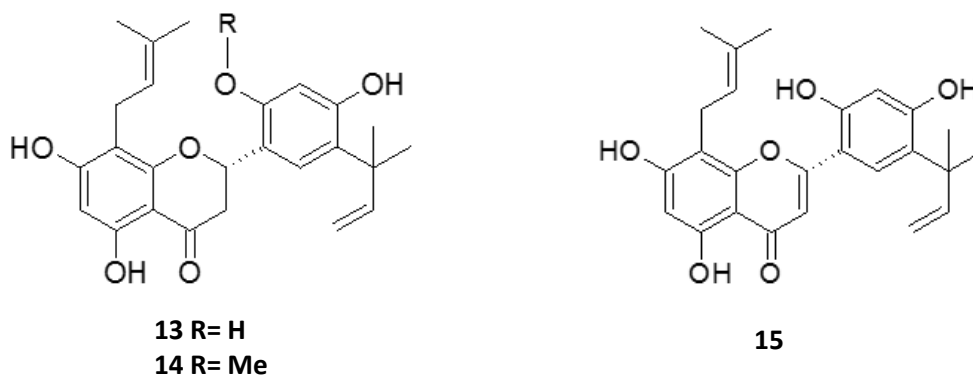


Figura 2.9. Flavonoides de *D. scandens* var. *paucifolia* con actividad antimicrobiana.

Posteriormente, se profundizó la investigación sobre la actividad antibacteriana y antifúngica del compuesto **6PP** aislado de *D. elegans* en nuestro laboratorio, trabajando con cepas resistentes aisladas clínicamente, algunas de ellas obtenidas de pacientes inmunodeprimidos como enfermos de SIDA. Este flavonoide presentó inhibición sobre las cepas bacterianas y fúngicas, siendo de relevancia la actividad observada sobre *S. aureus* tanto sensible como resistente a oxacilina. Se observó, además, que este compuesto inhibió el crecimiento de especies de *Candida* que poseen resistencia intrínseca o que son capaces de adquirirla frente a antifúngicos, como fluconazol y anfotericina B, normalmente utilizados en la clínica en el tratamiento de candidiasis (Pérez *et al.*, 2003).

A partir de *D. versicolor* Zucc., especie que crece en Arizona, (EEUU), fueron aislados siete metabolitos fenólicos, entre ellos cuatro presentaron el núcleo flavonoide: una isoflavona prenilada: 5,7,2',4'-tetrahidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilisoflavona (**16**) (Figura 2.10), dos flavanonas preniladas [ya informadas en *D. scandens* var. *paucifolia*, (**13** y **14**)] (Figura 2.9) y 4',6'-dihidroxi-3',5'-dimetil-2'-metoxichalcona (**17**) (Figura 2.10). Éstos aumentaron la actividad de berberina, eritromicina y tetraciclina en *S. aureus*. Dichos compuestos pudieron inhibir en *S. aureus*, la resistencia múltiple a drogas (MDR, multidrug resistance) y potenciaron la actividad de antimicrobianos (Belofsky *et al.*, 2004 a).

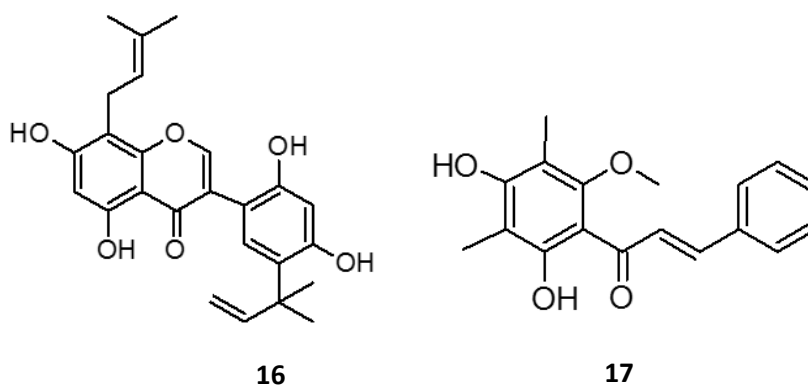


Figura 2.10. Isoflavona prenilada (**16**) y chalcona metoxilada (**17**) aisladas de *D. versicolor*.

De la especie estadounidense *D. spinosa* A. Gray, Belofsky *et al.* aislaron una isoflavona: 6,4'-dimetoxi-7,2'-dihidroxiisoflavona (**18**) (Figura 2.11). Los ensayos de este compuesto frente a *S. aureus* resistente, permitió concluir que **18** incrementó el efecto antimicrobiano de berberina, sugiriendo una actividad inhibidora de la MDR, asociada a la inhibición del transportador NorA (Belofsky *et al.*, 2006 a).

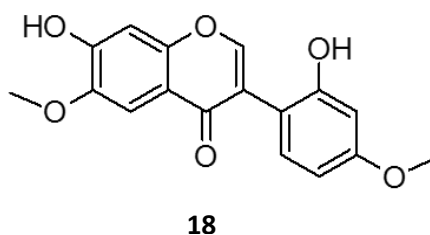


Figura 2.11. Isoflavona aislada de *D. spinosa*.

Continuando sus estudios en el género, Belofsky *et al.*, aislaron a partir de *D. purpurea*, un flavanonol prenilado, petalostemumol (**19**) (Figura 2.12), (Belofsky *et al.*, 2004 b). Asimismo, de *D. aurea* (Nutt. ex Pursh) Britton, aislaron dos isoflavanos prenilados (**20** y **21**) (Figura 2.13) los cuales demostraron actividad inhibitoria de la ameba *Naegleria fowleri* (Belofsky *et al.*, 2006 b). Ambas especies presentan su hábitat en EEUU.

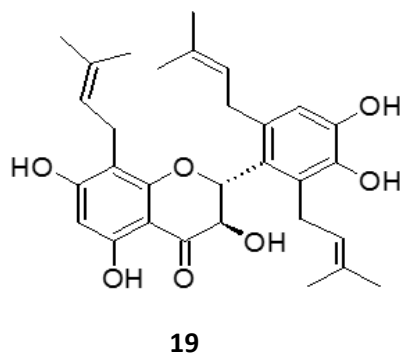


Figura 2.12. Flavonol prenilado de *D. purpurea*.

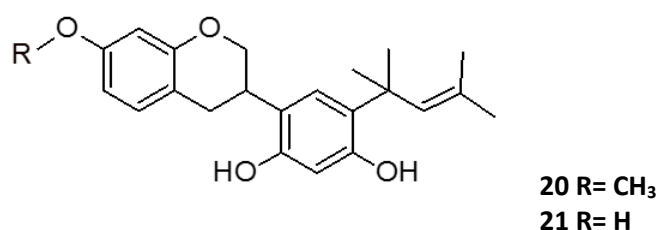


Figura 2.13. Isoflavanos prenilados de *D. aurea*.

En un trabajo interdisciplinario, nuevos estudios farmacológicos realizados en el flavonoide **6PP** (Figura 2.8) aislado de *D. elegans*, demostraron su actividad antioxidante significativa, capacidad atrapadora de radicales libres e inhibición de la peroxidación lipídica enzimática en microsomas hepáticos de rata (Elingold *et al.*, 2008).

En el año 2011, nuestro grupo informa el aislamiento de tres nuevas flavanonas preniladas, a partir del extracto hexánico de raíces de *Dalea boliviana* Britton, especie con hábitat en Argentina: (2*S*)-5,7,2'-trihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilflavanona (**22**), (2*S*)-5,7,2'-trihidroxi-8,3'-diprenilflavanona (**23**), y (2*S*)-5,2'-dihidroxi-6'',6''-dimetilchromeno-(7,8:2'',3'')-3'-prenilflavanona (**24**), junto a una conocida, cromeno (dimetilpirano) flavanona, obovatina (**25**) (Figura 2.14). A dichos compuestos se les llevó a cabo la medición de la actividad inhibidora de tirosinasa, resultando ser el compuesto **22** el más activo con una CI_{50} de 27,5 μ M, seguido por el compuesto **23**, cuya CI_{50} fue de 68,5 μ M; los compuestos **24** y **25** fueron escasamente activos (Peralta *et al.*, 2011).

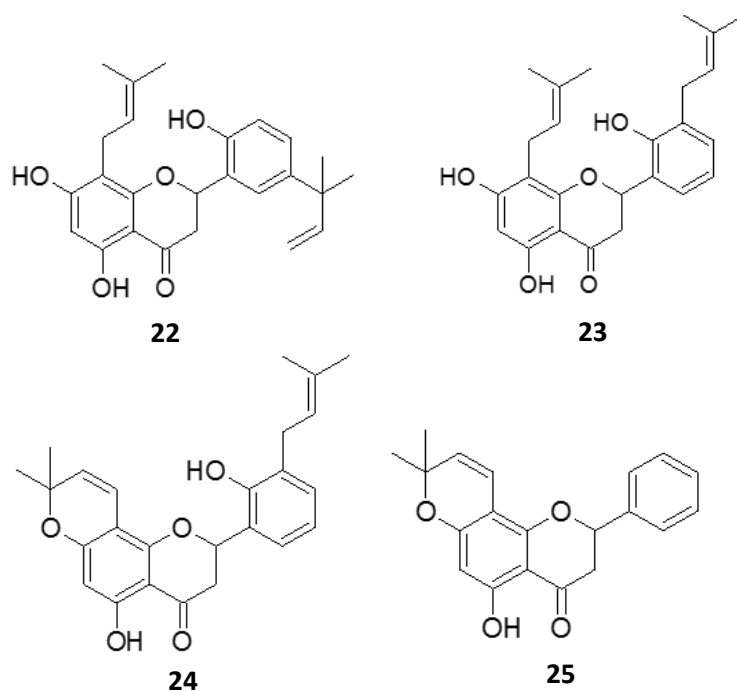


Figura 2.14. Flavanonas aisladas de *D. boliviana* Britton.

Ese mismo año, Chiari *et al.* informa el aislamiento de 5,2',4'-trihidroxi-2'',2''-dimetilcromeno-(6,7:5'',6'')-flavanona (dalenina), (Figura 2.15) a partir del extracto etanólico de partes aéreas de *D. elegans*, el cual resultó ser activo como inhibidor de la actividad Monofenolasa y Difenolasa de tirosinasa, presentando una CI_{50} de 0,26 y 18,61 μM , respectivamente (Chiari *et al.*, 2011).

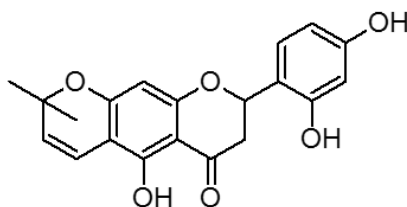


Figura 2.15. Cromeno flavanona 6-isoprenoide, dalenina.

Un año más tarde, Peralta *et al.*, informa al compuesto 2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (**6PP**) como un importante antifúngico sobre cepas de *Candida albicans* sensibles y resistentes a azoles, como así también su efecto inhibitorio sobre las bombas transportadoras de dichas cepas, lo que revierte la resistencia hacia fluconazol en cepas resistentes (Peralta, *et al.*, 2012). Adicionalmente demostró que la combinación de **6PP** y fluconazol fue más efectiva que cada compuesto por separado, mostrando un efecto sinérgico tanto en cepas de *C. albicans* resistentes como sensibles a azoles (Peralta *et al.* 2012).

A partir del extracto metanólico de raíces de la especie estadounidense *Dalea formosa* Torr., Belofsky *et al.*, informó el aislamiento de seis nuevos isoflavonoides, sedonans A-F (**26–31**). La actividad antifúngica de **26** sobre *Candida glabrata* fue más

alta que la observada para fluconazol (CIM=20 μ M). Sedonans A–F fueron además activos sobre cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 2.16) (Belofsky *et al.*, 2013).

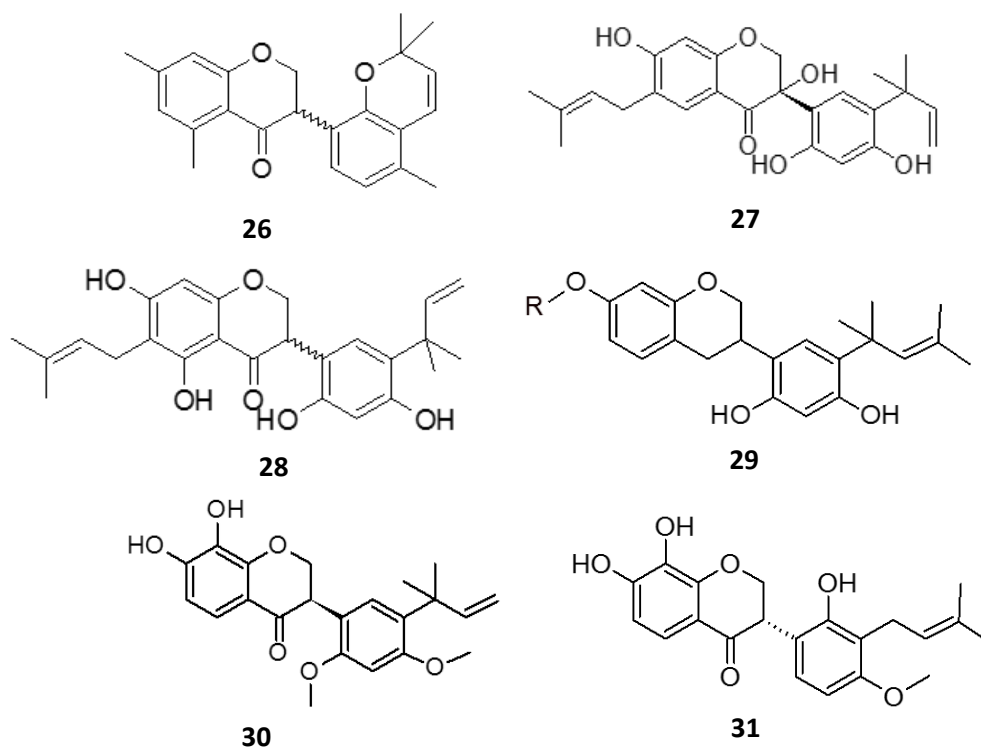


Figura 2.16. Compuestos aislados de *Dalea formosa*.

Del estudio químico de *Dalea searlsiae* (A. Gray) Barneby, especie nativa del oeste de Estados Unidos, se obtuvieron a partir del extracto metanólico de raíces, nuevas flavanonas preniladas y geraniladas A–D: malheuran A (**32**), malheuran B (**33**), malheuran C (**34**) y malheuran D (**35**), dos flavanonas conocidas: 5,7,2',4'-tetrahidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**15**) y prostratol F (**36**). Las isoflavonas griffonianona E (**37**) y calopogonium isoflavona A (**38**) fueron aisladas de las partes aéreas (Figura 2.17). Los compuestos **32–36** exhiben CIMs de 2–8 μ g/mL sobre cepas mutadas de *Streptococcus*, *Bacillus cereus* y *S. aureus* sensible y resistente a oxacilina. Los metabolitos **37–38** fueron inactivos. Fue observada, además una importante disminución por parte el compuesto **35** en el crecimiento de larvas de *Spodoptera frugiperda* (Belofsky *et al.*, 2014).

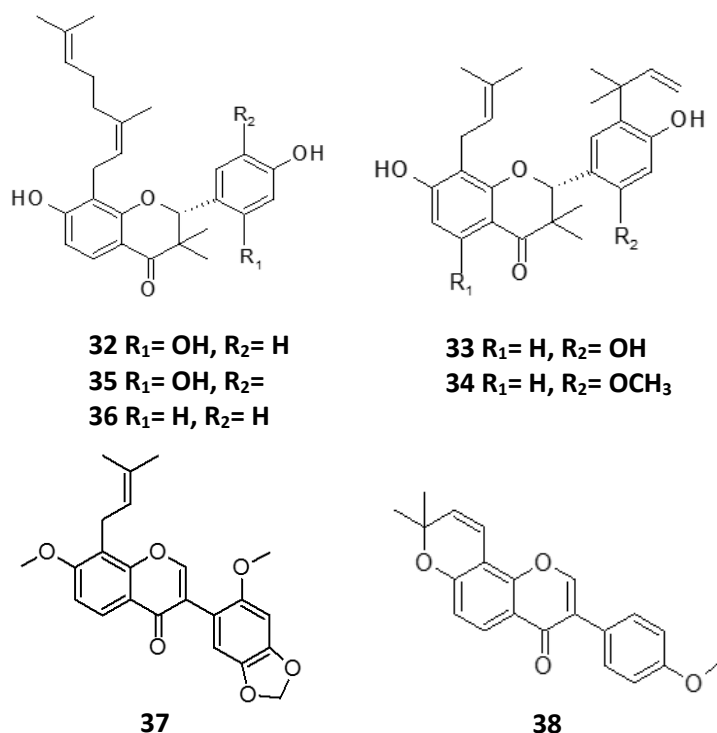


Figura 2.17. Compuestos aislados de *Dalea searlsiae*.

En 2014, mediante el empleo de experimentos de RMN en 2D (COSY, HMBC, HMQC), que permiten asignar inequívocamente los sustituyentes en estructuras orgánicas, nuestro grupo de investigación lleva a cabo la reasignación de los compuestos 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona (**6P**) y 5,7,2',4'-tetrahidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-6-prenilflavanona (**6PP**) informados en 1994, como (**8P**) y 5,7,2',4'-tetrahidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilflavanona (**8PP**), Figura 2.18 (Peralta *et al.*, 2014). **8PP** ya había sido informado en otras especies de *Dalea* (Nanayakkara *et al.*, 2002; Belowsky *et al.*, 2014).

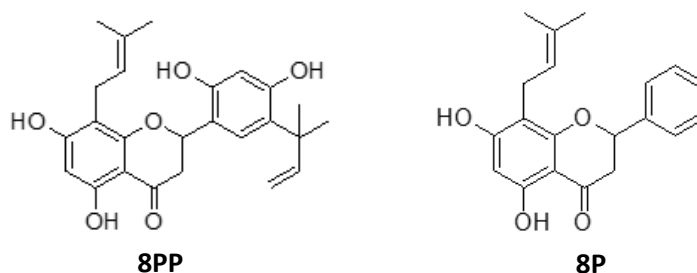


Figura 2.18. Compuestos **8P** y **8PP** aislados de *D. elegans*.

Posteriormente, nuestro grupo llevó a cabo la determinación de la actividad inhibidora Monofenolasa de tirosinasa de dichos compuestos. El compuesto **8PP** resultó ser el más activo, por lo que se le determinó la CI_{50} , que fue de $2,27\mu\text{M}$, demostrando ser aproximadamente dos veces más activo comparándolo con el inhibidor de referencia empleado, ácido kójico (AK) $CI_{50}=4,2\mu\text{M}$ (Peralta *et al.*, 2014).

Nuestro grupo de investigación continuó estudiando la actividad antifúngica del compuesto **8PP**, informando que dicho compuesto reduce la formación de biofilms ya que incrementa el estrés celular por medio de un aumento en las especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno. Adicionalmente produce una activación de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) de cepas de *C. albicans* sensible y resistentes a azoles (Peralta *et al.*, 2015).

El estudio de *Dalea frutescens* A. Gray, especie nativa de Texas (EEUU), llevó al aislamiento de dos nuevas chalconas isopreniladas llamadas sanjuanolide (**39**) y sanjoseolide (**40**). Dichos compuestos fueron evaluados sobre líneas celulares de cáncer de próstata, observándose que el compuesto **39** interfiere en la mitosis celular, provocando el desarrollo de husos mitóticos anormales, e impidiendo así la división celular (Shaffer, C. *et al.*, 2016).

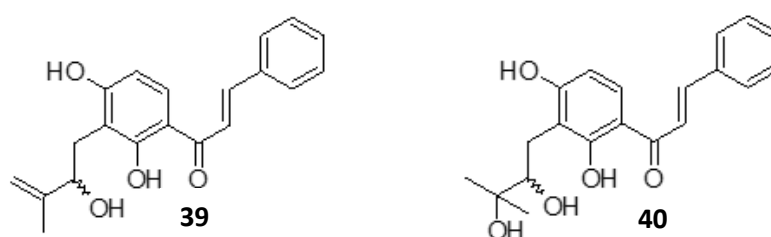


Figura 2.19. Chalconas aisladas de *D. frutescens*.

Los antecedentes presentados, denotan la riqueza química de metabolitos flavonoideos presentes en *Dalea*, haciendo de este género una vasta fuente para su estudio químico y farmacológico. Asimismo, no podemos dejar de mencionar las importantes y variadas actividades biológicas demostradas para dichos compuestos naturales, que no hacen más que revelar el amplio potencial farmacológico que poseen. De este modo, es por todo lo expuesto, lo que nos ha motivado a continuar con el estudio químico de especies de este género, para la obtención de flavonoides y la posterior evaluación en cuanto a su potencial farmacológico.

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos en este trabajo de tesis doctoral, se propone la profundización del estudio químico y farmacológico en especies sudamericanas del género *Dalea* con hábitat en Argentina y Bolivia, para la búsqueda de nuevos compuestos con actividad sobre enzimas relacionadas a la melanogénesis.

Sustancias con tales características revisten importancia por su potencial aplicación terapéutica en desórdenes que cursan una anormal pigmentación de la piel, como hiper o hipopigmentación, o bien para su uso en cosmética como blanqueadores.

3.1. *Objetivo General*

Llevar a cabo el estudio químico de especies de la flora autóctona sudamericana para contribuir al descubrimiento de nuevos principios activos, con potencialidad biológica, direccionada a la obtención de metabolitos flavonoideos con actividad sobre enzimas relacionadas a la melanogénesis.

3.2. *Objetivos Específicos*

1. Profundizar el estudio químico de especies del género *Dalea*, focalizándose en metabolitos flavonoideos obtenidos de:
 - ✓Partes aéreas y de raíz de *Dalea elegans*
 - ✓Raíces de *D. pazensis*
2. Evaluar el efecto de los flavonoides obtenidos sobre la acción estimuladora/inhibidora de enzimas relacionadas a la melanogénesis. Se pretende utilizar tirosinasa proveniente:
 - ✓De hongos
 - ✓De línea celular de melanoma de ratón B16
3. Realizar un estudio profundo sobre el mecanismo cinético de inhibición enzimática, para aquellos flavonoides que mostraron ser activos sobre tirosinasa de hongos.
4. Evaluar la acción de la combinación de los flavonoides activos y del blanqueador comercial empleado, ácido kójico.

**CAPÍTULO 4: ESTUDIOS
QUÍMICOS EN ESPECIES DEL
GÉNERO *Dalea***

4.1. Antecedentes

El estudio químico de las especies de *Dalea* seleccionadas para el presente proyecto, fue llevado a cabo considerando los múltiples antecedentes informados en el Capítulo 2 de esta tesis, en relación a la importante presencia de flavonoides, en su mayoría flavanonas y chalconas, en este género. Nuestro grupo fue pionero en el estudio químico de las especies de *Dalea* que crecen en Argentina y esta “*experticia*” permitió que incorporemos al estudio otra especie sudamericana endémica de Bolivia. Así, en el presente capítulo se informarán los avances realizados en relación al aislamiento, purificación y determinación estructural de las estructuras químicas obtenidas de las especies *D. elegans* y *D. pazensis*, seleccionadas para este trabajo de Tesis Doctoral.

4.1.1. *Dalea elegans*

Nuestro grupo de investigación de Farmacognosia ha llevado a cabo los primeros estudios químicos y de actividad biológica en especies argentinas del género *Dalea*, comenzando con la única especie de *Dalea* que habita en la provincia de Córdoba: *D. elegans* (Cafaratti *et al.*, 1994; Ortega *et al.*, 1996).

4.1.2. *Dalea pazensis*

De esta especie, no hay ningún antecedente informado al día de la fecha.

4.2. Estudios de flavonoides en *D. elegans* Gillies ex Hook. et Arn. var. *elegans*



4.2.1. Obtención y procesamiento del material vegetal. Ver Capítulo 7.

4.2.2. Preparación de los extractos. Ver Capítulo 7.

4.2.3. Aislamiento, separación y purificación de los principios activos

Para el aislamiento y purificación de flavonoides se procesó el extracto bencénico de las raíces, empleando diferentes técnicas cromatográficas (Capítulo 7), obteniéndose de una de las fracciones el compuesto **1** (7,5 mg).

En cuanto a las partes aéreas, fue procesado el extracto bencénico, cuyo fraccionamiento dió lugar a 72 mg del compuesto **2**; 9,1mg del compuesto **3**; 5,6 mg del compuesto **4**; 13,6 mg del compuesto **5** y 11,3 mg del compuesto **6**.

4.2.4. Determinación estructural de flavonoides de *D. elegans*

Los compuestos aislados de raíces y partes aéreas de *D. elegans*, fueron identificados mediante los siguientes métodos espectroscópicos y espectrofotométricos: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono-13 (RMN ^1H y ^{13}C), RMN en dos dimensiones (RMN 2D), espectrofotometría ultravioleta (UV), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y Dicroísmo Circular (DC). Para aquellos compuestos que ya habían sido informados por nuestro

grupo de investigación, su identificación se llevó a cabo por comparación frente a testigo de los perfiles de espectrofotometría ultravioleta (UV) y de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

A continuación se exponen y analizan los datos espectroscópicos obtenidos para cada una de las estructuras flavonoideas:

4.2.4.1. Determinación estructural del compuesto 1

La evidencia espectroscópica permitió determinar la estructura química del compuesto **1**, según se detalla a continuación.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto **1** se obtuvo en forma de sólido amorfo de color amarillo. Las flavanonas presentan absorbancias que corresponden a las transiciones electrónicas $\pi-\pi^*$ (máximo, 270-290nm) y $n-\pi^*$ (hombro, 320-340nm) propias de su núcleo (Markham, 1982). El espectro UV en MeOH de **1** mostró una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 291 (3,49), 330 (sh) (2,91) nm, indicando así, la presencia de un núcleo del tipo flavanona.

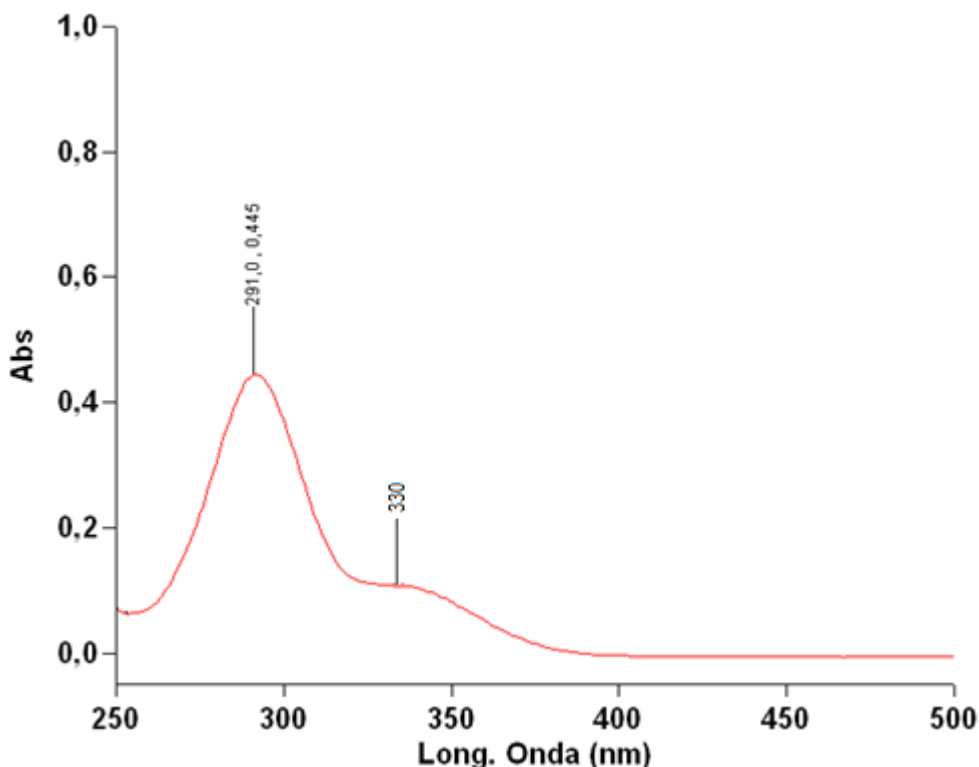
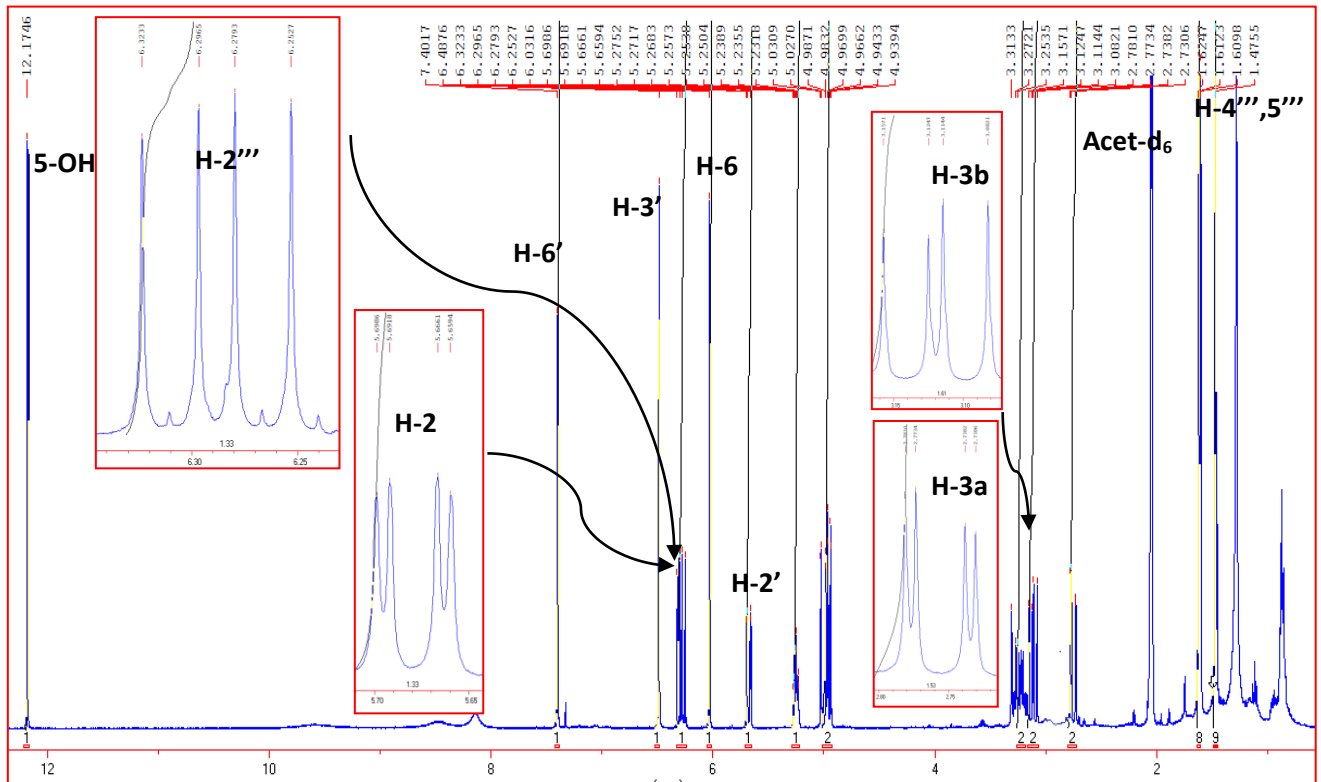


Figura 4.1. Espectro UV (MeOH) del compuesto 1.

Los datos de RMN de ^1H (400 MHz, Acet- d_6) de **1** se muestran en la Figura 4.2 y en la Tabla 4.1.

Figura 4.2. Espectro RMN ¹H de 1.



Posición	δ_H mult. (J en Hz)
2	5,68 dd (3,0; 12,9)
3a	2,75 dd (3,0; 17,1)
3b	3,12 dd (12,9; 17,1)
6	6,03 s
3'	6,48 s
6'	7,40 s
1''	3,26 d (7,3)
2''	5,25 t (7,3)
4''	1,62 s
5''	1,61 s
2'''	6,29 dd (17,8; 10,5)
3'''	5,00 <i>cis</i> d (17,8)
3'''	4,95 <i>trans</i> d (10,5)
4'''	1,47s
5'''	1,47 s
5-OH	12,17 s

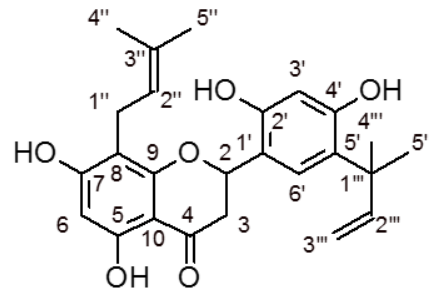


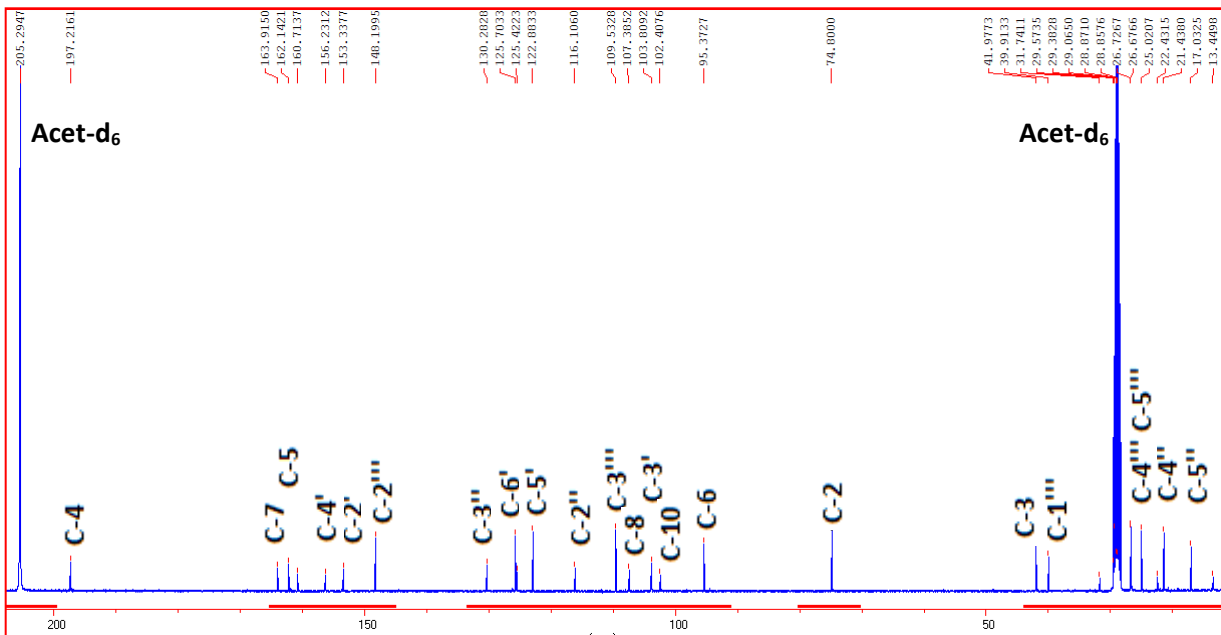
Tabla 4.1. Datos de RMN ¹H de 1, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

➤ Espectroscopía de RMN ¹³C

El espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.3) mostró las señales correspondientes a los veinticinco átomos de C del compuesto 1. En dicho espectro y en la tabla que se encuentra a continuación se detallan las multiplicidades de cada carbono, con

su respectiva numeración, las cuales se obtuvieron por comparación de testigo de dicho compuesto.

Figura 4.3. Espectro RMN ¹³C de 1.



Posición	δ _c , mult.	Posición	δ _c , mult.
2	74,8 CH	4'	156,3 qC
3a	40,3 CH ₂	5'	124,9 qC
3b	40,3 CH ₂	6'	125,3 CH
4	196,7 qC	1''	21,7 CH ₂
5	162,3 qC	2''	122,9 CH
6	95,5 CH	3''	130,5 qC
7	163,7 qC	4''	25,2 CH ₃
8	107,5 qC	5''	17,1 CH ₃
9	160,7 qC	1'''	39,9 qC
10	102,4 qC	2'''	148,2 CH
1'	116,1 qC	3'''	109,7 CH ₂
2'	153,4 qC	4'''	26,9 CH ₃
3'	103,7 CH	5'''	26,9 CH ₃

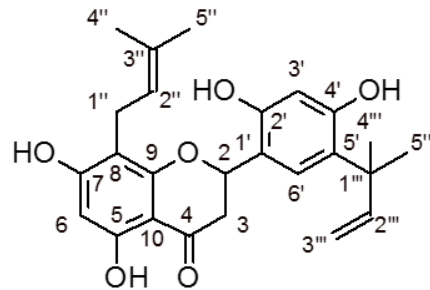
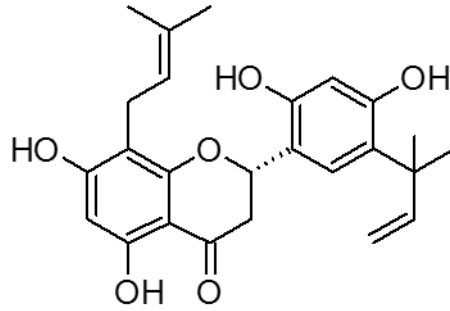


Tabla 4.2. Datos de RMN ¹³C de 1, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, en analogía con lo informado por Peralta *et al.*, 2014 en relación a sus RMN ¹H y ¹³C, se identifica al compuesto 1 como:



(-)-(2S)-5, 7, 2', 4'-tetrahydroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilflavanona (8PP)

4.2.4.2. Determinación estructural del compuesto 2

Los datos espectroscópicos permitieron determinar la estructura química del compuesto **2**, según se detalla a continuación.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto **2** se obtuvo en forma de sólido amorfo de color blanco. El espectro UV en MeOH de **2** mostró una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 294 (4,13), 330 (sh) (4,32) nm.

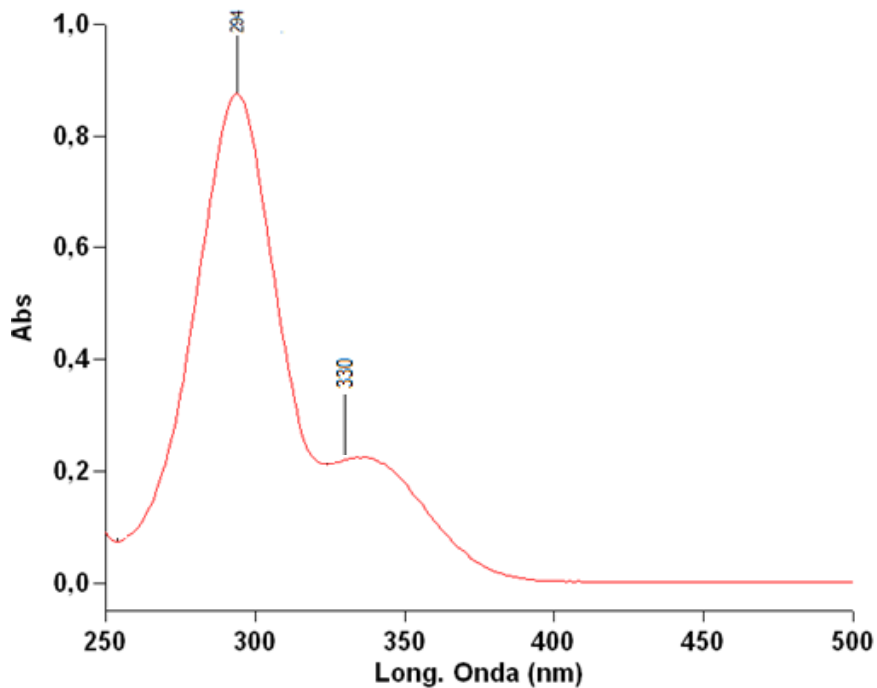
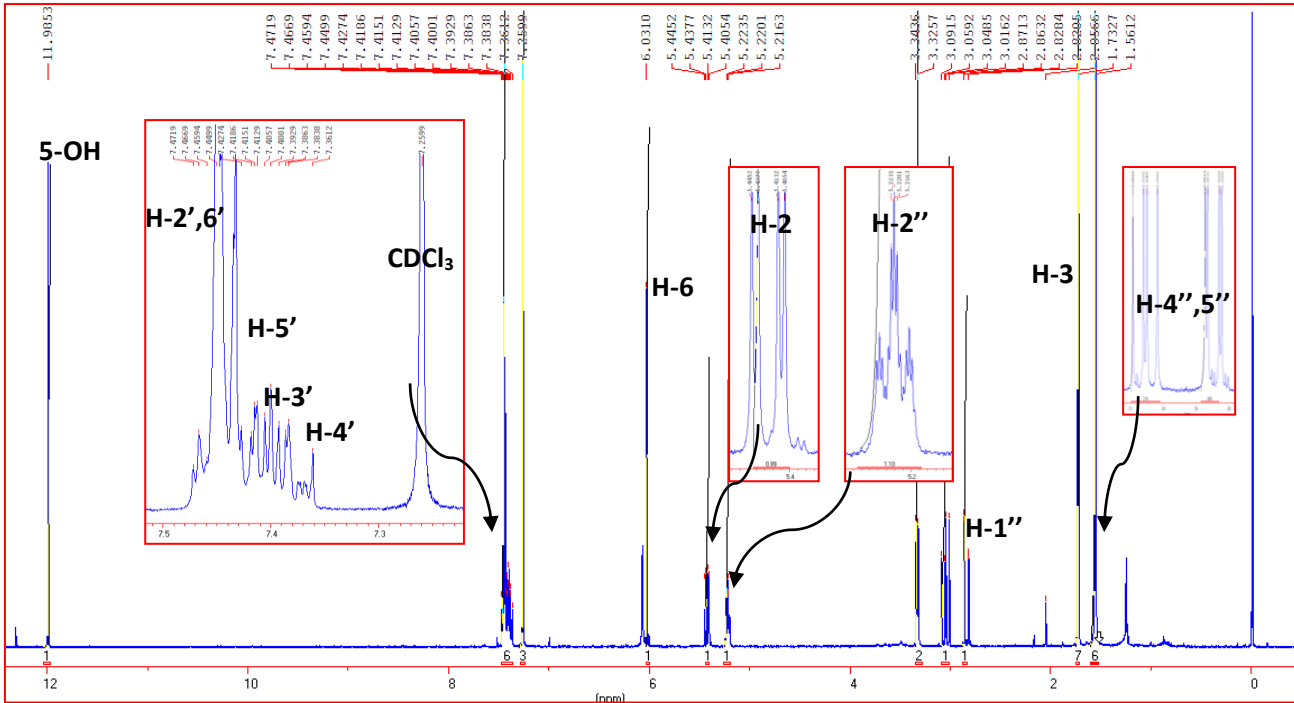


Figura 4.4. Espectro UV (MeOH) del compuesto 2.

Los datos de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **2** se muestran en la Tabla 4.3 y la Figura 4.5.

Figura 4.5. Espectro RMN ^1H de **2**.



Posición	δ_{H} mult. (<i>J</i> en Hz)
2	5,58 dd (3,3; 12,6)
3a	2,75 dd (3,3; 17,1)
3b	3,13 dd (12,6; 17,1)
6	6,04 s
2'	7,59 m
3'	7,46 m
4'	7,40 m
5'	7,44 m
6'	7,59 m
1''	3,25 d (7,0)
2''	5,21 d (7,0)
4''	1,62 s
5''	1,62 s
5-OH	12,12 s

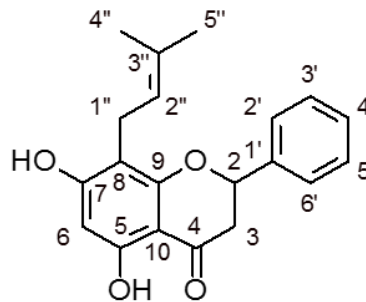


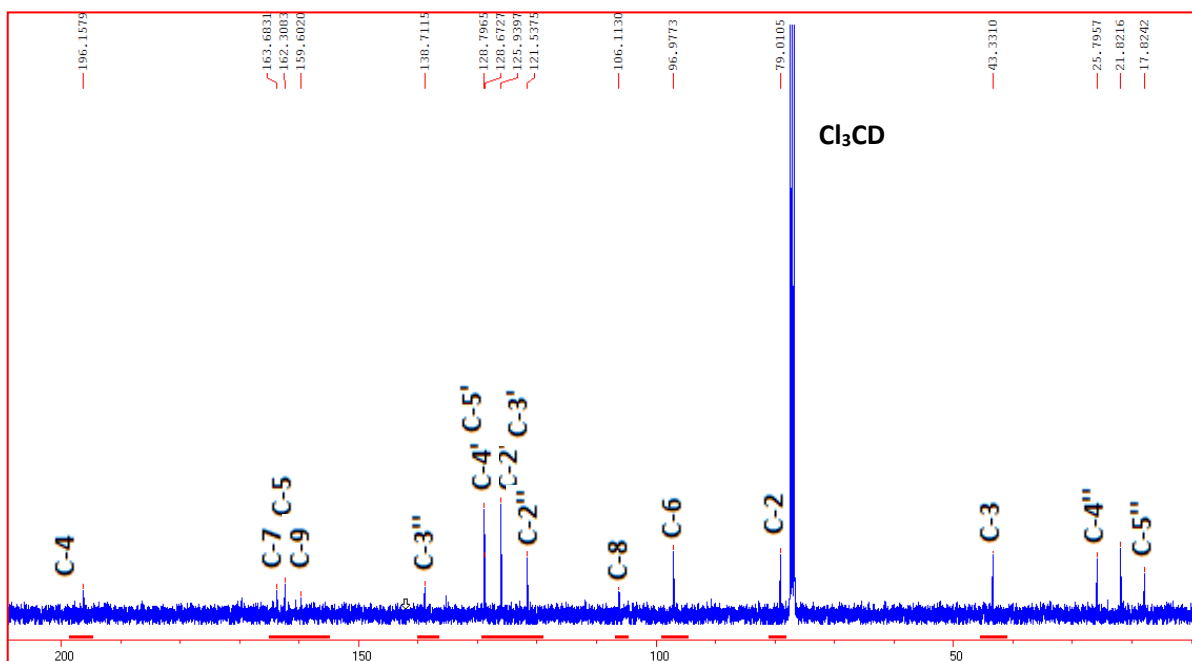
Tabla 4.3. Datos de RMN ^1H de **2**, en Cl_3CD . TMS como estándar interno.

➤ Espectroscopía de RMN ^{13}C

El compuesto **2** presentó un espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.6) con señales correspondientes a los veinte átomos de C. En dicho espectro y en la tabla

4.4, se detallan las multiplicidades de cada carbono, con su respectiva numeración, las cuales se obtuvieron por comparación de testigo de dicho compuesto.

Figura 4.6. Espectro RMN ^{13}C de **2**.



Posición	δ_c , mult.
2	78,9 CH
3a	42,7 CH ₂
3b	42,7 CH ₂
4	196,3 qC
5	160,0 qC
6	95,6 CH
7	162,1 qC
8	107,5 qC
9	158,5 qC
10	102,4 qC
1'	139,5 qC

Posición	δ_c , mult.
2'	126,2 CH
3'	128,6 CH
4'	128,4 CH
5'	128,6 CH
6'	126,2 CH
1''	21,4 CH ₂
2''	122,8 CH
3''	130,4 qC
4''	25,0 CH ₃
5''	17,0 CH ₃

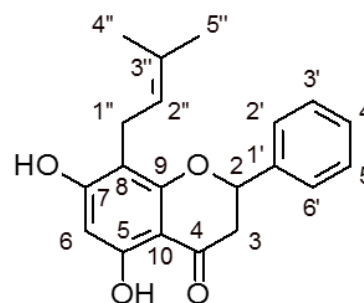
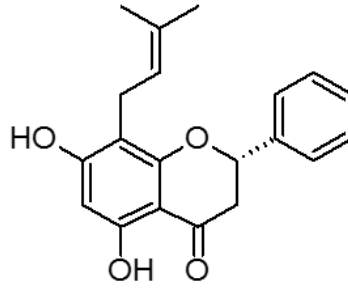


Tabla 4.4. Datos de RMN ^{13}C de **2**, en TMS como estándar interno.

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, en concordancia con lo informado por Peralta *et al.*, 2014 en relación a sus RMN ^1H y ^{13}C , se identifica al compuesto **2** como:



(-)-(2S)-5,7-dihidroxi-8-prenilflavanona (8P)

A diferencia de **8PP** y **8P**, los compuestos **3**, **4**, **5** y **6** no habían sido descritos para la especie *D. elegans*, por lo que se exponen todos los datos espectroscópicos y espectrofotométricos que llevaron a su identificación.

4.2.4.3. Determinación estructural del compuesto **3**

La evidencia espectroscópica permitió determinar la estructura química del compuesto **3**, según se detalla a continuación.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto **3** se obtuvo en forma de sólido amorfo de color rojo. Las chalconas presentan un máximo de absorbanza que se corresponde a las transiciones electrónicas $n-\pi^*$ propias de la excitación en el anillo aromático y en el grupo $C=O$ (Sarojini, *et. al* 2006). El espectro UV en MeOH de **3** mostró una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 325 (3,80) nm (Fig. 4.7).

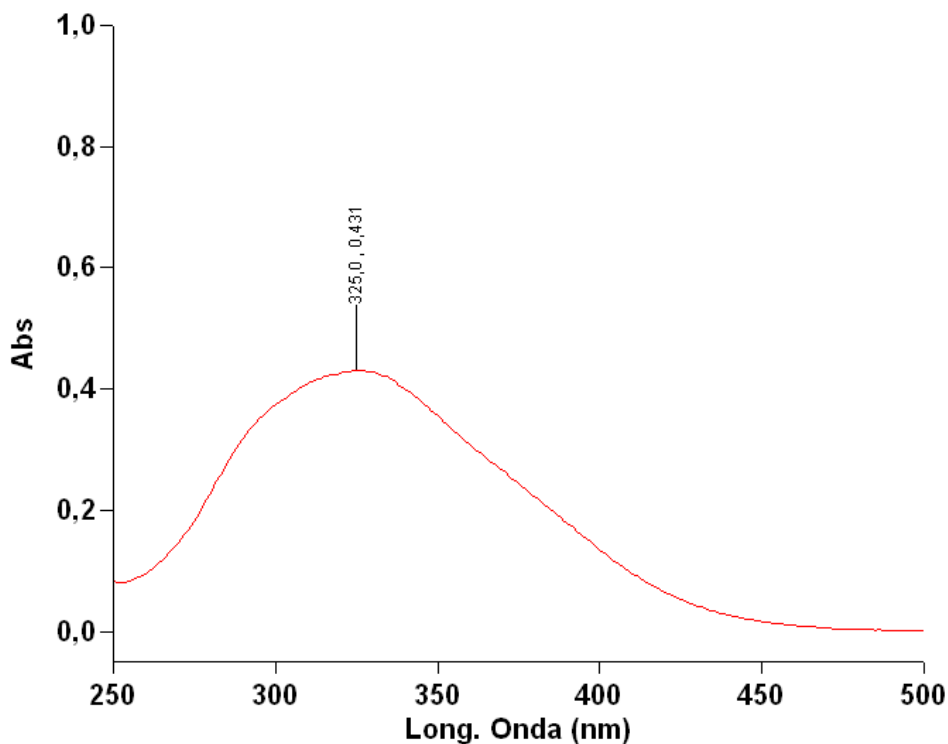


Figura 4.7. Espectro UV (MeOH) del compuesto **3**.

➤ Espectrometría de masas

$C_{17}H_{15}O_4$, fue la fórmula molecular propuesta para **3** de acuerdo a su espectro de masas de alta resolución (HRMS) (Figura 4.8) según el cual, el ión molecular de HRMS m/z 283,0964 $[M-H]^-$ responde al calculado para $C_{17}H_{15}O_4$, 283,0965.

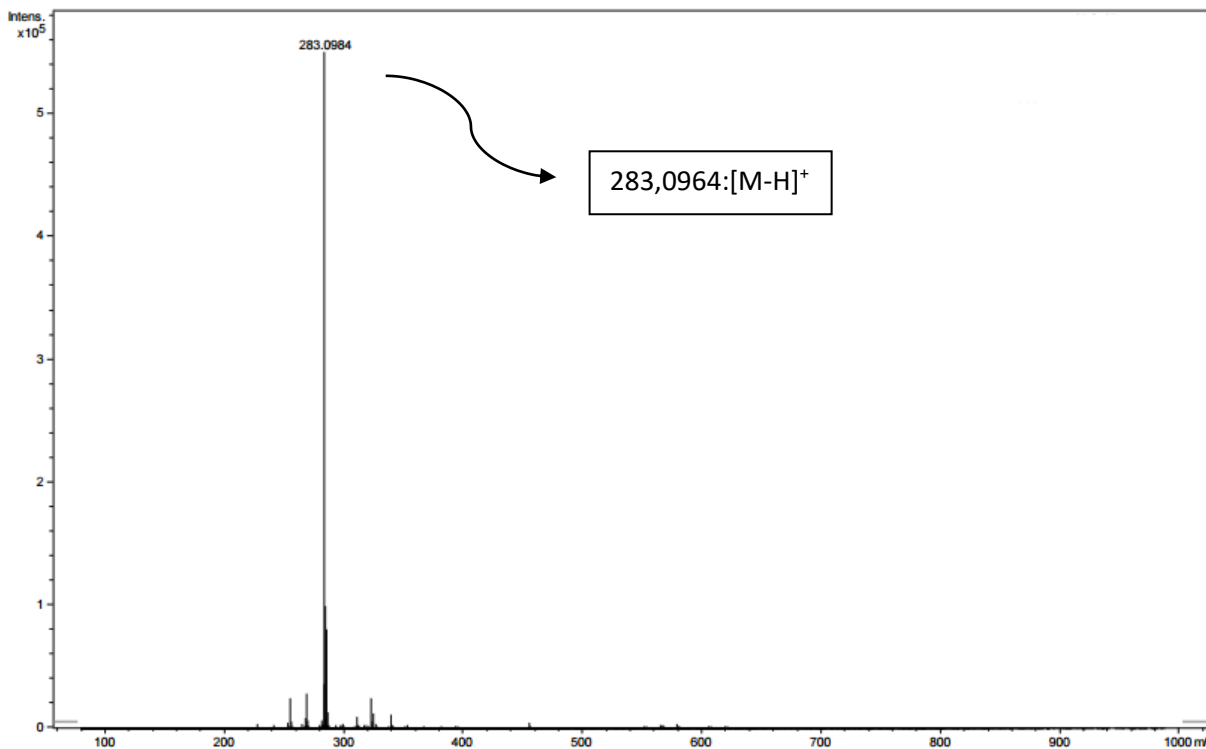


Figura 4.8. Espectro de HRMS de **3**.

➤ Espectroscopía de RMN 1H

Los datos de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) de **3** se muestran en la Tabla 4.5 y concordaron con los reportados previamente por Mustafa *et al.*, 2005. La numeración en el caso de las chalconas según Shimokoriyama, *et al.* 1962 se muestra en la Figura 4.9.

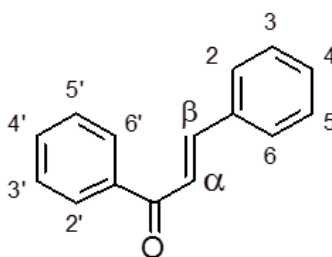
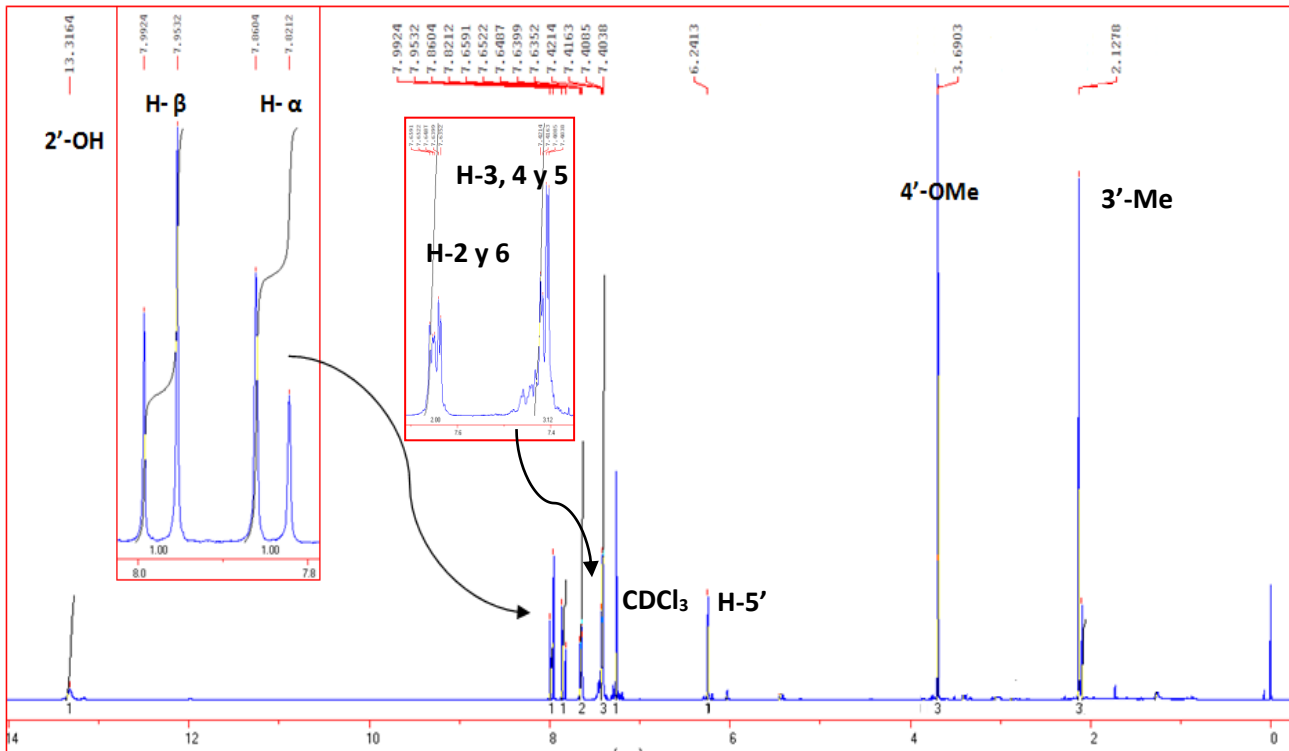


Figura 4.9. Numeración en chalconas.

El espectro de RMN 1H de **3** (Figura 4.10) mostró una señal a δ_H 13,32 (1H, s), debida al protón unido al grupo hidroxilo del C-2'. Se observaron además las señales características de los protones α y β , las cuales fueron δ_H 7,84 (1H, d; $J=15,8$) y δ_H 7,97 (1H, d; $J=15,8$). Los valores de las constantes de acoplamiento (J) indican que dichos

protones se encuentran en posición *trans* entre ellos (Pretsch *et al.*, 2005). Con respecto a las señales de protones aromáticos, se advirtieron las correspondientes a cinco protones aromáticos pertenecientes al anillo B (Figura 4.5, zona ampliada); las señales a δ_H 7,60 (2H, m) y 7,40 (3H, m) (Figura 4.10) fueron asignadas a los protones H-2 y H-6 y H-3, H-4 y H-5 respectivamente. El espectro de RMN 1H además, mostró señales de protones pertenecientes a un grupo metoxi a δ_H 3,69 (3H, s) y metilo δ_H 2,12 (3H, s).

Figura 4.10. Espectro RMN 1H de 3.



Posición	δ_H mult. (J en Hz)	Posición	δ_H mult. (J en Hz)
1	---	5'	6,24 s
2	7,60 m	6'	---
3	7,40 m	α	7,84 d (15,8)
4	7,40 m	β	7,97 d (15,8)
5	7,40 m	2'-OH	13,32 s
6	7,60 m	4'-OMe	3,69 s
1'	---	3'-Me	2,12 s
2'	---		
3'	---		
4'	---		

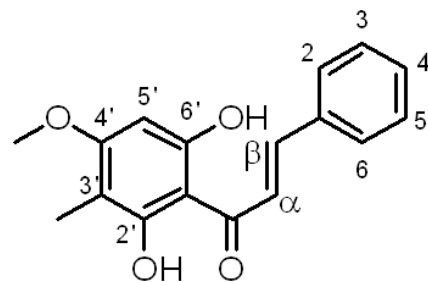
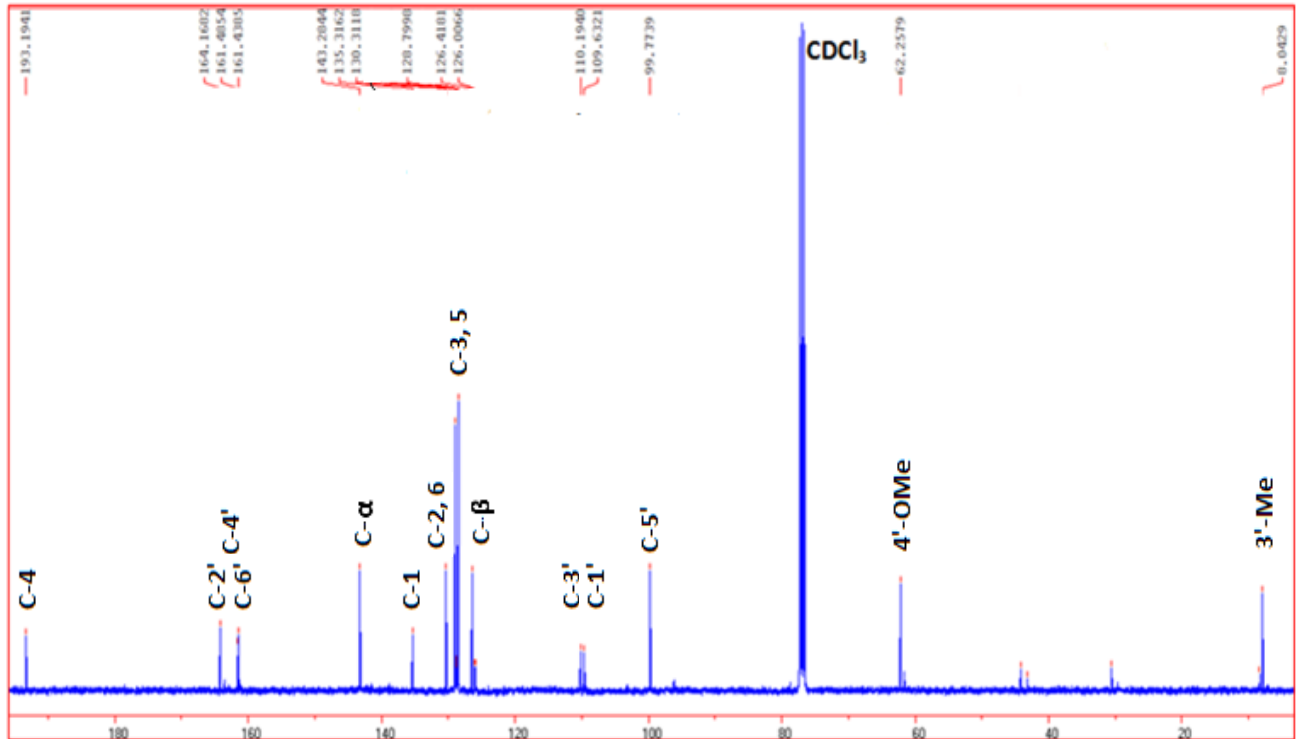


Tabla 4.6. Datos de RMN 1H de 3, en Cl_3CD . TMS como estándar interno.

➤ **Espectroscopía de RMN ¹³C**

El espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.11) mostró las señales correspondientes a los diecisiete átomos de C del compuesto **3**. En dicho espectro y en la tabla que se encuentra a continuación se detallan las multiplicidades de cada carbono, con su respectiva numeración, con el objeto de un análisis mayormente descriptivo, aclarando que dicha información se obtuvo luego, empleando RMN 2D.

Figura 4.11. Espectro RMN ¹³C de **3**.



Posición	δ _c , mult.
1	135,3 qC
2	130,3 CH
3	128,8 CH
4	126,0 CH
5	128,8 CH
6	130,3 CH
1'	109,6 qC
2'	164,2 qC
3'	110,2 qC
4'	161,5 qC
5'	99,8 CH
6'	161,4 qC
α	143,3 CH
β	126,5 CH
4'-OMe	62,3 CH ₃
3'-Me	8,04 CH ₃

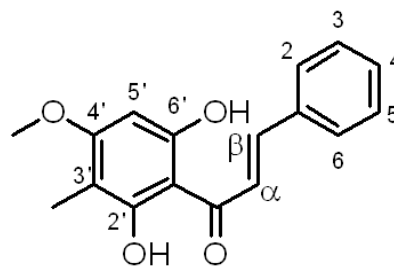
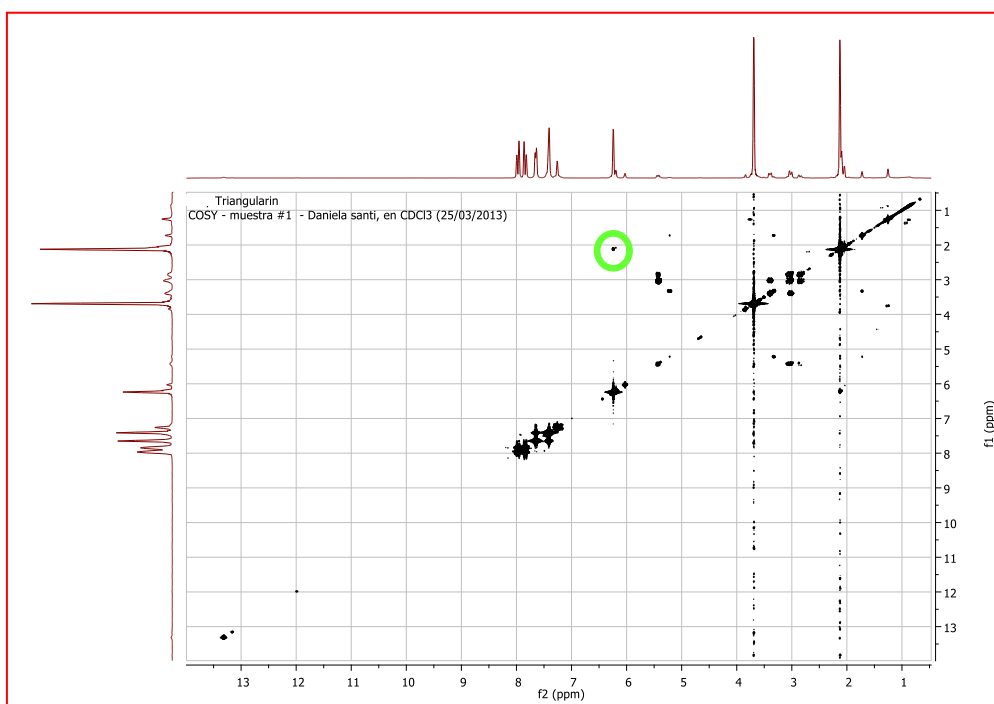


Tabla 4.7. Datos de RMN ¹³C de **3**, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

➤ RMN 2D

Para completar la Determinación estructural de **3**, se realizaron los experimentos de RMN 2D. El experimento COSY (correlated spectroscopy) de correlación homonuclear (H-H) es utilizado para correlacionar los desplazamientos químicos de los protones acoplados entre sí con una determinada constante de acoplamiento (J) permitiendo establecer la red de acoplamiento (conectividad-J) de una molécula. El espectro COSY de **3** se presenta en la Figura 4.12 y permitió observar la correlación que se detalla en la Tabla 4.8. Los datos de RMN 2D no habían sido informados en la literatura, por lo que se presentan aquí por primera vez.

Figura 4.12. Espectro RMN 2D COSY (H-H) del compuesto **3**.

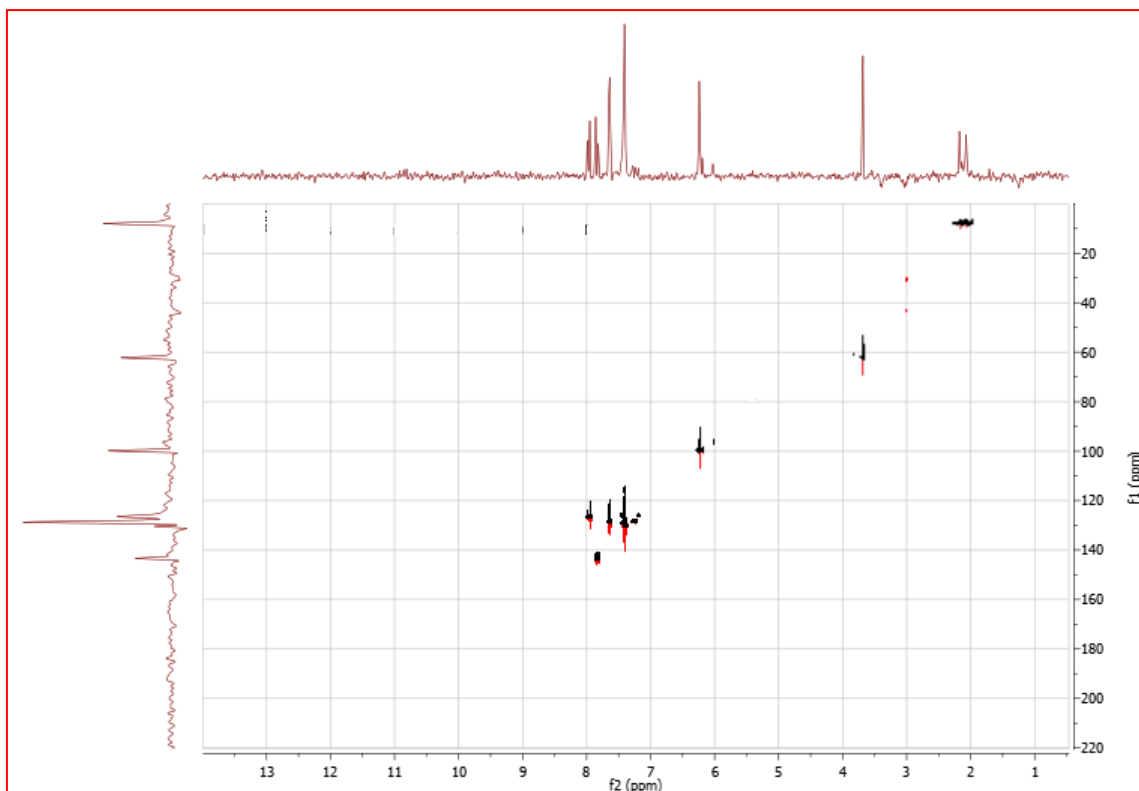


Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$	Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$
CH-5'	6,24	3'-CH ₃	2,12

Tabla 4.8. Correlación más importante del espectro COSY (H-H) del compuesto **3**.

El experimento de RMN 2D llamado HSQC (Heteronuclear Simple Quantum Coherence), permite reconocer la conectividad entre un protón y el átomo de carbono al que está unido. Es importante con el objeto de asignar los corrimientos químicos de ^1H y ^{13}C que corresponden a cada posición de la estructura. La Figura 4.13 exhibe el espectro de HSQC del compuesto **3**. Las correlaciones fueron determinadas y permitieron asignar junto con el análisis del ^{13}C cada posición del protón con su correspondiente carbono. Así se pudo indicar en forma inequívoca la multiplicidad de cada señal de carbono obtenido en ^{13}C , las mismas se detallan en la Tabla 4.9.

Figura 4.13. Espectro RMN 2D HSQC (H-C) del compuesto 3.



Posición	3	
	δ_H	δ_C , mult.
2	7,60	130,3 CH
3	7,40	128,8 CH
4	7,40	126,0 CH
5	7,40	128,8 CH
6	7,60	130,3 CH
5'	6,24	99,8 CH
α	7,84	143,3 CH
β	7,97	126,5 CH
4'-OMe	3,69	62,3 CH ₃
3'-Me	2,12	8,04 CH ₃

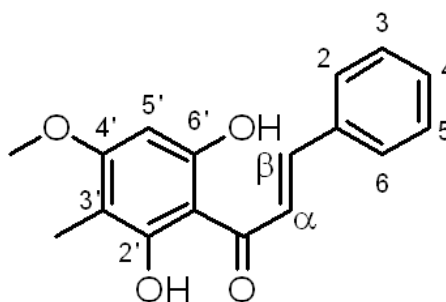
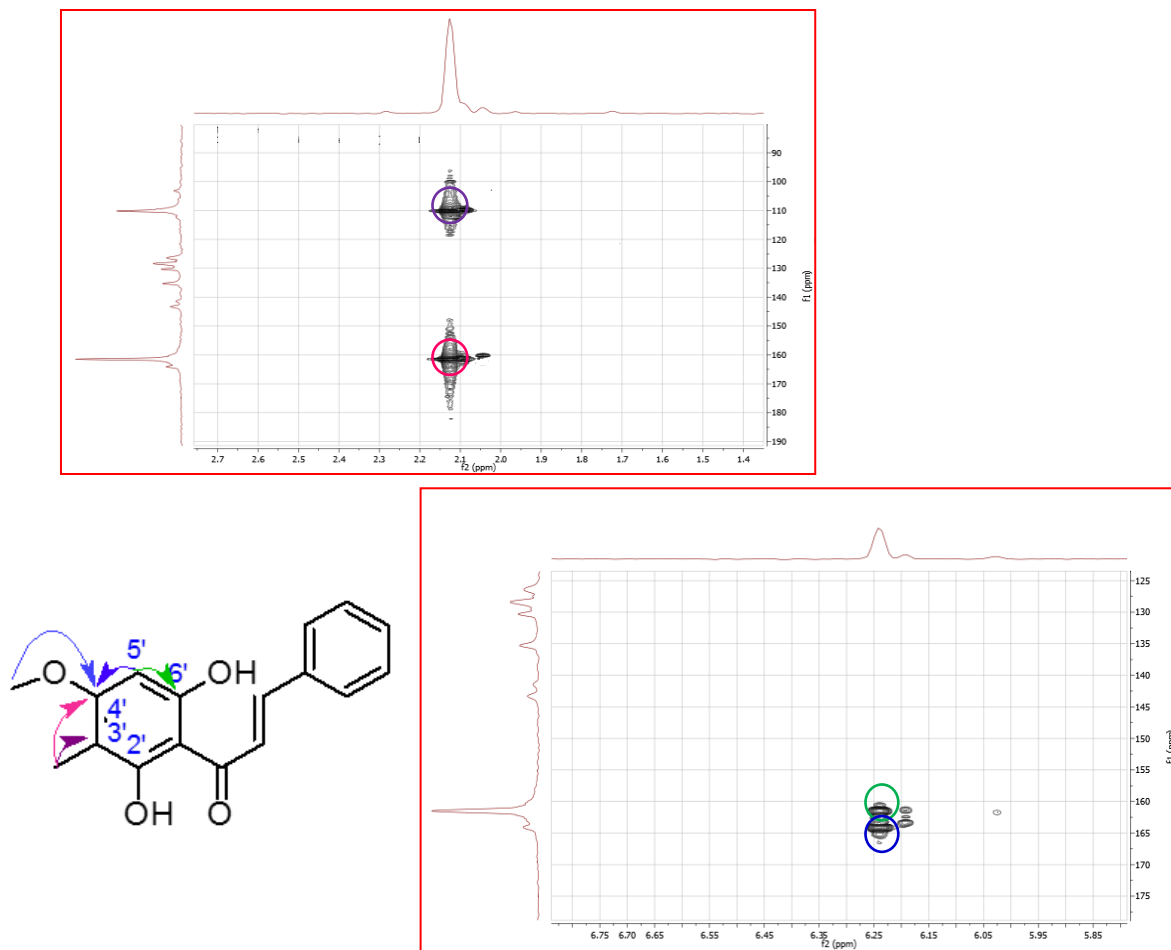


Tabla 4.9. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) del compuesto 3.

El espectro de RMN 2D HMBC (Heteronuclear Multi Bond Correlation Spectroscopy) es utilizado para relacionar o conectar las señales de átomos de protones con carbonos separados por más de un enlace, generalmente dos o tres. El experimento está diseñado para suprimir los acoplamientos de un enlace, no obstante algunos pueden ser observados en el espectro. No es posible conocer cuántos enlaces separan a un protón de un átomo de carbono cuando se presenta una correlación; sin embargo, esas correlaciones a múltiples enlaces proveen una valiosa información. Por lo tanto, mediante el espectro de HMBC de un compuesto, se pueden observar correlaciones entre carbonos cuaternarios con protones de carbonos vecinos, lo que permite ubicar la posición de dichos carbonos. En el caso de los flavonoides, esta aplicación es especialmente utilizada para localizar los sustituyentes que se unen a los átomos

cuaternarios de los anillos aromáticos A y B, además de su posición. Para el compuesto **3**, el espectro de HMBC se presenta en la figura 4.9 y permitió determinar las posiciones de los grupos hidroxilo, metilo y metoxi en forma inequívoca, según las correlaciones observadas entre los protones del grupo metilo en 3' a δ_H 2,12 y el C-4' a δ 161,5 y el C-3' a δ 110,2. Por otra parte, los protones del grupo metoxi a δ_H 3,69 correlacionan con el carbono C-4' a δ 161,5, indicando su posición en dicho carbono. El protón 5' a δ_H 6,24 correlaciona con el átomo de C4' a δ 161,5 y con el átomo de C-6' a δ 161,4, indicando que dicho carbono se encuentra libre (Figura 4.14).

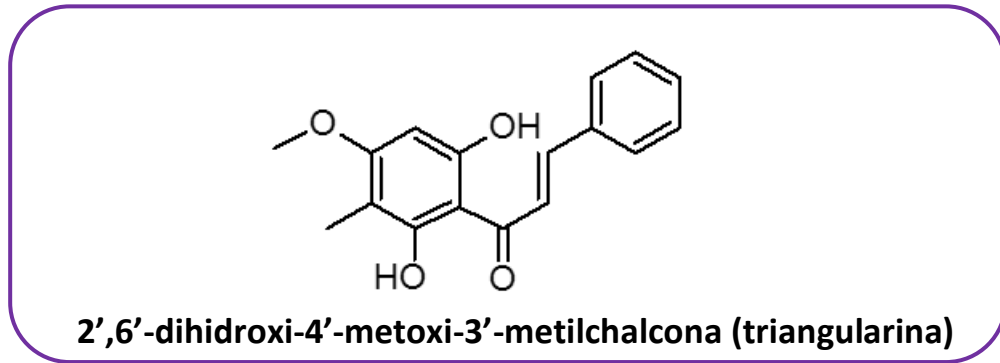
Figura 4.14. Ampliación de zonas y correlaciones más relevantes del espectro RMN 2D HMBC (H-C) del compuesto **3**.



H	$\delta(\text{ppm})$	C	$\delta(\text{ppm})$
3'-Me	2,12	C-3',C-4'	110,2;161,5
4'-OMe	3,69	C-4'	161,5
5'	6,24	C-4',C-6'	161,5;161,4

Tabla 4.10. Principales correlaciones en el espectro HMBC de **3**.

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, en analogía con lo informado por Mustafa *et al.*, 2005 en relación a sus RMN ^1H y ^{13}C , se identifica al compuesto **3** como:



4.2.4.4. Determinación estructural del compuesto 4

La evidencia espectroscópica permitió determinar la estructura química del compuesto **4**, según se detalla a continuación.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto **4** se obtuvo en forma de sólido amorfo de color amarillo pálido. El espectro UV en MeOH de **4** mostró señales características del núcleo flavanona: una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$) 296 (4,05) y un hombro a 330 (sh) (3,51) nm. (Fig. 4.15).

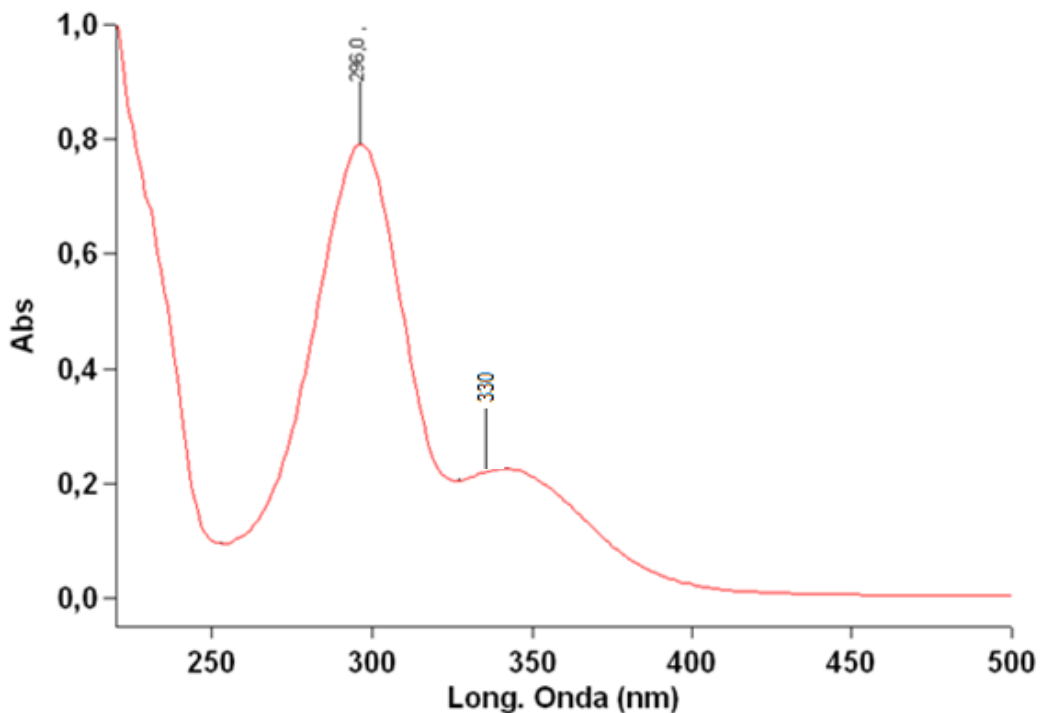
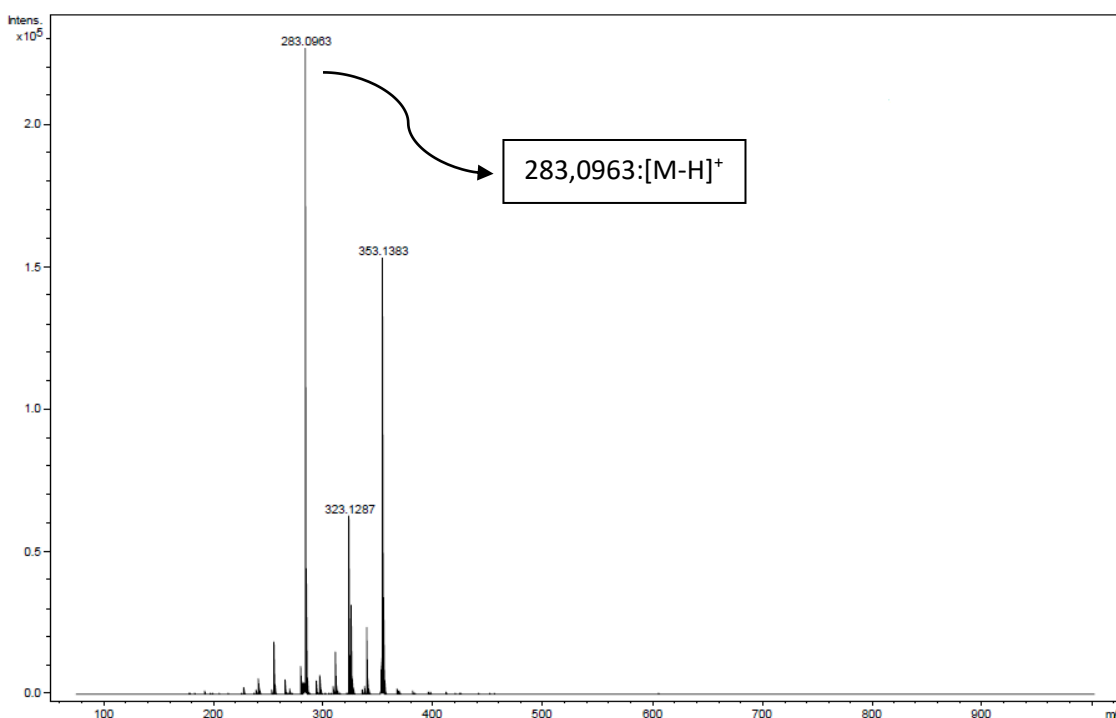


Figura 4.15. Espectro UV (MeOH) del compuesto 4.

➤ Espectrometría de masas

La fórmula molecular de **4** fue propuesta como $C_{17}H_{15}O_4$ según su espectro de masas de alta resolución (HRMS) (Figura 4.16) según el cual, el ión molecular de HRMS m/z 283,0963 $[M-H]^-$ responde al calculado para $C_{17}H_{15}O_4$, 283,0965.

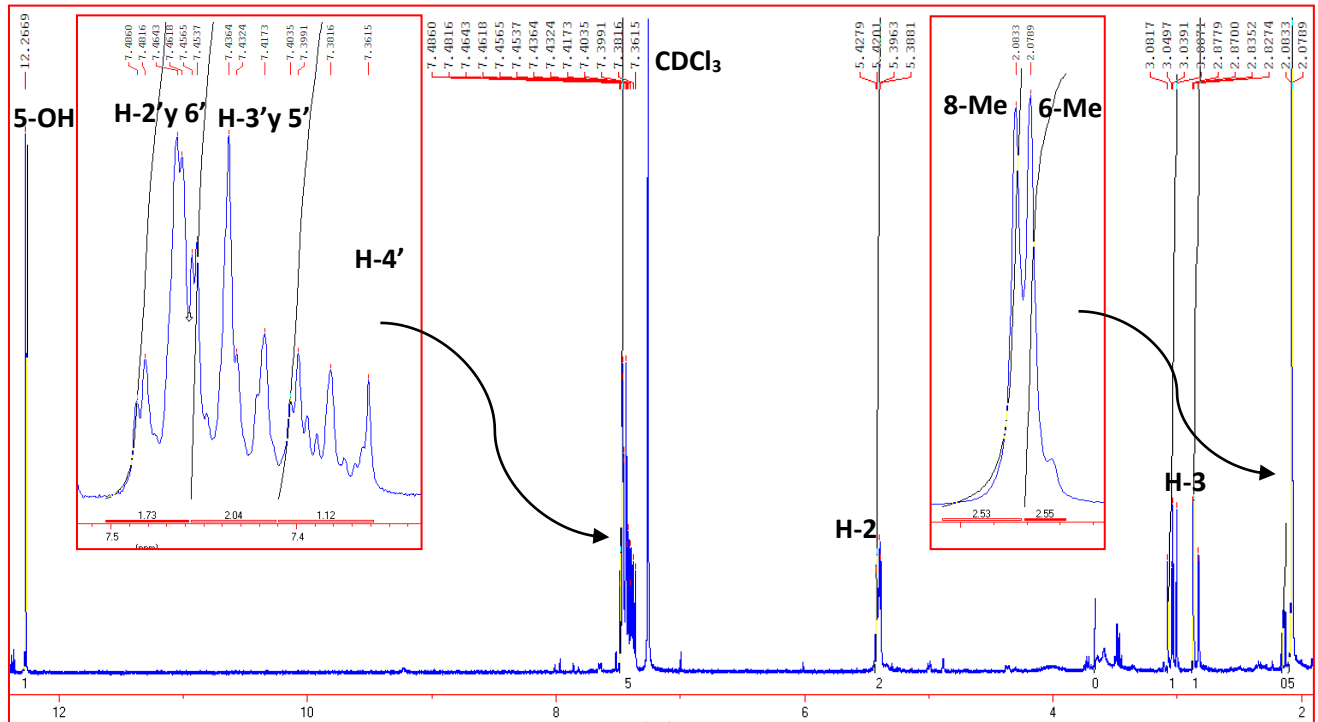
Figura 4.16. Espectro de HRMS de **4**.



➤ Espectroscopía de RMN ¹H

Los datos de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) de **4** se muestran en la Tabla 4.11 y concordaron con los reportados previamente por Basnet *et al.*, 1993. El espectro de RMN 1H (Figura 4.17) mostró una señal a δ_H 12,27 (1H, s), debida al protón unido al grupo hidroxilo del C-5. Fueron observadas las señales del sistema de spin ABX, características de una flavanona: [δ_H 5,40 (1H, dd, $J=12,1$; 3,3 Hz, H-2), 3,04 (1H, dd, $J=3,1$; 17,1 Hz, H-3ax) y 2,85 (1H, dd, $J=12,1$; 17,1 Hz, H-3eq)]. Con respecto a las señales de protones aromáticos, se advirtieron las correspondientes a cinco H aromáticos pertenecientes al anillo B, ampliando la región que corresponde a estos protones (Figura 4.17), se presentaron las señales a δ_H 7,40 (1H, m); 7,44 (2H, m) y 7,5 (2H, m), (Figura 4.17). Las mismas fueron asignadas a los protones H-4', H-3' y H-5', H-2' y H-6' respectivamente. El espectro de RMN 1H además, mostró señales de protones pertenecientes a grupos metilo a δ_H 2,08 (3H, s) y 2,07 (3H, s).

Figura 4.17. Espectro RMN ¹H de 4.



Posición	δH mult. (J en Hz)
2	5,40 dd (3.3, 12.1)
3a	2,85 dd (12.1, 17.1)
3b	3,04 dd (3.1, 17.1)
2'	7,50 m
3'	7,44 m
4'	7,40 m
5'	7,44 m
6'	7,50 m
6-Me	2,07 s
8-Me	2,08 s
5-OH	12,27s

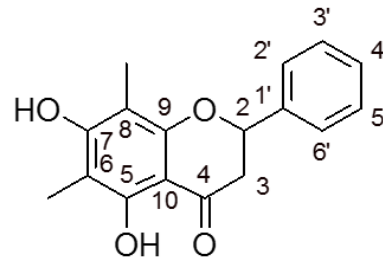


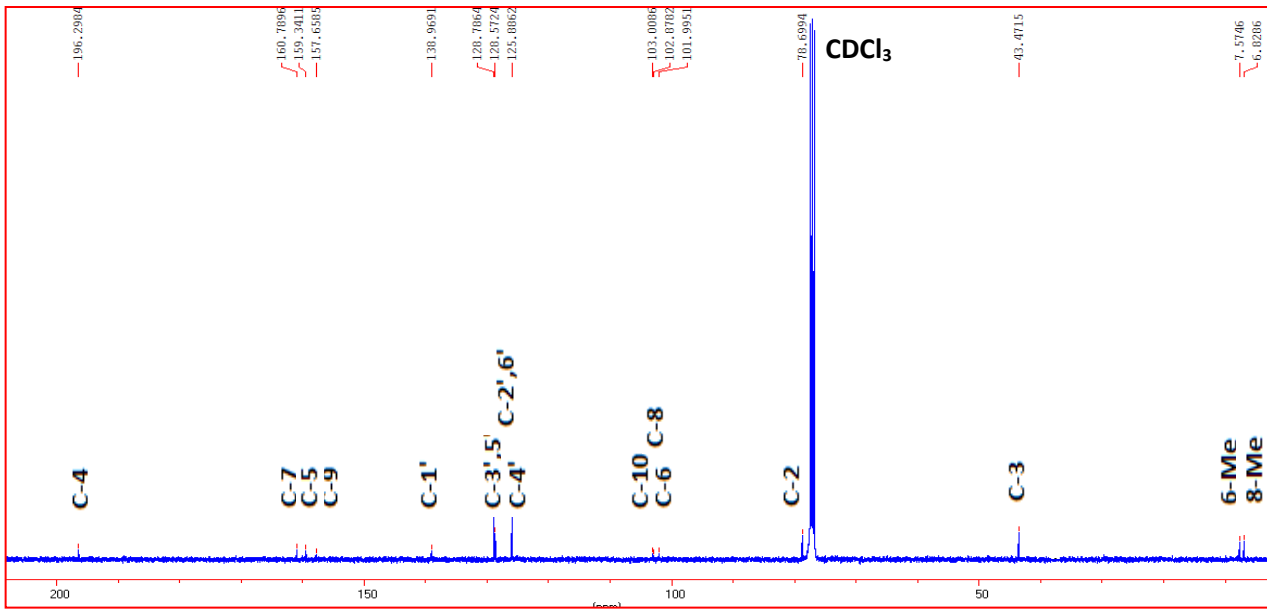
Tabla 4.11. Datos de RMN ¹H de 4, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

➤ Espectroscopía de RMN ¹³C

El espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.18) mostró señales correspondientes a la presencia de diecisiete átomos de C en el compuesto 4.

A los fines de mostrar un espectro más descriptivo de RMN ¹³C, se incluye en el mismo, el número del carbono correspondiente para cada señal, lo que además puede observarse en la tabla que se encuentra debajo, aclarando que, dichas asignaciones como así también, las multiplicidades de cada carbono, fueron determinadas inequívocamente posteriormente realizando experimentos de RMN 2D.

Figura 4.18. Espectro RMN ^{13}C de 4.



Posición	δ_{C} , mult.
2	78,7 CH
3a	43,5 CH ₂
3b	43,5 CH ₂
4	196,3 qC
5	159,3 qC
6	102,0 qC
7	160,8 qC
8	102,9 qC
9	157,7 qC
10	103,0 qC
1'	138,9 qC
2'	125,9 CH
3'	128,8 CH
4'	128,6 CH
5'	128,8 CH
6'	125,9 CH
6-Me	7,6 CH ₃
8-Me	6,8 CH ₃

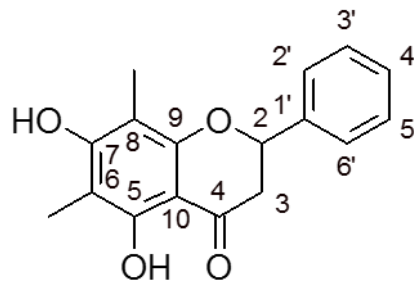


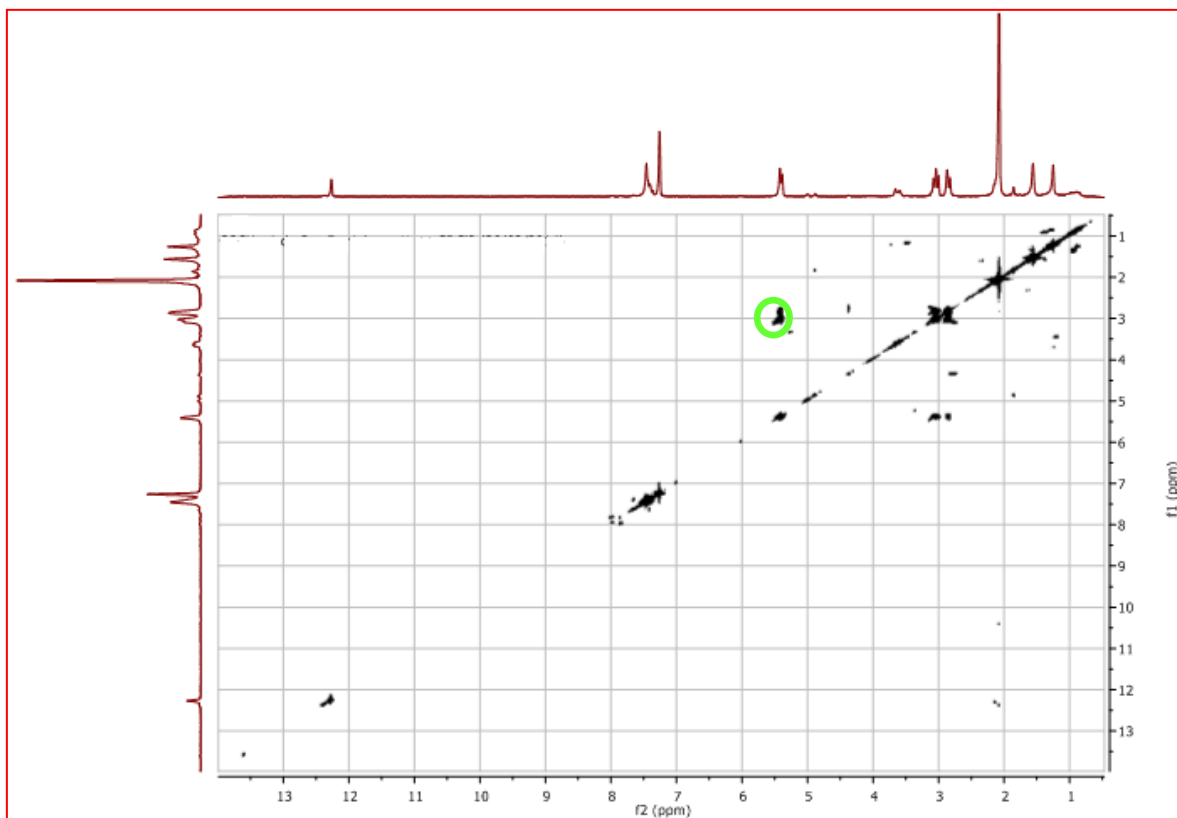
Tabla 4.12. Datos de RMN ^{13}C de 4, en Cl_3CD . TMS como estándar interno.

Los experimentos realizados mediante RMN 2D, permitieron determinar la multiplicidad de cada carbono, y la posición de cada sustituyente en la estructura. A continuación se informa el análisis de dichos experimentos.

➤ **RMN 2D**

Para completar la determinación estructural de **4**, se realizaron los experimentos de RMN 2D. El espectro COSY de **4** se presenta en la Figura 4.19 y permitió observar las correlaciones que se detallan en la Tabla 4.13 y que condujeron a confirmar la presencia del núcleo de tipo flavanona.

Figura 4.19. Espectro RMN 2D COSY (H-H) del compuesto **4**.

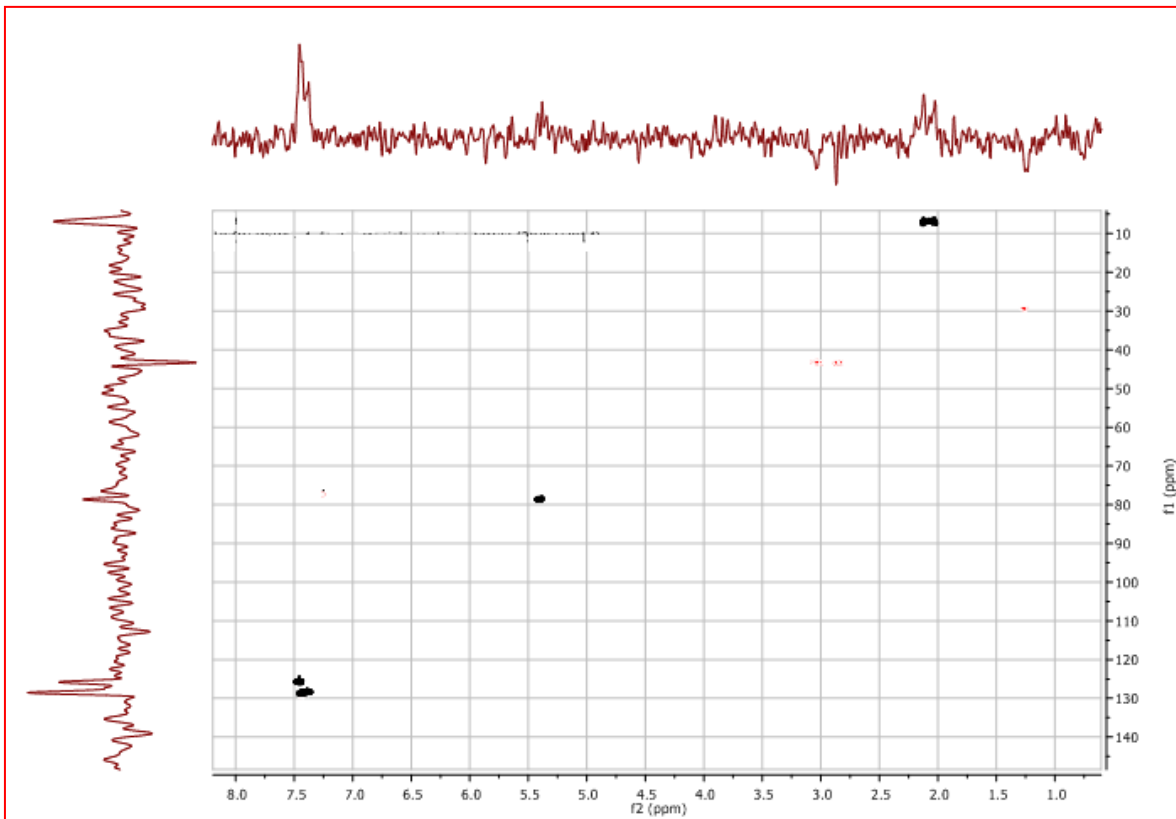


Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$	Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$
CH-2	5,4	CH ₂ -3	2,85; 3,04

Tabla 4.13. Correlación más relevante del espectro COSY (H-H) del compuesto **4**.

La Figura 4.20 exhibe el espectro de HSQC del compuesto **4**. Las correlaciones fueron determinadas y se detallan en la Tabla 4.14.

Figura 4.20. Espectro RMN 2D HSQC (H-C) del compuesto 4.



Posición	4	
	δ_H	δ_C , mult.
2	5,40	78,7 CH
3a	2,85	43,5 CH ₂
3b	3,04	43,5 CH ₂
2'	7,50	125,9 CH
3'	7,44	128,8 CH
4'	7,40	128,6 CH
5'	7,44	128,8 CH
6'	7,50	125,9 CH
6-Me	2,08	7,6 CH ₃
8-Me	2,07	6,8 CH ₃

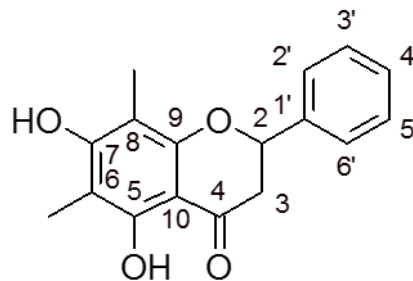
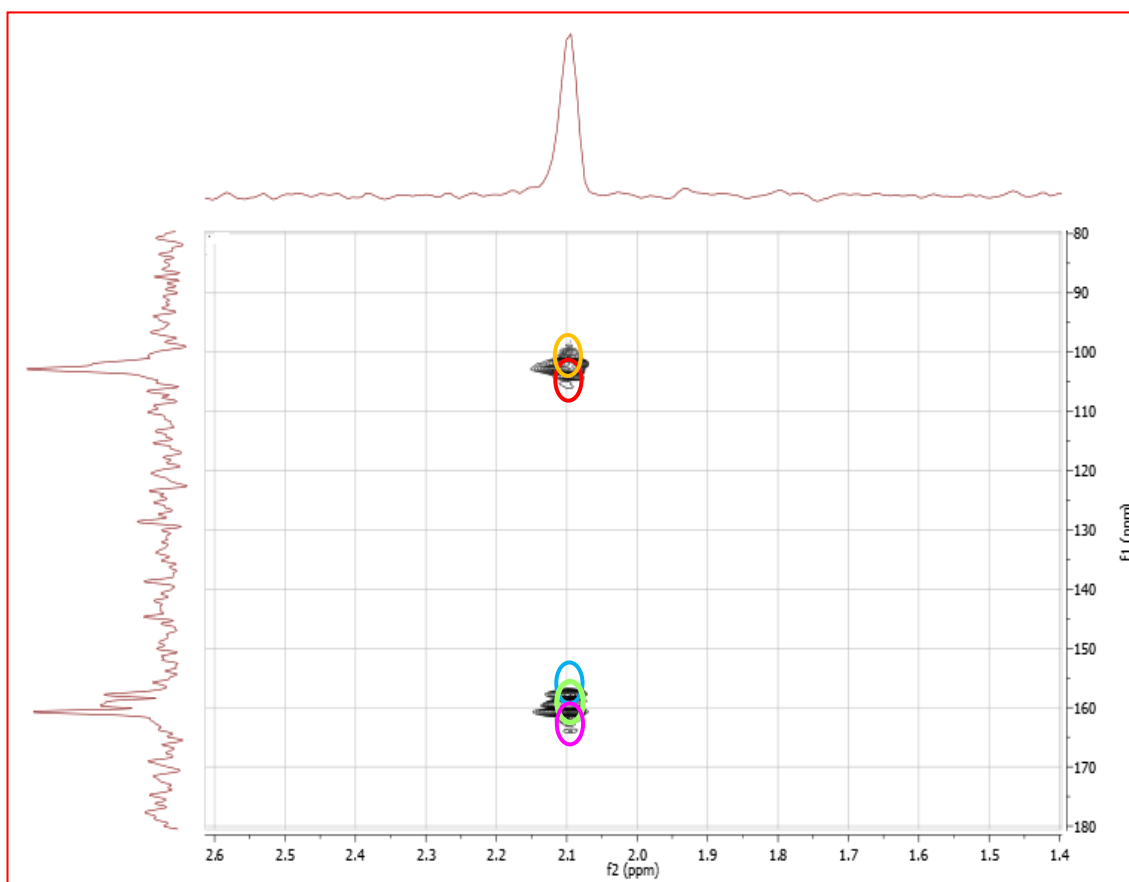


Tabla 4.14. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) del compuesto 4.

Para el compuesto 4, el espectro de HMBC se presenta en la Figura 4.21 y permitió localizar los grupos hidroxilo y metilo en forma inequívoca, según las correlaciones observadas entre los protones de 6-Me a δ_H 2,08 y el C-5 δ 159,3, como así también dicho protón correlaciona con el carbono C-7 a δ 160,8 (Figura 4.21), y el C-6 a δ 102. Los protones del grupo metilo 8-Me a δ_H 2,07 correlacionan con el átomo de C-9 a δ 157,7; el C-8 a δ 102,9 y C-7 a δ 160,8. Se observó además, una correlación entre el protón del grupo OH a δ_H 12,27 con el átomo de C-10 a δ 103.

Figura 4.21. Espectro RMN 2D HMBC (H-C) y correlaciones más importantes del compuesto 4.



H	$\delta(\text{ppm})$	C	$\delta(\text{ppm})$
6-Me	2,07	C-5,C-6,C-7	159,3;102,0;160,8
8-Me	2,08	C-7,C-8, C-9	160,8;102,9;157,7
OH-5	12,27	C-10	103,0

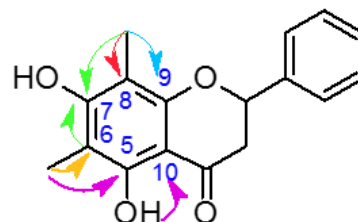


Tabla 4.15. Principales correlaciones en el espectro HMBC de 4.

➤ Dicroísmo circular

De acuerdo a lo indicado por Slade *et al.*, (2005), mediante el empleo de la regla del octante, fue determinada la configuración absoluta del compuesto **4** en el C-2 como *S*, acorde a los datos del espectro de DC, el cuál presentó un efecto Cotton negativo a CD (c 0,002; MeOH) $[\Theta]_{296} -14.70$ (Figura 4.22).

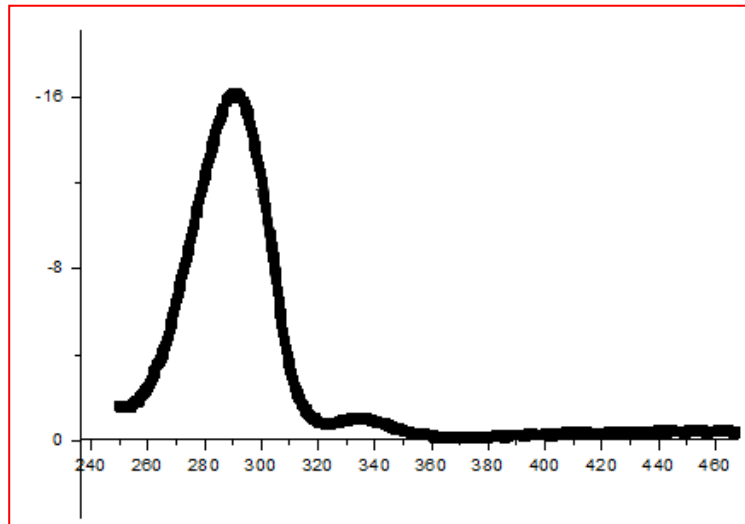
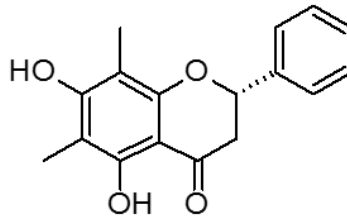


Figura 4.22. Gráfico de perfil en dicroísmo circular del compuesto 4. $[\theta]_{296} -14,70$, (MeOH; c 0,002).

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, en analogía con lo informado por Basnet *et al.*, 1993, se identifica al compuesto 4 como:



(-)-(2S)-5,7-dihidroxi-6,8-dimetilflavanona (demetoximateucinol)

4.2.4.5. Determinación estructural del compuesto 5

La determinación estructural del compuesto 5, fue llevada a cabo en base a la evidencia espectroscópica según se detalla a continuación.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto 5 se obtuvo en forma de sólido amorfo de color blanco. El espectro UV en MeOH de 5 mostró una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 283 (4,22), 324 (sh) (3,80) nm (Fig. 4.23).

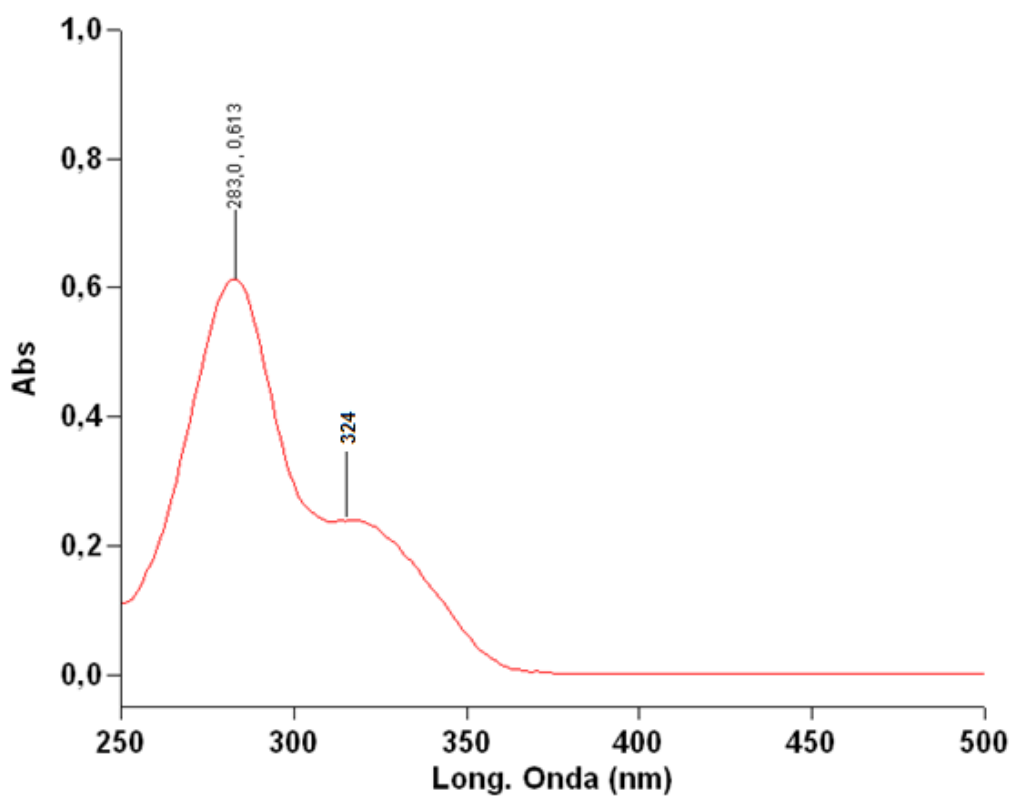
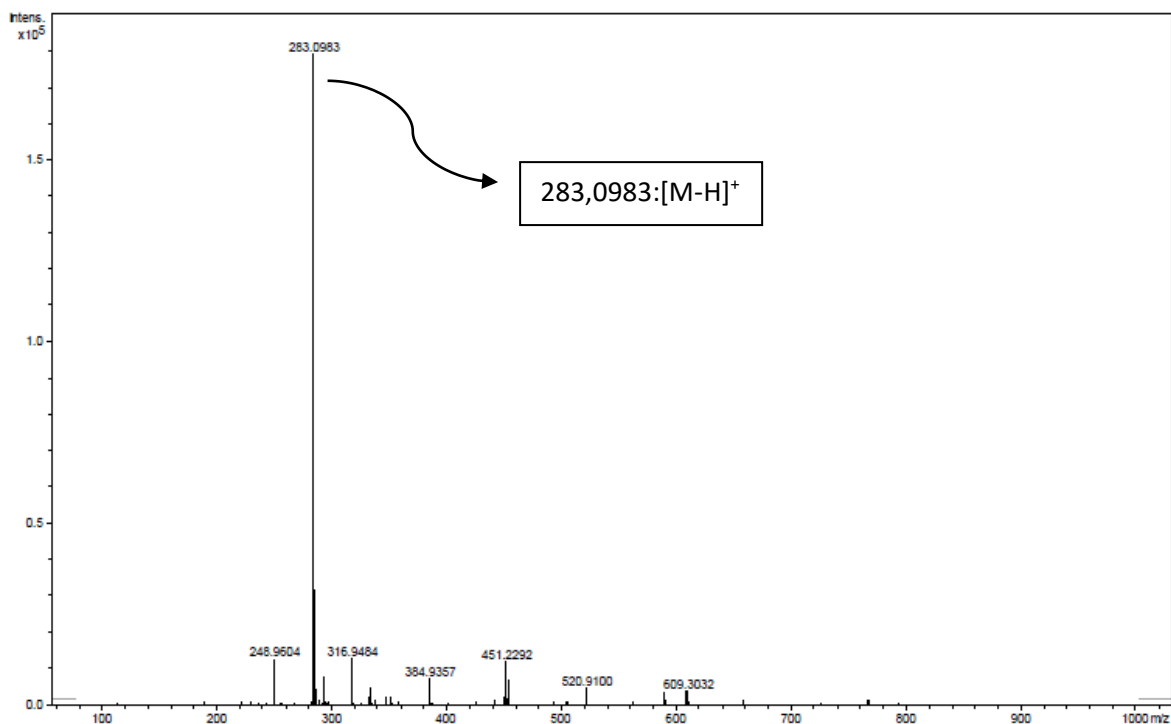


Figura 4.23. Espectro UV (MeOH) del compuesto 5.

➤ **Espectrometría de masas**

La fórmula molecular de **5** fue propuesta como $C_{17}H_{15}O_4$ según su espectro de masas de alta resolución (HRMS) (Figura 4.24) cuyo ión molecular de HRMS m/z 283,0983 $[M-H]^-$ responde al calculado para $C_{17}H_{15}O_4$, 283,0965.

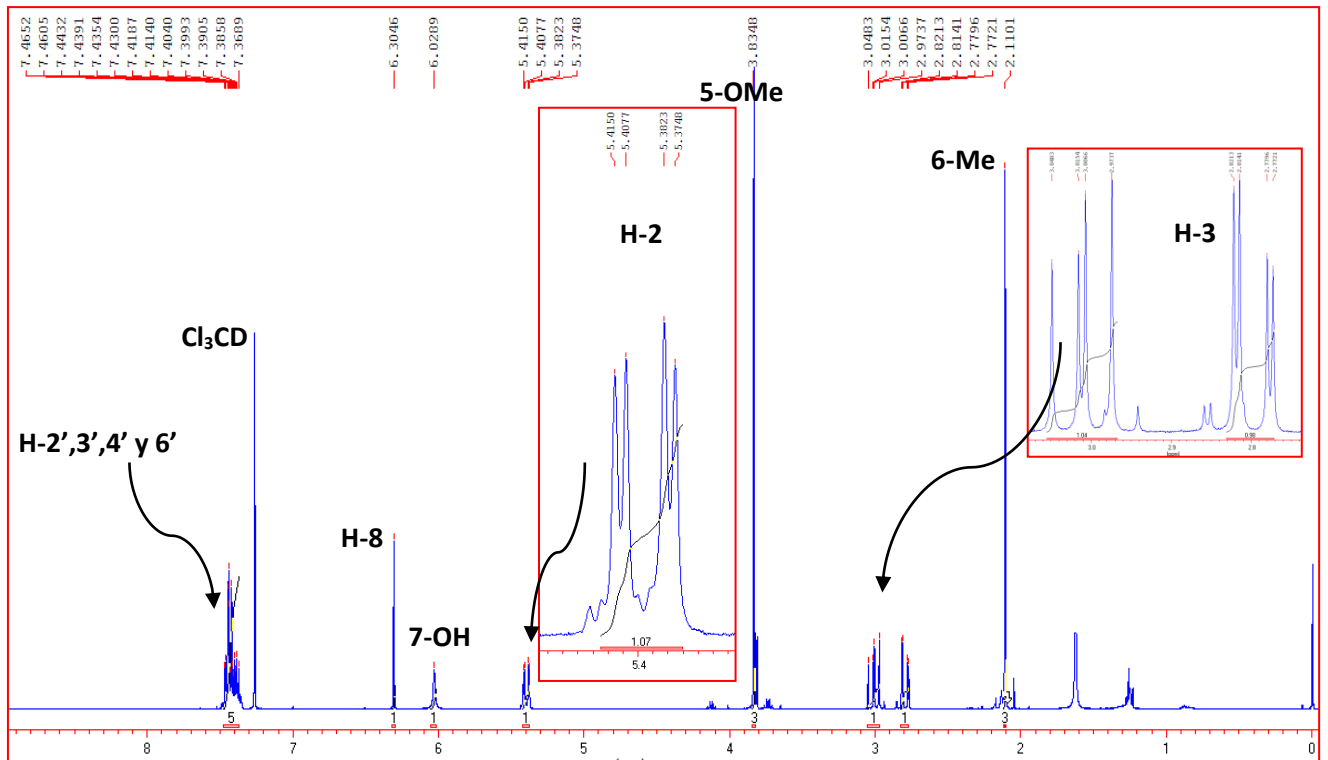
Figura 4.24. Espectro de HRMS de 5.



➤ Espectroscopía de RMN ^1H

Los datos de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **5** se muestran en la Tabla 4.16 y concordaron con los reportados previamente por Kenneth *et al.*, 1987. El espectro de RMN ^1H (Figura 4.25) presentó las señales del sistema de spin ABX, características de una flavanona: [δ_{H} 5,40 (1H, dd, $J=13,0$; 3,0 Hz, H-2), 3,01 (1H, dd, $J=13,2$; 16,9 Hz, H-3ax) y 2,79 (1H, dd, $J=3,1$, 16,8 Hz, H-3eq)]. Con respecto a las señales de protones aromáticos, se observó una señal correspondiente a los cinco protones aromáticos pertenecientes al anillo B, a δ_{H} 7,42 (5H, m) (Figura 4.25). El espectro de RMN ^1H además, mostró señales de protones pertenecientes a un grupo metoxilo a δ_{H} 3,81 (3H, s) y a un grupo metilo a δ_{H} 2,11 (3H, s). Por otra parte, una señal a δ_{H} 6,03 (1H, br s) demostró la presencia de un grupo OH en posición 7 del anillo A. Una señal a δ_{H} 6,30 (1H, s) mostró la presencia de un protón en posición 8.

Figura 4.25. Espectro RMN ¹H de 5.



Posición	δ_H mult. (J en Hz)
2	5,40 dd (3,0; 13,0)
3a	3,01 dd (16,9; 13,2)
3b	2,79 dd (16,8; 3,1)
8	6,30s
2'	7,42 m
3'	7,42 m
4'	7,42 m
5'	7,42 m
6'	7,42 m
5-OMe	3,81 s
6-Me	2,11 s
7-OH	6,03s

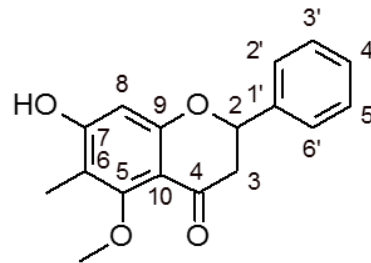
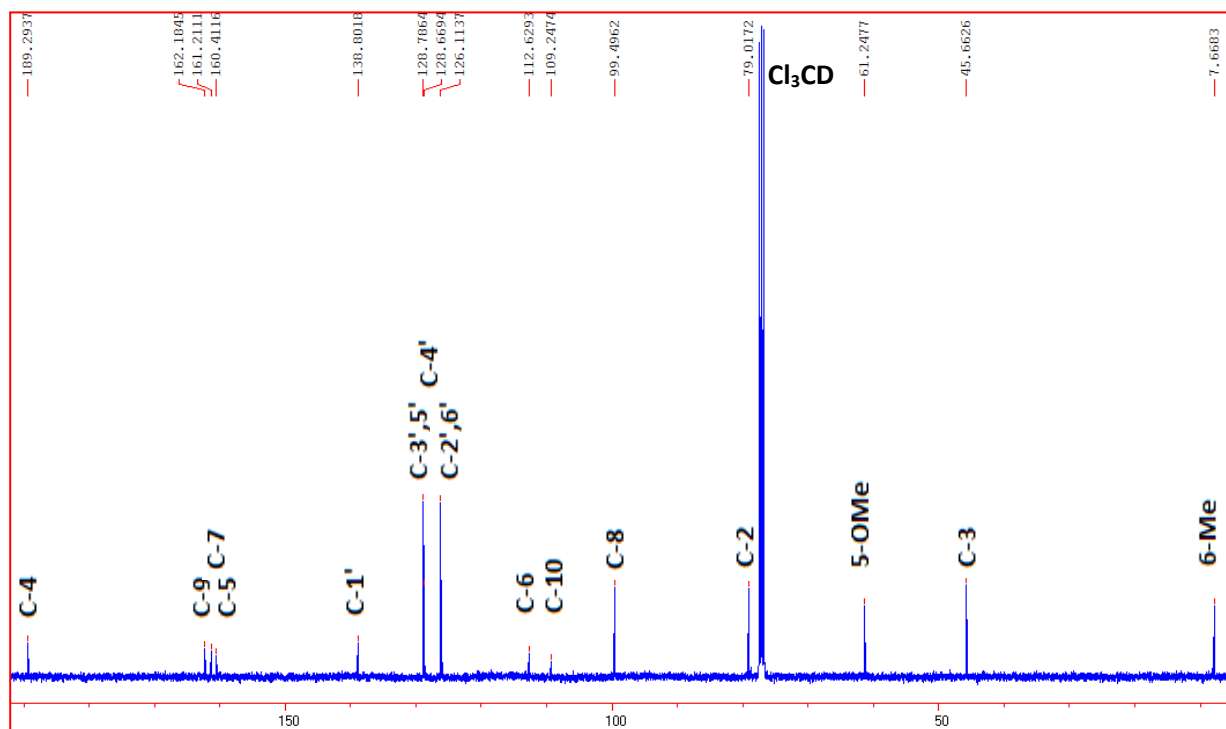


Tabla 4.16. Datos de RMN ¹H de 5, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

➤ Espectroscopía de RMN ¹³C

Los diecisiete átomos de C del compuesto **5** fueron observados en el espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.26). Las multiplicidades y numeración mostradas pretenden hacer más completo este espectro, sin embargo, dichos datos fueron obtenidos luego de analizar los espectros de RMN 2D.

Figura 4.26. Espectro RMN ¹³C de 5.



Posición	δ_c , mult.
2	79,0 CH
3a	45,7 CH ₂
3b	45,7 CH ₂
4	189,3 qC
5	160,4 qC
6	112,6 qC
7	161,2 qC
8	99,5 CH
9	162,2 qC
10	109,3 qC
1'	138,8 qC
2'	126,1 CH
3'	128,8 CH
4'	128,7 CH
5'	128,8 CH
6'	126,1 CH
5-OMe	61,3 CH ₃
6-Me	7,7 CH ₃

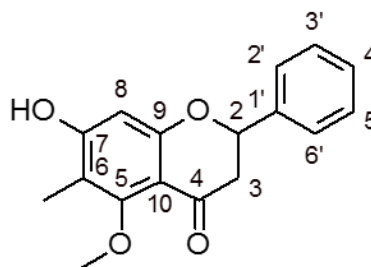


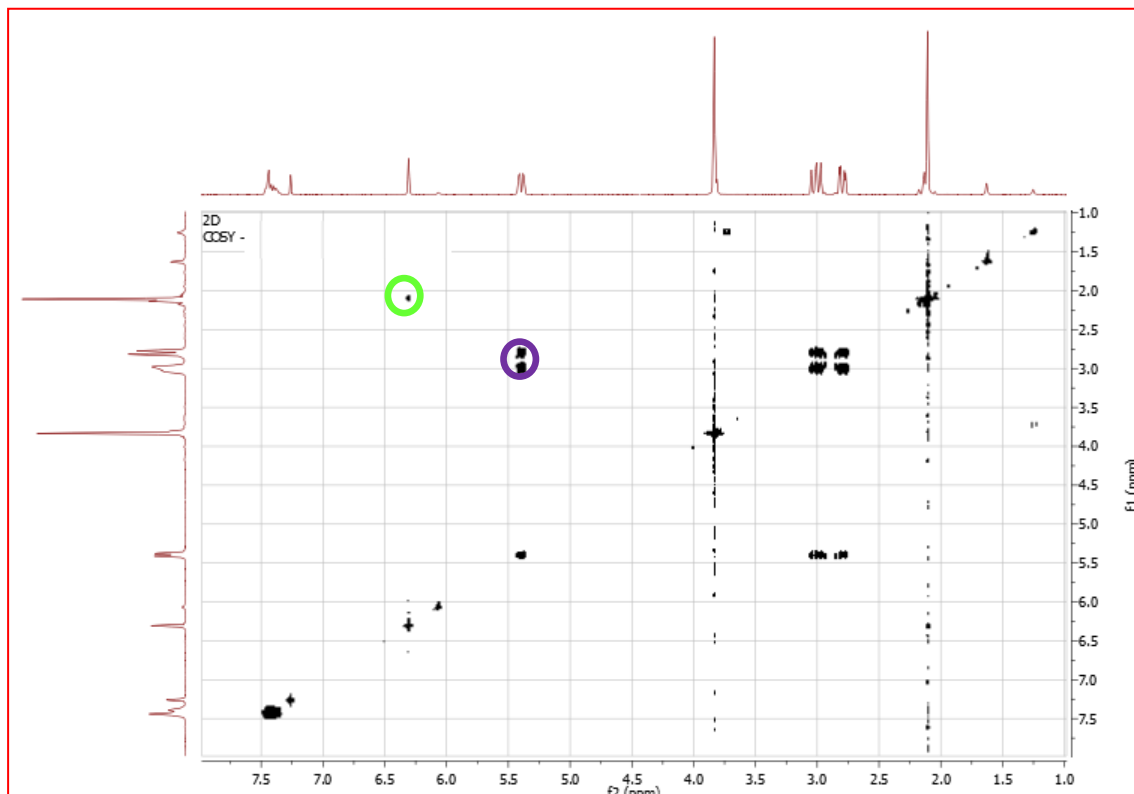
Tabla 4.17. Datos de RMN ¹³C de 5, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

➤ RMN 2D

Para completar la Determinación estructural de 5, se realizaron los experimentos de RMN 2D. Estos experimentos no habían sido informados en la literatura.

El espectro COSY de **5** se presenta en la Figura 4.27 y permitió observar las correlaciones que se detallan en la Tabla 4.18 y que condujeron a ratificar la presencia del núcleo flavanona y la posición del sustituyente metilo.

Figura 4.27. Espectro RMN 2D COSY (H-H) del compuesto **5**.

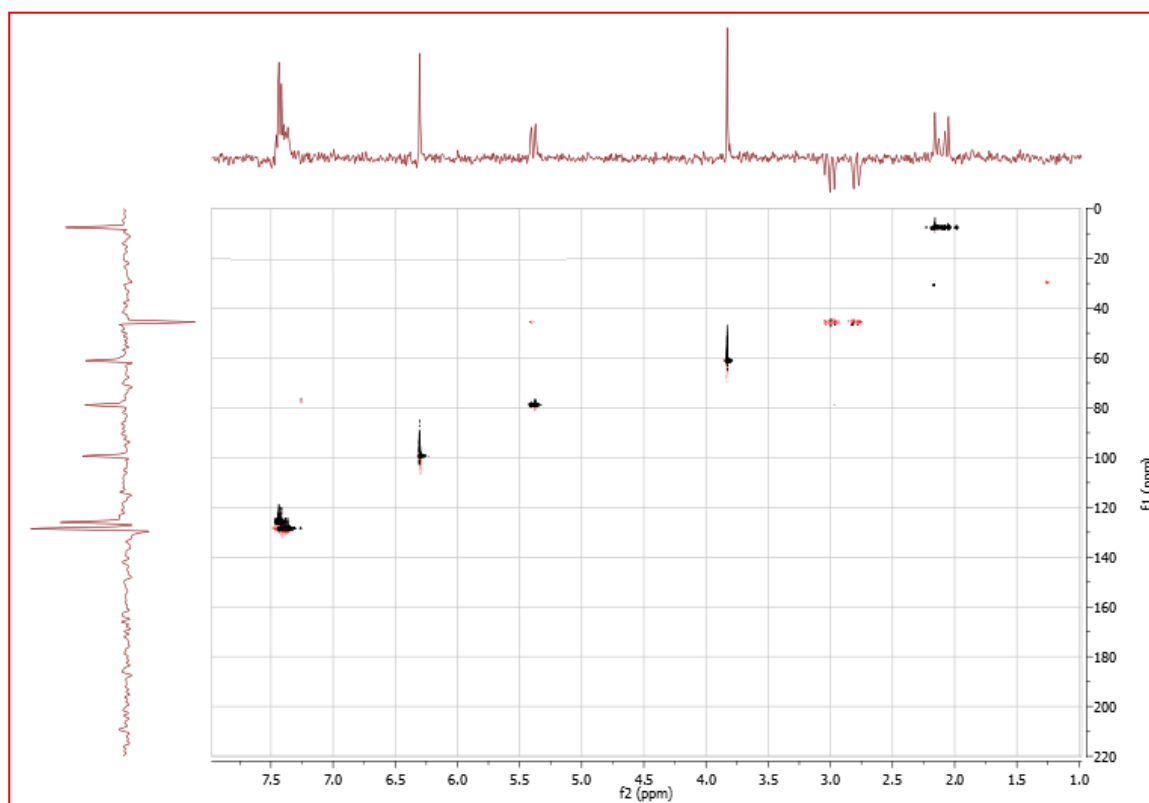


Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$	Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$
○ CH ₂ -3	2,8; 3,0	CH-2	5,4
○ CH-8	6,3	6-Me	2,11

Tabla 4.18. Principales correlaciones del espectro COSY (H-H) del compuesto **5**.

La Figura 4.28 exhibe el espectro de HSQC del compuesto **5**. Las correlaciones fueron determinadas y se detallan en la Tabla 4.19.

Figura 4.28. Espectro RMN 2D HSQC (H-C) del compuesto 5.



Posición	5	
	δ_H	δ_C , mult.
2	5,40	79,0 CH
3a	3,01	45,7CH ₂
3b	2,79	45,7CH ₂
8	6,30	99,5CH
2'	7,42	126,1 CH
3'	7,42	128,8 CH
4'	7,42	128,7 CH
5'	7,42	128,8 CH
6'	7,42	126,1 CH
5-OMe	3,81	61,3 CH ₃
6-Me	2,11	7,7 CH ₃

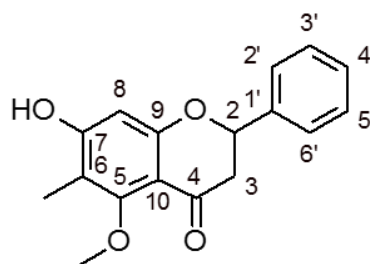
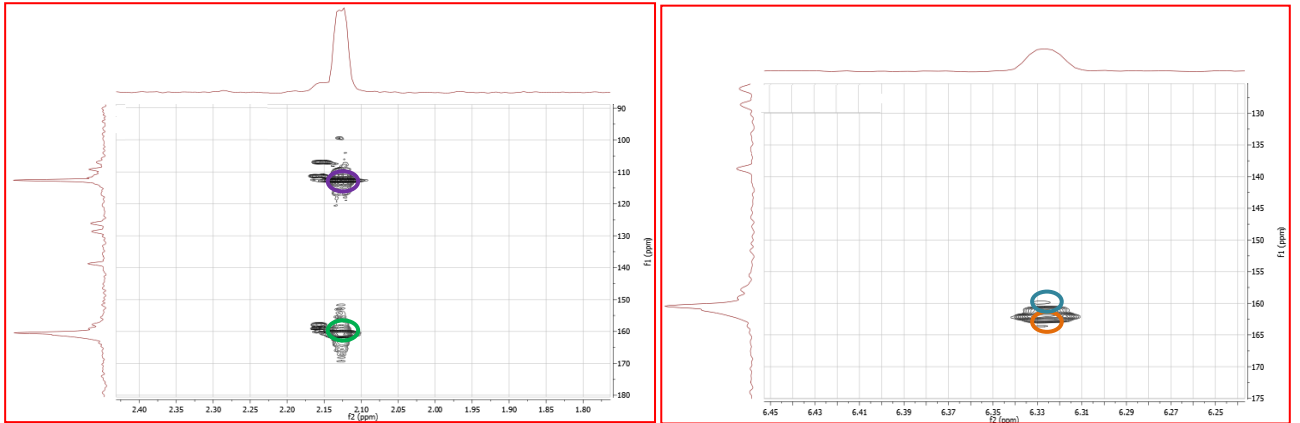


Tabla 4.19. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) del compuesto 5.

Para el compuesto 5, el espectro de HMBC se presenta en la Figura 4.29 y permitió localizar los grupos hidroxilo, metilo y metoxi en forma inequívoca, según las correlaciones observadas entre los protones del grupo metilo en 6 a δ_H 2,11; el C-5 a δ 160,4 y el C-6 a δ 112,6. Por otra parte, los protones del grupo metoxi a δ_H 3,81 correlacionan con el carbono C-5 a δ 160,4 indicando así su posición. El protón en C-8 a δ_H 6,30 correlaciona con el átomo de C-9 a δ 162,2 y con el átomo de C-7 a δ 161,2. El protón del grupo OH-C7 a δ_H 6,03 correlaciona con C-6 a δ 112,6 (Figura 4.29).

Figura 4.29. Ampliaciones del espectro RMN 2D HMBC (H-C) y correlaciones más importantes del compuesto 5.



H	$\delta(\text{ppm})$	C	$\delta(\text{ppm})$
5-OMe	3,81	C-5	160,4
6-Me	2,11	C-5, C-6	160,4; 112,6
H-8	6,30	C-7,C-9	161,2; 99,5
7-OH	6,03	C-6	112,6

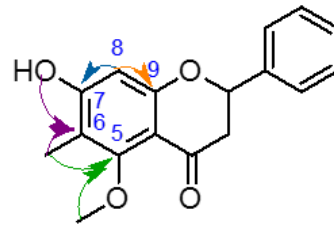


Tabla 4.20. Correlaciones más relevantes en el espectro HMBC de 5.

➤ **Dicroísmo circular**

El compuesto **5** presentó una configuración absoluta en el C-2 determinada como *S*, (Slade *et al.*, 2005) observándose un efecto Cotton negativo a CD (c 0.001, MeOH) $[\theta]_{283} -5,87$, $[\theta]_{324} +0,24$ en el espectro de DC (Figura 4.30).

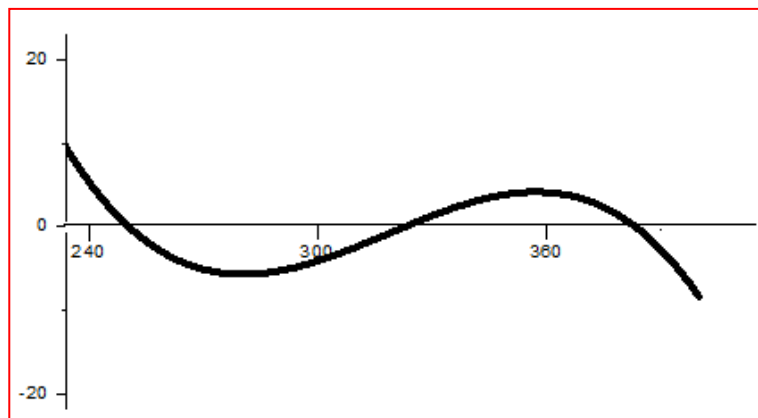
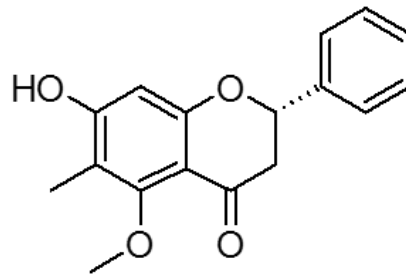


Figura 4.30. Gráfico de perfil en dicroísmo circular del compuesto 5.
 $[\theta]_{283} -5,87$, $[\theta]_{324} +0,24$, (MeOH; c 0,001).

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, en analogía con lo informado por Kenneth *et al.*, 1987 para RMN ^1H y ^{13}C , se identifica al compuesto **5** como:



(-)-(2S)-7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona (comptonina)

4.2.4.6. Determinación estructural del compuesto 6

A continuación se detalla el análisis de los datos espectroscópicos que permitió determinar la estructura química del compuesto 6.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto 6 se obtuvo en forma de sólido amorfo de color blanco. Dicho compuesto en MeOH mostró un espectro UV con una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$) 287 (4,08), 340 (sh) (3.59) nm (Fig. 4.31).

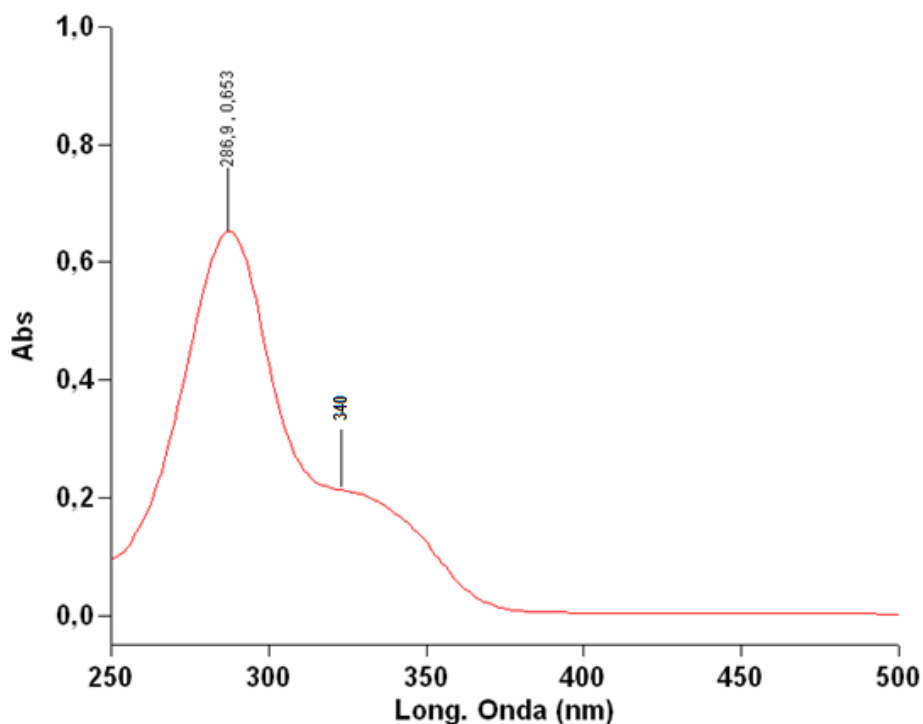


Figura 4.31. Espectro UV (MeOH) del compuesto 6.

➤ Espectrometría de masas

$C_{17}H_{15}O_4$ fue la fórmula molecular de **6** propuesta según su espectro de masas de alta resolución (HRMS) (Figura 4.32) con un ión molecular de HRMS m/z 297,1122 $[M-H]^-$ que responde al calculado para $C_{18}H_{17}O_4$, 297,1121.

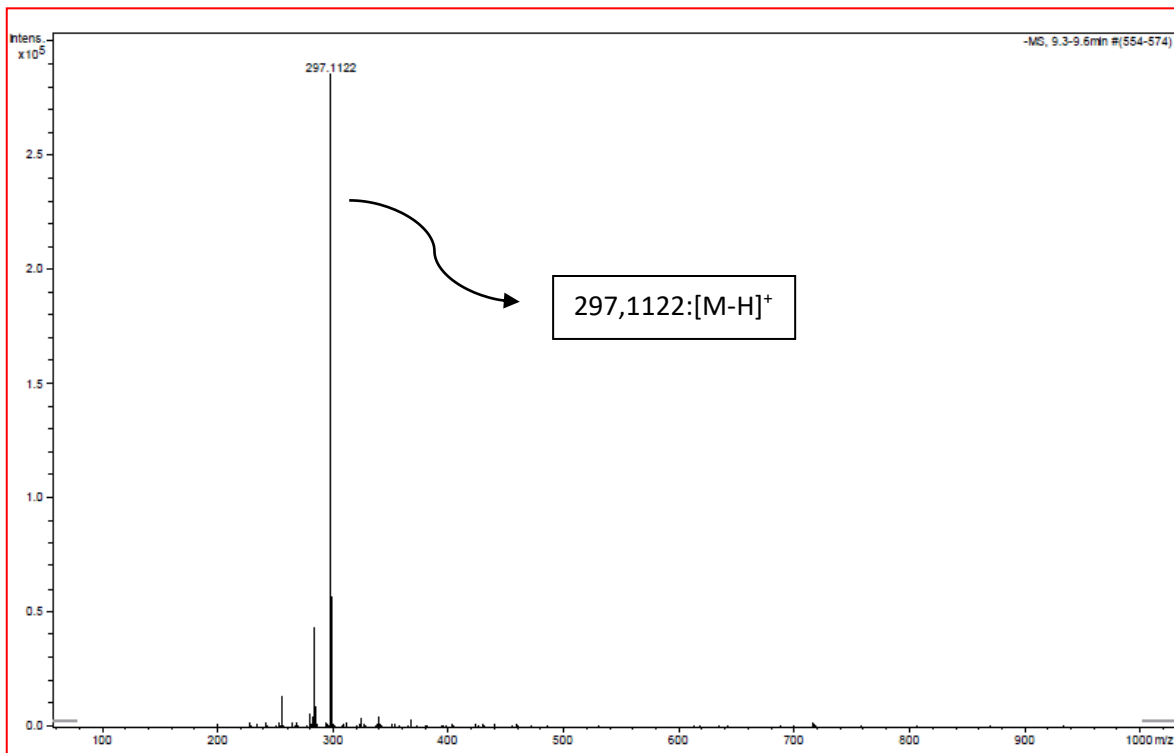
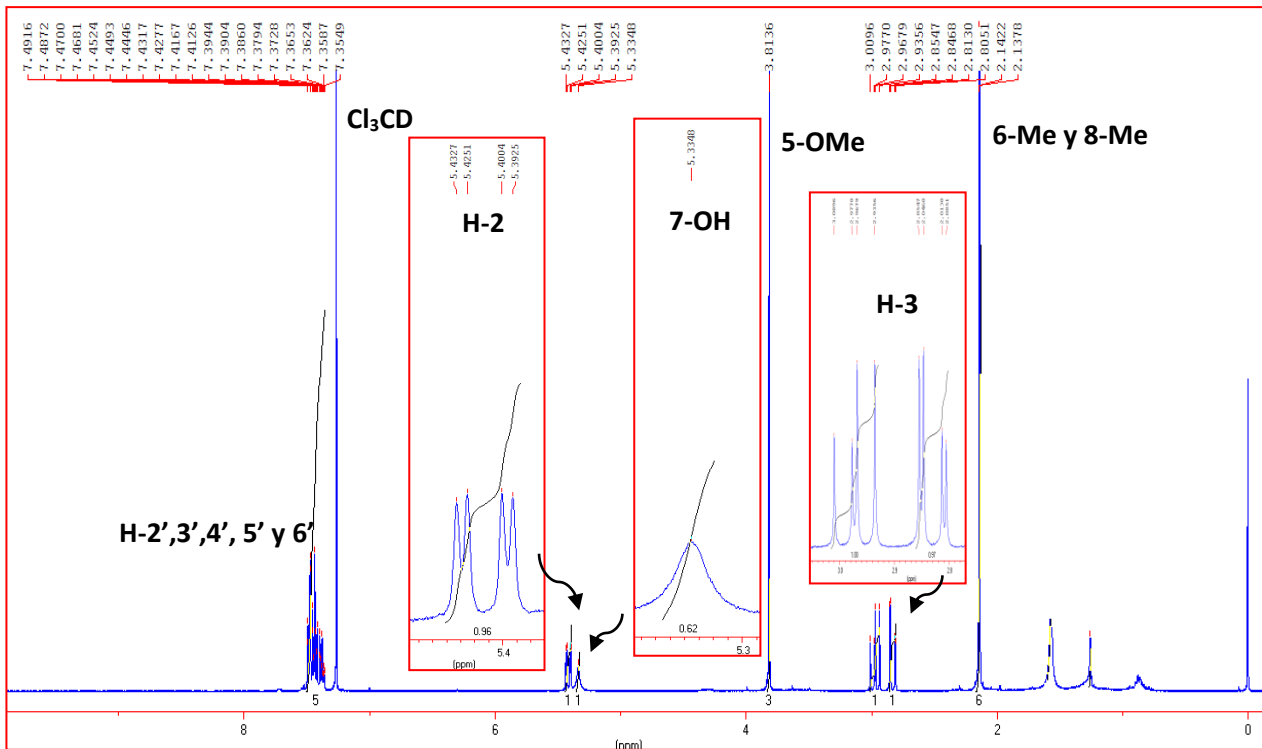


Figura 4.32. Espectro de HRMS de **6**.

➤ Espectroscopía de RMN ¹H

En la Tabla 4.21 se muestran los datos de RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) de **6**, que concordaron con los reportados previamente por Amor *et al.*, 2005. Además de presentar las señales características de una flavanona: [δ_H 5,41 (1H, dd, $J=13,0$; 3,1 Hz, H-2), 2,97 (1H, dd, $J=13,0$; 16,6 Hz, H-3ax) y 2,83 (1H, dd, $J=3,1$; 16,6 Hz, H-3eq)], se observó una señal δ_H 7,40 (5H, m) que manifiesta la presencia de cinco protones aromáticos en el anillo B, indicando que este anillo no presenta sustituyentes (Figura 4.33). El espectro de RMN 1H además, mostró señales de protones pertenecientes a un grupo metoxilo a δ_H 3,81 (3H, s) y a dos grupos metilos a δ_H 2,14 (3H, s) y δ_H 2,13 (3H, s). Una señal a δ_H 5,33 (1H, br s) demostró la presencia de un grupo OH en posición 7 del anillo A. Este compuesto sólo se diferencia del anteriormente descrito, en cuanto a la presencia de un grupo metilo adicional, y por lo tanto la ausencia del H-6.

Figura 4.33. Espectro RMN ¹H de 6.



Posición	δ_H mult. (J en Hz)
2	5,41 dd (3,1; 13,0)
3a	2,97 dd (13,0; 16,6)
3b	2,83 dd (3,1; 16,6)
2'	7,40 m
3'	7,40 m
4'	7,40 m
5'	7,40 m
6'	7,40 m
5-OMe	3,81 s
6-Me	2,14 d (2,1)
7-OH	5,33 s
8-Me	2,13 d (2,2)

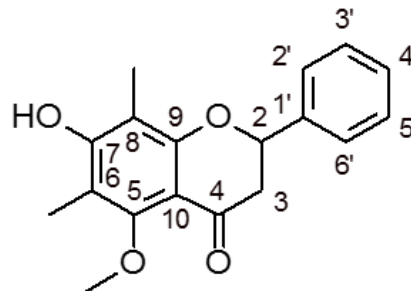
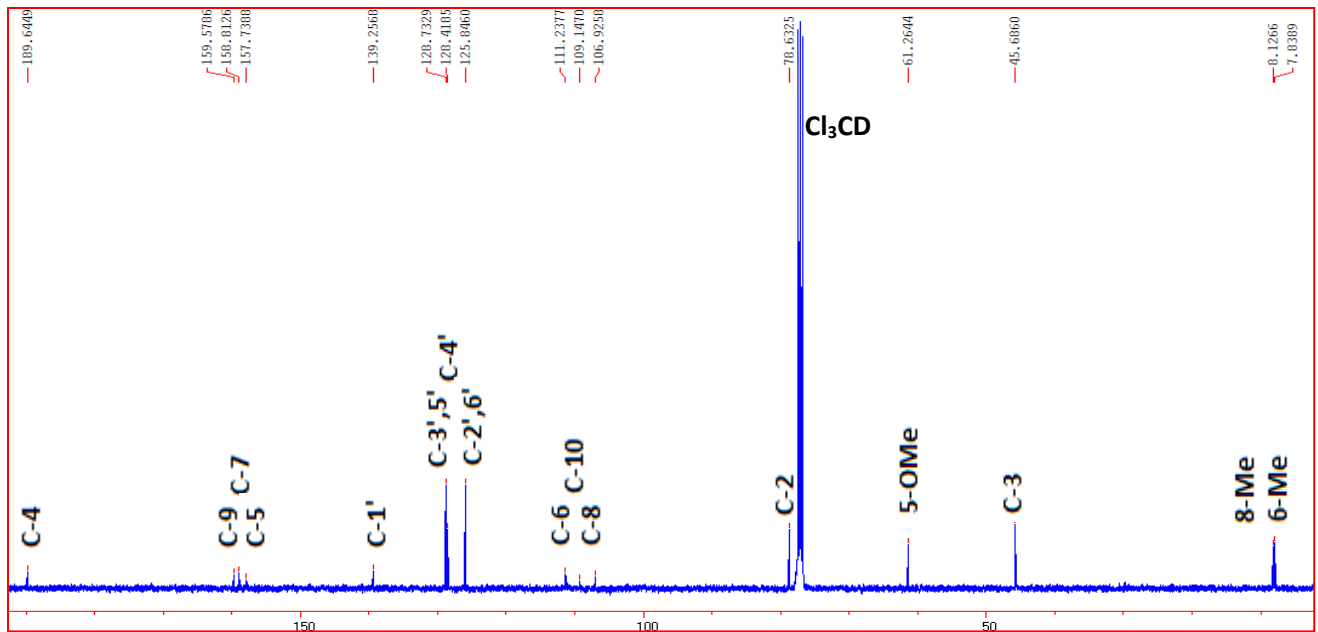


Tabla 4.21. Datos de RMN ¹H de 6, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

➤ **Espectroscopía de RMN ¹³C**

A continuación se muestra el espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.34) con las señales correspondientes a los diecisiete átomos de C del compuesto 6; junto con éste se detallan las multiplicidades y posición de cada uno de los C, datos que fueron obtenidos tras el análisis de los espectros RMN 2D, y que se incluyen aquí a fines descriptivos.

Figura 4.34. Espectro RMN ¹³C de 6.



Posición	δ_c , mult.
2	78,6 CH
3a	45,7 CH ₂
3b	45,7 CH ₂
4	189,6 qC
5	157,7 qC
6	111,2 qC
7	158,8 qC
8	106,9 qC
9	159,6 qC
10	109,2 qC
1'	139,3 qC
2'	125,9 CH
3'	128,7 CH
4'	128,4 CH
5'	128,7 CH
6'	125,9 CH
5-OMe	61,3 CH ₃
6-Me	7,8 CH ₃
8-Me	8,1 CH ₃

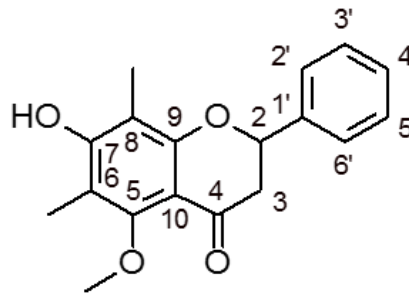


Tabla 4.22. Datos de RMN ¹³C de 6, en Cl₃CD. TMS como estándar interno.

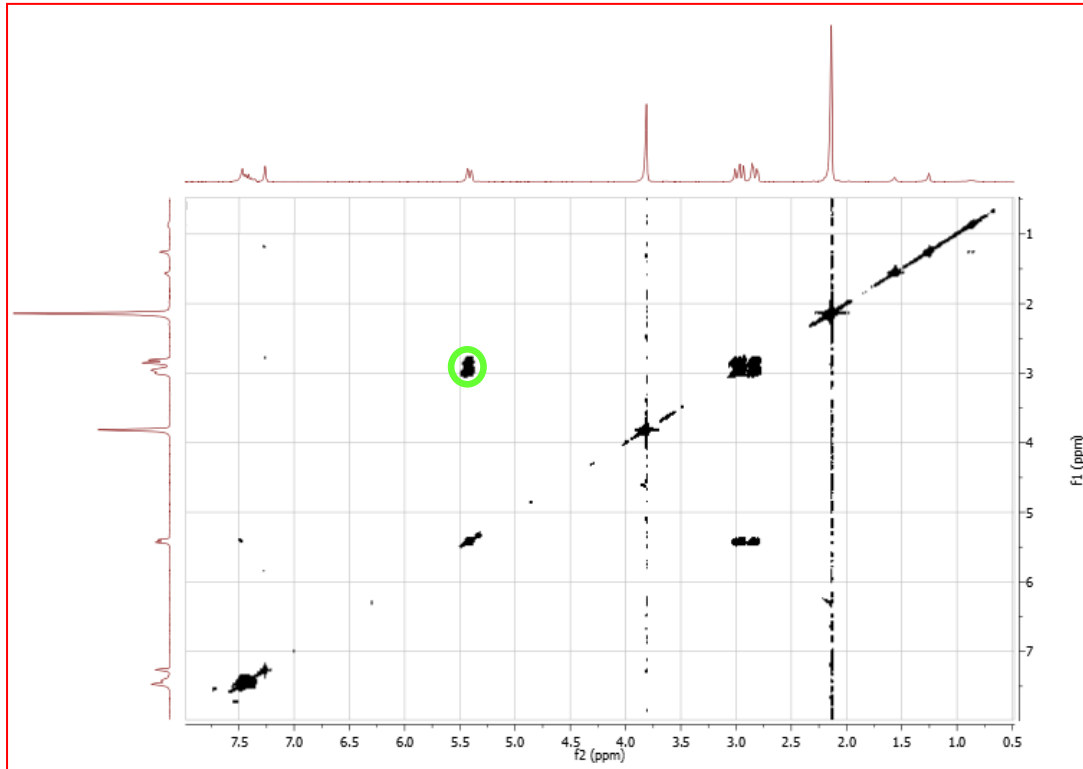
➤ **RMN 2D**

Los experimentos de RMN 2D permitieron completar la Determinación estructural de 6. Tras el análisis de dichos experimentos, se encontraron algunas diferencias relacionadas a las asignaciones de los carbonos oxigenados C-5 y C-7, y de

algunos de los carbonos aromáticos del anillo B en relación a lo previamente descrito por Amor et al., 2005.

El espectro COSY de **6** se presenta en la Figura 4.35 y permitió observar la correlación que se detallan en la Tabla 4.23 que nos confirmó la presencia de un núcleo del tipo flavanona.

Figura 4.35. Espectro RMN 2D COSY (H-H) del compuesto 6.

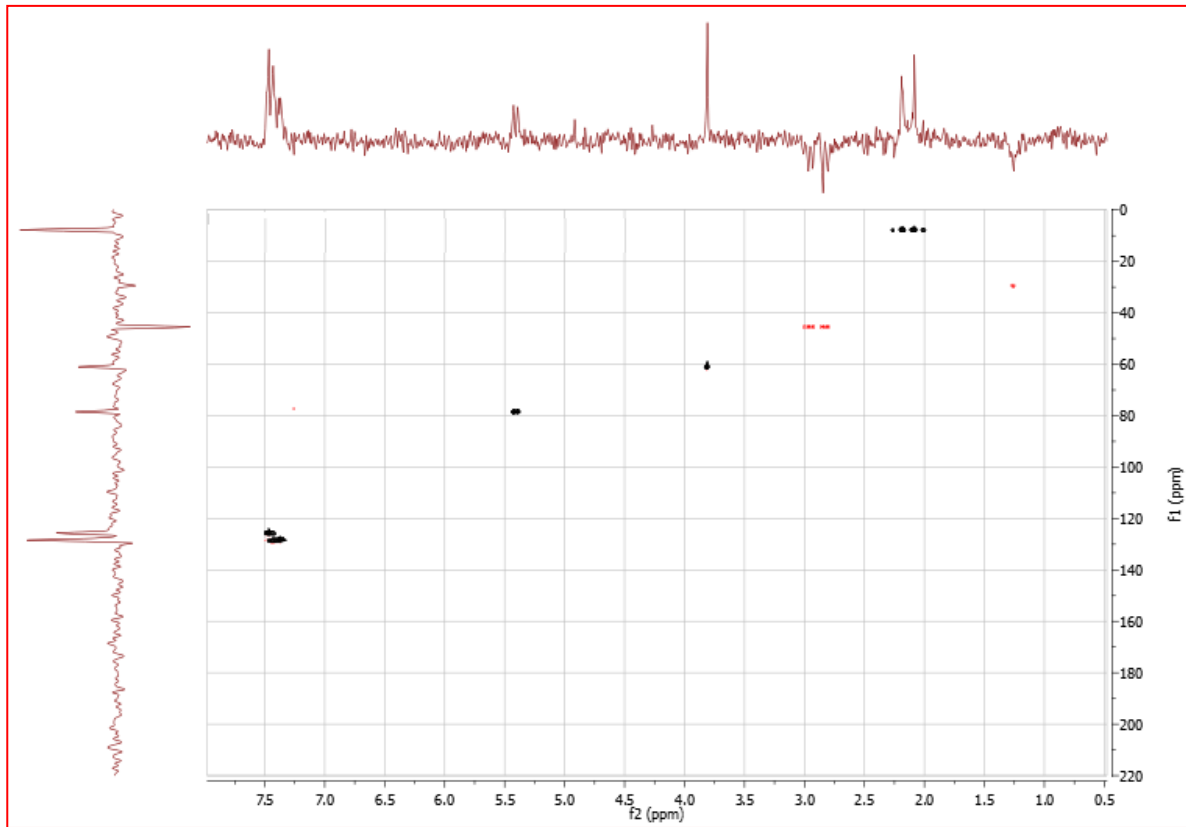


Señal ¹ H	δ(ppm)	Señal ¹ H	δ(ppm)
○ CH ₂ -3	2,83; 2,97	CH-2	5,41

Tabla 4.23. Correlación del espectro COSY (H-H) del compuesto 6.

El espectro de HSQC del compuesto **6** se muestra en la Figura 4.36. Las correlaciones para este compuesto se encuentran detalladas en la Tabla 4.24.

Figura 4.36. Espectro RMN 2D HSQC (H-C) del compuesto 6.



Posición	6	
	δ_H	δ_C , mult.
2	5,41	78,6 CH
3a	2,97	45,7CH ₂
3b	2,83	45,7CH ₂
2'	7,40	125,9 CH
3'	7,40	128,7 CH
4'	7,40	128,4 CH
5'	7,40	128,7 CH
6'	7,40	125,9 CH
5-OMe	3,81	61,3 CH ₃
6-Me	2,14	7,8 CH ₃
8-Me	2,13	8,1 CH ₃

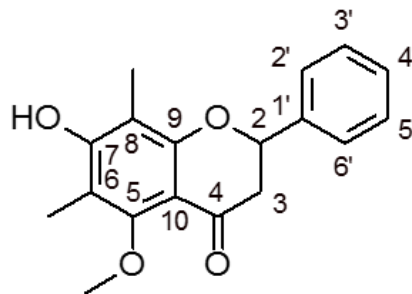
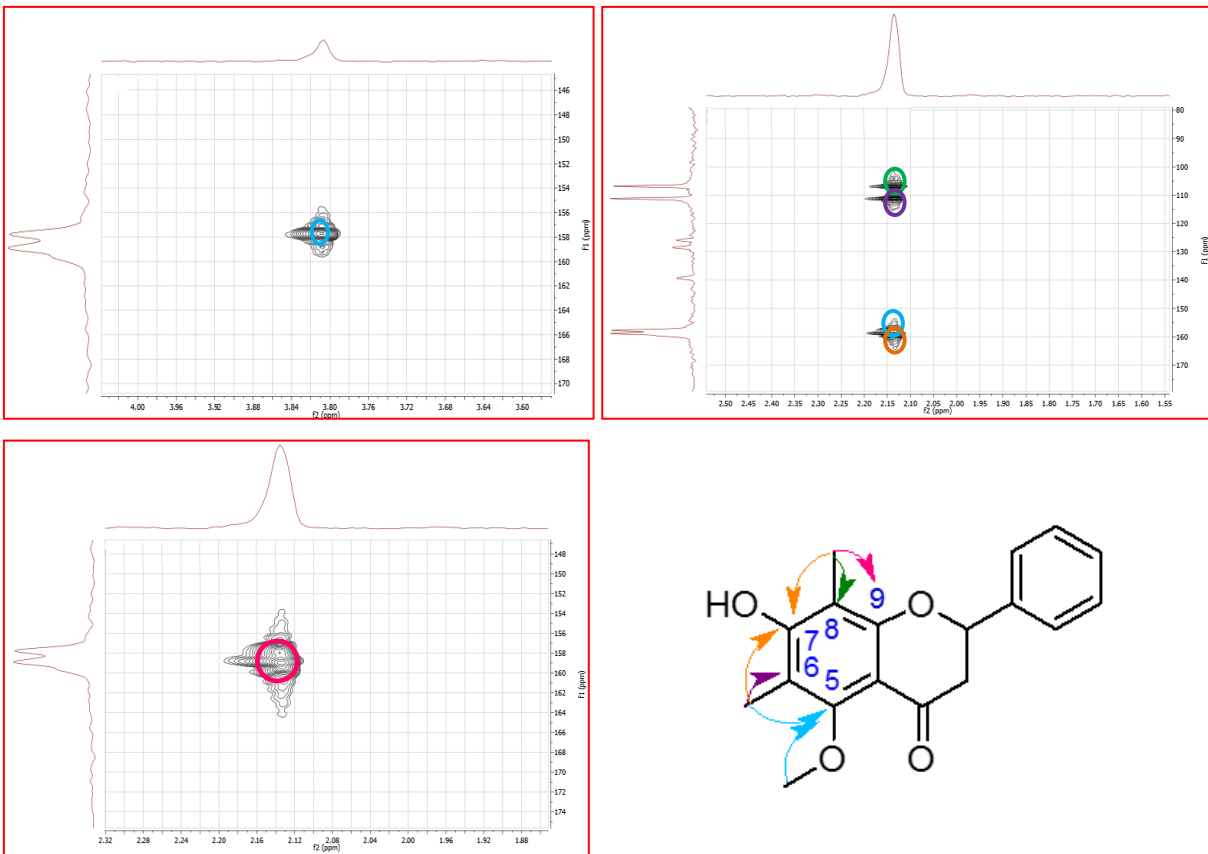


Tabla 4.24. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) del compuesto 6.

La localización de los grupos hidroxilo, metilo y metoxi en el anillo A del compuesto **6**, fueron determinadas mediante el análisis del espectro de HMBC que se presenta en la Figura 4.32. Las correlaciones observadas fueron: entre los protones del grupo metilo en 6 a δ_H 2,14, el C-5 a δ 157,7, el C-7 a δ 158,8 y el C-6 a δ 111,2. Por otra parte, los protones del grupo metoxi MeO a δ_H 3,81 correlacionan con el carbono C-5 a δ 157,7. Los protones de 8-Me a δ_H 2,13 correlacionan con el átomo de C-8 a δ 106,9; con C-9 a δ 159,6 y con C-7 a δ 158,8 (Figura 4.37). Otras correlaciones son detalladas en la Tabla 4.25.

Figura 4.37. Espectro RMN 2D HMBC (H-C) y correlaciones más importantes del compuesto 6.



H	$\delta(\text{ppm})$	C	$\delta(\text{ppm})$
CH-2	5,41	C-1', C-2', C-6'	139,3; 125,9; 125,9
5-OMe	3,81	C-5	157,7
6-Me	2,14	C-5, C-6, C-7	157,7; 111,2; 158,8
8-Me	2,13	C-7, C-8, C-9	158,8; 106,9; 159,6

Tabla 4.25. Correlaciones en el espectro HMBC de 6.

Las diferencias que fueron observadas en cuanto a lo informado por Amor *et al.*, 2005, se centraron, por un lado, en la correlación de los protones del grupo metoxilo a δ_{H} 3,81 y el carbono cuaternario a δ 157,7 y, por otro lado, en los protones del metilo en C-6 a δ_{H} 2,14, los cuales correlacionaron con dos señales de carbonos oxigenados a δ 157,7 y δ 158,8, lo que nos permitió asignar estas señales como C-5 y C-7, respectivamente. Otras diferencias observadas fueron las correspondientes a las señales de los carbonos aromáticos del anillo B. Las fuertes correlaciones dadas entre el protón del metino en C-2 y los carbonos aromáticos no sustituidos a δ 125,9, nos permitió asignar estas señales como C-2' y C-6'. El resto de los carbonos aromáticos de dicho anillo, se asignaron de acuerdo a lo descrito por Harbone & Mabry *et al.*, 1982 para flavanonas.

➤ **Dicroísmo circular**

El compuesto **6** presentó un efecto Cotton negativo a CD (c 0.0005, MeOH) $[\theta]_{287} -0,18$, $[\theta]_{340} +0,15$ en el C-2 llevando así, a la configuración absoluta *S* (Slade *et al.*, 2005), de acuerdo con los datos del espectro de DC (Figura 4.38).

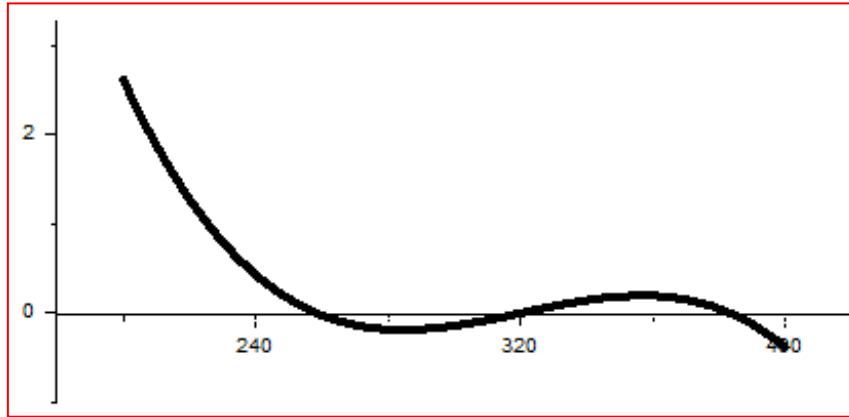
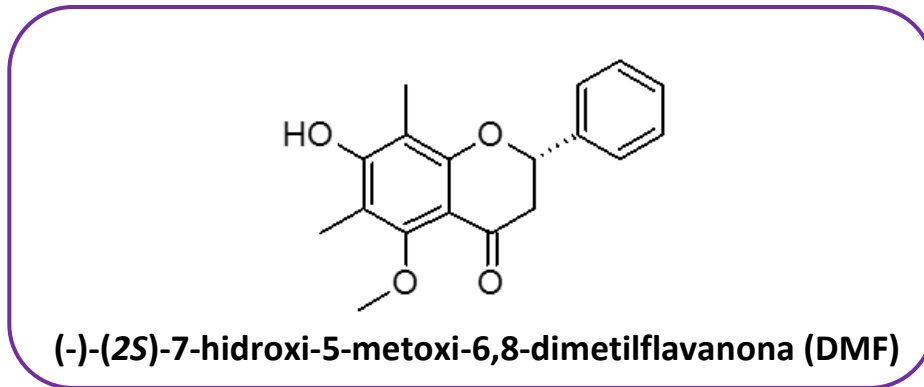


Figura 4.38. Gráfico de perfil en dicroísmo circular del compuesto **6**. $[\theta]_{287} -0,18$, $[\theta]_{340} +0,15$, (MeOH; c 0,005).

Así, tras este análisis y en analogía con lo informado por Amor *et al.*, 2005 se identifica al compuesto **6** como:



De esta manera, los compuestos obtenidos a partir de raíces y partes aéreas de *D. elegans* fueron:

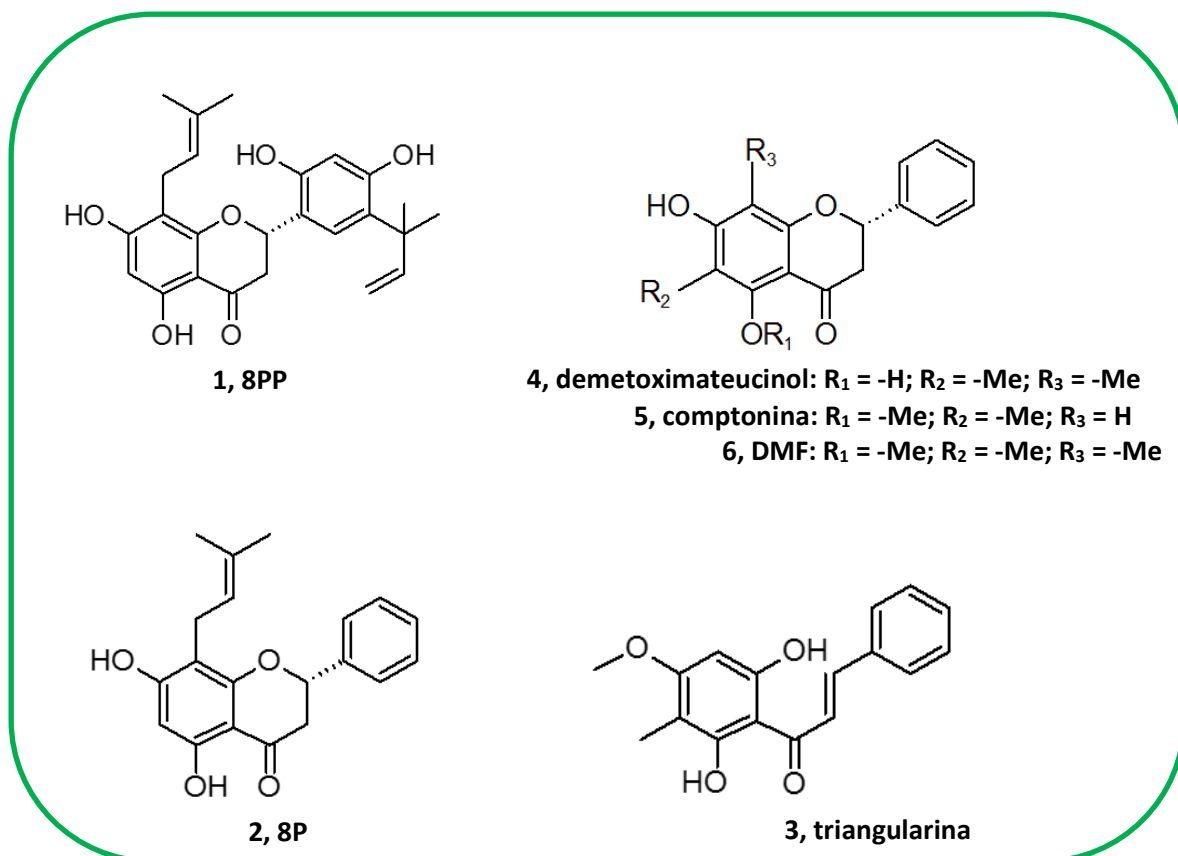


Figura 4.39. Estructuras químicas de los flavonoides obtenidas a partir de raíces y partes aéreas de *D. elegans*.

4.3. Estudios de flavonoides en *D. pazensis* Rusby



4.3.1. Obtención y procesamiento del material vegetal. Ver Capítulo 7.

4.3.2. Preparación de los extractos. Ver Capítulo 7.

4.3.3. Aislamiento, separación y purificación de los principios activos

El extracto bencénico fue sujeto a diferentes técnicas cromatográficas (Capítulo 7), a través de las cuales se obtuvieron los compuestos **1** (4 mg), **2** (6 mg), **3** (16,4 mg) y **4** (4 mg).

4.3.4. Determinación estructural de flavonoides de *D. pazensis*

Los compuestos aislados de raíces de *D. pazensis*, fueron identificados y sus estructuras químicas dilucidadas mediante los siguientes métodos espectroscópicos y espectrofotométricos: Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones y carbono-13 (RMN ¹H y ¹³C), RMN en dos dimensiones (RMN 2D), espectrofotometría ultravioleta (UV), espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y Dicroísmo Circular (DC). Para aquellos compuestos que resultaron ser novedosos se les llevó a cabo, adicionalmente, Espectroscopía Infrarroja (IR) y determinación del ángulo de rotación óptica.

A continuación se exponen y analizan los datos espectroscópicos obtenidos.

4.3.4.1. Determinación estructural del compuesto 1

La evidencia espectroscópica permitió determinar la estructura química del compuesto **1**, según se detalla a continuación.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto **1** se obtuvo en forma de sólido amorfo de color amarillo. Dicho compuesto en MeOH mostró un espectro UV con una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$) 295 (3,69), 330 (sh) (3,13) nm. (Fig. 4.40), lo que indicó la presencia de un núcleo flavanona, de acuerdo a lo descrito por Markham, 1982, acorde a transiciones electrónicas $\pi\text{-}\pi^*$ y $n\text{-}\pi^*$ propias de este tipo de estructuras.

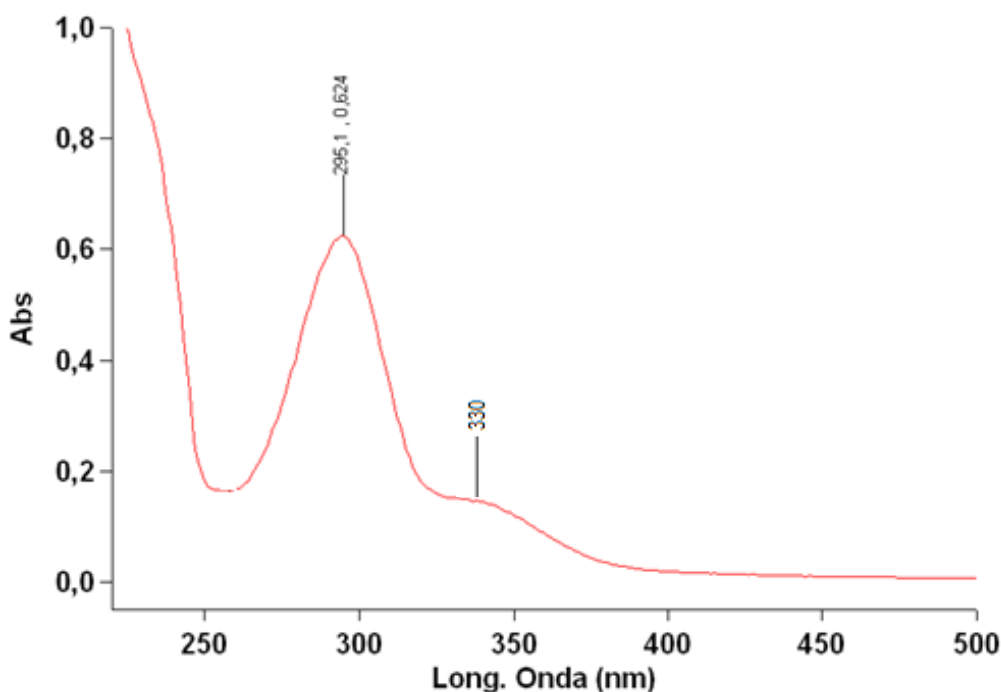


Figura 4.40. Espectro UV (MeOH) del compuesto 1.

➤ Espectroscopía Infrarroja (IR)

En el espectro IR (KBr) del compuesto **1** se observaron señales de los grupos característicos presentes en una flavanona, como las correspondientes a un grupo oxhidrilo a $\nu_{\text{máx}}$ 3644 cm^{-1} , a 1644 cm^{-1} la señal perteneciente a la función carbonilo conjugado, y a $\nu_{\text{máx}}$ 1601 y 1455 cm^{-1} , correspondientes al anillo aromático. Asimismo, se observó la señal dada por el grupo metoxilo a $\nu_{\text{máx}}$ 2852 cm^{-1} .

➤ Espectrometría de masas

El análisis del espectro de masas de alta resolución (HRMS) del compuesto **1** permitió establecer su fórmula molecular como $C_{25}H_{28}O_6$ (Figura 4.41). El ión molecular de HRMS m/z 447,1775 $[M+Na]^+$ responde al calculado para $C_{25}H_{28}O_6$, 447, 1778.

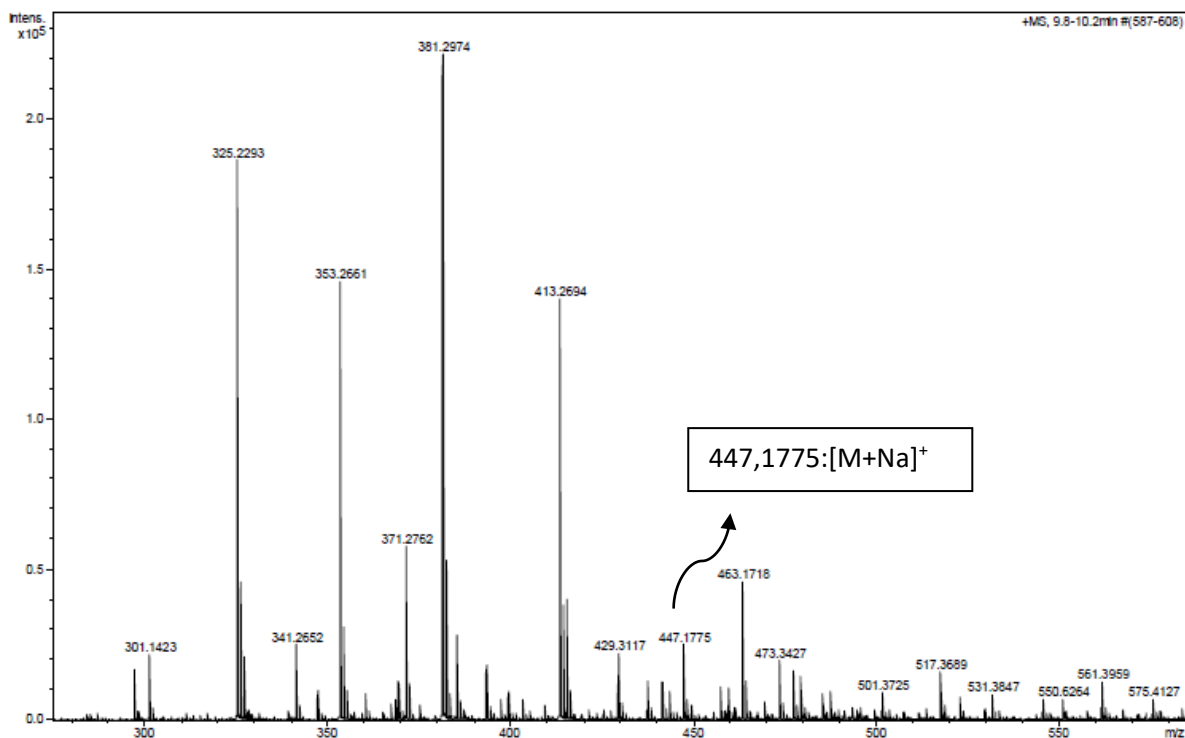
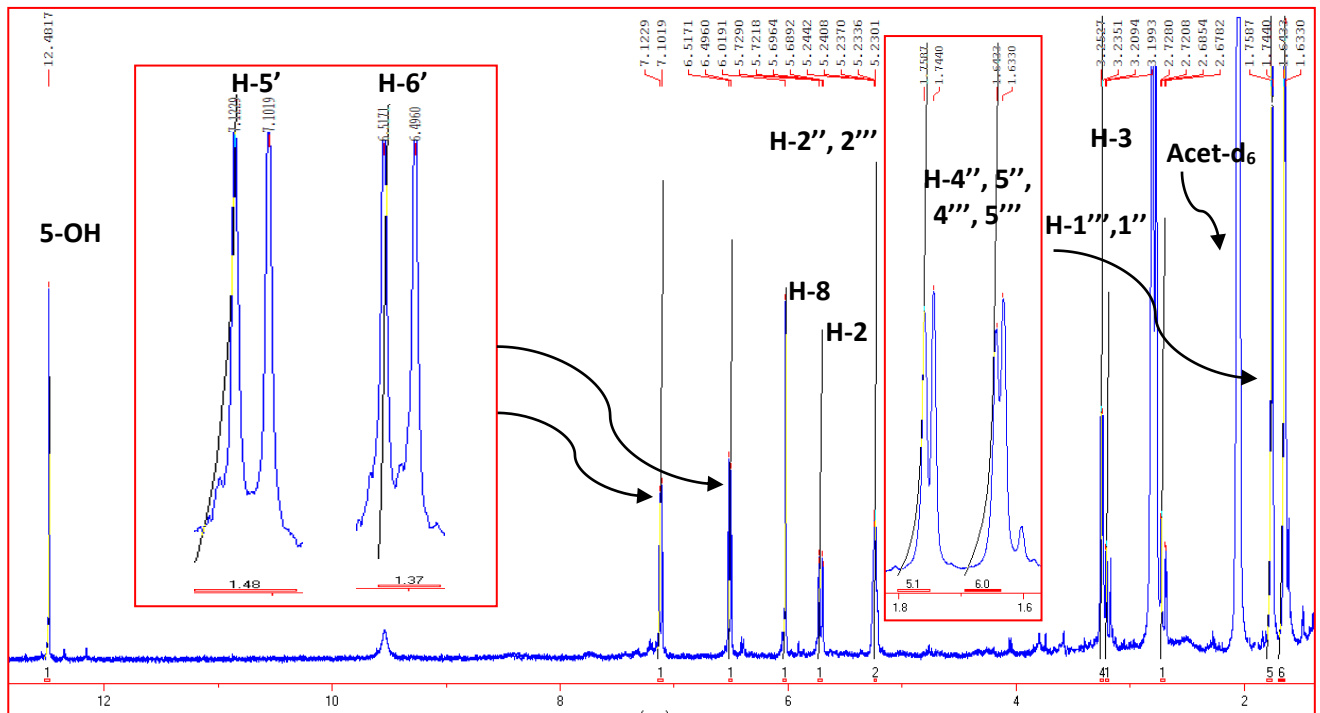


Figura 4.41. Espectro de HRMS de **1**.

➤ Espectroscopía de RMN ¹H

En la Tabla 4.26 se muestran los datos de RMN de 1H (400 MHz, Acetona- d_6) de **1**. En dicho espectro de RMN 1H (Figura 4.42) se observaron las señales [δ_H 5,71 (1H, dd, $J=13,0$; 2,8 Hz, H-2), 2,70 (1H, dd, $J=2,8$; 17,3 Hz, H-3ax) y 3,20 (1H, dd, $J=13,0$; 17,3 Hz, H-3eq)] características de una flavanona. Asimismo, se observaron señales a δ_H 7,11 (1H, d) y δ_H 6,50 (1H, d) pertenecientes a dos protones aromáticos del anillo B, lo cual indica la presencia de sustituyentes en dicho anillo (Figura 4.42). El espectro de RMN 1H además, mostró señales de protones pertenecientes a dos grupos prenilos δ_H 3,24 (4H, d), δ_H 3,44 (4H, d), δ_H 5,23 (2H, m), δ_H 1,63 (3H, s), δ_H 1,64 (3H, s), δ_H 1,74 (3H, s), δ_H 1,75 (3H, s). Una señal a δ_H 12,48 (1H, s) demostró la presencia de un grupo OH en posición 5 del anillo A.

Figura 4.42. Espectro RMN ^1H de **1**.



Posición	δ_{H} mult. (J en Hz)
2	5,71 dd (2,8; 13,0)
3a	2,70 dd (2,8; 17,3)
3b	3,20 dd (13,0; 17,3)
8	6,02 s
5'	7,11 d (8,4)
6'	6,50 d (8,4)
1''	3,24 d (7,0)
2''	5,23 m (7,0)
4''	1,63 s
5''	1,74 s
1'''	3,44 d (7,0)
2'''	5,23 m (7,0)
4'''	1,64 s
5'''	1,75 s
5-OH	12,48s

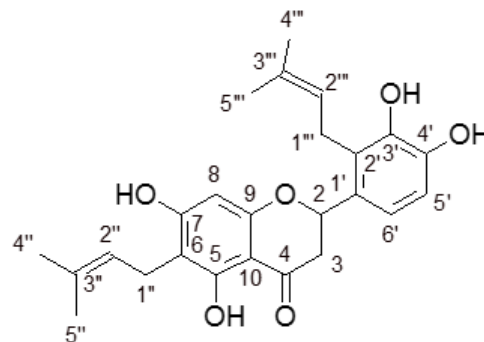


Tabla 4.26. Datos de RMN ^1H de **1**, en Acetona- d_6 . TMS como estándar interno.

➤ Espectroscopía de RMN ^{13}C

En la Figura 4.43 se puede observar el espectro de RMN de ^{13}C , el que mostró las señales correspondientes a los veinticinco átomos de C del compuesto **1**. En dicho espectro se muestran las posiciones de cada carbono, y en la tabla a continuación, la multiplicidad de los mismos, datos que fueron obtenidos luego del análisis de RMN 2D y se muestran aquí con el objetivo de mostrar más detalladamente este espectro.

Posición	δ_c , mult.
2	78,7 CH
3a	41,6 CH ₂
3b	41,6 CH ₂
4	196,9 qC
5	162,6 qC
6	108,1 qC
7	163,5 qC
8	94,3 CH
9	161,4 qC
10	102,2 qC
1'	117,0 qC
2'	115,9 qC
3'	153,4 qC
4'	156,2 qC
5'	124,7 CH
6'	107,2 CH
1''	20,5 CH ₃
2''	122,8 CH
3''	130,2 qC
4''	24,8 CH ₃
5''	16,8 CH ₃
1'''	20,8 CH ₂
2'''	122,7 CH
3'''	130,9 qC
4'''	24,8 CH ₃
5'''	16,8 CH ₃

Figura 4.43. Espectro RMN ¹³C de 1.

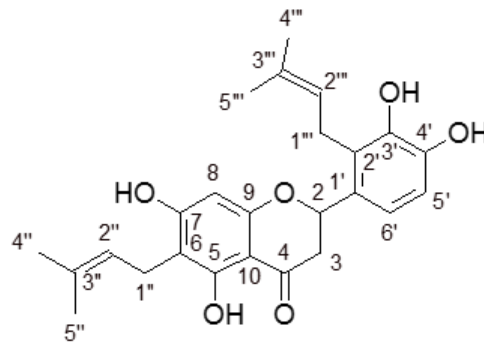
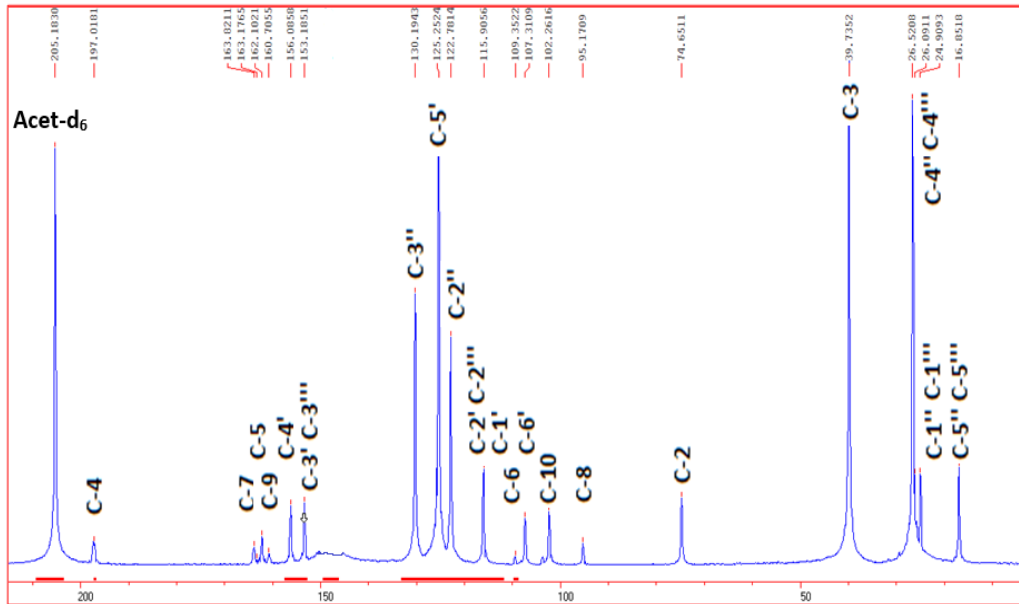
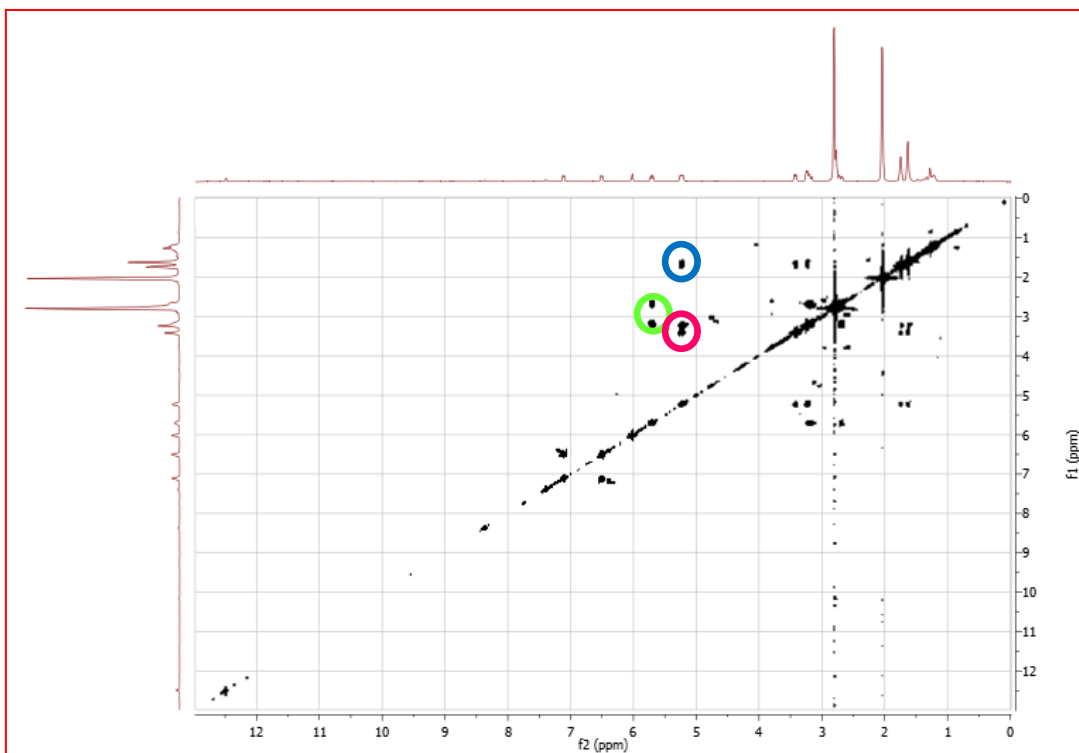


Tabla 4.27. Datos de RMN ¹³C de 1, en Acetona-d₆. TMS como estándar interno.

➤ RMN 2D

Se realizaron los experimentos de RMN 2D ultimando de esta manera, la determinación estructural de **1**: en la Figura 4.44 se muestra el espectro COSY de **1**, el que permitió observar las correlaciones que se detallan en la Tabla 4.28 y que condujeron a reafirmar la presencia de los sustituyentes prenilo ya observados en el RMN ¹H y ¹³C, como así también la presencia del núcleo flavanona.

Figura 4.44. Espectro RMN 2D COSY (H-H) del compuesto 1.

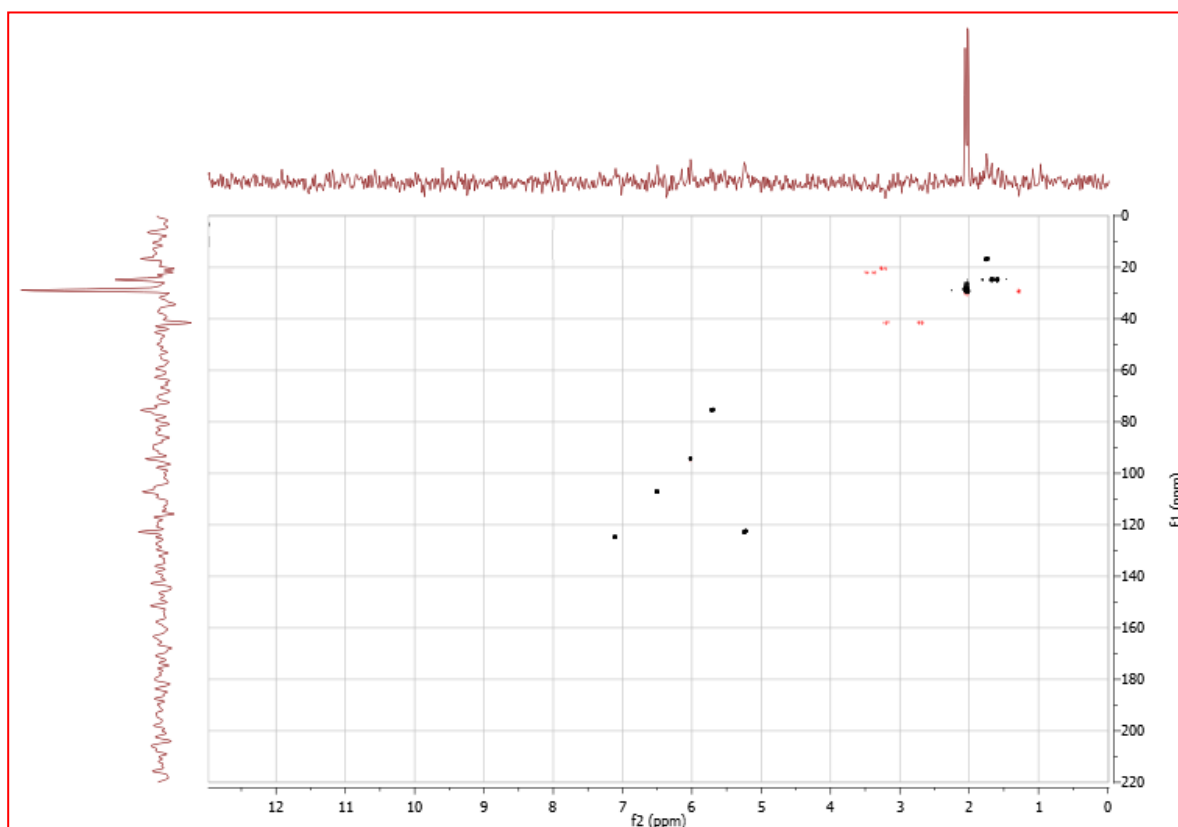


Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$	Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$
○ CH ₂ -3	2,70; 3,20	CH-2	5,71
○ CH-1''	3,24	CH-2''	5,23
○ CH-2''	5,23	CH-4'', CH-5''	1,63; 1,74
○ CH-2'''	5,23	CH-4''', CH-5'''	1,64; 1,75

Figura 4.28. Correlaciones más importantes del espectro COSY (H-H) del compuesto 1.

El espectro de HSQC del compuesto 1 se exhibe en la Figura 4.45. Las correlaciones fueron determinadas y se detallan en la Tabla 4.29.

Figura 4.45. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) del compuesto 1.



Posición	1	
	δ_H	δ_C , mult.
2	5,71	78,7 CH
3a	2,70	41,6 CH ₂
3b	3,20	41,6 CH ₂
8	6,02	94,3 CH
5'	7,11	124,7 CH
6'	6,50	107,2 CH
1''	3,24	20,5 CH ₂
2''	5,23	122,8 CH
4''	1,63	24,8 CH ₃
5''	1,74	16,8 CH ₃
1'''	3,44	20,5 CH ₂
2'''	5,23	122,7 CH
4'''	1,64	24,8 CH ₃
5'''	1,75	16,8 CH ₃

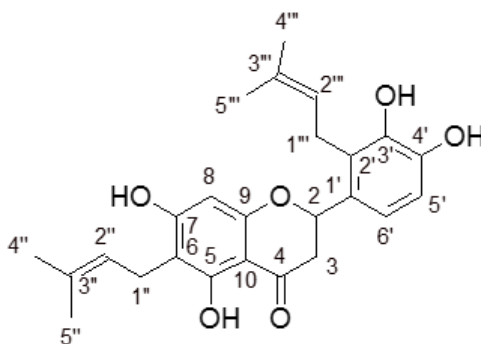
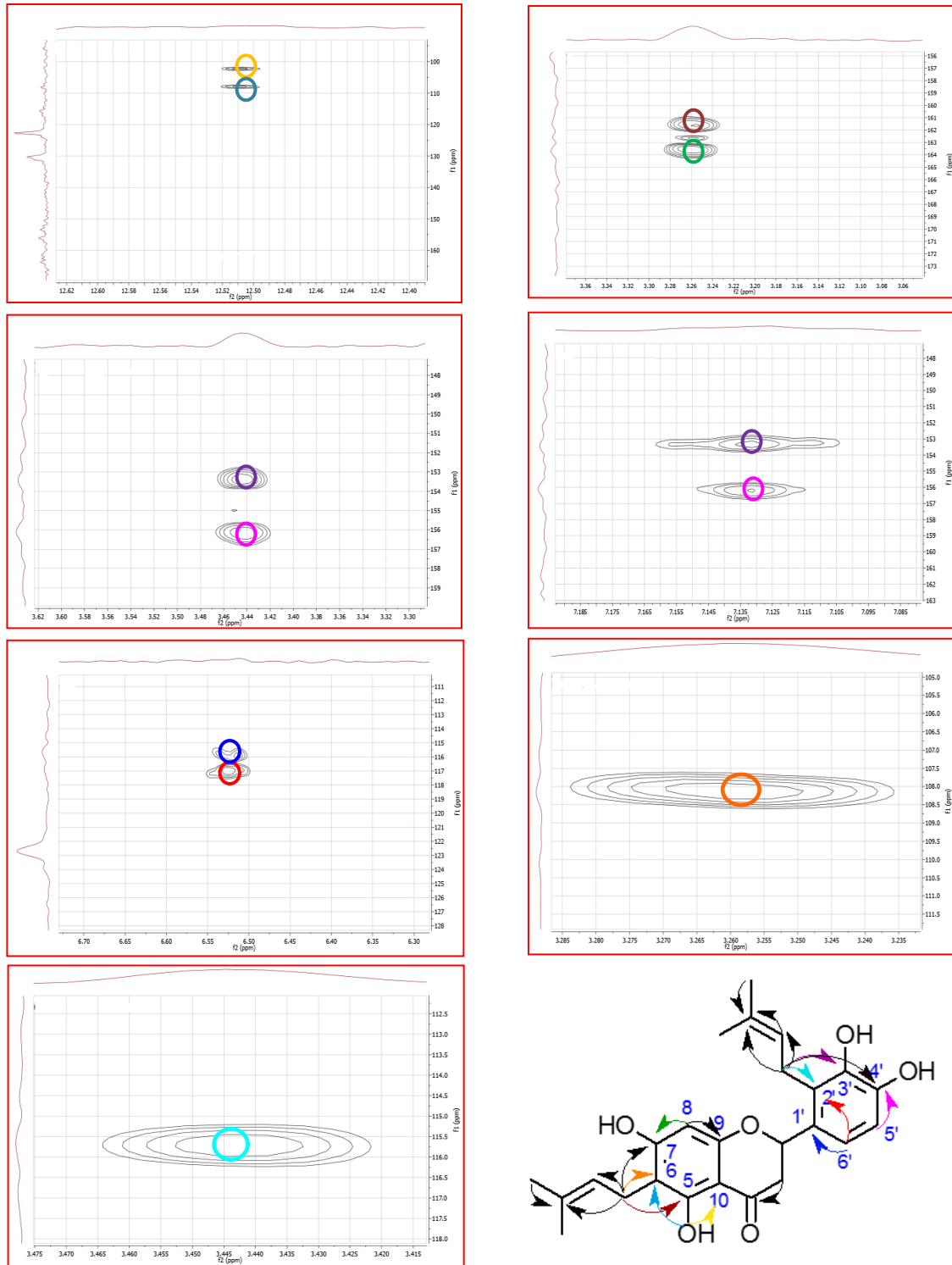


Tabla 4.29. Correlaciones en el espectro HSQC de 1.

El espectro de HMBC del compuesto **1** permitió localizar todos los grupos prenilo e hidroxilo (Figura 4.46). Las correlaciones más importantes observadas fueron: entre el protón 1'' del grupo prenilo Pr, a δ_H 3,24 con el C-5 a δ 162,6, el C-6 a δ 108,1 y el C-7 a δ 163,5, lo que nos condujo a determinar la posición de sustitución de Pr en 6 en el anillo A. El protón 1''' del grupo prenilo, a δ_H 3,44 correlaciona con el C-2' a δ 115,9, lo que permitió establecer la posición del grupo prenilo en la posición 2' del anillo B. Por otra parte, dicho protón, como así también el protón 5' a δ_H 7,11

correlacionan con el carbono C-3' a δ 153,4 y el C-4' a δ 156,2. El protón 6', por su parte, correlaciona con el C-1' a δ 117,0 y el C-2' a δ 115,9. Otras correlaciones son mostradas en la Tabla 4.30. Las flechas de coloración negra presentes en la estructura del compuesto 1, pertenecen a correlaciones no mostradas en la Figura 4.46.

Figura 4.46. Ampliaciones del espectro RMN 2D HMBC (H-C) y correlaciones más importantes del compuesto 1.



H	$\delta(\text{ppm})$	C	$\delta(\text{ppm})$
5-OH	12,48	C-6, C-10	108,1; 102,2
CH ₂ -1''	3,24	C-5, C-6, C-7, C-2'', C-3''	162,6; 108,1; 163,5; 122,7; 130,2
CH-8	6,02	C-7, C-9	122,8; 130,2
CH ₂ -1'''	3,24	C-2', C-3', C-4', C-2''', C-3'''	115,9; 153,4; 156,2; 122,7; 130,9
CH-5'	7,11	C-3', C-4'	153,4; 156,2
CH-6'	6,50	C-1', C-2'	117,0; 115,9

Tabla 4.30. Principales correlaciones en el espectro HMBC de **1**.

➤ Dicroísmo circular y rotación óptica

De acuerdo a lo indicado por Slade *et al.*, (2005), mediante el empleo de la regla del octante, es posible determinar que flavanonas con una conformación del anillo heterocíclico con helicidad-P y un C-2 ecuatorial al anillo B, exhiben un efecto cotton positivo a la longitud de onda del hombro en el espectro UV, y negativo a la longitud de onda del pico correspondiente a la transición $\pi-\pi^*$ (máximo) lo que indica una configuración de tipo S.

El efecto Cotton negativo a CD (c 0,004, MeOH) $[\theta]_{293} -0,46$, $[\theta]_{330} +0,05$ (Figura 4.47), permitió determinar la configuración absoluta del compuesto **1** en el C-2, la cual fue determinada como S, de acuerdo con los datos del espectro de DC.

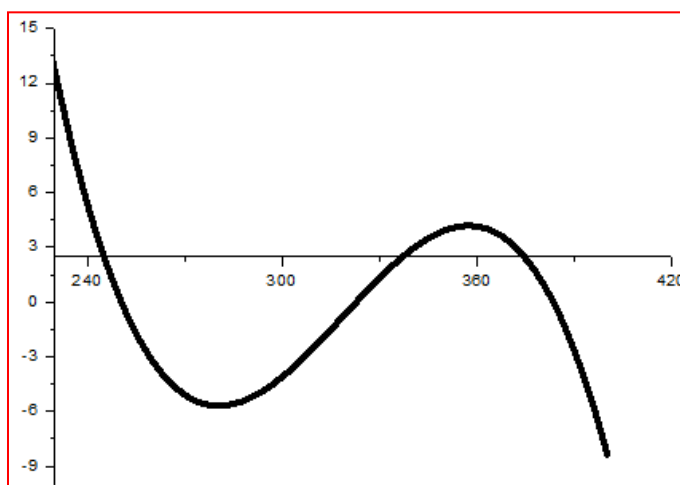
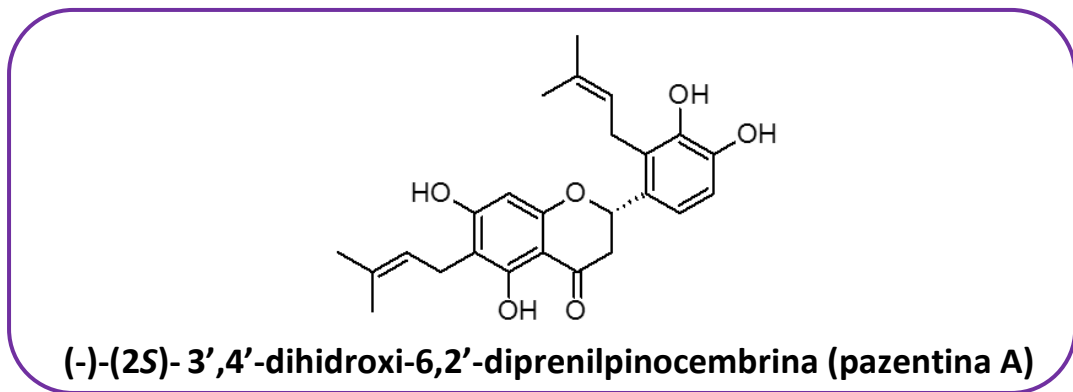


Figura 4.47. Gráfico de perfil en dicroísmo circular del compuesto **2**. $[\theta]_{293} -0,46$, $[\theta]_{330} +0,05$, (MeOH; c 0,004).

La rotación óptica observada para el compuesto **1** fue levorotatoria $[\alpha]_D^{25} -17$ (c 0,1, MeOH).

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, se identifica al compuesto **1** como:



4.3.4.2. Determinación estructural del compuesto 2

La estructura química del compuesto **2** fue determinada mediante el análisis de la evidencia espectroscópica, según se detalla a continuación.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto **2** se obtuvo en forma de sólido amorfo de color amarillo pálido. El espectro UV en MeOH de **2** mostró una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ ($\log \epsilon$) 291 (4,08), 330 (sh) (3,38) nm (Fig. 4.48), lo que indicó la presencia de un núcleo de tipo flavanona, de acuerdo a los perfiles descritos para este tipo de compuestos (Markham, 1982).

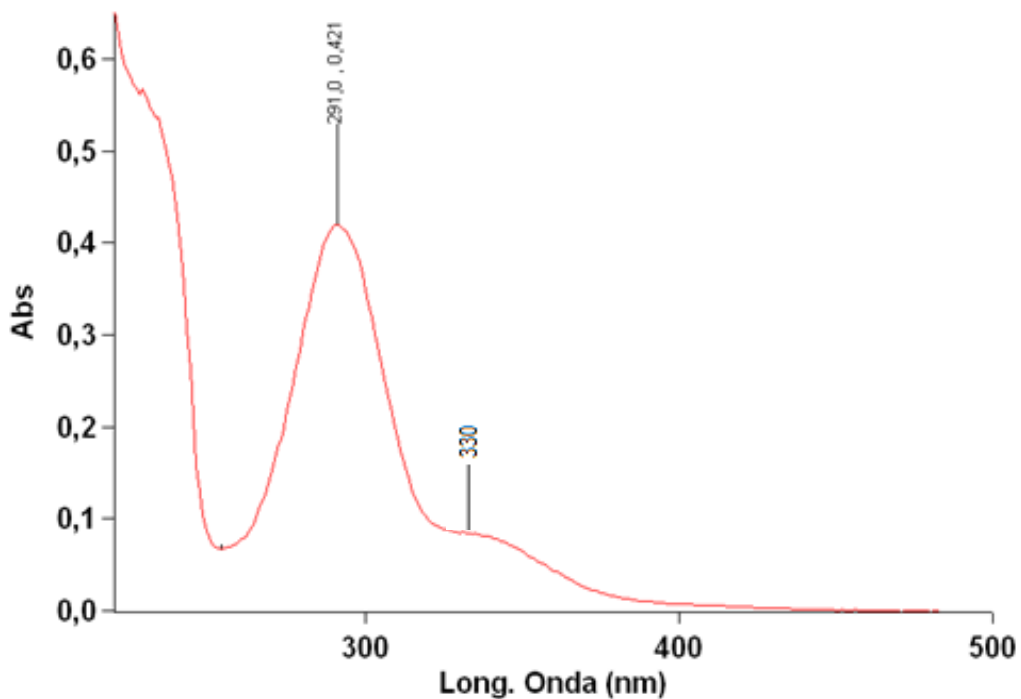


Figura 4.48. Espectro UV (MeOH) del compuesto 2.

➤ Espectroscopía Infrarroja (IR)

El compuesto **2** presentó un espectro IR (KBr) con las señales características de una flavanona, fueron observadas las correspondientes a un grupo oxhidrilo a $\nu_{\text{máx}}$ 3454 cm^{-1} , la señal perteneciente al carbonilo conjugado a $\nu_{\text{máx}}$ 1635 cm^{-1} , y las correspondientes al anillo aromático $\nu_{\text{máx}}$ 1604 y 1453 cm^{-1} . A $\nu_{\text{máx}}$ 2854 cm^{-1} se observó la señal perteneciente al grupo metoxilo.

➤ Espectrometría de masas

La fórmula molecular de **2** fue propuesta como $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6$ según su espectro de masas de alta resolución (HRMS) (Figura 4.49), donde el ión molecular de HRMS m/z 461,1944 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ responde al calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_6$, 461,1935.

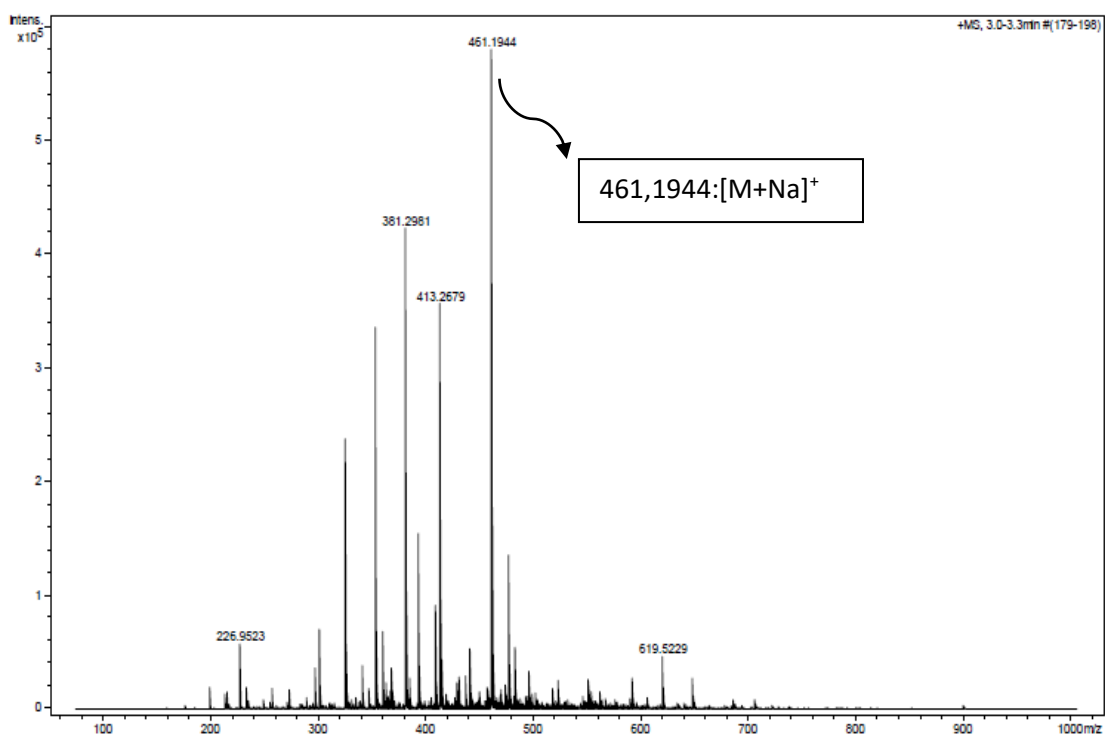


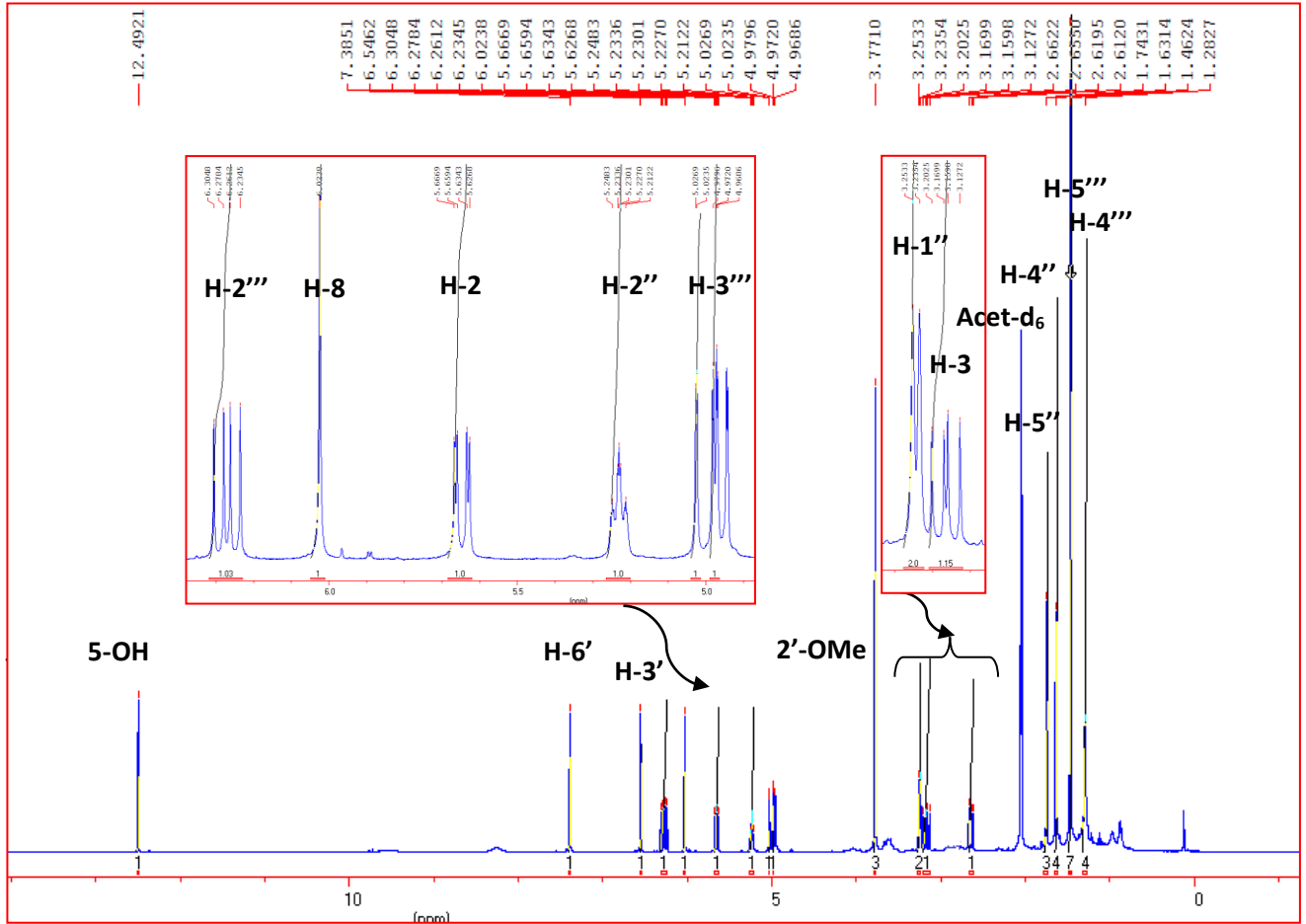
Figura 4.49. Espectro de HRMS de **2**.

➤ Espectroscopía de RMN ¹H

El espectro de RMN ^1H (Figura 4.50) presentó las señales de flavanona: [δ_{H} 5,65 (1H, dd, $J=13,0$; 3,0 Hz, H-2), 2,64 (1H, dd, $J=3,0$; 17,2 Hz, H-3ax) y 3,17 (1H, dd, $J=13,0$; 17,1 Hz, H-3eq)]. Fueron observadas dos señales a δ_{H} 7,38 (1H, d) y δ_{H} 6,54 (1H, d) pertenecientes a los protones aromáticos del anillo B que indican que dicho anillo presenta sustituyentes (Figura 4.50). El espectro de RMN ^1H además, mostró señales de protones pertenecientes a un grupo prenilo δ_{H} 3,24 (2H, d), δ_{H} 5,2 (2H, t), δ_{H} 1,63 (3H, s), δ_{H} 1,74 (3H, s); a un grupo dimetilalil δ_{H} 6,27 (1H, s), δ_{H} 5,0 (1H, d), δ_{H} 4,96 (1H, d), δ_{H} 1,28 (3H, s), δ_{H} 1,46 (3H, s) y a un grupo metoxi δ_{H}

3,77 (3H, s) . Una señal a δ_H 12,49 (1H, s) demostró la presencia de un grupo OH en posición 5 del anillo A.

Figura 4.50. Espectro RMN 1H de 2.



Posición	δ_H mult. (J en Hz)
2	5,65 dd (13,0; 3,0)
3a	2,64 dd (17,2; 3,0)
3b	3,17 dd (17,2; 13,0)
8	6,02 s
3'	6,54 s
6'	7,38 s
1''	3,24 d (7,2)
2''	5,2 t (7,2)
4''	1,63 s
5''	1,74 s
2'''	6,27 dd (17,6; 10,7)
3'''	5,0 <i>cis</i> d (17,6)
3'''	4,96 <i>trans</i> d (10,7)
4'''	1,28s
5'''	1,46 s
5-OH	12,49 s
2'-OMe	3,77 s

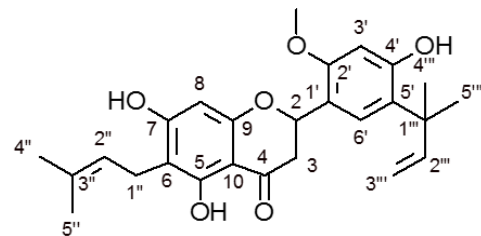


Tabla 4.31. Datos de RMN 1H de 2, en Acetona- d_6 . TMS como estándar interno.

➤ Espectroscopía de RMN ^{13}C

A continuación se muestra el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 4.51), el cual reveló las señales correspondientes a los diecisiete átomos de C. Si bien en el espectro se indican las posiciones de cada carbono, y en la tabla su multiplicidad, estos datos fueron obtenidos en forma fehaciente luego del análisis de RMN 2D del mismo.

Posición	δ_{C} subst.
2	74,4 CH
3a	42,0 CH ₂
3b	42,0 CH ₂
4	197,0 qC
5	161,5 qC
6	108,0 qC
7	163,8 qC
8	94,4 CH
9	161,6 qC
10	102,2 qC
1'	117,3 qC
2'	156,0 qC
3'	100,2 CH
4'	156,6 qC
5'	125,8 qC
6'	126,1 CH
1''	20,7 CH ₂
2''	122,8 CH
3''	130,3 qC
4''	25,0 CH ₃
5''	16,9 CH ₃
1'''	36,9 qC
2'''	147,9 CH
3'''	109,7 CH ₂
4'''	26,6 CH ₃
5'''	26,5 CH ₃
2'-OMe	55,0 CH ₃

Figura 4.51. Espectro RMN ^{13}C de **2**.

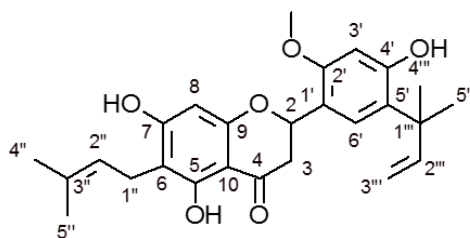
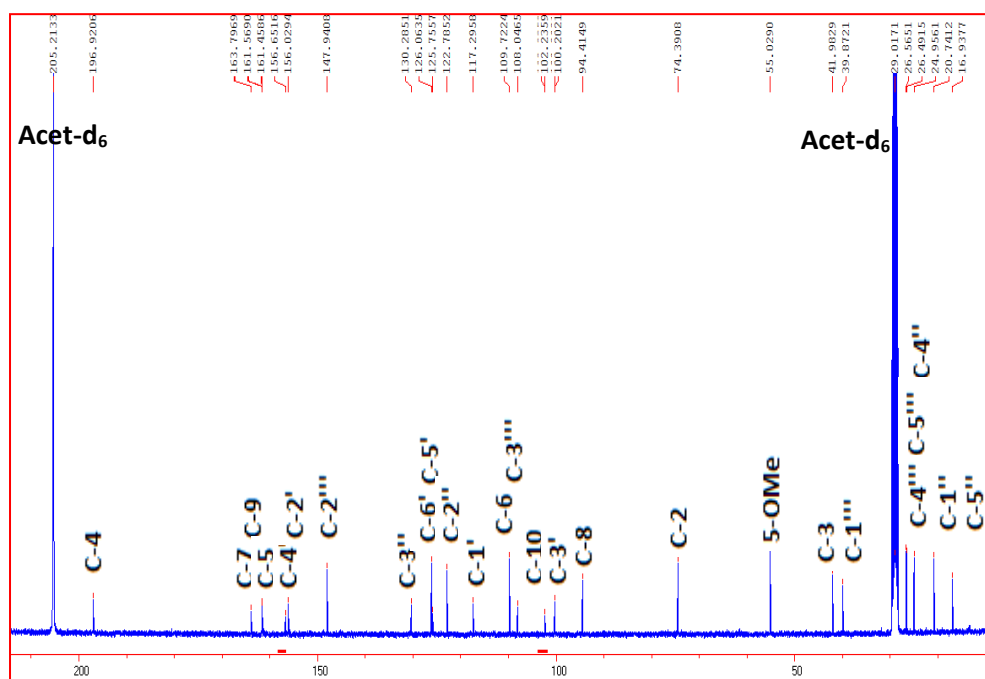
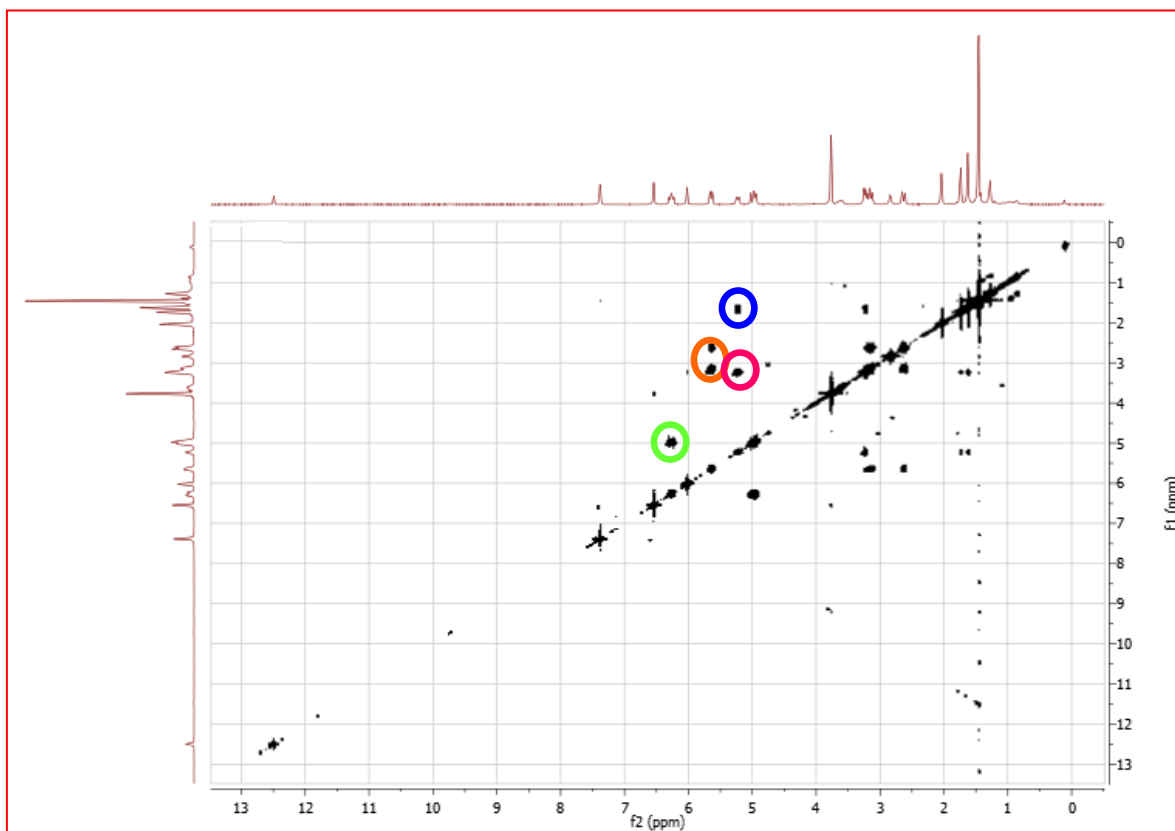


Tabla 4.32. Datos de RMN ^{13}C de **2**, en Acetona- d_6 . TMS como estándar interno.

➤ RMN 2D

Para completar la Determinación estructural de **2**, se realizaron los experimentos de RMN 2D: el espectro COSY de **2** se presenta en la Figura 4.52 y permitió observar las correlaciones que se detallan en la Tabla 4.33 y que condujeron a ratificar la presencia del núcleo flavanona y de un sustituyente prenilo.

Figura 4.52. Espectro RMN 2D COSY (H-H) del compuesto 2.

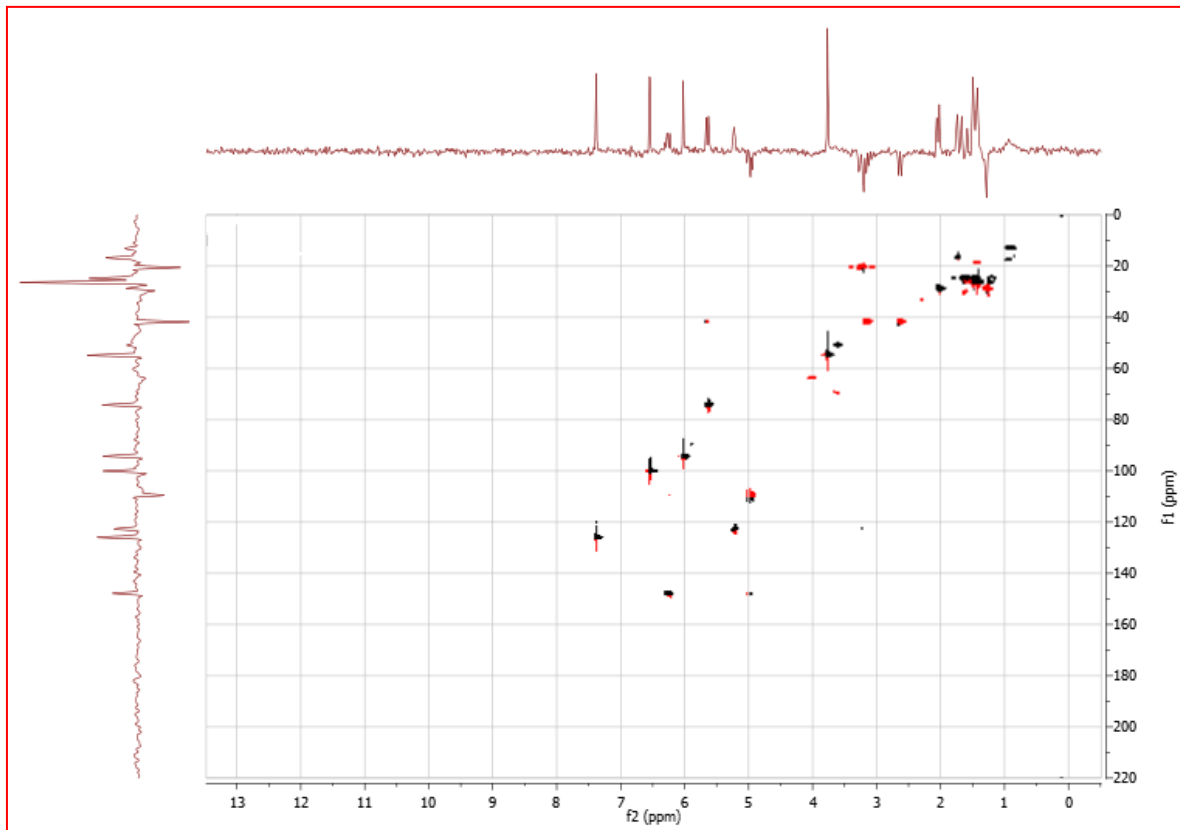


Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$	Señal ^1H	$\delta(\text{ppm})$
○ CH-2	5,65	CH ₂ -3	2,64; 3,17
○ CH-1''	3,24	CH-2''	5,20
○ CH-2''	5,20	CH-4'', CH-5''	1,63; 1,74
○ CH-2'''	6,27	CH-3'''	5,0; 4,96

Tabla 4.33. Correlaciones más importantes del espectro COSY (H-H) del compuesto 2.

La Figura 4.53 exhibe el espectro de HSQC del compuesto 2. Las correlaciones fueron determinadas y se detallan en la Tabla 4.34.

Figura 4.53. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) del compuesto 2.



Posición	2	
	δ_H	δ_C , mult.
2	5,65	74,4 CH
3a	2,64	42,0 CH ₂
3b	3,17	42,0 CH ₂
8	6,02	94,4 CH
3'	6,54	100,2 CH
6'	7,38	126,1 CH
1''	3,24	20,7 CH ₂
2''	5,20	122,8 CH
4''	1,63	25,0 CH ₃
5''	1,74	16,9 CH ₃
2'''	6,27	147,9 CH
3'''	5,00 4,96	109,7 CH ₂
4'''	1,28	26,6 CH ₃
5'''	1,46	26,5 CH ₃
2'-OMe	3,77	55,0 CH ₃

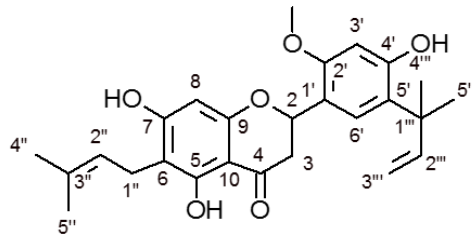
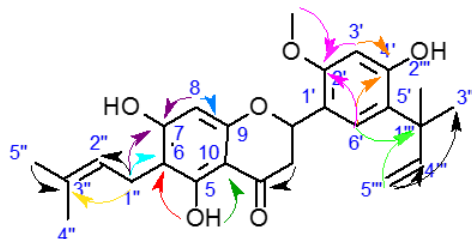
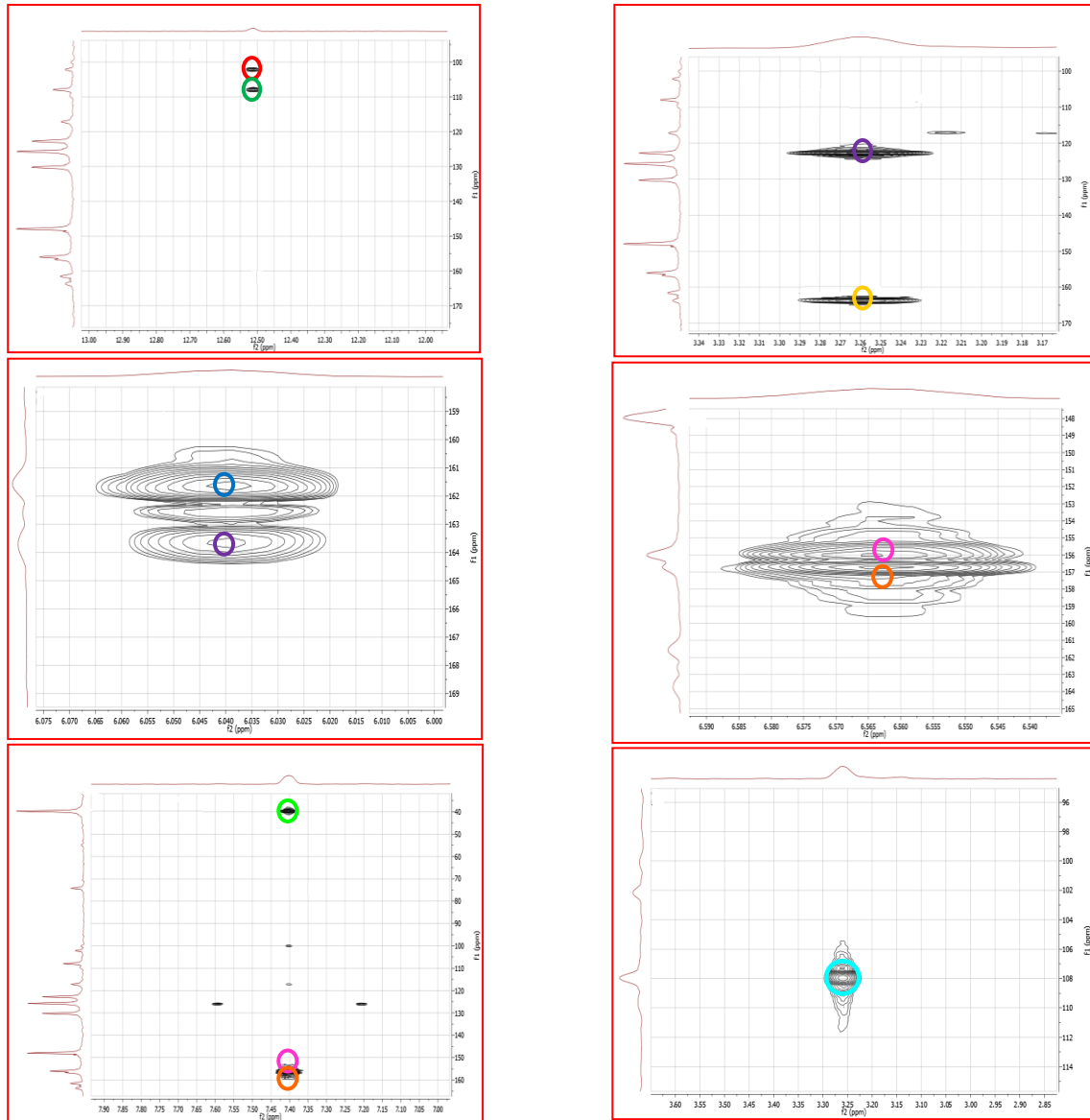


Tabla 4.34. Correlaciones en el espectro HSQC de 2.

Para el compuesto 2, el espectro de HMBC se presenta en la Figura 4.54 y permitió localizar las posiciones de los grupos prenilo, dimetialil, metoxi e hidroxi. Las correlaciones más importantes observadas fueron: entre el protón del grupo hidroxi a δ 12,49 con el C-10 δ 102,2 y el C-6 δ 108,0. Por otra parte el H-1'' del grupo prenilo

ubicado en posición 6 del anillo A, a δ 3,24, correlaciona con el C-6 a δ 108,0 y C-7 a δ 163,8. En cuanto al anillo B, el H-3' δ 6,54 y el H-6' δ 7,38, correlacionan con el C-2' a δ 156,0 y el C-4' a δ 156,6, a su vez el H-6' correlaciona con el C-1''' δ 39,9 perteneciente al grupo dimetilalil, ubicado en posición 5'. En la tabla 4.35 se muestran otras correlaciones relevantes para dicho compuesto. Las flechas de color negro en la estructura del compuesto **2** muestran correlaciones no mostradas en la Figura 4.54.

Figura 4.54. Zonas ampliadas del espectro RMN 2D HMBC (H-C) y correlaciones más importantes del compuesto **2**.

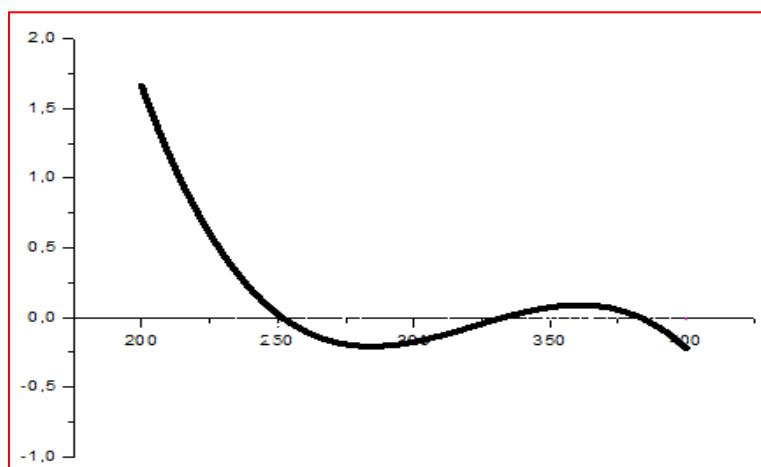


H	$\delta(\text{ppm})$	C	$\delta(\text{ppm})$
5-OH	12,49	C-6, C-10	108,0; 102,2
CH ₂ -1''	3,24	C-7, C-2'', C-3''	163,8; 122,8; 130,3
MeO-2'	3,77	C-2'	156,0
CH-3'	6,54	C-2', C-4'	156,0; 156,6
CH-6'	7,38	C-2', C-4', C-1'''	156,0; 156,6; 39,9
CH ₂ -3'''	5,00 4,96	C-1''', C-2''', C-5'''	39,9; 147,9; 16,9

Tabla 4.35. Correlaciones en el espectro HMBC de 2.

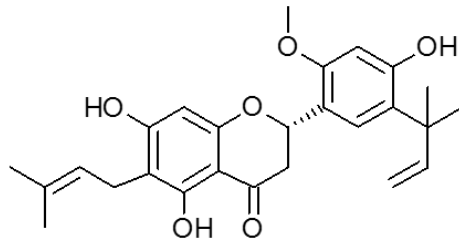
➤ Dicroísmo circular y rotación óptica

La configuración absoluta del compuesto **2** en el C-2, fue determinada como *S* (Slade *et al.*, 2005), de acuerdo a la regla del octante y con los datos del espectro de DC, el cuál presentó un efecto Cotton negativo a c 0,002, MeOH) $[\theta]_{293}$ -0,18, $[\theta]_{330}$ +0,03 (Fig. 4.55).

Figura 4.55. Dicroísmo circular compuesto 2. $[\theta]_{293}$ -0,18; $[\theta]_{330}$ +0,03, (MeOH; c 0,002).

El compuesto **2** presentó una rotación óptica levorrotatoria, $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -23,2 (c 0,095, MeOH).

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, se identifica al compuesto **2** como:



(2S)-(-)- 4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1'',1''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (pazentina B)

4.3.4.3. Determinación estructural del compuesto 3

A continuación se informan los datos espectroscópicos que permitieron elucidar la estructura química del compuesto **3**.

➤ Espectrofotometría UV

El compuesto **3** se obtuvo en forma de cristales blancos. El espectro UV de **3** en MeOH mostró una absorción máxima a $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 290 (4,72); 330 (sh) (4,04) nm, coincidentes con un núcleo del tipo flavanona.

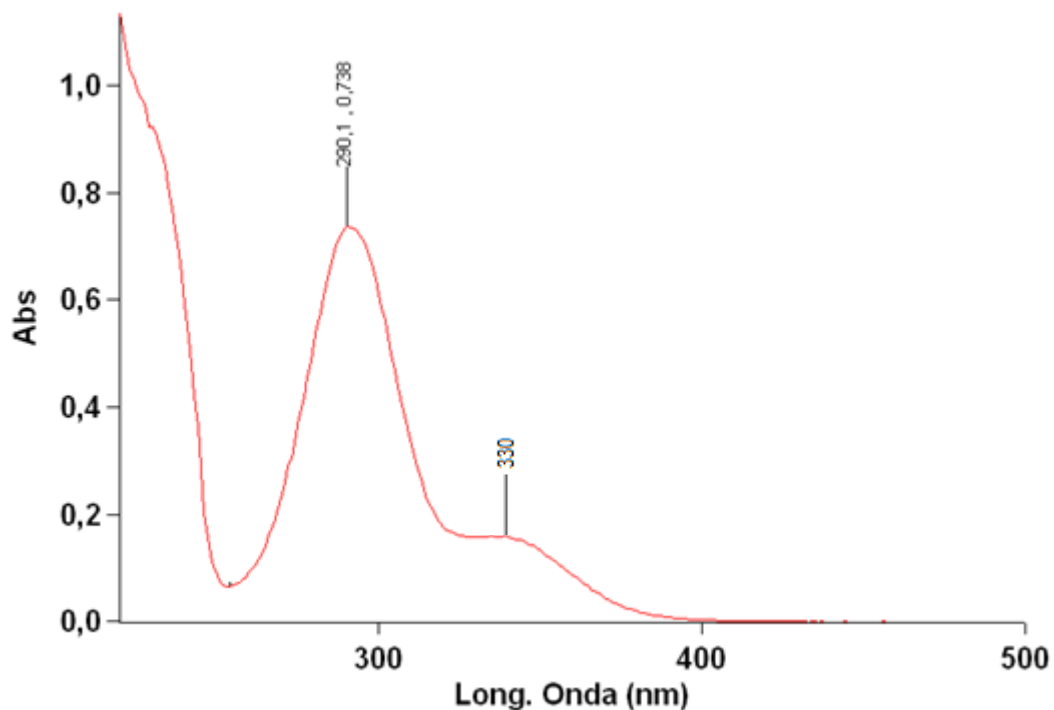


Figura 4.56. Espectro UV (MeOH) del compuesto **3**.

➤ Espectrometría de masas

$C_{25}H_{27}O_6$ fue la fórmula molecular propuesta para el compuesto **3** y fue determinada según su espectro de masas de alta resolución (HRMS) (Figura 4.57) donde su ión molecular de HRMS m/z 461,1922 $[M+Na]^+$ responde al calculado como $C_{26}H_{30}O_6$, 461,1935.

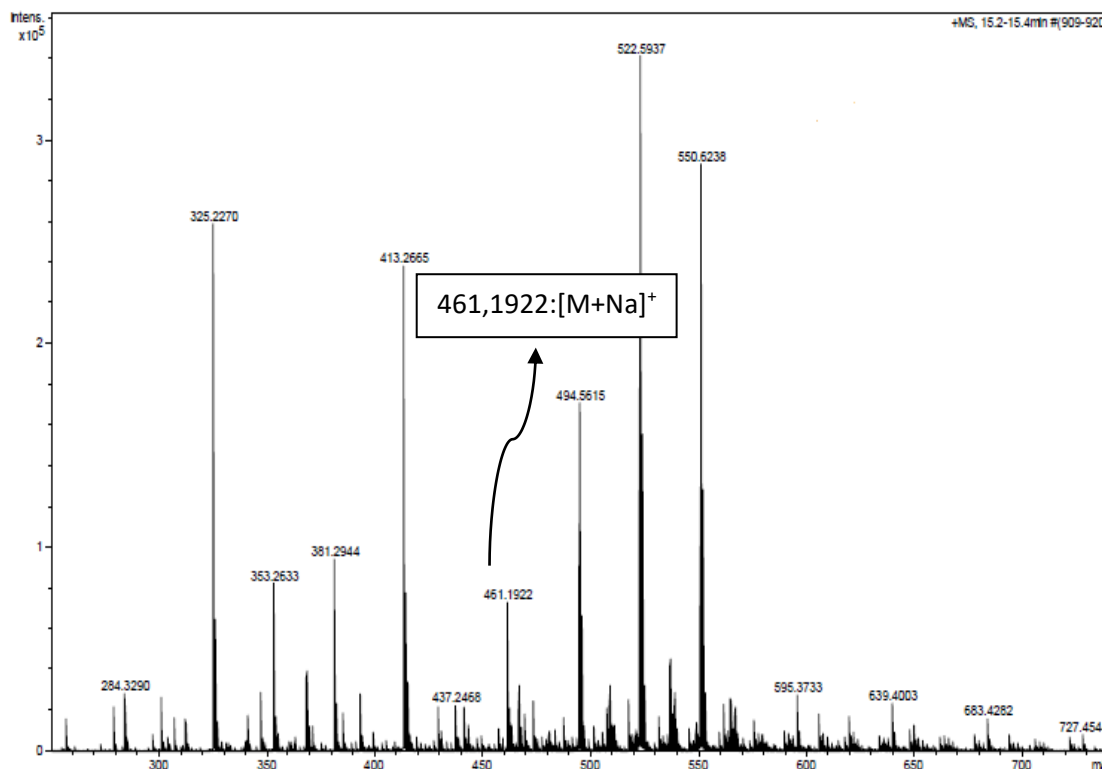
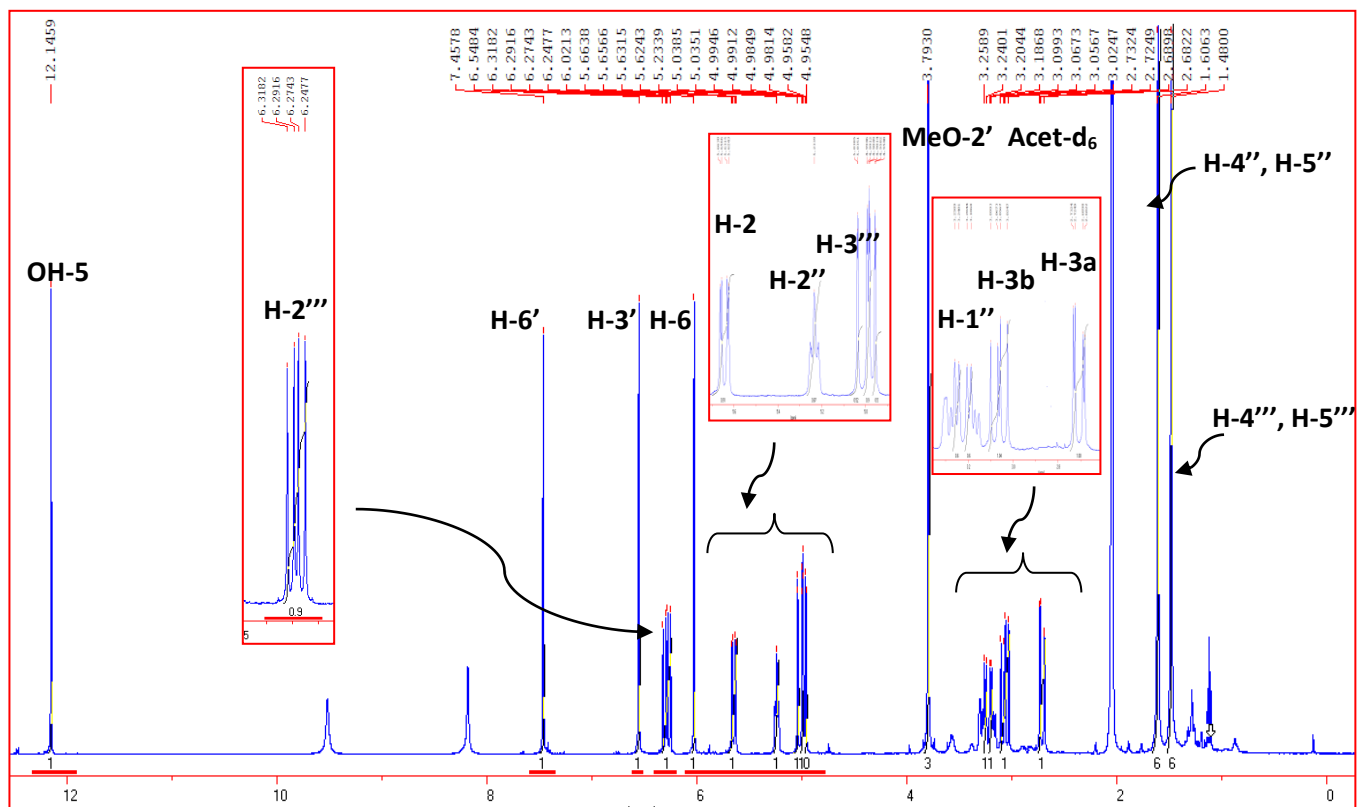


Figura 4.57. Espectro de HRMS de **3**.

➤ Espectroscopía de RMN 1H

Los datos de RMN de 1H (400 MHz, Acetona- d_6) de **3** se muestran en la Tabla 4.36. El espectro de RMN 1H (Figura 4.58) presentó las señales características de una flavanona: [δ_H 5,64 (1H, dd, $J=12,9$; 2,9 Hz, H-2), 2,71 (1H, dd, $J=3,0$; 17,1 Hz, H-3ax) y 3,06 (1H, dd, $J=12,8$; 17,1 Hz, H-3eq)]. La presencia de dos dobletes a δ_H 7,46 (1H, d) y δ_H 6,55 (1H, d), dieron indicios de que el anillo B se encontraba sustituido. (Figura 4.53). Se observaron además, señales de protones pertenecientes a un grupo prenilo δ_H 3,22 (2H, d), δ_H 5,23 (2H, d), δ_H 1,61 (6H, s) y a un grupo dimetilalil a δ_H 6,28 (1H, dd), δ_H 5,04 (1H, d), δ_H 4,96 (1H, d), δ_H 1,48 (2H, s). El RMN también demostró la presencia de un grupo OH en posición 5 del anillo a δ_H 12,15 (1H, s) y la de un grupo metoxi a δ_H 3,79 (3H, s).

Figura 4.58. Espectro RMN ^1H de 3.



Posición	δ_{H} mult. (J en Hz)
2	5,64 dd (2,9; 12,9)
3a	2,71 dd (3,0; 17,1)
3b	3,06 dd (12,8;17,1)
6	6,02 s
3'	6,55 s
6'	7,46 s
1''	3,22 d (7,5)
2''	5,23 d (7,5)
4''	1,61 s
5''	1,61 s
2'''	6,28 dd (17,6; 10,7)
3'''	5,04 <i>cis</i> d (17,6)
3'''	4,96 <i>trans</i> d (10,7)
4'''	1,48s
5'''	1,48 s
5-OH	12,15 s
2'-OMe	3,79 s

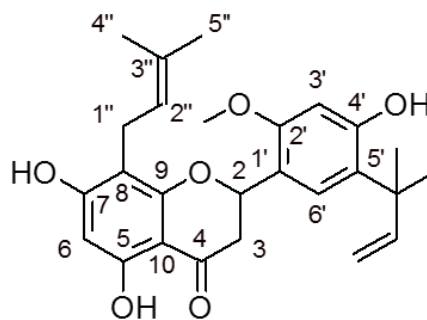


Tabla 4.36. Datos de RMN ^1H de 3, en Acetona- d_6 . TMS como estándar interno.

➤ **Espectroscopía de RMN ¹³C**

El espectro de RMN de ¹³C (Figura 4.59) reveló las señales correspondientes a los veintiseis átomos de C del compuesto **3**. Junto a éste se detallan las multiplicidades y posiciones de cada carbono, información obtenida tras el análisis en RMN 2D, que se incluyen aquí, para mostrar un espectro de carbono más detallado.

Figura 4.59. Espectro RMN ¹³C de **3**.

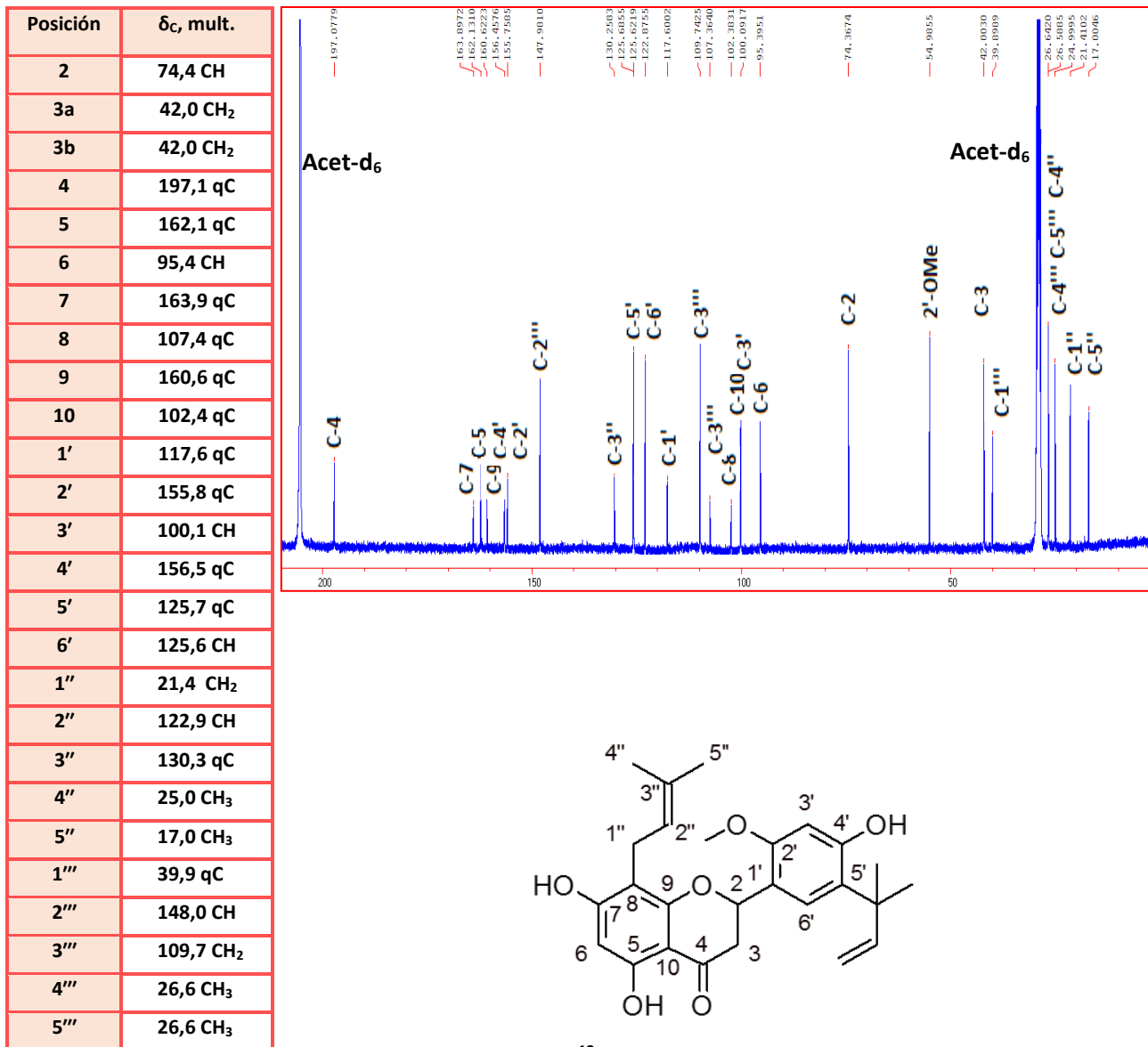
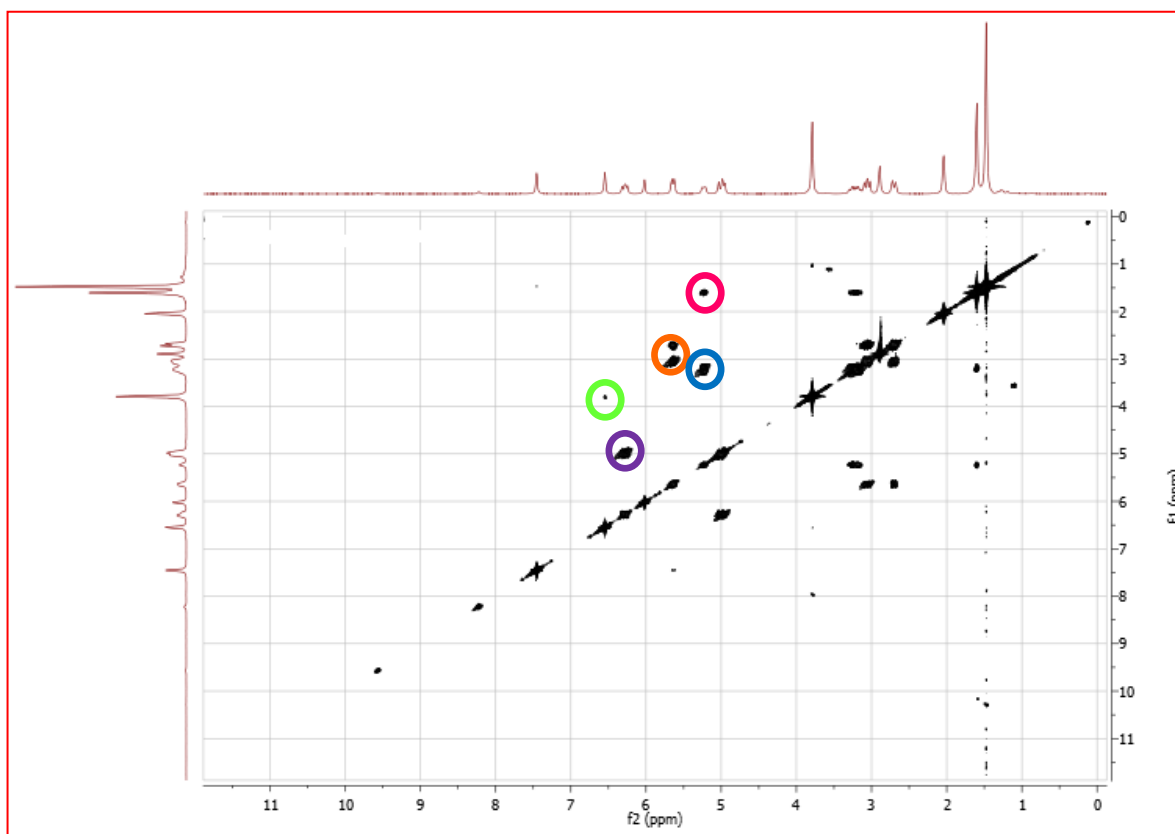


Tabla 4.37. Datos de RMN ¹³C de **3**, en Acetona-d₆. TMS como estándar interno.

➤ **RMN 2D**

El espectro COSY de **3** condujo a corroborar la presencia de los sustituyentes prenilo, dimetilalil y metoxi, como así también la del núcleo flavanona (Figura 4.60), y las correlaciones se detallan en la Tabla 4.38.

Figura 4.60. Espectro RMN 2D COSY (H-H) del compuesto 3.

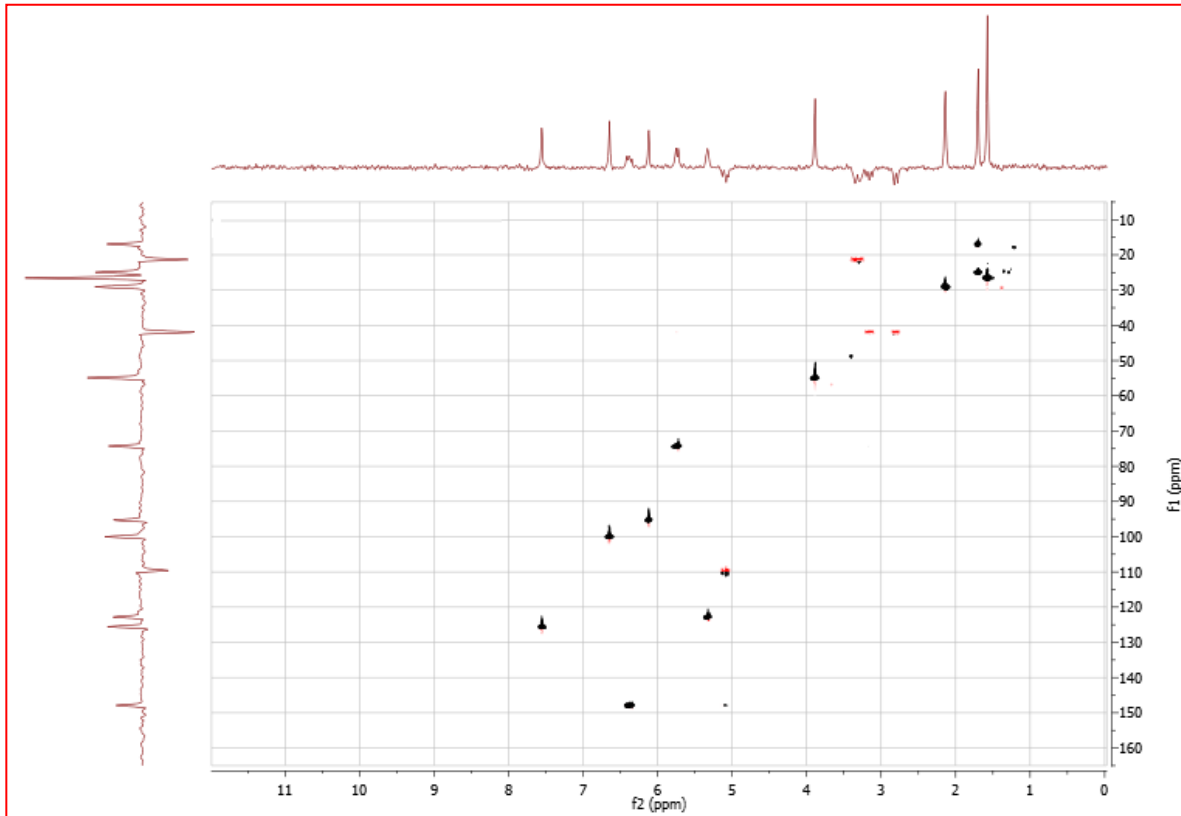


Señal ¹ H	δ(ppm)	Señal ¹ H	δ(ppm)
○ CH-2	5,64	CH ₂ -3	2,71; 3,06
○ CH-1''	3,22	CH-2''	5,23
○ CH-2''	5,23	CH-4'', CH-5''	1,61
○ CH-2'''	6,28	CH-3'''	5,0; 4,96
○ MeO-2'	3,79	CH-3'	6,55

Tabla 4.38. Principales correlaciones del espectro COSY (H-H) del compuesto 3.

La Figura 4.61 exhibe el espectro de HSQC del compuesto 3. Las correlaciones fueron determinadas y se detallan en la Tabla 4.38.

Figura 4.61. Correlaciones del espectro HSQC (H-C) del compuesto 3.



Posición	3	
	δ_H	δ_C , mult.
2	5,64	74,4 CH
3a	2,71	42,0 CH ₂
3b	3,06	42,0 CH ₂
6	6,02	95,4 CH
3'	6,55	100,1 CH
6'	7,46	125,6 CH
1''	3,22	21,4 CH ₂
2''	5,23	122,9 CH
4''	1,61	25,0 CH ₃
5''	1,61	17,0 CH ₃
2'''	6,28	148,0 CH
3'''	5,04 4,96	109,7 CH ₂
4'''	1,48	26,6 CH ₃
5'''	1,48	26,6 CH ₃
2'-OMe	3,79	55,0 CH ₃

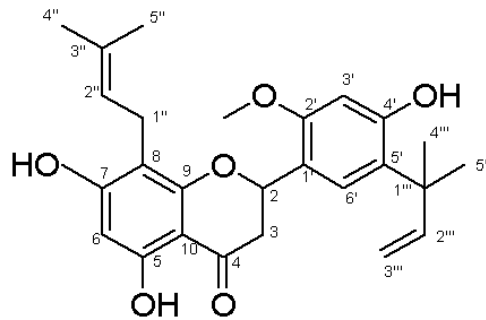
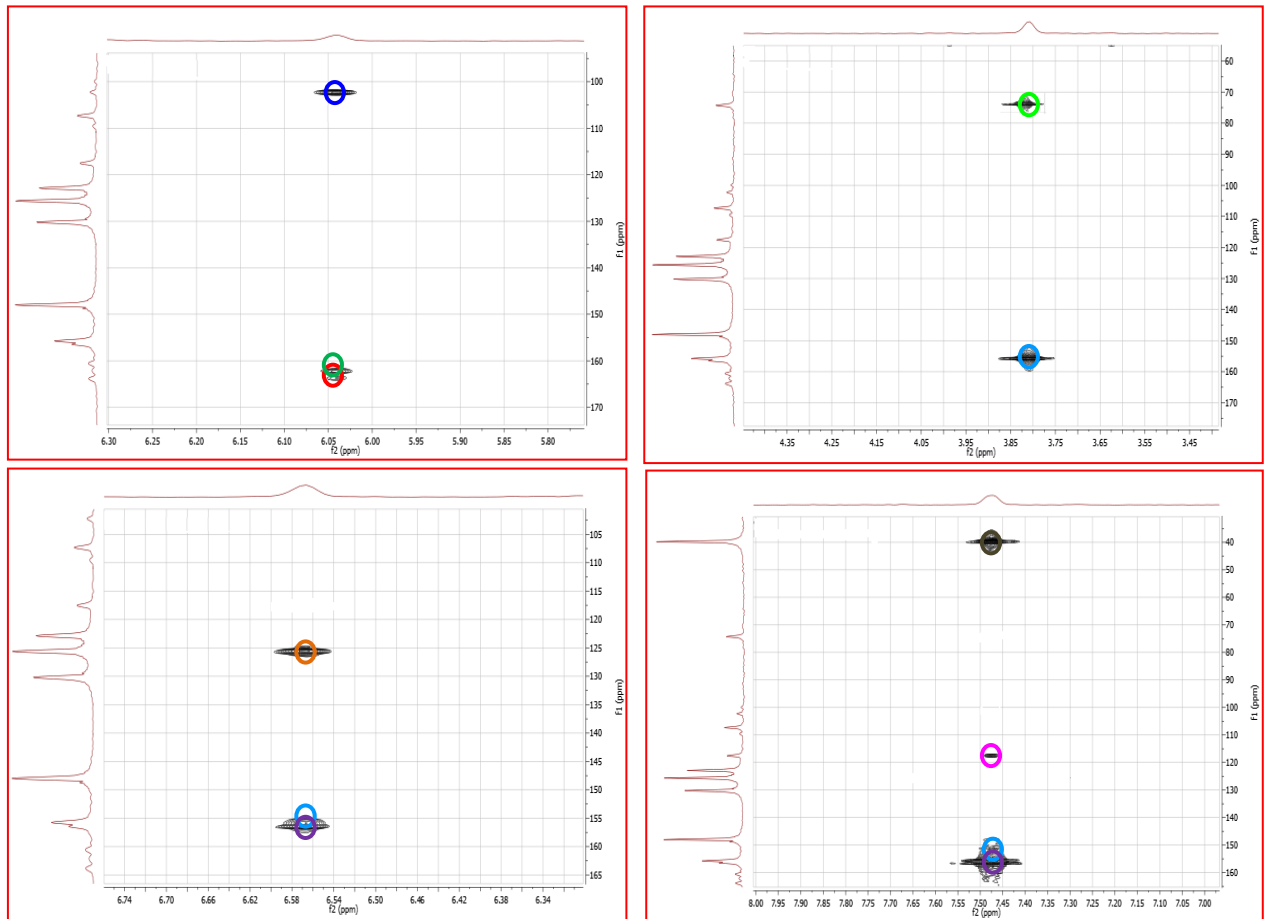


Tabla 4.39. Correlaciones en el espectro HSQC de 3.

Para el compuesto **3**, el espectro de HMBC se presenta en la Figura 4.62 y permitió ubicar los grupos prenilo, dimetialil, metoxi e hidroxilo. Las correlaciones más importantes observadas fueron: entre el protón a δ_H 6,02 con el C-5, C-7 y C-10 a δ 162,1, 163,9 y 102,4, respectivamente, lo que nos indicó que la posición 6 del anillo A no se encontraba sustituida, y que, por lo tanto, el grupo prenilo se encontraba en la

posición 8. Por otra parte el protón 1'' del grupo prenilo Pr a δ_H 3,22, correlaciona con el C-7 a δ 163,9, C-2'' a δ 122,9 y C-3'' a δ 130,3, lo que nos confirmó la presencia del Pr en posición 8. En cuanto al anillo B, el H-3' δ_H 6,55 correlaciona con el C-2' a δ 155,8 y el C-4' a δ 156,5, a su vez el H-6' correlaciona con el C-1', C-2', C-4' y C-1''' a δ 117,6, 155,8, 156,5 y 39,9 respectivamente, este último perteneciente al grupo dimetilalil, ubicado en posición 5'. Otras correlaciones observadas se encuentran en la Tabla 4.40.

Figura 4.62. Espectro RMN 2D HMBC (H-C) y correlaciones más importantes del compuesto 3.



H	δ (ppm)	C	δ (ppm)
CH-6	6,02	C-5, C-7,C-10	162,1; 163,9; 102,4
MeO-2'	3,79	C-2', C-2	155,8; 74,4
CH-3'	6,55	C-2', C-4', C-5'	155,8; 156,5; 125,7
CH-6'	7,46	C-1',C-2', C-4', C-1'''	117,6; 155,8; 156,5; 39,9
CH ₂ -1''	3,22	C-7, C-2'', C-3''	163,9; 122,9; 130,3
CH ₂ -3'''	5,04 4,96	C-1''', C-2''', C-5'''	39,9; 148,0; 26,6

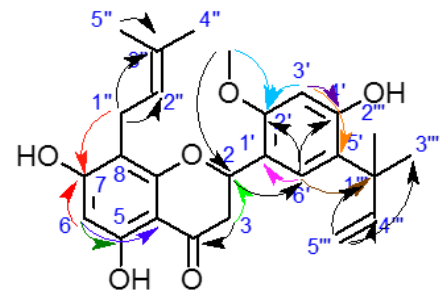


Tabla 4.40. Correlaciones más relevantes en el espectro HMBC de 3.

➤ **Dicroísmo circular**

La configuración absoluta del compuesto **3** en el C-2, fue determinada como S (Slade *et al.*, 2005), de acuerdo con los datos del espectro de DC, el cuál presentó un efecto Cotton negativo a $(c\ 0,002, \text{MeOH})$ $[\theta]_{290} -0,09$ $[\theta]_{330} +0,005$.(Figura 4.63).

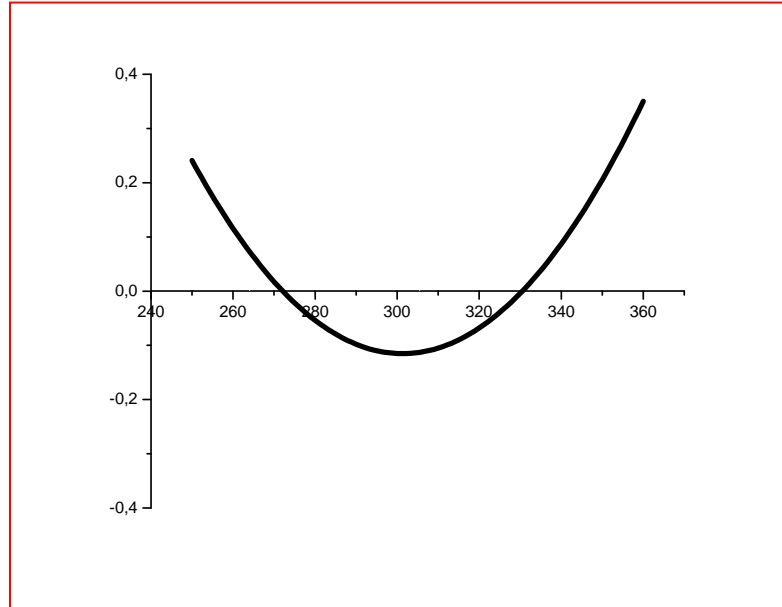
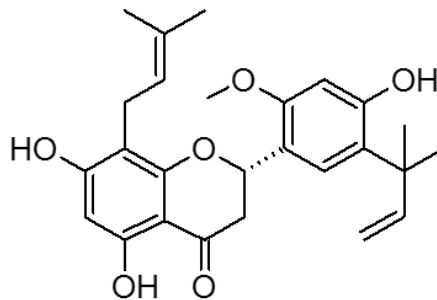


Figura 4.63. Dicroísmo circular compuesto **3**. $[\theta]_{290} -0,09$ $[\theta]_{330} +0,005$ (MeOH; c 0,002).

De acuerdo a los datos expuestos anteriormente, y a lo indicado por Nanayakkara, *et al.* 2002, se identifica al compuesto **3** como:



**(-)-(2S)- 4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1'',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina
(Me8PP)**

4.3.4.4. Determinación estructural del compuesto 4

Los datos espectroscópicos y espectrofotométricos del compuesto **4** fueron coincidentes a los del compuesto **8PP** previamente aislado de *D. elegans* por Peralta *et al.*, 2014 (Págs. 35-38).

De esta manera los compuestos aislados de la especie *D. pazensis* fueron:

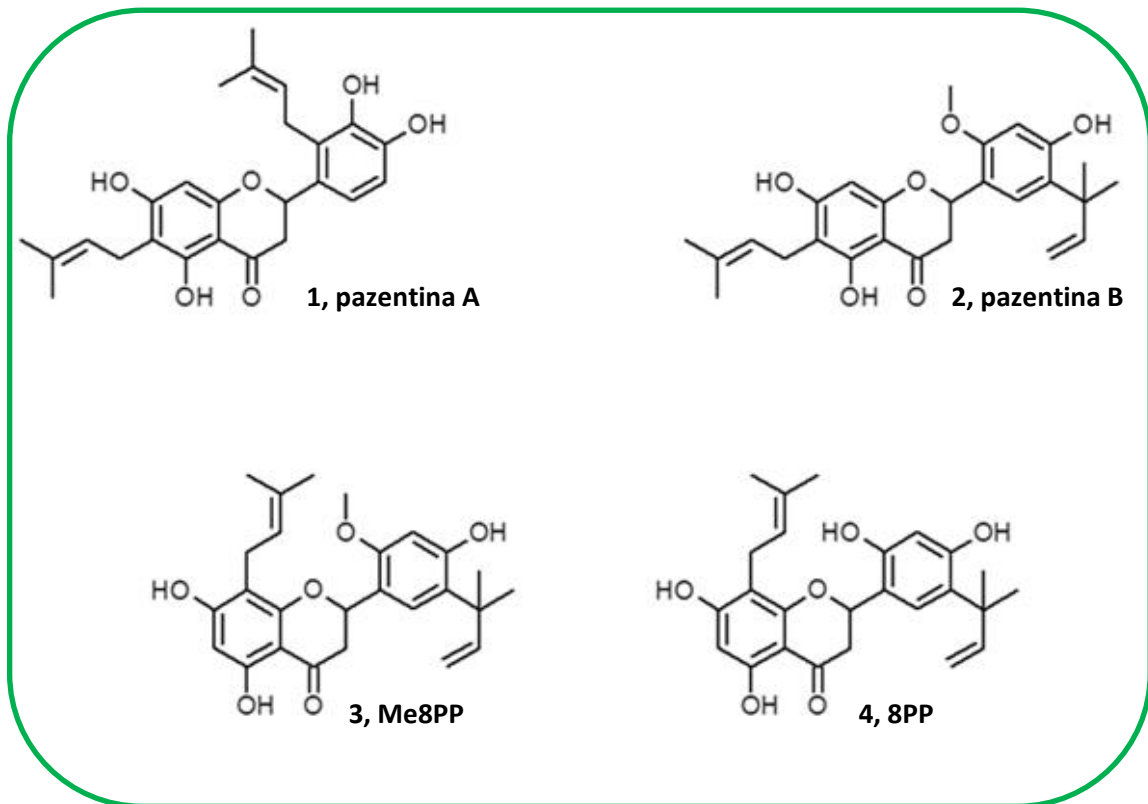


Figura 4.64. Estructuras químicas de los flavonoides obtenidas a partir de raíces de *D. pazensis*.

4.4. Conclusiones

De acuerdo a los objetivos específicos planteados, se profundizó en el estudio de la especie autóctona argentina *D. elegans*, obteniendo a partir de sus raíces, un compuesto ya informado en nuestro grupo de investigación para esta especie: (-)-(2*S*)-2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**8PP**). El trabajo con las partes aéreas por su parte, condujo al aislamiento e identificación de tres flavonoides no informados previamente para esta especie: (-)-(2*S*)-6,8-dimetilpinocembrina (**demetoximateucinol**), (-)-(2*S*)-7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona (**comptonina**), y una chalcona 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-3'-metilchalcona (**triangularina**); como así también una flavanona prenilada ya informada por nuestro grupo: (-)-(2*S*)-8-prenilpinocembrina (**8P**). Estos resultados aportan ampliamente al conocimiento de los constituyentes flavonoideos en *Dalea*, siendo las dos flavanonas metoxiladas y la chalcona informados por primera vez en la familia de flavonoides pertenecientes a este género.

Otro de los objetivos era el de iniciar el estudio fitoquímico en la especie *Dalea pazensis*. De esta manera, se obtuvieron y elucidaron las estructuras de cuatro

flavanonas preniladas, dos informadas por primera vez en la naturaleza como resultado de esta tesis doctoral: (-)-(2S)-3',4'-dihidroxi-6,2'-diprenilpinocembrina (**pazentina A**), (-)-(2S)-4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1''',1''''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (**pazentina B**); las otras dos, ya informadas para el género *Dalea*: (-)-(2S)-4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1''',1''''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**Me8PP**) y (-)-(2S)-2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1''''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**8PP**).

De los 9 flavonoides obtenidos en las especies de *Dalea* estudiadas, prima la presencia de flavanonas preniladas. Este tipo de metabolitos, no comunes en la naturaleza, ya habían sido informados para otras especies del género, con distintos hábitats Americanos. De este modo, se considera pertinente reafirmar la teoría presentada por Peralta en su Tesis Doctoral (2011) quien plantea que su presencia permitiría proponer a estos flavonoides como marcadores quimiotaxonómicos del género. Sin embargo, la profundización en el estudio químico de otras especies de *Dalea* no estudiadas, que habiten diferentes regiones de América, colaborarían para poder avalar dicha hipótesis.

**CAPÍTULO 5: ACTIVIDAD
BIOLÓGICA DE FLAVONOIDES
AISLADOS SOBRE LA
MELANOGÉNESIS**



En el Capítulo 2, se hizo referencia a la variada actividad biológica que pueden presentar los diferentes tipos de metabolitos flavonoideos, mostrando, muchos de ellos, actividad antibacteriana y antifúngica y, algunos, como inhibidores de tirosinasa. Nuestro grupo de investigación, pionero en la Argentina en el estudio químico y biológico de este género, obtuvo de *D. elegans* y *D. boliviana* flavanonas preniladas y cromeno flavanonas, evaluándolas principalmente en relación a la actividad antibacteriana y antifúngica e inició los estudios sobre la actividad inhibidora de tirosinasa. Es en este sentido, que propusimos focalizarnos en la profundización química de *D. elegans*, e incorporar al estudio otra especie, *D. pazensis*, endémica de Bolivia, apuntando a la evaluación biológica de los flavonoides obtenidos, sobre la melanogénesis, cuyos desórdenes resultan, no sólo un problema estético y psicológico para la persona afectada, sino también un problema sanitario de alcance mundial.

En el desarrollo del presente Capítulo se han descripto los factores involucrados en la biosíntesis de melanina, como así también los antecedentes existentes en cuanto a compuestos que influyen en la melanogénesis, denotando así la importancia de la evaluación de dicha actividad biológica.

5.1. Melanogénesis

Entre la amplia variedad de los biopolímeros presentes en la naturaleza, son pocos los que, tal y como sucede en el caso de las melaninas, pueden ofrecer relaciones interdisciplinarias tan profundas y fascinantes que engloben a distintas ramas de la ciencia como son la física, la química, la biología y la medicina. Las razones que permiten justificar esta afirmación descansan sobre el papel fundamental que estos pigmentos desarrollan en el sistema pigmentario humano y también, sobre la importancia socio-económica y relevancia clínica de estos biopolímeros en cuanto a su implicancia en desórdenes pigmentarios entre los que se destaca el melanoma, el más agresivo entre los cánceres de piel (S. Ito., 2003).

5.1.1. La piel. Estructura y tipos celulares

La piel es el órgano más extenso del hombre (entre 2 y 2,5 m²), que recubre y protege toda la superficie del cuerpo. Su función principal es la de protección contra los agentes externos, aunque su metabolismo es activo y no debe considerarse como una simple barrera física. Está compuesta por un tejido conjuntivo, la dermis, y un tejido epitelial, la epidermis, que están separados por una membrana basal (Figura 5.1). La dermis está constituida principalmente por tejido conectivo, mientras que la epidermis está formada por varios tipos celulares, los queratinocitos (85-90%; síntesis de queratina), células de Merkel (1-2%; receptores sensoriales cutáneos), células dendríticas (3-4%; células de Langherans) y melanocitos (4-5%) que son células especializadas localizadas a nivel de la membrana basal de la epidermis, y cuya función principal es la producción de pigmentos polifenólicos, las melaninas (Camacho, 1998).

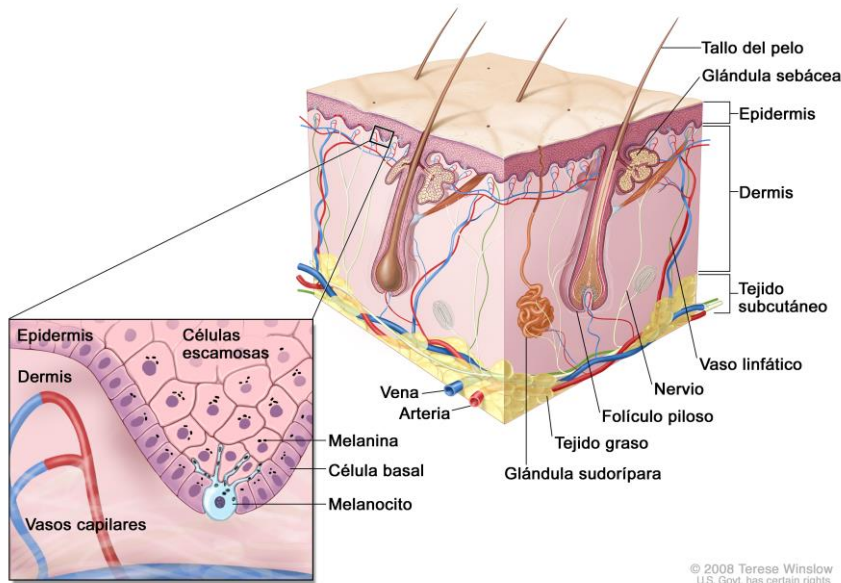


Figura 5.1. Esquema de organización de la piel (Young y Heath, 2000).

5.1.2. Melanocitos y el Melanosoma

Los melanocitos están localizados en el estrato basal de la epidermis, en los folículos pilosos, en la cóclea (oído) y en la úvea (ojo). Se trata de células altamente especializadas que, junto a las del epitelio retinal pigmentado, son las únicas capaces de sintetizar y excretar gránulos de melaninas a través de prolongaciones dendríticas. Esta especialización se manifiesta por la expresión exclusiva de determinadas proteínas indispensables para la biosíntesis de melaninas (Bouchard, B. *et al.*, 1994). El pigmento melánico se encuentra confinado dentro de unas vesículas membranosas, los melanosomas, que son orgánulos específicos de melanocitos en los que tiene lugar la biosíntesis de melanina. Los melanosomas son transferidos desde los melanocitos hacia los queratinocitos, donde las hidrolasas lisosomales degradan los melanosomas, lo que reduce a las melaninas en partículas pequeñas que son más eficaces apantallando la radiación ultravioleta. En su conjunto, este proceso asegura la distribución de los pigmentos melánicos por toda la piel. Así, puesto que el número de melanocitos apenas varía en las distintas etnias, el grado de pigmentación de la piel depende del número, tamaño y densidad de los melanosomas en los queratinocitos.

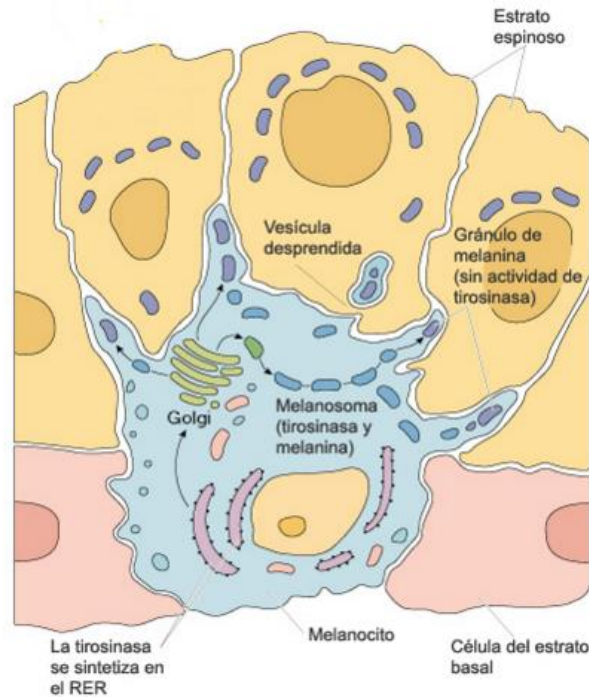


Figura 5.2. Unidad Melano-epidérmica (Ross M.H.: Histología .Texto y Atlas)

5.1.3. Melaninas: tipos, biosíntesis, características y función

Las melaninas producidas en los melanocitos de mamíferos se clasifican históricamente en tres grupos, en función de su estructura: eumelaninas, feomelaninas y tricocromos. Las diferencias en las propiedades físico-químicas de los compuestos de cada uno de estos grupos son consecuencia de las etapas finales de la vía biosintética, que determinan su estructura, composición, tamaño, y en última instancia, su pigmento.

Las eumelaninas son pigmentos de masa molecular alta de color negro o pardo. Las feomelaninas tienen color amarillento-rojizo y, a diferencia de las eumelaninas, presentan azufre en su composición. Estos dos grupos son los más importantes, ya que los tricocromos, pigmentos de baja masa molecular y color rojizo, son poco frecuentes en mamíferos (Prota, G., 1980; Prota, G. *et al.*, 1998).

5.1.3.1. Ruta de Raper-Mason. Biosíntesis y estructura de eumelaninas

La biosíntesis de las melaninas en mamíferos transcurre a través de una ruta enzimática compleja, cuyas líneas generales fueron postuladas inicialmente por Raper (1928) y confirmadas dos décadas después por Mason (1948), de modo que la ruta se conoce como vía Raper-Mason. En ella, sólo se consideraba la participación de la única enzima implicada que se conocía entonces, la tirosinasa, aunque posteriormente se identificaron e incluyeron otras. Así, en mamíferos, las principales proteínas responsables de la catálisis del proceso son tres metaloenzimas muy semejantes entre sí: tirosinasa y las proteínas relacionadas a la tirosinasa (Tyrps 1 y 2). Esta ruta consiste en un conjunto de reacciones todavía no completamente definidas en sus etapas finales (Figura 5.3), cuyos aspectos esenciales pueden resumirse como sigue.

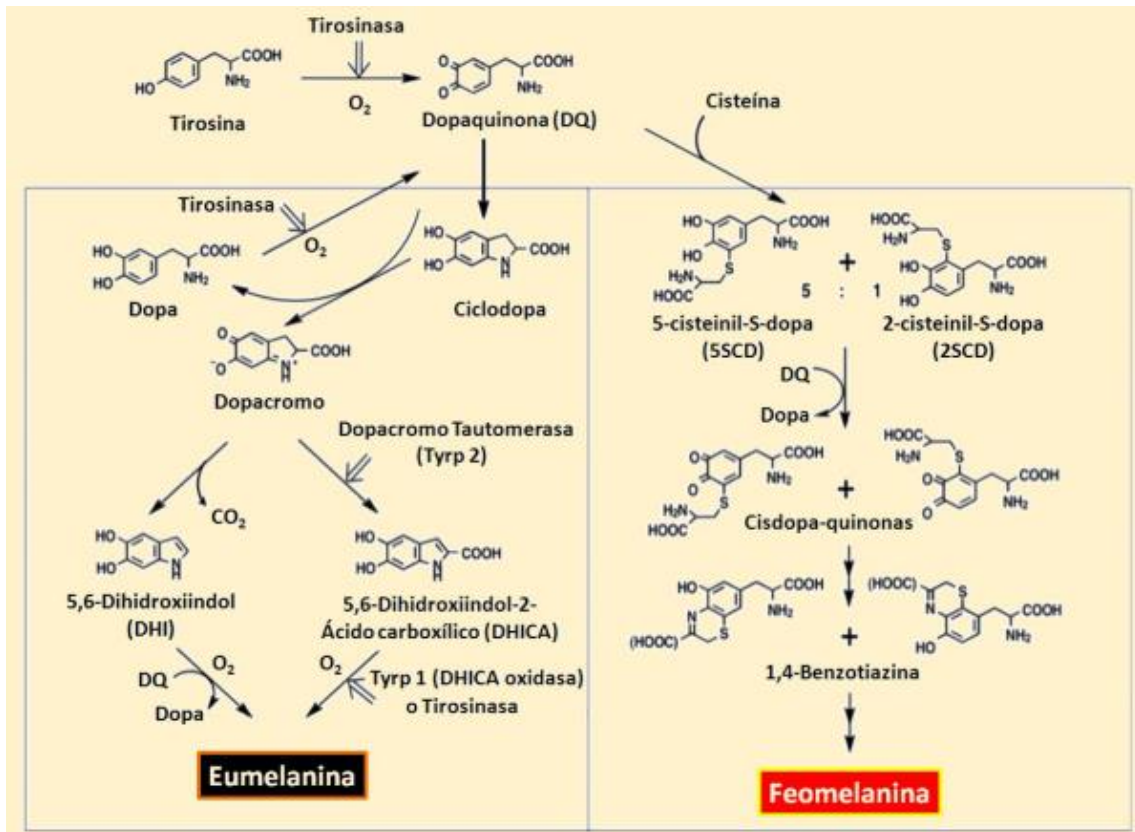


Figura 5.3. Ruta biosintética actual de eumelanina y feomelanina [(Alejandro González- Orive (2012)].

5.1.3.2. Función de las melaninas

La melanina es la responsable de la pigmentación en la piel de los animales, y, a su vez, protege de la radiación UV, evitando así mutaciones en el ADN celular, por medio de reacciones fotoquímicas inducidas por radiación UV, que pudieran ocasionar conformaciones anómalas que impidan la correcta expresión del ADN (Kollias *et al.*, 1991). La melanina es capaz de absorber fotones y disipar la energía absorbida como calor, sonido y, probablemente, otras formas de relajación no radiante (Proctor, P.H. *et al.*, 1989). Además, las melaninas desarrollan algunas otras funciones importantes como por ejemplo, la de amortiguar la actividad de especies oxidantes tales como peróxidos y superóxidos, así como de diversos iones metálicos o de radicales libres. La melanina es capaz de atrapar grandes cantidades de cationes metálicos tales como Ca, Mg, Cu, Al, Zn y Fe (Liu, Y. *et al.*, 2003). De hecho, estudios recientes demuestran que, en la neuromelanina (NM) presente en la *Substantia Nigra* del cerebro medio humano, el hierro aparece comúnmente asociado a este pigmento (Zecca, L. *et al.*, 2001).

5.1.4. Tirosinasa (EC 1.14.18.1)

Tirosinasa (monofenol-3,4-dihidroxifenilalanina: oxígeno oxidoreductasa) es una enzima ampliamente distribuida en la escala filogenética, desde los microorganismos hasta las plantas y animales, por lo que indudablemente apareció en un estadio temprano de la evolución. Se la denomina con nombres diversos como polifenol oxidasa (PPO), cresolasa y catecolasa y, en animales, la del mamífero ha

atraído la máxima atención de los investigadores. La mayoría de los estudios de caracterización de tirosinasa se han llevado a cabo con melanomas pigmentados de animales de laboratorio, sobre todo derivados de línea celular de ratón B16, pues la concentración de esta enzima en los tejidos epidérmicos normales es muy baja debido a la escasa densidad de melanocitos. Es una cuproglicoproteína que cataliza las dos primeras etapas de la ruta melanogénica: hidroxilación de L-tirosina a L-DOPA (reacción Monofenolasa) y oxidación de ésta a dopaquinona (reacción Difenolasa), utilizando como oxidante oxígeno molecular. Esta enzima dispone de dos sitios activos, en cada sitio se encuentran dos iones cobres, CuA y CuB, coordinados cada uno de ellos a seis o siete residuos de histidina y a un residuo de cisteína (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2011; Loizzo, M.R. *et al.*, 2012).

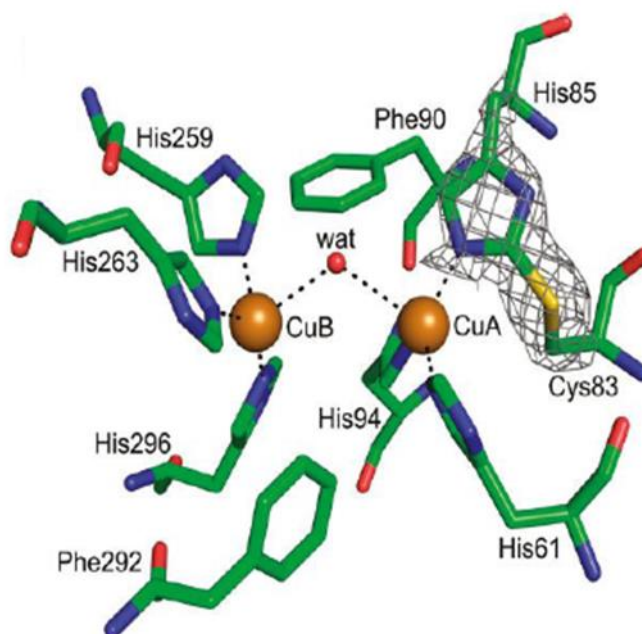


Figura 5.4. Sitio activo de tirosinasa de *Agaricus bisporus* (Ismaya *et al.*, 2011). Geometría del sitio activo, los átomos de C, N, O y S han sido coloreados de verde, azul, rojo y amarillo, respectivamente. Los átomos de cobre están coloreados en marrón.

Los sitios activos están localizados muy cerca de la superficie de la proteína y esto lleva consigo que moléculas análogas a los sustratos fundamentales de la enzima (monofenoles y *o*-difenoles) puedan llegar al sitio activo.

El centro activo de tirosinasa presenta tres diferentes formas, que dependen del estado de oxidación de los iones cobre: Met-tirosinasa (Cu^{2+} , Cu^{2+}), Deoxi-tirosinasa (Cu^{1+} , Cu^{1+}) y Oxi-tirosinasa (Cu^{2+} , Cu^{2+} , O^{2-}). La forma oxi de tirosinasa puede actuar sobre monofenoles y difenoles, mientras que la forma Met, solo actúa sobre *o*-difenoles (Figura 5.5).

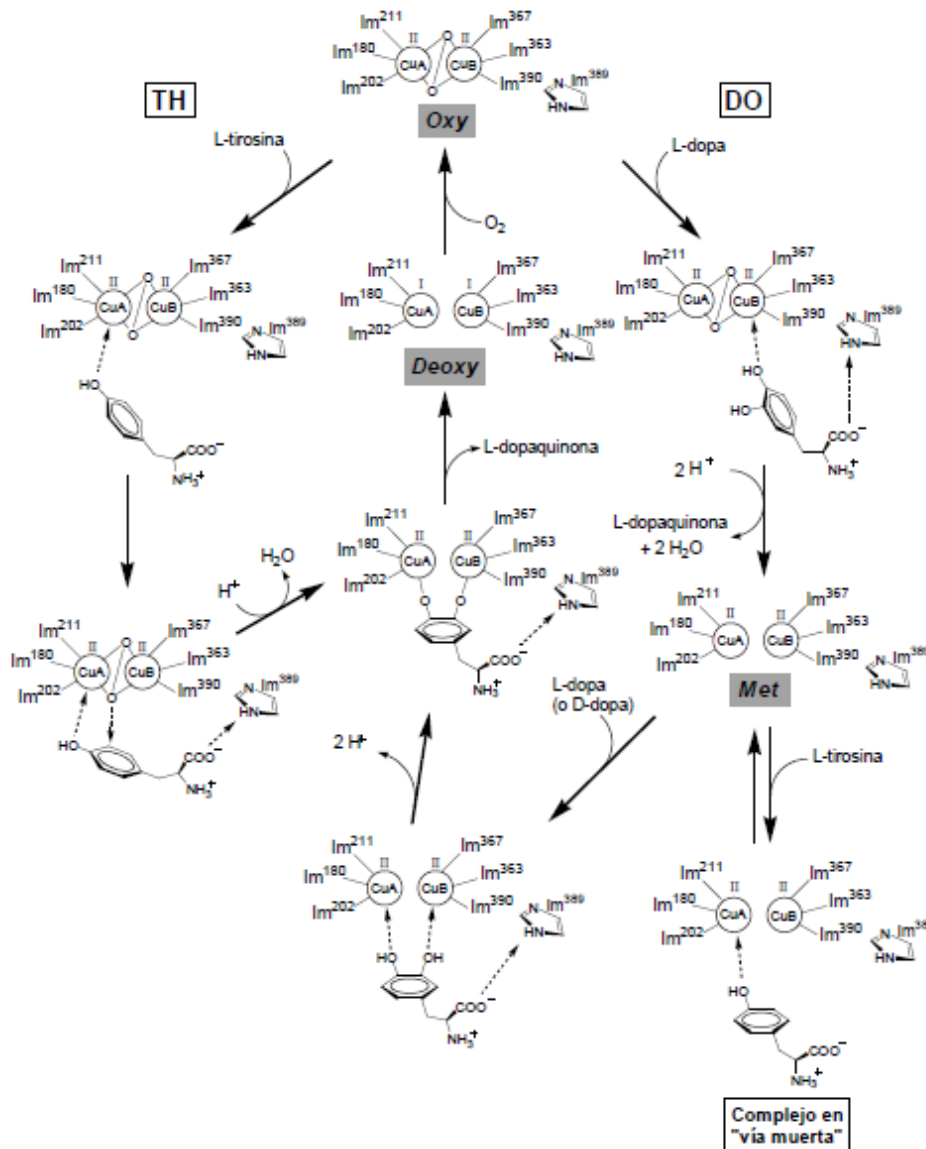


Figura 5.5. Vía melanogénica en mamíferos (Solano F. & García-Borrón J.C, 2006).

5.1.4.1. Actividad Monofenolasa

El estudio de esta actividad ha atraído la atención de muchos investigadores (Mason, 1956; Osaki, 1963; Vanneste y Zubersbühler, 1974; Cabanes *et al.*, 1987; Naish-Byfield y Riley, 1992; Rodríguez-López *et al.*, 1992; Ros *et al.*, 1994a; 1994b; Fenoll *et al.*, 2000a; 2000b; 2000c; 2002; Peñalver *et al.*, 2002; Fenoll *et al.*, 2004). Las características más ampliamente descritas de la actividad Monofenolasa son:

(a) La actividad Monofenolasa siempre se expresa junto con la actividad Difenolasa, puesto que el producto de la primera actividad es el *o*-difenol, que es sustrato de la segunda actividad.

(b) Las etapas no enzimáticas que se originan a partir de *o*-dopaquinona son iguales en las dos actividades.

(c) La actividad Monofenolasa muestra un período de retardo (*lag*) característico en la acumulación del producto dopacromo antes de llegar al estado estacionario. El período de retardo depende de la naturaleza de la enzima, de su concentración y de la naturaleza y concentración del sustrato. Es mayor cuanto menor es la concentración de L-dopa, y se inhibe por exceso de L-tirosina, lo que no ocurre en la actividad dopa oxidasa. Además, L-dopa, producto inmediato de la hidroxilación de la tirosina, es cofactor de la reacción y anula el período de *lag* o retardo en cantidades catalíticas (Solomon *et al.*, 1996).

5.1.4.2. Actividad Difenolasa

La actividad Difenolasa consiste en la oxidación, en un ciclo (*turnover*), de dos moléculas de *o*-difenol utilizando una molécula de oxígeno. Los *o*-difenoles son mejores nucleófilos que los monofenoles, lo que repercute en una mayor rapidez de reacción para los *o*-difenoles.

5.1.5. Regulación de la melanogénesis

Aunque el pigmento de melanina es una importante protección contra la radiación UV, cuando se encuentra en exceso, puede ocasionar el desarrollo de desórdenes hiperpigmentantes tales como lentigo, efélide, nevo y otros trastornos de la piel. Por otra parte, una disminución en los niveles de melanina, puede llevar a Cáncer de piel, Vitiligo, entre otras enfermedades. Dichos desórdenes a nivel de pigmentación de la piel, son condiciones devastadoras para muchos pacientes, lo que lleva a un impacto negativo en calidad de vida de estas personas (Arung *et al.*, 2010, Grimes, 2009, Briganti *et al.*, 2003; Seo *et al.*, 2003).

Entre las enzimas implicadas en la melanogénesis, la tirosinasa es responsable de los dos primeros pasos, por lo que es de la cascada melanogénica, la enzima más importante (Chang, 2009). Los desórdenes hiperpigmentantes son difíciles de tratar sin causar despigmentaciones permanentes o irritación. Hasta el presente los agentes hipopigmentantes más efectivos son los inhibidores de tirosinasa y, por su parte, la mayoría de los empleados actualmente poseen graves efectos secundarios.



Fotografías de izquierda a derecha, Paciente con Lentigo [Ariza S.A. *et al.*, 2008] y Paciente con Efélides [Loyna (2007)].



Fotografías de izquierda a derecha, Paciente con Nevo [Artero López E. (2012)] y Paciente con Cáncer de Piel [Casanova J.M. (2012)].

5.1.5.1. Aplicaciones de los inhibidores

La definición de inhibidor de tirosinasa es a veces confusa, ya que algunos autores usan este término para definir como inhibidores de esta enzima a moléculas

que desvían la ruta de biosíntesis de melaninas, generando otras o-quinonas distintas a o-dopaquinona en lugar que ocurra una interacción inhibidor/enzima directa. Se han aislado e identificado un gran número de inhibidores tanto de fuentes naturales (Parvez *et al.*, 2007) como sintéticos (Rescigno *et al.*, 2002; Solano *et al.*, 2006; Chang, 2009). Muchos de estos inhibidores han sido evaluados utilizando tirosina/dopa como sustratos midiendo la formación de dopacromo. Así pues, desde un punto de vista experimental, la inhibición de tirosinasa puede ser clasificada en diferentes tipos:

1. Agentes reductores que producen la reducción de o-dopaquinona a L-Dopa. En este tipo se encuentran inhibidores clásicos como ácido ascórbico, que se utiliza como inhibidor de la melanogénesis ya que, al reducir la o-dopaquinona, impide la formación de dopacromo y, por tanto, la formación de melaninas.

2. Eliminadores de o-dopaquinona, que reaccionan también con ésta y forman compuestos coloreados. En este tipo se destacan los compuestos tiólicos como la cisteína, que forma un aducto con la o-quinona y ralentiza el proceso de formación de eumelaninas hasta que el compuesto tiólico es consumido.

3. Sustratos enzimáticos alternativos. En este tipo están los compuestos fenólicos cuyo producto quinónico absorbe en una longitud de onda del espectro electromagnético diferente a la del dopacromo. Cuando la enzima tiene una buena afinidad por estos compuestos, la formación del dopacromo disminuye y, por tanto, son clasificados erróneamente como inhibidores de la enzima.

4. Inactivadores enzimáticos no específicos. En este tipo se encuadran los ácidos y bases, los cuales desnaturalizan inespecíficamente a la enzima inactivándola.

5. Inactivadores específicos de tirosinasa. Estos son los inhibidores basados en el mecanismo de la enzima, entre los que destacan los sustratos suicidas. Estos compuestos actúan irreversiblemente sobre la enzima induciendo su inactivación suicida.

6. Inhibidores específicos de tirosinasa. Son aquellos inhibidores que se unen reversiblemente a la enzima reduciendo su actividad catalítica.

De todas estas clases, sólo los del tipo 5 y 6 se pueden considerar como verdaderos inhibidores, ya que son los que se unen a la enzima e inhiben su actividad. Estos verdaderos inhibidores se pueden clasificar en cuatro subtipos: (a) inhibidores competitivos, (b) inhibidores incompetitivos, (c) inhibidores mezcla y (d) inhibidores no competitivos. En cualquier caso, debido a la inespecificidad de tirosinasa, el grado de inhibición de la enzima por cualquier inhibidor nuevo se compara con el del AK, que es el inhibidor clásico de tirosinasa (Chen *et al.*, 1991; Cabanes *et al.*, 1994).

La inhibición de tirosinasa puede ser aplicada en varios campos entre los que se destacan la industria cosmética y la medicina:

Industria cosmética: El uso de inhibidores de tirosinasa tiene un creciente interés en la industria cosmética, debido a los efectos de blanqueamiento de la piel que poseen. De todos los inhibidores de tirosinasa descritos hasta hoy, sólo unos cuantos han sido utilizados como agentes despigmentantes, debido principalmente a riesgos de toxicidad para uso humano.

En el caso de drogas despigmentantes, la hidroquinona produce hipopigmentación y dermatitis; por su uso crónico genera ocronosis exógena, decoloración permanente y leucoderma permanente. El uso clínico entonces está limitado a obtener una

despigmentación generalizada en pacientes con vitiligo difundido (Njoo, M.D. *et al.*, 1999). Ácido kójico, otro compuesto empleado como despigmentante es genotóxico, hepatocarcinogénico y produce dermatitis alérgicas [Figura 5.6 (Seo *et al.*, 2003)].

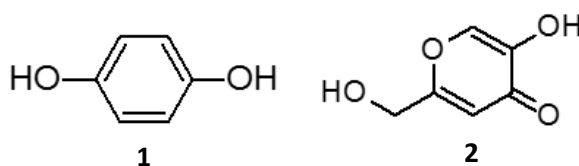


Figura 5.6. Estructuras de hidroquinona (1) y ácido kójico (2).

Medicina: los inhibidores de tirosinasa han sido evaluados en células de melanoma humano, observándose que la acción de los mismos conlleva a un aumento de la sensibilidad de dichas células al tratamiento con radioterapia (Rayos Gamma) (Brozyna *et al.*, 2008) y quimioterapia (Ciclofosfamida) (Slominski *et al.*, 2009), por lo que se ha postulado que inhibidores de la actividad de tirosinasa contribuirían a la inhibición del crecimiento del melanoma.

5.1.5.2. Aplicaciones de los estimuladores

Industria cosmética: En el caso de tratamientos repigmentantes, es importante tratar la enfermedad que originó el trastorno pigmentario. Las opciones de tratamiento para patologías hipopigmentantes incluyen inmunomoduladores y psoraleno (Alchorne & Abreu, 2008). Inmunomoduladores tópicos como tacrolimus y pimecrolimus, han demostrado una eficacia similar a los corticosteroides tópicos, sin los efectos adversos concomitantes, y pueden ser utilizados, por ejemplo, en párpados; sin embargo, una hipertricosis focal en niños tratados con tacrolimus fue descrito (Bellet & Prosa 2005). Psoraleno tópico u oral combinado con irradiación UVA (PUVA) es eficaz, sin embargo, la fotoquimioterapia PUVA oral puede causar muchos efectos secundarios como náuseas, vómitos, reacciones fototóxicas y aumento del riesgo de cáncer de piel, mientras que el tratamiento tópico PUVA tienen efectos secundarios tales como enrojecimiento, formación de ampollas y la hiperpigmentación de la piel normal adyacente (Bellet y Prosa 2005).

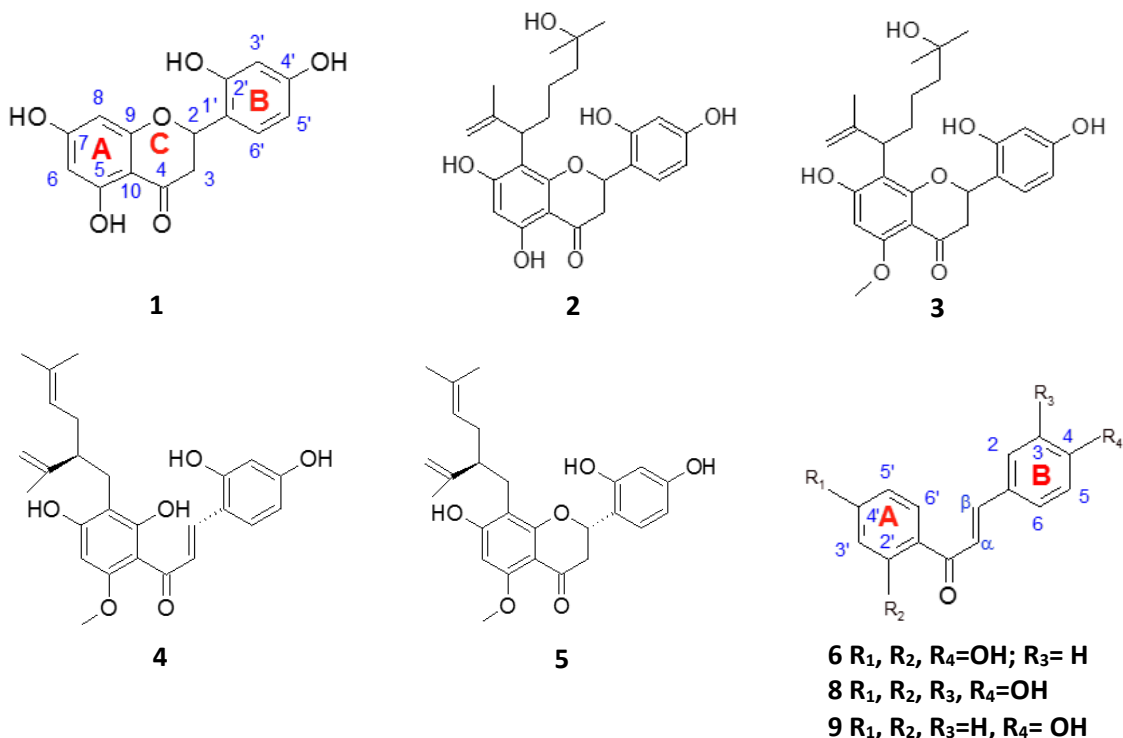
Todos estos antecedentes nos han llevado a plantear la importancia de la búsqueda de nuevos inhibidores o estimuladores de tirosinasa a ser empleados para el tratamiento de desórdenes que cursan con Hiper o Hipopigmentación.

5.1.6. Principales flavonoides moduladores de la melanogénesis

Conforme a los antecedentes manifestados en el Capítulo 2, el género *Dalea* se caracteriza por poseer entre otros metabolitos secundarios, derivados flavonoideos. Dentro de ellos se destacan las flavanonas y chalconas, por lo que a continuación se detallan los antecedentes existentes sobre ellos informados para diferentes especies vegetales, como inhibidores o estimuladores de enzimas relacionadas a la melanogénesis.

5.1.6.1. Flavanonas y chalconas como inhibidores de tirosinasa

Los primeros antecedentes en cuanto a flavanonas y chalconas como inhibidores de tirosinasa fueron informados por Shimizu *et al.*, (1998), quienes examinaron extractos metanólicos crudos de tejido leñoso (duramen) de veintitrés especies de árboles de Papúa, Nueva Guinea. Se demostró que el extracto de *Artocarpus incisa* (Thunb.) L. f. (Moraceae) presentó una importante actividad inhibidora de la actividad monofenolasa tirosinasa comparada con la del AK. Los extractos mostraron supresión de la biosíntesis de melanina en células de melanoma B16-F10, sin indicios de citotoxicidad o irritación de la piel en las partes posteriores de conejillo de indias marrón. A partir de este extracto, se aisló, entre otros compuestos fenólicos, una flavanona: (+)-norartocarpanona (**1**), (Fig. 5.7), la cual presentó una importante actividad inhibidora de la actividad monofenolasa de tirosinasa ($CI_{50}=1,76 \mu M$) comparándola con la del inhibidor de referencia AK ($CI_{50}=8,66 \mu M$). Continuando con el trabajo sobre el compuesto **1**, Shimizu *et al.*, (2000) evaluaron su actividad inhibidora sobre la reacción difenolasa de tirosinasa y observó una débil inhibición del tipo competitiva ($CI_{50}=90,4 \mu M$), comparada con la de AK ($CI_{50}=17,2 \mu M$). En dicho trabajo, fueron evaluados otros compuestos flavonoides aislados anteriormente, y fue establecida la primera relación estructura-actividad para la inhibición de la reacción monofenolasa de tirosinasa, observándose que todos los compuestos activos presentaban un resorcinol 4-sustituído en el anillo B y que la introducción de un sustituyente en posición 3 del anillo C, disminuiría drásticamente la actividad inhibidora.



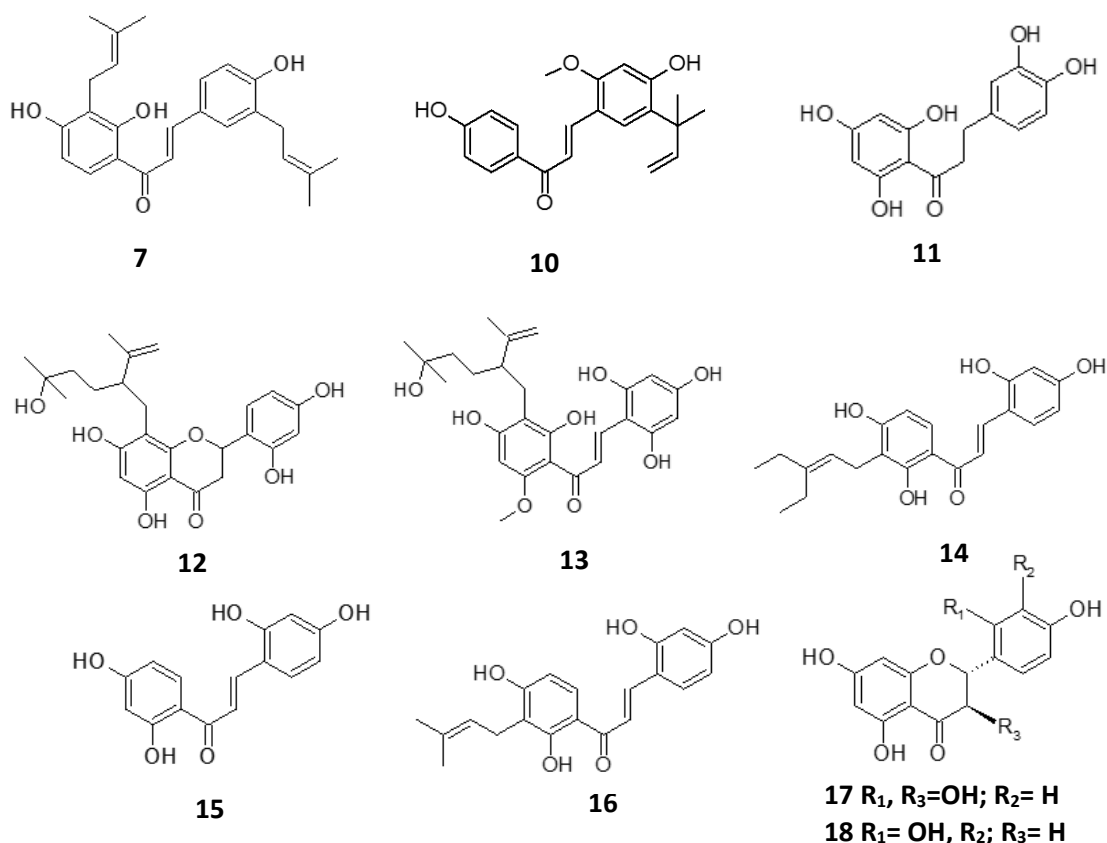


Figura. 5.7. Flavonoides inhibidores de tirosinasa.

Son *et al.*, 2003 evaluaron la actividad inhibidora de la reacción difenolasa de tirosinasa de compuestos fenólicos aislados a partir de raíces de *Sophora flavescens* Aiton. Entre ellos dos flavanonas kurarinona (**2**) y norkurarinol (**3**) (Fig. 5.7), presentaron una potente actividad ($Cl_{50} = 1,3 \mu\text{M}$ y $2,1 \mu\text{M}$; respectivamente), frente a AK que presentó una Cl_{50} de $11,3 \mu\text{M}$. Adicionalmente, comparando con el resto de los compuestos evaluados, sugieren que la sustitución con un grupo isoprenil en posición 6 del anillo A, disminuiría la actividad inhibidora de tirosinasa.

Kim *et al.*, 2003 demostraron que el extracto etanólico y la fracción de diclorometano de *S. flavescens* presentan una inhibición significativa sobre tirosinasa de hongos. Desde la fracción diclorometano, se aislaron tres flavonoides prenilados conocidos, entre ellos una chalcona, kuraridina (**4**) y una flavanona, kurarinona (**5**), (Fig. 5.7). En comparación con AK ($Cl_{50} = 20,5 \mu\text{M}$), estos compuestos inhibieron potentemente la actividad de tirosinasa con valores de Cl_{50} de $0,6$ y $6,2 \mu\text{M}$ (**4** y **5** respectivamente).

Nerya *et al.*, 2003 estudiaron 2',4',4-trihidroxichalconas, aisladas a partir de raíces de *Glycyrrhiza glabra* (Regaliz) sobre la actividad monofenolasa de tirosinasa de hongos, observando que mientras 2',4',4-trihidroxichalcona (isoliquiritigenin, **6**) (Fig. 5.7) fue activa ($Cl_{50} = 8,1 \mu\text{M}$), la 2',4',4-trihidroxi-3',3'-diisoprenilchalcona (isoprenilchalcona, **7**) no inhibió la actividad de tirosinasa, lo que sugeriría que la adición de dos sustituyentes isoprenil en los anillos A y B, serían responsables de la

supresión de la misma. Asimismo, el compuesto **6** generó una inhibición en la formación de melanina en melanocitos.

Nerya *et al.*, 2004 probaron nueve mono-, di-, tri- y tetra hidroxil chalconas como supresores de mono- y di-fenolasa, presentando que el aspecto importante en su eficacia fue la posición de los grupos hidroxilo situados en los dos anillos aromáticos, con una notable acción ante la presencia de un anillo B 4-sustituído, más importante que la del anillo A sustituido. Ni el número de hidroxilos, ni la presencia de un resto catecol en el anillo B se asociaron con el aumento de la actividad inhibidora de tirosinasa. Isoliquiritigenina (**6**), buteína (**8**) y 4-hidroxichalcona (**9**) disminuyeron la actividad de la tirosinasa y redujeron el período de retardo de la función Monofenolasa de la enzima (Fig. 5.7). El compuesto **8** exhibió una inhibición competitiva, mientras que **6** y **9** exhibieron una inhibición semi-competitiva. Este trabajo posicionó a las chalconas como potenciales componentes despigmentantes. Conforme a esta observación, Khatib *et al.*, 2005 estableció una relación estructura-actividad para chalconas tetrahidroxiladas, observando que un anillo B con un resto resorcinol en posición 2,4 y en posición 2',4' del anillo A, presentan la mayor actividad inhibidora tanto sobre la reacción Monofenolasa como Difenolasa de tirosinasa de hongos.

Fu *et al.*, 2005 aislaron a partir de *Glycyrrhiza inflata* Bat. licochalcona A (**10**) (Fig. 5.7), la cual presentó una potente actividad inhibidora CI_{50} de 0,0258 μM sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa de hongos, comparada con la del inhibidor de referencia (AK, CI_{50} =0,14 μM). Al estudiar su efecto empleando L-DOPA como sustrato, observaron que la actividad era muchas veces menor, atribuyendo tal diferencia a la diferencia estructural de los sustratos involucrados en cada reacción, en donde el compuesto **10** posee una clara similitud con el sustrato L-tirosina.

Lin *et al.*, 2007 aislaron trece componentes de manzanas de la especie *Malus doumeri* var. *formosana* (Kawak & Koidz) S. S. Ying, que luego fueron identificados y evaluados por sus capacidades de inhibición de la tirosinasa en células HEMn. Dentro de los compuestos purificados, una chalcona 3-hidroxifloretina (**11**) fue potencialmente más interesante, provocando una disminución de las funciones de tirosinasa en células HEMn.

En 2008, Ryu *et al.*, informaron la actividad inhibidora de tirosinasa de Kurarinol (**12**) (Fig. 5.7), una flavanona aislada de raíces de *S. flavescens*, siendo su CI_{50} =0,1 μM y presentando una inhibición del tipo competitiva, estableciendo que el grupo hidroxil presente en el sustituyente lavandulil del anillo A, sería fundamental para la inhibición observada. Continuando con el estudio de flavonoides aislados de *S. flavescens*, Hyun *et al.*, 2008 estudiaron la flavanona Kurarinol (**12**), y una chalcona, Kuraridinol (**13**), e informaron una potente actividad inhibidora de tirosinasa por parte de ambos compuestos, con una CI_{50} de 8,60 μM y 0,88 μM , respectivamente, frente a AK (CI_{50} =16,22 μM), presentando inhibiciones del tipo no-competitivas.

Peralta *et al.*, 2011 informa la actividad inhibidora de tirosinasa de tres nuevas flavanonas preniladas aisladas de raíces de *D. boliviana*, mientras que, ese mismo año Chiari *et al.*, 2011 informa la actividad inhibidora de tirosinasa, y el tipo de inhibición de cromeno-flavanona aislada de partes aéreas de *Dalea elegans*, antecedentes informados en el Capítulo 2 (pág. 22).

El compuesto morachalcona A (**14**) (Fig. 5.7) aislada de *Artocarpus heterophyllus* por Nguyen *et al.*, 2012, presentó una actividad inhibidora 3000 veces

mayor sobre la reacción Difenolasa de tirosinasa de hongos ($CI_{50}=0,013 \mu\text{M}$), que la de AK ($CI_{50}=44,6 \mu\text{M}$).

Takahashi *et al.*, 2012 evaluaron la actividad sobre la melanogénesis de cuatro chalconas aisladas de tallos de *Morus australis* Poir., de las cuales 2, 4, 2', 4'-tetrahidroxichalcona (**15**) y 2, 4, 2', 4'-tetrahidroxi-3'-prenilchalcona (**16**) (Fig. 5.7), presentaron una importante actividad inhibidora, $CI_{50}=0,21 \mu\text{M}$ y $0,82 \mu\text{M}$ con respecto al inhibidor de referencia arbutina ($CI_{50}=164 \mu\text{M}$).

Zong-Ping Zheng *et al.*, 2013, evaluaron extractos de partes aéreas de *Cudrania tricuspidata* (Carrière.)Bur. ex Lav. sobre tirosinasa de champiñón y observaron una potente inhibición de $CI_{50}=113,5 \mu\text{g/mL}$. Ellos aislaron más de 28 compuestos fenólicos; entre ellos dos flavononas: transdihidromorina (**17**) y steppogenina (**13**), que exhibieron una CI_{50} de $21,54$ y $2,52 \mu\text{M}$, respectivamente (Fig. 5.7). De acuerdo con la relación estructura-actividad (REA), señalaron que las sustituciones con grupos hidroxilo en posiciones 2' y 4' del anillo aromático B de flavanonas podría desempeñar un papel vital en la inhibición actividad de la tirosinasa.

Peralta *et al.*, 2014, informa la CI_{50} en cuanto a la actividad inhibidora Monofenolasa de tirosinasa del compuesto **8PP**, detallado en el Capítulo 2 de la presente tesis, págs. 25 y 26.

5.1.6.2. Flavanonas y chalconas como estimuladores de tirosinasa

Algunos flavonoides fueron informados como estimuladores de la producción de melanina, como por ejemplo podrían mencionarse la phloridizina (chalcona glicosilada) y naringenina (flavanona) (Figura 5.8). Shoji *et al.* descubrieron que phloridizina estimula notablemente la producción de melanina en células de melanoma B16F10 a través de la inhibición de la actividad PKC (Shoji *et al.*, 1997). La naringenina estimula la melanogénesis mediante el aumento de la expresión de la tirosinasa, TYRP 1, TYRP 2 y MITF, importante para la activación de la melanogénesis (Ohguchi *et al.*, 2006).

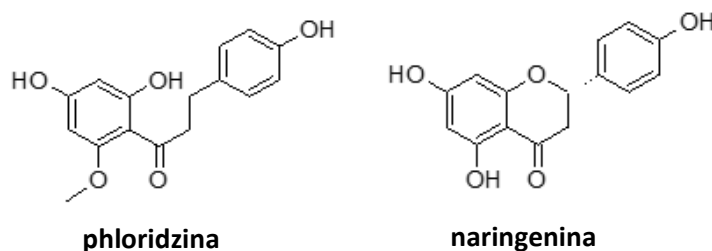


Figura 5.8. Flavonoides estimuladores de tirosinasa.

Los antecedentes informados sobre flavonoides como moduladores de la melanogénesis, teniendo en cuenta que algunos de ellos han sido obtenidos de especies del género *Dalea*, y que existe una necesidad sanitaria que prima la búsqueda de nuevos productos para el tratamiento de desórdenes que cursan con hiper o hipopigmentación, nos motivó a evaluar a los flavonoides obtenidos de *D. elegans* y *D. pazensis* sobre la melanogénesis.

5.2. Evaluación de flavonoides obtenidos de *D. elegans* y *D. pazensis* sobre tirosinasa aislada de hongos

Ha sido llevada a cabo la evaluación de la inhibición de dichos compuestos sobre la actividad Monofenolasa y Difenolasa de tirosinasa, reacciones que se corresponden a las dos primeras etapas de la biosíntesis de melaninas (Figura 5.9) (Chang *et al.*, 2009).

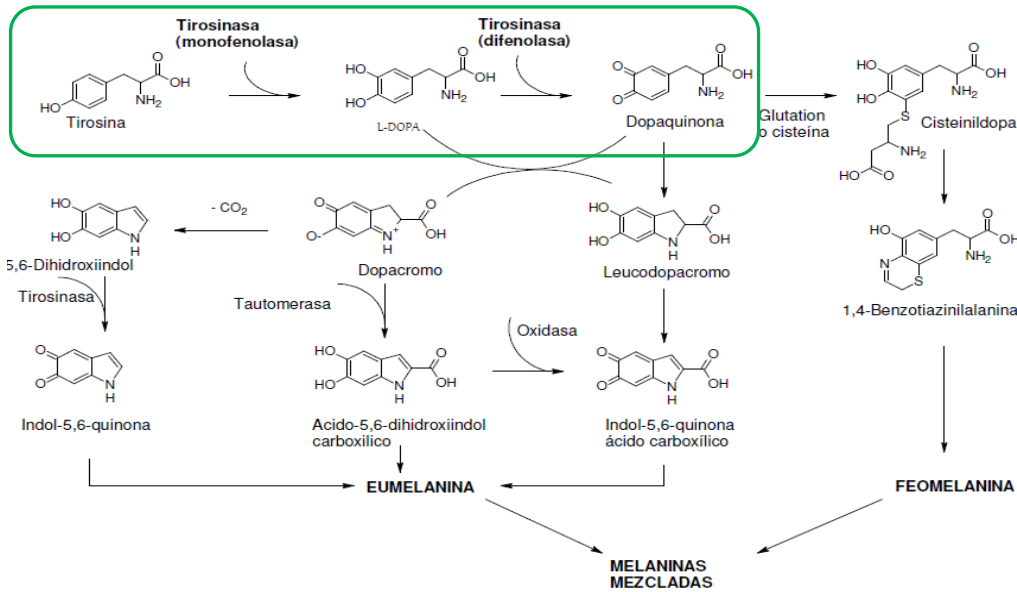


Figura. 5.9. Vía de biosíntesis de Melanina.

5.2.1. Metodología. Ver Capítulo 7.

5.2.2. Efecto de flavonoides aislados de *D. elegans* sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa

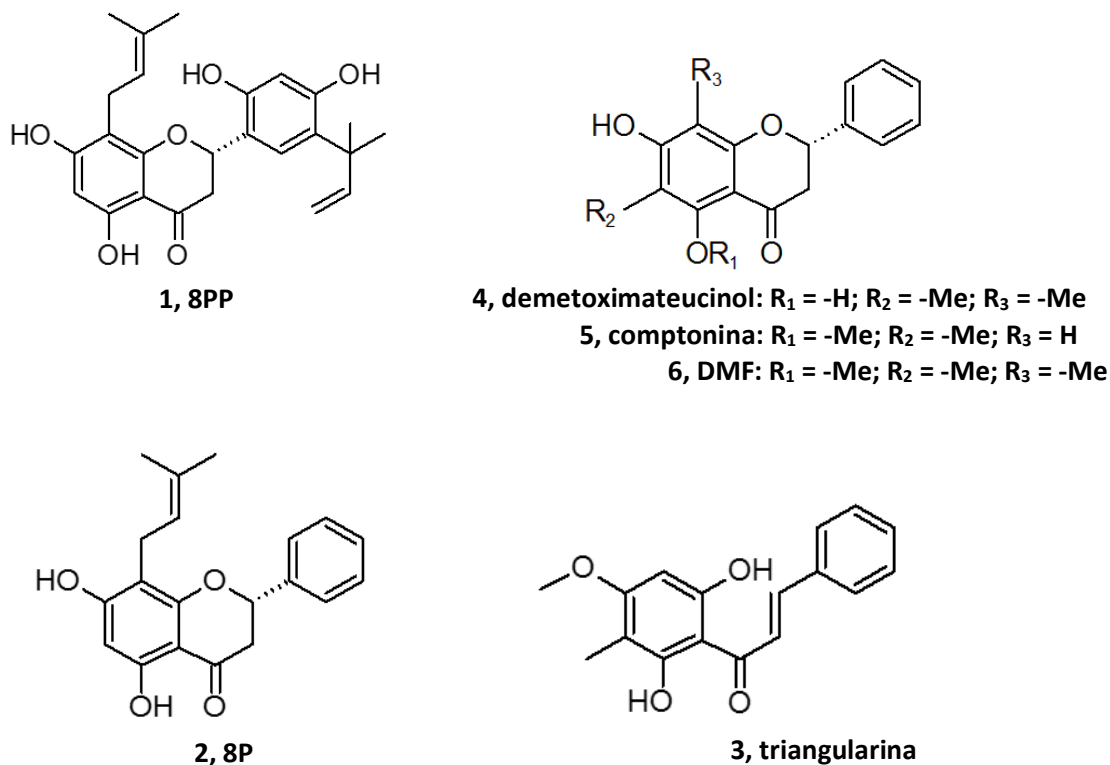


Figura. 5.10. Flavonoides aislados de *D. elegans*.

Se evaluaron los compuestos **2-6** a diferentes concentraciones, en cuanto a su actividad inhibitoria sobre la enzima tirosinasa usando L-tirosina como sustrato; el compuesto **8PP (1)** ya había sido evaluado específicamente sobre la actividad Monofenolasa e informado por Peralta *et al.*, 2014; pero sus datos fueron incluidos en la Tabla 5.1 y la Figura 5.11 que son mostrados a continuación, con el objeto de revelar la importancia de las condiciones estructurales necesarias para la manifestación de dicha actividad biológica, en forma comparativa con el resto de los flavonoides evaluados. En cuanto a los compuestos ensayados, **triangularina (3)** a 100 μ M mostró una inhibición importante de la enzima tirosinasa ($98,6 \pm 0,6\%$), mientras que la actividad de 8P (**2**) y de demetoximateucinol (**4**) fue moderada ($73,7 \pm 0,6\%$ y $50,0 \pm 0,6\%$, respectivamente). Comptonina (**5**) y 7-hidroxi-5-metoxi-6,8-dimetilflavanona (**6**) demostraron, a dicha concentración, una inhibición muy baja ($22,7 \pm 0,6\%$ y $7,0 \pm 0,6\%$, respectivamente) (Tabla 5.1). Dados estos valores, se decidió continuar trabajando con aquellos compuestos que superaban el 50% de inhibición a 100 μ M, a los que se les determinó la concentración inhibitoria media (CI_{50}). Los valores de CI_{50} para **2-4** y el inhibidor de referencia AK se estimaron utilizando el ajuste no lineal de los datos de concentración-respuesta (Tabla 5.1).

Compuesto	Inhibición a 10 μM (%)	Inhibición a 100 μM (%)	CI ₅₀ (μM)
1	90,5 \pm 5,0	95,0 \pm 0,6	2,32 \pm 0,01*
2	8,4 \pm 1,6	73,7 \pm 0,6	80,6 \pm 0,3
3	24,7 \pm 0,6	98,6 \pm 0,6	33,3 \pm 0,1
4	6,3 \pm 1,3	50,0 \pm 0,6	97,6 \pm 0,3
5	6,7 \pm 0,9	22,7 \pm 0,6	-----
6	5,5 \pm 0,3	7,0 \pm 0,6	-----

Tabla 5.1. %Inhibición y CI₅₀ de flavonoides de *D. elegans* sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa. Control positivo AK, CI₅₀=4,93 \pm 0,01 μM . * Peralta, M.A., 2011 (Tesis Doctoral).

Como se detalla en la Tabla 5.1, el compuesto **1** mostró una importante actividad inhibidora de tirosinasa (CI₅₀ 2,32 \pm 0,01 μM), aproximadamente dos veces más activo que el AK, (CI₅₀ 4,93 \pm 0,01 μM), seguido de **3** (33,3 \pm 0,1 μM). Por otro lado, **2** y **4** mostraron inhibiciones débiles (80,6 \pm 0,3 y 97,6 \pm 0,3 μM , respectivamente) (Tabla 5.1 y Fig. 5.11).

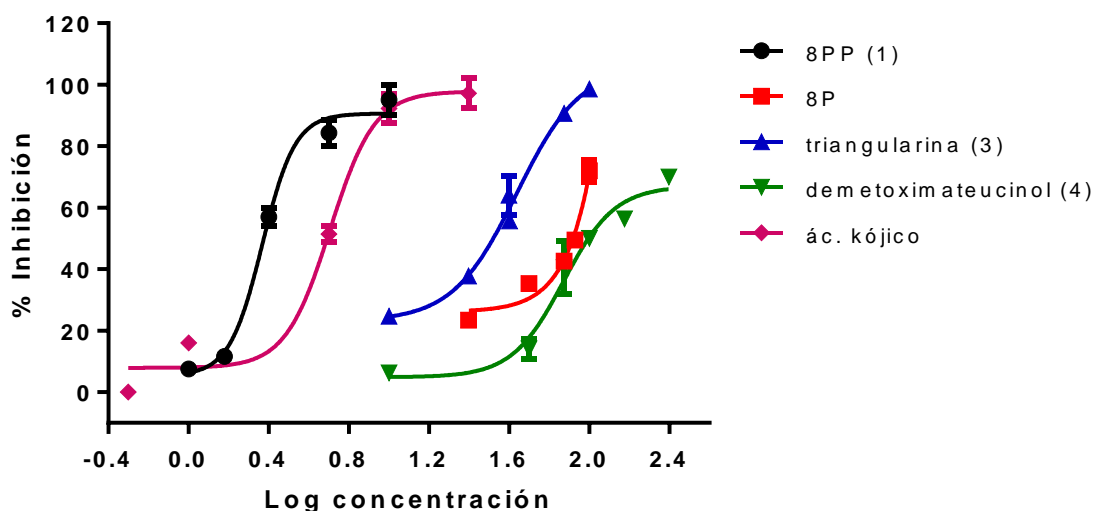


Figura 5.11. Gráfico de % Inhibición vs. Logaritmo de la concentración de los flavonoides más activos de *D. elegans* y del inhibidor de referencia AK.

Como resultado de la evaluación de los compuestos aislados de la especie *D. elegans*, sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa, se ha observado que **1** muestra una importante actividad inhibidora de tirosinasa, seguido de **3**, mientras que **2** y **4** fueron notablemente menos activos. Los compuestos **5** y **6** mostraron una muy baja actividad inhibidora, aún a 100 μM (Tabla 5.1).

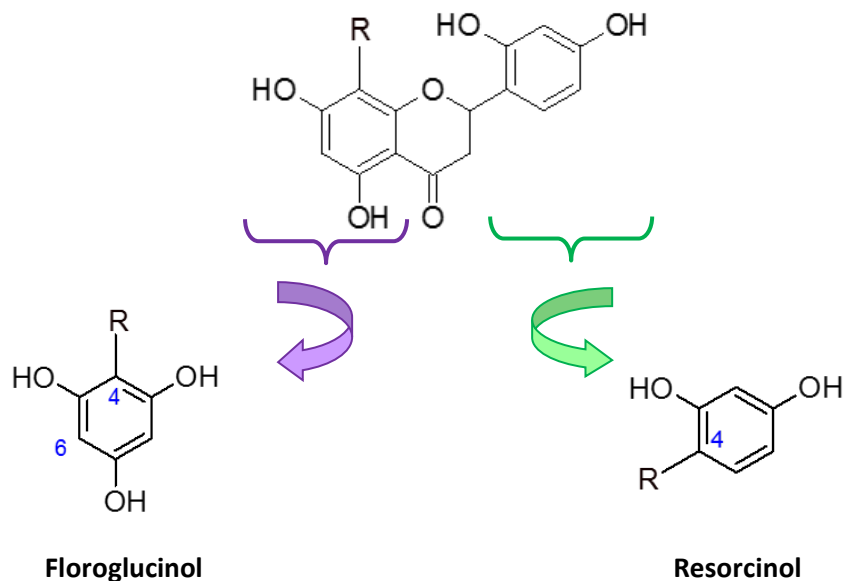


Figura 5.12. Estructuras Floroglucinol 4-sustituído y Resorcinol 4-sustituído.

Analizando los requerimientos estructurales para la actividad inhibitora sobre tirosinasa, previamente se ha informado que la presencia de un resorcinol 4-sustituído en el anillo B en flavonas y flavanonas (Fig. 5.12) es esencial para la actividad inhibitora de tirosinasa (Shimizu *et al.*, 2004). En estudios recientes de nuestro grupo de investigación, se ha demostrado, adicionalmente, la importancia del anillo floroglucinol 4-sustituído, cuando éste forma parte del anillo A (Fig. 5.12) (Peralta *et al.*, 2011). El compuesto **1** presenta los dos requerimientos estructurales, lo que explicaría su potente actividad, que inclusive supera a la del AK. Por su parte, el compuesto **2** presenta la porción floroglucinol 4-sustituído, pero no posee un resorcinol 4-sustituído en el anillo B, lo que se ve reflejado en una disminución considerable de su actividad con respecto al compuesto **1**. El compuesto **4**, si bien posee, al igual que el compuesto **2**, la porción floroglucinol 4-sustituído en el anillo A, presentó una baja actividad inhibitora, que es inclusive menor que la observada para el compuesto **2**, hecho que podría deberse a la ausencia de un sustituyente prenil en el anillo A. En este sentido, antecedentes informan que flavonoides prenilados que poseen un sustituyente isoprenil en C-6 o C-8 del anillo A, sin la presencia del resto 4-resorcinol en el anillo B presentan un aumento en la actividad inhibitora de tirosinasa (Zheng *et al.*, 2013). En relación a esto, nuestro grupo ha observado un comportamiento similar en dos flavanonas aisladas de raíces de *Dalea boliviana* (Fig. 5.13), con resto prenil en C-8, las cuales presentaron una actividad moderada como inhibidores de tirosinasa (Peralta *et al.*, 2011). Otra de las consideraciones estructurales a analizar es la presencia de un grupo hidroxilo libre en C-5 del anillo A, ya que se observa que al ser sustituido por un grupo metoxi, se pierde la porción floroglucinol y la actividad se ve disminuida, como es el caso de los compuestos **5** y **6**.

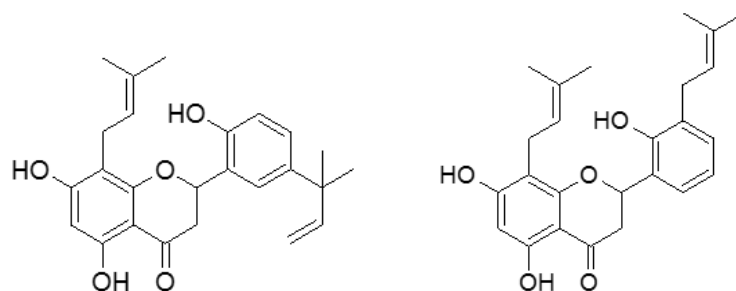


Figura 5.13. Flavanonas preniladas obtenidas de *D. boliviana*.

El compuesto **3** (**triangularina**), hasta el momento es la única chalcona obtenida de esta especie y ha mostrado una interesante actividad inhibidora de tirosinasa. En cuanto a la relación estructura-actividad inhibidora de tirosinasa de chalconas, se ha informado que el resto 4-resorcinol en el anillo B es esencial para dicha actividad, contribuyendo también la presencia de grupos hidroxilo en el anillo A, especialmente los ubicados en posición 2', 4' y 6' (Jun *et al.*, 2007; Chang, 2009). A pesar de que **3** presenta parcialmente estos requerimientos estructurales, dado que posee sustituyentes hidroxilo en posición 2' y 6', su actividad inhibidora es relevante, por lo que, mayores estudios deberían ser realizados en este aspecto; sin embargo se observa que es menor a la del compuesto **1**.

5.2.3. Efecto de flavonoides aislados de *D. elegans* sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa

Dado que la enzima tirosinasa cataliza las dos primeras reacciones en la cascada de síntesis de melaninas (Fig. 5.9), se decidió evaluar además, el efecto de los compuestos flavonoides sobre la segunda reacción, en la que el sustrato de tirosinasa es L-Dopa. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 5.2.

Compuesto	Inhibición a 10 μM (%)	Inhibición a 100 μM (%)	CI ₅₀ (μM)
1	22,2 \pm 0,8	65,7 \pm 0,9	80,7\pm0,4
2	25,2 \pm 0,1	65,3 \pm 1,9	83,4\pm0,3
3	36,7 \pm 0,4	65,2 \pm 0,1	69,0\pm0,1
4	25,7 \pm 0,3	38,2 \pm 1,1	-----
5	14,8 \pm 1,9	27,9 \pm 0,1	-----
6	30,3 \pm 0,3	33,9 \pm 0,7	-----

Tabla 5.2. %Inhibición y CI₅₀ de flavonoides de *D. elegans* sobre actividad Difenolasa de tirosinasa. Control positivo AK, CI₅₀=129,6 \pm 0,3 μM .

Los compuestos **1** (**8PP**), **2** (**8P**) y **3** (**triangularina**), mostraron una mayor actividad a 100 μM . Dados estos resultados, se estimó la CI₅₀ para dichos compuestos (Tabla 5.2), las cuales se pueden apreciar en la Figura 5.14.

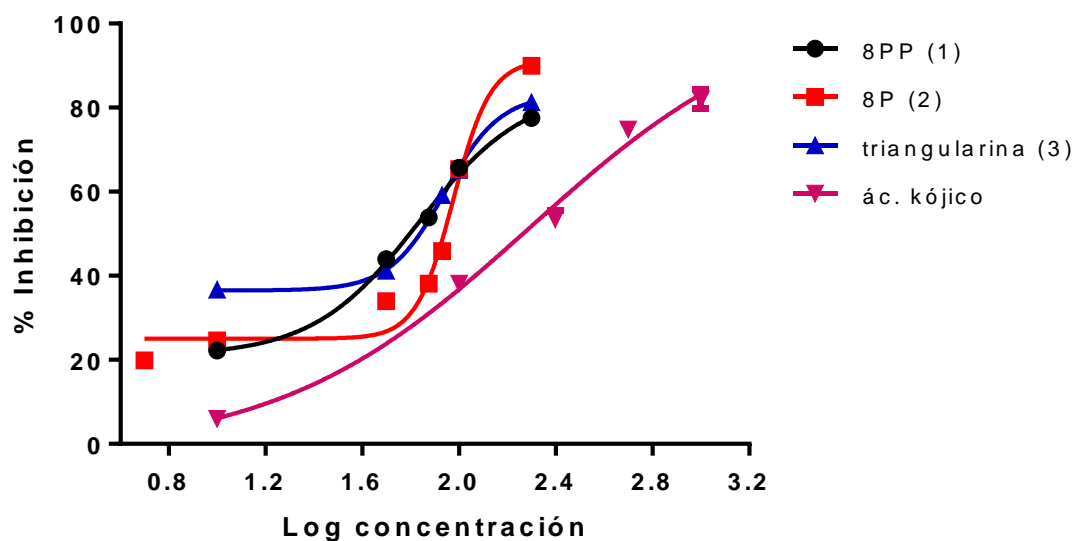


Figura 5.14. Gráfico de % Inhibición vs. Logaritmo de la concentración de los flavonoides más activos de *D. elegans* y del inhibidor de referencia AK.

En relación a los resultados observados para los flavonoides obtenidos de la especie *D. elegans*, sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa, si bien **3** mostró una actividad inhibidora de tirosinasa moderada, fue aproximadamente 2 veces mayor que la del inhibidor de referencia. En orden de actividad siguieron **1** y **2**, mientras que **4**, **5** y **6** fueron notablemente menos activos aún a 100 μ M (Tabla 5.2).

Si hacemos una comparación entre los compuestos **8PP** y **triangularina**, quienes mostraron ser activos en ambas reacciones, podemos aseverar que el grado de inhibición es superior para la reacción Monofenolasa. Esto podría explicarse a nivel estructural, en cuanto al sitio de unión de dichos compuestos a la enzima, dado que como se explicó anteriormente (pág. 97), la enzima tiene tres formas (met, oxi y deoxi), (Solano F. & García-Borrón J.C, 2006) dependientes del grado de oxidación de los átomos de cobre, que se encuentran en su sitio activo. Esto significaría un cambio estructural de la enzima en su sitio activo, haciendo que su selectividad a la unión de sustratos sea diferente también, sin embargo consideramos que mayores estudios estructurales serían necesarios para explicar esta diferencia de actividad en ambas reacciones.

5.2.4. Determinación de la cinética enzimática de compuestos activos de *Dalea elegans*

Dada la importante actividad inhibidora de tirosinasa sobre la reacción monofenolasa que presentaron los compuestos **8PP** y **triangularina**, se decidió determinar el mecanismo cinético (Fig. 5.15) por el cual dichos compuestos ejercen su inhibición. Esta información resulta de interés, dado que permite conocer el modo de unión del compuesto a la enzima, la afinidad de la enzima por éste, lo que contribuye al conocimiento de la farmacocinética, en el caso de que estos compuestos puedan ser empleados clínicamente en un futuro.

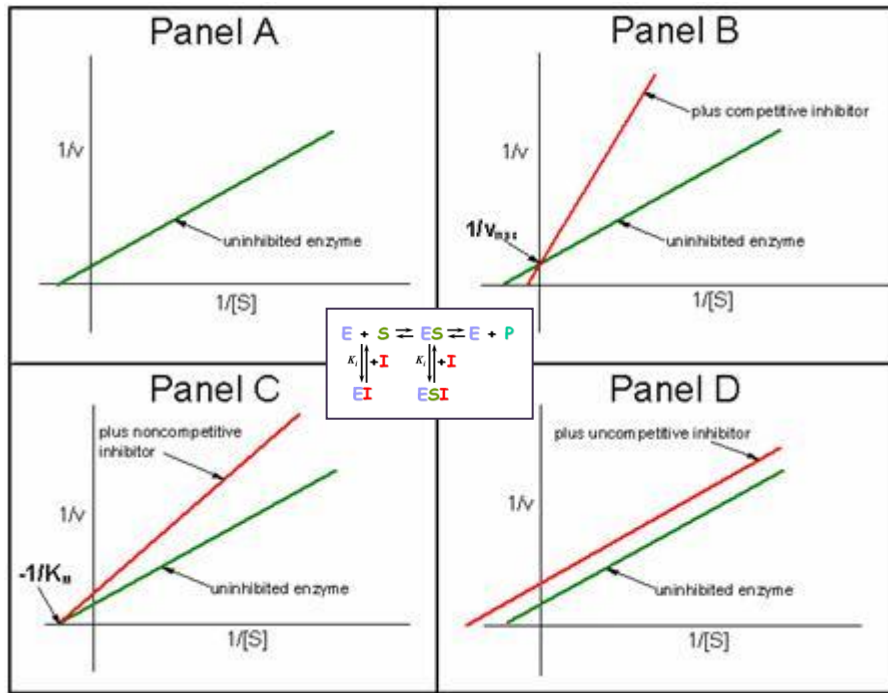


Figura 5.15. Tipos de inhibición enzimática Reversible [Michael W. King (2016)].

Como se observa a continuación los gráficos de actividad enzimática vs. concentración de la enzima, dieron lugar para ambos compuestos, a una familia de líneas rectas, las cuales pasan todas por el origen (Figura 5.16 a y b). El incremento en la concentración de los inhibidores resulta en una disminución de la pendiente de las rectas, indicando que la inhibición que efectúan es de tipo Reversible, y que, por lo tanto, podría ser suprimida por un aumento del sustrato de dicha enzima.

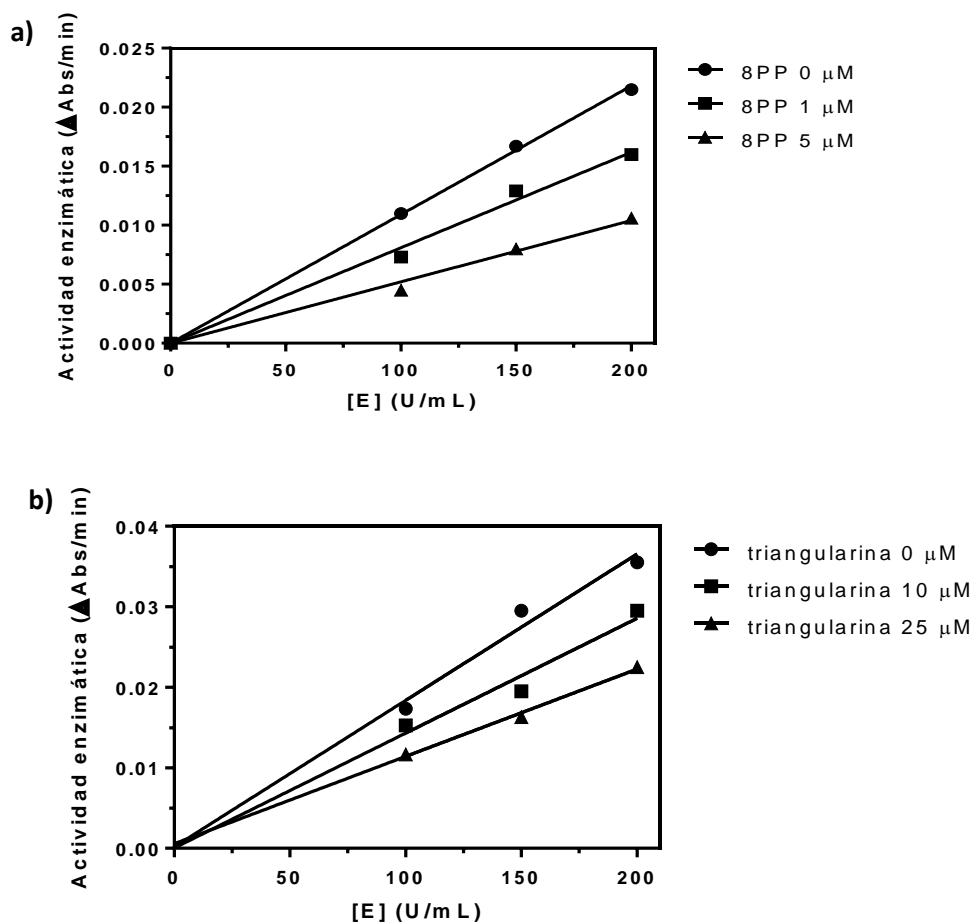


Figura 5.16. Gráficos de Actividad enzimática vs. concentración de la enzima tirosinasa aislada de hongos, para a) 8PP y b) triangularina.

Posteriormente, se ha determinado el tipo de inhibición de ambos compuestos a distintas concentraciones, analizando el comportamiento cinético sobre tirosinasa de hongos. Los resultados fueron analizados empleando los perfiles de Lineweaver-Burk, $1/v$ vs. $1/[S]$ (Figura 5.17 a y b).

Para **8PP**, los perfiles muestran una familia de líneas rectas cuyas pendientes aumentan conforme aumenta la concentración del inhibidor, presentando todas ellas, la misma ordenada al origen. Mientras los valores de $V_{m\acute{a}x}$ (velocidad máxima alcanzada por la reacción) permanecen constantes, se observa que los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) se ven aumentados conforme incrementa la concentración del inhibidor, lo que indica que **8PP** lleva a cabo una inhibición del tipo Competitiva, disputando con el sustrato L-tirosina el sitio de unión a tirosinasa (Figura 5.17 a). El comportamiento observado sugiere que esta prenil flavanona presenta una actividad inhibidora por unión a la enzima libre. La constante de inhibición presentada por la unión de **8PP** a la enzima libre, K_i , fue obtenida del gráfico de K_m vs. concentración de **8PP**, como se muestra en la Figura 5.17 a. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.3.

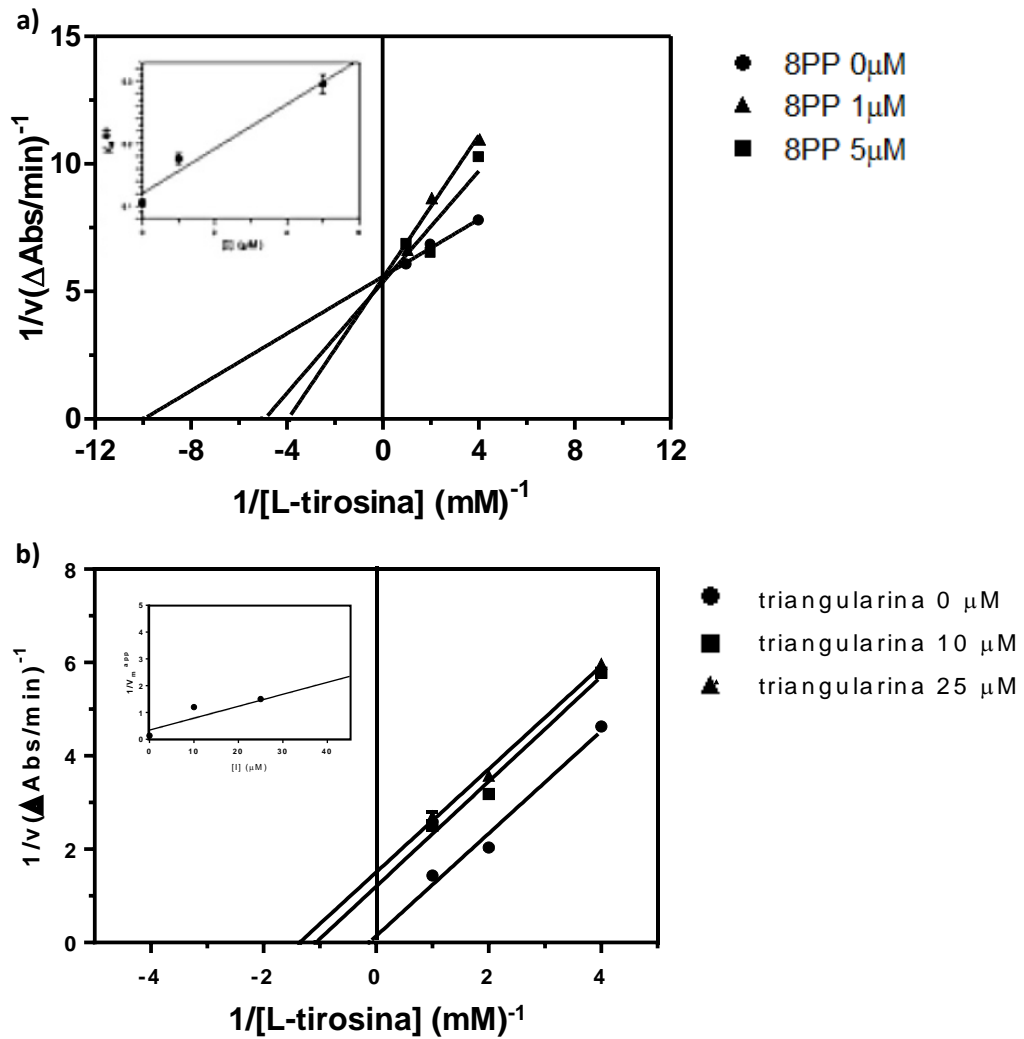


Figura 5.17. Velocidad de reacción⁻¹ vs. concentración de sustrato (L-tirosina)⁻¹, para a) 8PP y b) triangularina.

La Figura 5.17 b, ilustra la inhibición de **triangularina** sobre tirosinasa de hongos. En este gráfico se observa una familia de líneas rectas paralelas. A medida que la concentración del inhibidor aumenta, los valores de K_m y $V_{\text{máx}}$ decrecen, lo que indica que **triangularina** presenta una inhibición de tipo Acompetitiva, esto involucra que **triangularina** se une al complejo enzima-sustrato, para efectuar su acción, y no a la enzima libre. La constante de inhibición K_{is} fue obtenida a partir del gráfico de $1/V_m^{\text{app}}$ vs. concentraciones de **triangularina**, como se observa en la Figura 5.17 b.

	8PP	triangularina
K_m	0,10±0,02 μM	8,0±0,9 μM
V_m	0,19±0,01 μM	7,3±2,2 μM
Inhibición	Reversible	Reversible
Tipo inhibición	Competitiva	Acompetitiva
K_i	2,94±0,01 μM	-----
K_{is}	-----	7,8±2,3 μM

Tabla 5.3. Cinética y constantes de inhibición para 8PP y triangularina sobre tirosinasa aislada de hongos.

La determinación del tipo de inhibición para estos compuestos naturales, es un dato farmacocinético muy valioso, dado que, en un futuro, de ser administrada en humanos, sería importante conocer el mecanismo de acción cinético para ajustar parámetros que favorezcan su acción en el organismo.

5.2.5. Efecto de flavonoides aislados de *D. pazensis* sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa

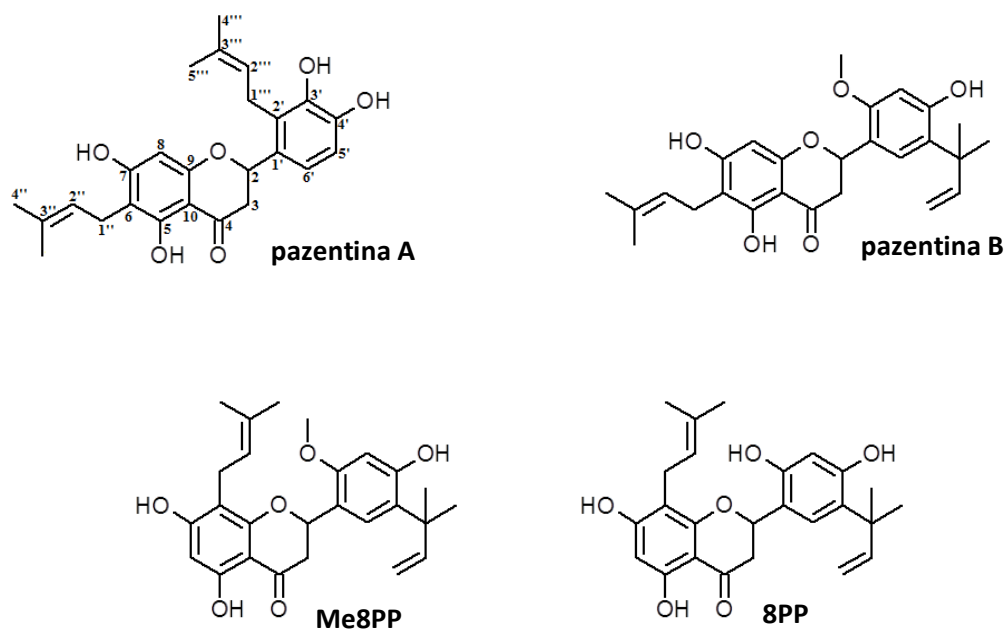


Figura 5.18. Flavonoides aislados de *D. pazensis*.

Los compuestos **pazentina A**, **pazentina B** y **Me8PP** fueron evaluados a diferentes concentraciones, con respecto a su actividad inhibitora sobre la enzima tirosinasa usando L-tirosina como sustrato. El compuesto **8PP** ya ha sido informado junto con los flavonoides aislados de *D. elegans* (pág. 108). El compuesto **Me8PP** mostró una moderada inhibición a 100 μM (63,8 \pm 4,4) %, mientras que el compuesto **pazentina A**, a la misma concentración, demostró una muy baja inhibición (9,4 \pm 0,3) %, y **pazentina B** no fue activo sobre tirosinasa (Tabla 5.4). Los valores de CI_{50} para **Me8PP** y el inhibidor de referencia AK fueron calculadas empleando una estimación no lineal del gráfico de % inhibición vs. log de la concentración (Fig. 5.19). El valor de CI_{50} para **Me8PP** fue de 49,80 \pm 0,09 μM y para el AK fue de 4,93 \pm 0,01 μM . (Tabla 5.4 y Figura 5.19).

Compuesto	Inhibición a 10 μM (%)	Inhibición a 100 μM (%)	CI_{50} (μM)
1	2,84 \pm 0,4	9,4 \pm 0,3	-----
2	0	0	-----
3	21,5 \pm 1,8	63,8 \pm 4,4	49,80\pm0,09

Tabla 5.4. %Inhibición y CI_{50} de flavonoides de *D. pazensis* sobre actividad Monofenolasa de tirosinasa. Control positivo AK, CI_{50} =4,93 \pm 0,01 μM .

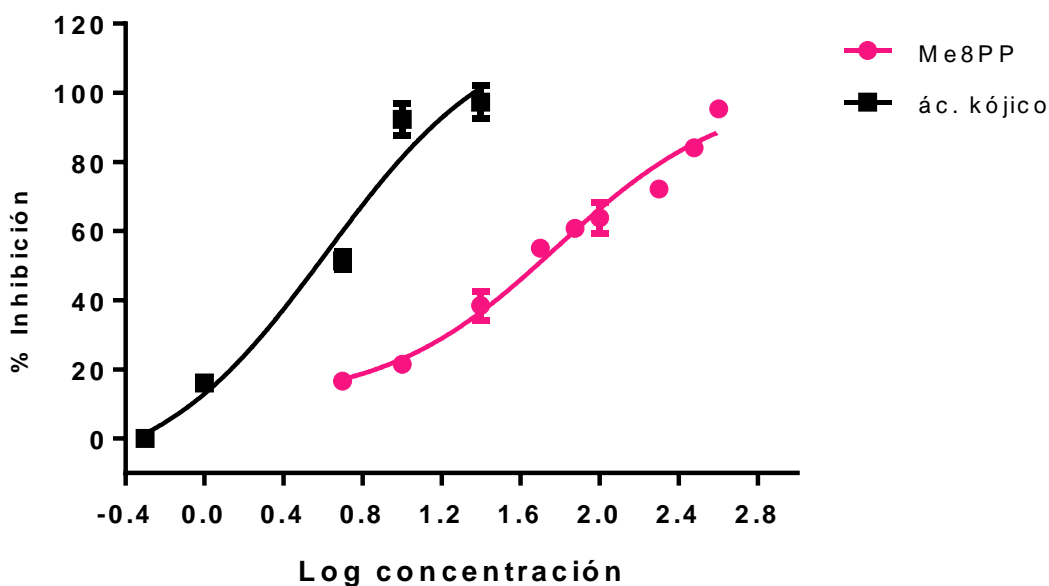


Figura 5.19. Gráfico de % Inhibición vs. Logaritmo de la concentración del compuesto 3 aislado de *D. pazensis* y del inhibidor de referencia AK.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se hace importante no perder de vista los requerimientos estructurales relacionados con la actividad inhibitora de tirosinasa de los compuestos flavonoides. Como se ha expresado anteriormente, la presencia de un resorcinol 4-sustituído en el anillo B (Lee *et al.*, 2004, Shimizu *et al.*, 2004) y un floroglucinol 4-sustituído en el anillo A (Peralta *et al.*, 2011) son

requerimientos esenciales para la manifestación de la actividad inhibidora de tirosinasa de flavonas y flavanonas. El compuesto **Me8PP** cumple con el segundo requerimiento mencionado y exhibe una actividad moderada como inhibidor de tirosinasa, a diferencia del compuesto **8PP** que cumple con ambos requerimientos, mostrando una fuerte inhibición. Los compuestos **pazentina A** y **B**, quienes mostraron muy baja o inexistente actividad, respectivamente, no poseen dichos requerimientos estructurales. En efecto, ambos compuestos presentan un floriglucinol en el anillo A, pero sustituido en 6. Este hecho podría repercutir en la manifestación de la actividad inhibidora de tirosinasa, condición estructural que se torna más relevante cuando comparamos las actividades de dos de los compuestos que son químicamente similares: el compuesto **Me8PP** ($CI_{50}=49,80\pm 0,09 \mu M$), que muestra el floriglucinol 4-sustituido en A, con la inactividad mostrada por el compuesto **pazentina B**, que posee un anillo floriglucinol 6-sustituido en A. Así, una vez más, reforzamos la teoría demostrada por nuestro grupo, que la presencia floriglucinol 4-sustituido en el anillo A es una característica que colabora con la manifestación de la actividad. Teniendo en cuenta estos antecedentes, postulamos que las diferencias observadas en la actividad de los compuestos obtenidos de *D. pazensis*, podrían deberse a estos aspectos estructurales, en donde la posición del sustituyente en el anillo A, influiría en la actividad sobre tirosinasa.

5.2.6. Efecto de flavonoides aislados de *D. pazensis* sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa

Tras evaluar la actividad de los compuestos de *D. pazensis* sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa se observó una actividad estimuladora de tirosinasa para los compuestos **pazentina B** y **Me8PP**, siendo más marcada para este último, mientras que el compuesto **pazentina A** resultó ser inactivo. La evaluación del compuesto **8PP** fue llevada a cabo junto con los flavonoides obtenidos de *D. elegans* (pág. 110).

Compuesto	Estimulación a 10 μM (%)	Estimulación a 100 μM (%)	CE ₅₀ (μM)
1	0	0	-----
2	9 \pm 2	23,5 \pm 0,9	-----
3	15 \pm 2	83,05 \pm 3,5	49,80\pm0,01

Tabla 5.5. %Estimulación y CE₅₀ de flavonoides de *D. pazensis* sobre actividad Difenolasa de tirosinasa.

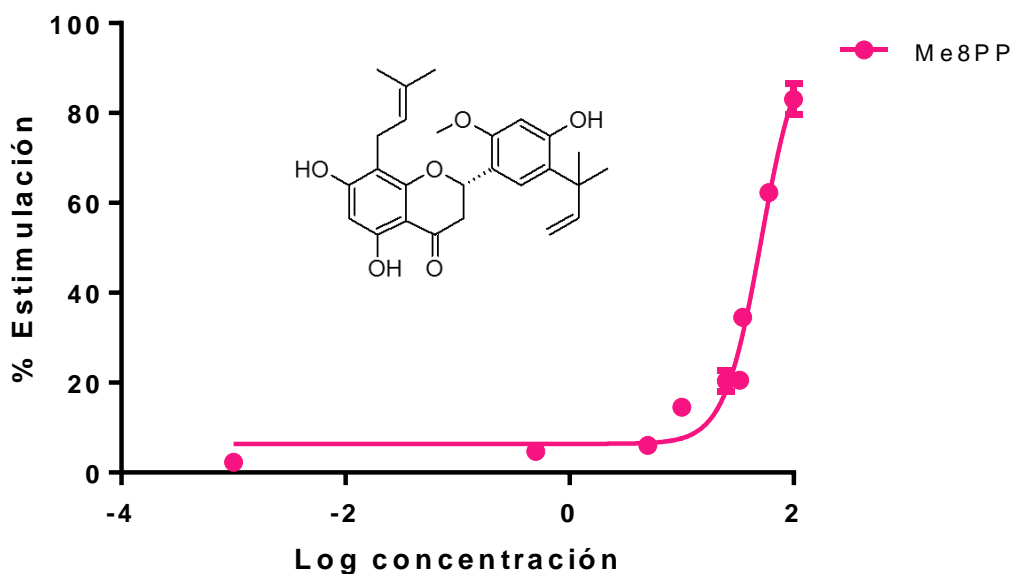


Figura 5.20. Gráfico de % Estimulación vs. Logaritmo de la concentración del compuesto 3 obtenido de *D. pazensis*.

Al compuesto **Me8PP** (Fig. 5.20) le ha sido estimada la concentración estimuladora media (CE_{50}), la cual arrojó un valor de $(49,80 \pm 0,01) \mu\text{M}$.

Dentro de los compuestos evaluados, este es el primero que demostró ser inhibidor para la reacción Monofenolasa de tirosinasa de hongos y estimulador para la reacción Difenolasa de tirosinasa, lo que suele denominarse como “efecto dual”.

Qin L. *et al.* 2014, presentó el mismo caso para el compuesto α -arbutina, empleado actualmente como blanqueador cosmético, Figura 5.21.

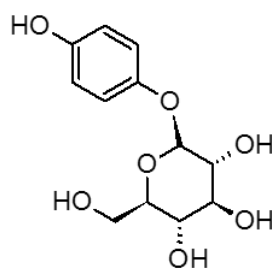


Figura 5.21. Estructura química de α -arbutina.

Ellos proponen que la estimulación de la actividad Difenolasa se debe a la interacción de α -arbutina con residuos situados en la entrada al sitio activo de la enzima, lo que repercute en una disminución en la actividad inhibitoria. Plantean además la hipótesis de que dicho compuesto induce un cambio conformacional en tirosinasa, que no sólo hace que la unión de L-Dopa-enzima sea más eficaz, sino también aumenta en gran medida la velocidad de su transformación. Lo observado por Qin L., *et al.* podrían explicar el efecto dual observado para el compuesto **Me8PP**, sin embargo, más estudios deberían ser llevados a cabo, por ejemplo empleando Docking

molecular, para así determinar la forma de unión del compuesto a tirosinasa, y un posible cambio conformacional de dicha enzima.

5.3. Evaluación de flavonoides activos obtenidos de D. elegans sobre tirosinasa aislada de células de melanoma de ratón B16F0

La enzima tirosinasa aislada de células de melanoma de ratón guarda una alta homología con la obtenida de líneas celulares de melanoma humano en cuanto a la secuencia de aminoácidos que las forman (aproximadamente 78%) [Olivares-Sánchez, (Tesis Doctoral, 2003)] por lo que resulta ser un modelo válido para la evaluación de actividad inhibidora o estimuladora de tirosinasa acercándonos al comportamiento que ocurriría en humanos. De ese modo, para aquellos compuestos que resultaron ser mayormente activos sobre tirosinasa aislada de hongos, se les determinó su acción sobre tirosinasa aislada de la línea celular de melanoma de ratón B16F0 (Fig. 5.22).

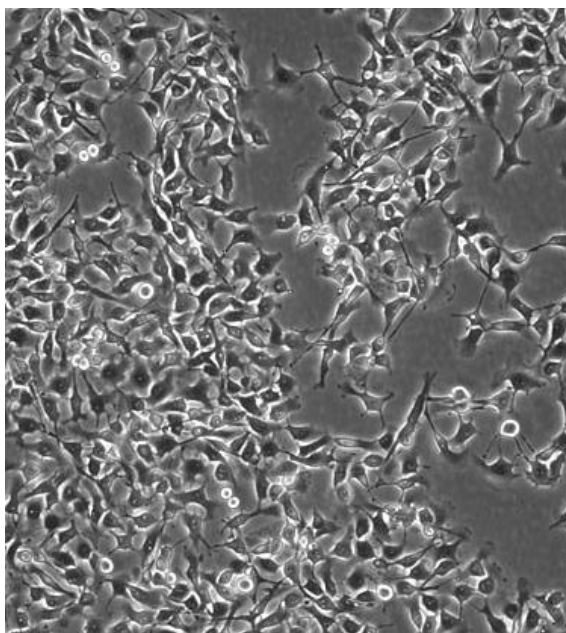


Figura 5.22. Línea celular de melanoma de ratón B16-F0 en DMEM High Glc, 10% FSB y 1% Penicilina/Estreptomicina [S. Sillagi (2008)].

Al trabajar con células de melanoma, sólo es evaluada la actividad Difenolasa de tirosinasa. Como se describió previamente (págs. 95-98), se ha observado que en la catálisis llevada a cabo por tirosinasa, L-DOPA actúa como sustrato de la enzima y como cofactor de su actividad hidroxilasa. En tirosinasa de mamíferos la afinidad de la tirosinasa por L-DOPA como cofactor es mayor que como sustrato, esto genera mayor hidroxilación de L-tirosina para dar L-Dopa. Por ello, la abundancia de Dopa generada por la reacción de síntesis de melanina, mantiene moléculas de enzima ocupadas en la actividad Difenolasa (hay una competencia) lo que se traduce en una INHIBICIÓN

PROGRESIVA DE LA ACTIVIDAD MONOFENOLASA. Por lo que, dado que dicha actividad sería muy baja o nula, se mide espectrofotométricamente la actividad Difenolasa de tirosinasa. La actividad Monofenolasa para tirosinasa de mamíferos se mide a través de un método Radiométrico, en donde se acota la detección a la primera reacción por unión de tritio (Winder, et al 1991).

5.3.1. Metodología. Ver Capítulo 7.

5.3.2. Evaluación de 8PP y triangularina. Tirosinasa aislada de células B16F0

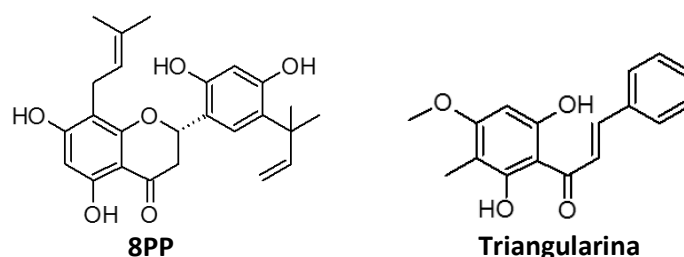


Figura 5.23. Flavanona **8PP**, aislada de raíces de *D. elegans* y *D. pazensis*, y chalcona triangularina aislada de partes aéreas de *D. elegans*.

8PP y **triangularina**, los compuestos más activos sobre tirosinasa de hongos, fueron evaluados sobre tirosinasa extraída de células de melanoma de ratón B16, y sus actividades, comparadas con la del inhibidor de referencia AK, en idénticas condiciones. En todos los casos se observó una inhibición concentración-dependiente. Tanto el compuesto **8PP** como **triangularina**, resultaron ser más activos que el inhibidor de referencia (Tabla 5.6). Los valores de Cl_{50} fueron calculados empleando una estimación no lineal del gráfico de %inhibición vs. log de la concentración (Fig. 5.24). El valor de Cl_{50} para **8PP** fue de $6,72 \pm 0,04 \mu M$, para triangularina fue de $31,6 \pm 0,7 \mu M$ y para el AK fue de $89,7 \pm 0,4 \mu M$. (Tabla 5.6 y Figura 5.25).

Compuesto	Inhibición a 10 μM (%)	Inhibición a 100 μM (%)	Cl_{50} (μM)
8PP	64,0460 \pm 0,0001	86,0506 \pm 0,0001	6,72\pm0,04
triangularina	43,73684 \pm 0,0001	61,42632 \pm 0,0001	31,6\pm0,7
ác. kójico	7,3038 \pm 0,0002	56,6045 \pm 0,0001	89,7\pm0,4

Tabla 5.6. %Inhibición y Cl_{50} de **8PP** y triangularina sobre tirosinasa aislada de células de melanoma humano B16. Control positivo AK.

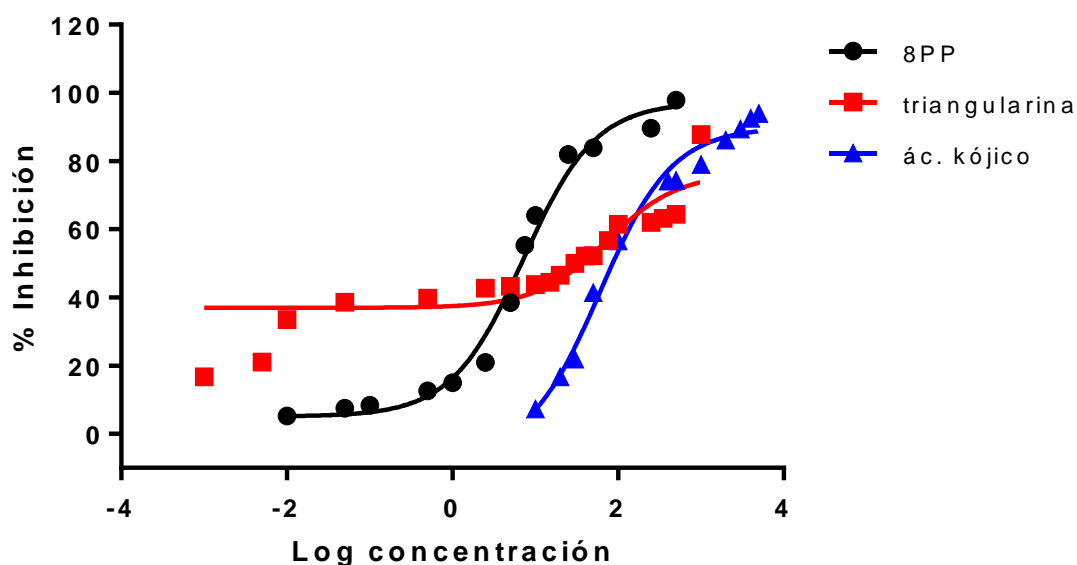


Figura 5.24. Gráfico de % Inhibición vs. Logaritmo de la concentración de 8PP y triangularina aislado de *D. elegans* y el inhibidor de referencia AK.

8PP resulta ser 13 veces más activo que AK, mientras que **triangularina** es aproximadamente 3 veces más activo respecto a dicho inhibidor de referencia. Se observa así, que estos compuestos son activos como inhibidores no sólo sobre tirosinasa aislada de hongos, sino también en tirosinasa aislada de melanoma de ratón B16, modelo que se aproxima más a un nivel de escala humana.

5.4. Actividad de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16F0: influencia sobre la melanina extracelular y tirosinasa intracelular

Dado que **8PP** y **triangularina** mostraron ser activos sobre tirosinasa aislada de línea celular, se evaluó el efecto sobre células de melanoma de ratón, para determinar si dichos compuestos son permeables a la membrana celular y afectan la producción de melanina, mediante la evaluación de los niveles de melanina extracelular.

5.4.1. Metodología. Ver Capítulo 7.

5.4.2. Determinación de Viabilidad Celular y evaluación sobre la melanogénesis

En este punto fue determinada la viabilidad celular frente al tratamiento con los compuestos naturales y el inhibidor de referencia. A concentraciones no citotóxicas se determinó el porcentaje de melanina extracelular tras dicho tratamiento. Posteriormente, se llevó a cabo la evaluación de la actividad inhibitoria de estos compuestos sobre tirosinasa intracelular.

CAPÍTULO 5: Actividad de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16: influencia sobre la melanina extracelular y tirosinasa intracelular.

En cuanto a **8PP**, se observó que la máxima concentración no citotóxica (MCNC) fue de $(10 \pm 1) \mu\text{M}$, la MCNC de **triangularina** fue de $(100 \pm 2) \mu\text{M}$ y la del inhibidor de referencia **AK**, $(5000 \pm 10) \mu\text{M}$ (Figura 5.25), por lo que, estos resultados permitirían inferir que el **AK** presentaría una menor citotoxicidad sobre las células de melanoma de ratón B16 respecto a lo obtenido para **8PP** y **triangularina**.

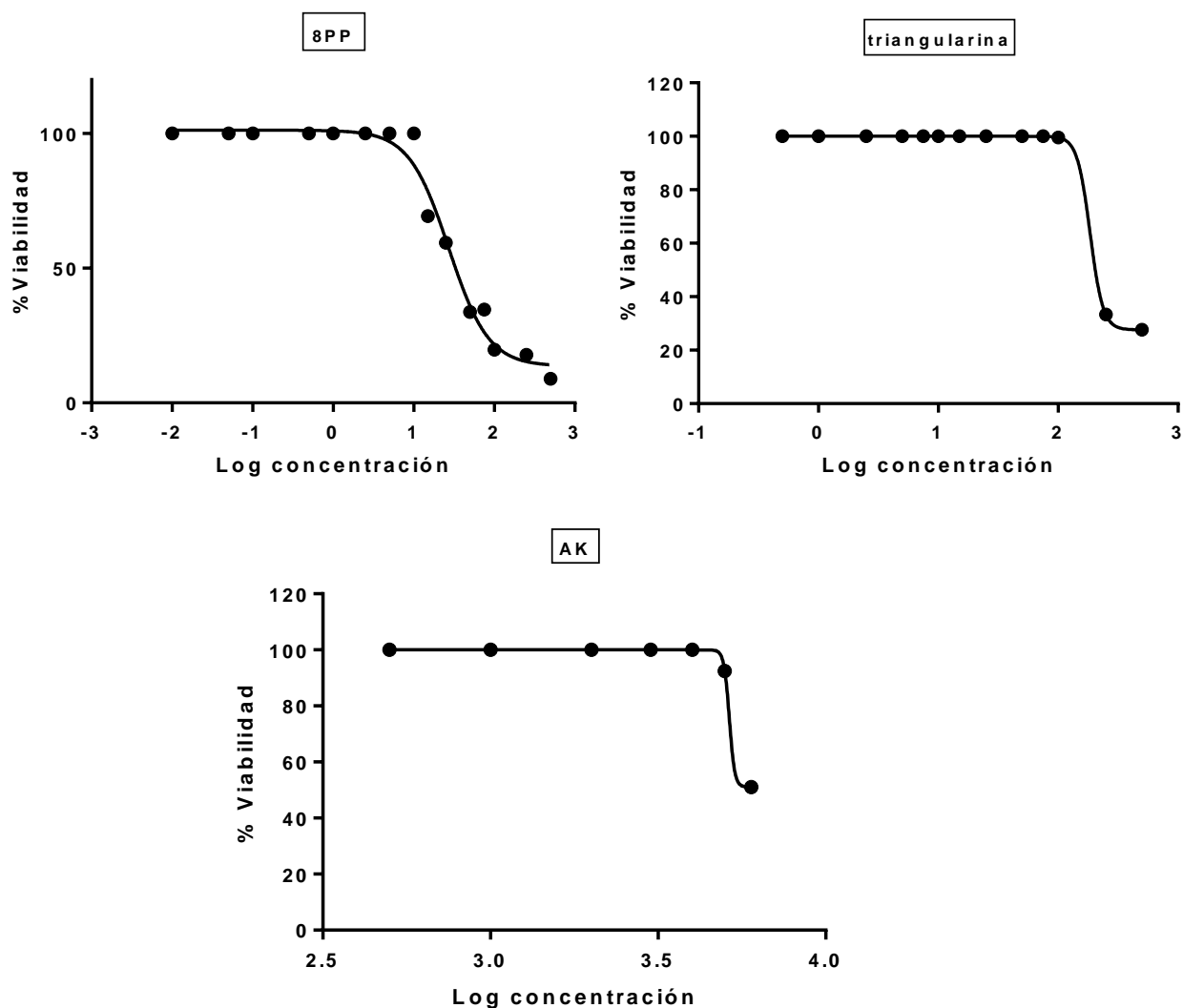


Figura 5.25. Gráficos de % Viabilidad celular vs. Logaritmo de la concentración de 8PP, triangularina y AK sobre tirosinasa en células de melanoma de ratón B16.

Los resultados obtenidos de los ensayos de viabilidad celular, permitieron así seleccionar diferentes concentraciones por debajo de las MCNC de cada compuesto, para ser posteriormente evaluados sobre la producción de la melanina extracelular (Tabla 5.7).

CAPÍTULO 5: Actividad de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16: influencia sobre la melanina extracelular y tirosinasa intracelular.

AK (μM)	% Melanina extracelular	8PP (μM)	% Melanina extracelular	triangularina (μM)	% Melanina extracelular
500	61,2±1,1	0,1	61,2±0,9	0,5	88,4±1,1
1000	61,2±1,2	0,5	61,2±1,1	5	74,8±1,0
2000	47,6±1,1	1	47,6±1,1	10	57,8±1,0
3000	38,8±1,1	2,5	54,4±1,0	25	47,6±1,3
4000	29,9±1,0	5	40,8±1,0	50	44,2±1,2
5000	20,2±1,2	10	40,8±1,0	100	40,8±1,3

Tabla 5.7. Tabla de % Melanina extracelular en células de melanoma de ratón B16.

De la tabla se desprende que para disminuir aproximadamente un 50% de la melanina extracelular, las concentraciones necesarias de **8PP** y **triangularina** son de 1 y 25 μM, mientras que para el inhibidor de referencia la concentración necesaria es de 2000 μM. Por lo que **8PP** y **triangularina**, serían 2000 y 80 veces más activos que AK, respectivamente, tomando como 100% de melanina extracelular la generada por las células B16, sin el tratamiento con los compuestos naturales.

Dados los resultados obtenidos, y con el objeto de establecer las causas de dicha disminución, se decidió evaluar la influencia de estos compuestos sobre tirosinasa intracelular. Debido a que ninguno de los compuestos logró establecer inhibiciones mayores al 45% sobre dicha enzima, a concentraciones no citotóxicas para estas células, se informan los datos de % de inhibición para cada uno de ellos, a sus MCNC. **8PP**, a 10 μM, lleva a cabo una inhibición de tirosinasa intracelular del (34,2±0,2) %. Por otra parte, **triangularina** a 100 μM, presenta una inhibición de (20,1±0,3) %. El inhibidor de referencia AK, presenta una inhibición de (45,4±0,1) %, a 5000 μM (Figura 5.26, Tabla 5.8).

CAPÍTULO 5: Actividad de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16: influencia sobre la melanina extracelular y tirosinasa intracelular.

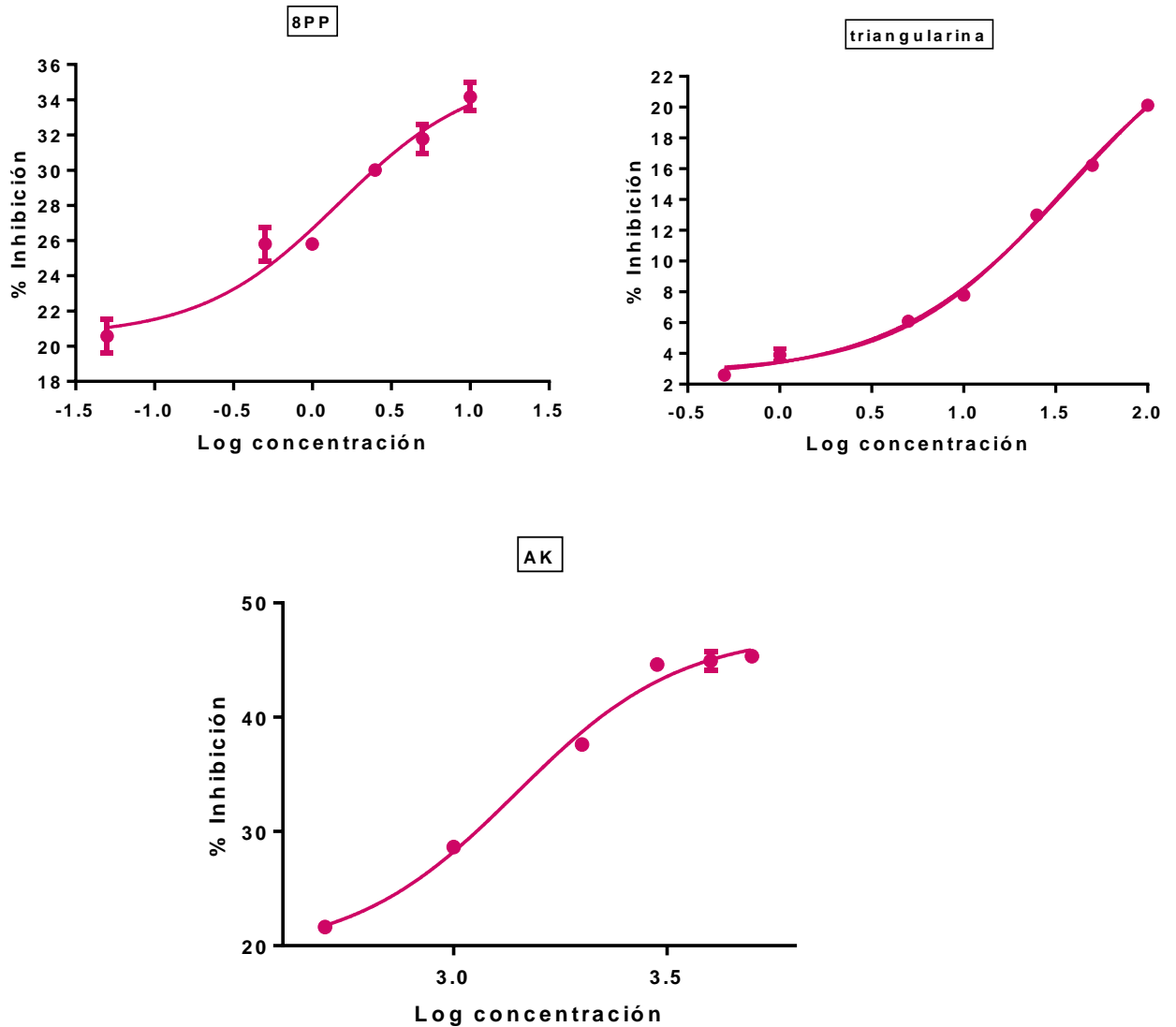


Figura 5.26. Gráfico de % Inhibición vs. Logaritmo de la concentración de 8PP, triangularina y AK sobre células de melanoma de ratón B16.

Comparando los % de inhibición de los flavonoides, a sus MCNC, con el del inhibidor de referencia, observamos que **8PP** sería unas 125 veces más activo que AK, mientras que **triangularina** sería aproximadamente 5 veces más activa que AK (Tabla 5.8).

Compuesto	Concentración	% Inhibición tirosinasa
8PP	10 μ M	(34,2 \pm 0,2) %
AK	1250 μ M	(34,2 \pm 0,1) %
triangularina	100 μ M	(20,1 \pm 0,3) %
AK	486 μ M	(20,1 \pm 0,1) %

Tabla 5.8. Comparación de los % Inhibición de tirosinasa en células de melanoma de ratón B16 de 8PP y triangularina, a sus MCNC, con el inhibidor de referencia AK.

Estos resultados nos permiten inferir, al menos en parte, que la disminución de la melanina extracelular observada es producida por una inhibición de la tirosinasa a nivel intracelular, siendo estos compuestos capaces de atravesar la membrana celular en células de melanoma de ratón B16.


5.5. Conclusiones

- Todos los flavonoides obtenidos de ambas especies de *Dalea* fueron evaluados en cuanto a su actividad sobre tirosinasa de hongos en las fases Mono y Difenolasa.
- En la reacción Monofenolasa, (-)-(2S)-2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**8PP**) y 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-3'-metilchalcona (**triangularina**), presentaron una importante actividad, dando a conocer el mecanismo cinético de acción sobre dicha enzima. Tanto **8PP** como **triangularina** presentaron una inhibición Reversible. En el caso de **8PP** esta inhibición fue del tipo Competitiva, y para **triangularina** Acompetitiva. El resto de los compuestos evaluados, presentaron una actividad moderada (8P, demetoximateucinol y Me8PP) baja (comptonina, DMF y pazentina A), o bien, resultaron ser inactivos (pazentina B), sobre tirosinasa. Esto podría deberse a que no presentan todos los requisitos estructurales descritos como necesarios (resorcinol 4-sustituído en el anillo B (Lee *et al.*, 2004) y anillo floriglucinol 4-sustituído en el anillo A (Peralta *et al.*, 2011) para presentar actividad como inhibidores, como es el caso de **8PP**.
- En cuanto a la actividad Difenolasa de tirosinasa aislada de hongos, se observó que los compuestos aislados de *D. elegans* fueron también activos sobre esta reacción pero en menor magnitud que sobre la Monofenolasa, lo que podría estar relacionado a la conformación que adopta la enzima en cada reacción en su sitio activo para unirse al sustrato, dicha conformación difiere y por lo tanto se vería modificada la afinidad hacia los compuestos conforme a sus estructuras químicas. A su vez, dos compuestos aislados de *D. pazensis*, Me8PP y pazentina B, presentaron efecto estimulador sobre la actividad Difenolasa catalizada por tirosinasa. Me8PP fue el único compuesto, de todos los evaluados, que tuvo un efecto dual, siendo inhibidor sobre la reacción Monofenolasa, y estimulador sobre la reacción de Difenolasa.

CAPÍTULO 5: Actividad de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16: influencia sobre la melanina extracelular y tirosinasa intracelular.

- Empleando tirosinasa aisladas de células de melanoma de ratón B16, la cual posee similitud a nivel de los aminoácidos que la conforman con la tirosinasa humana, se observó que **8PP** resultó ser trece veces más activo y **triangularina** tres veces más activo que el inhibidor de referencia, evaluando la actividad Difenolasa de tirosinasa.
- Asimismo, estos compuestos produjeron una disminución de aproximadamente el 50% en los niveles de melanina extracelular, siendo **8PP** y **triangularina** dos mil y ochenta veces más activos que ácido kójico, tras la comparación de la concentración de cada compuesto necesaria para dicha disminución. Uno de los posibles mecanismos para esta actividad, estaría relacionado a la capacidad que ellos mostraron de inhibir la tirosinasa intracelular. **8PP** demostró ser cientoveinticinco veces más activo y **triangularina** aproximadamente cinco veces más activo que el ácido kójico, comparando la concentración responsable de cada compuesto necesaria para efectuar dicha inhibición. No obstante, serían necesarios mayores estudios que permitan evaluar si dichos compuestos además de inhibir la enzima tirosinasa por unión a su sitio activo, actúan adicionalmente a nivel de la expresión transcripcional y proteica de las enzimas que regulan la biosíntesis de melanina (Tyr, Tyrp1 y Tyrp2) estableciendo así probables mecanismos a través de los cuales estos compuestos ejercerían su acción.

**CAPÍTULO 6: EVALUACIÓN DE
LA COMBINACIÓN DE
FLAVONOIDES ACTIVOS DEL
GÉNERO *Dalea* Y ÁCIDO KÓJICO
SOBRE TIROSINASA**



6.1. Antecedentes

Las combinaciones de fármacos han sido utilizadas para el tratamiento de enfermedades desde tiempos remotos. Ya en el siglo pasado, la Farmacología, reconocía los beneficios que ejercía la combinación de principios activos. Se ha observado que el tratamiento con un único principio activo actuando sobre una diana específica, es menos eficaz que el multitratamiento con principios activos combinados, que actúan a niveles diferentes, potenciando así la actividad terapéutica (Zimmermann *et al.*, 2007; Biavatti, 2009; Lehàr *et al.*, 2009), tal es el ejemplo de tratamientos empleados para enfermedades como SIDA, cáncer, hipertensión arterial, entre otras. A medida que la tecnología del aislamiento de productos naturales y la capacidad de síntesis química avanza, las combinaciones de fármacos han sido más definidas y sofisticadas y su alcance se sigue ampliando.

Se ha intentado, medir cuantitativamente las relaciones dosis-efecto de cada fármaco por separado y de sus combinaciones, con el objeto de determinar si una combinación de fármacos posee o no, un efecto potenciador. A partir de esto, se han generado numerosos modelos, enfoques, hipótesis y teorías para poder analizar la combinación de fármacos, dado que tanto los sistemas biológicos, como los modelos de dosis-efecto son muy complejos. La principal diferencia entre aquellos modelos y el desarrollado por Chou *et al.*, es que en este modelo se evalúan las combinaciones mediante análisis físico-químicos y teorías verificables matemáticamente empleando ecuaciones, algoritmos, entre otros. Existen numerosas definiciones de los posibles efectos observados tras la combinación de fármacos, la mayoría de ellas comparte lo indicado por Tallarida *et al.*, 2012:

- **Sinergismo:** se presenta cuando el efecto farmacológico de las drogas combinadas es mayor al observado para las drogas individualmente
- **Antagonismo:** se observa cuando el efecto farmacológico de la combinación es menor al efecto mostrado por las drogas individualmente.
- **Aditivismo:** el efecto farmacológico mostrado por las drogas combinadas es igual a la suma de sus efectos individuales.

¿Por qué evaluar la combinación?

El uso de la combinación de medicamentos se puede orientar a diferentes objetivos, por ejemplo, hacia el tratamiento de enfermedades en donde se ha detectado resistencia a los fármacos usuales, al tratamiento de enfermedades múltiples simultáneamente, entre otros. Fármacos con diferentes mecanismos o modos de acción se pueden combinar para dirigir el efecto hacia una enfermedad o enfermedades múltiples tratándolas de manera más eficaz.

Se ha demostrado que las combinaciones sinérgicas de fármacos son altamente eficaces y terapéuticamente más específicas. El antagonismo de la droga, en contraste, es a menudo indeseable, pero podría ser útil en la selección contra las mutaciones resistentes a los fármacos (Yin *et al.*, 2014).

Los posibles resultados favorables para sinergismo incluyen:

- ✓ incrementar la eficacia del efecto terapéutico,

- ✓ disminuir la dosis, viéndose esto traducido a una disminución en la toxicidad, siempre aumentando o manteniendo la misma eficacia terapéutica,
- ✓ minimizar o ralentizar el desarrollo de resistencia a los medicamentos, y
- ✓ proporcionar sinergia selectiva frente a un objetivo.

Estos beneficios terapéuticos pueden ser logrados gracias al empleo de combinaciones de fármacos, convirtiéndose en la principal elección para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y las enfermedades infecciosas, incluyendo al SIDA (Chou *et al.*, 2006).

Existen numerosos reportes en los que se informan combinaciones de productos naturales con drogas sintéticas, mostrando mejoras en la terapéutica a menores dosis, algunos ejemplos de las mismas se describen a continuación.

Se realizó un análisis isoblográfico para evaluar la interacción sinérgica de dos combinaciones: ácido elálgico y quercetina con resveratrol, evaluando la inducción de la actividad de caspasa-3. Se confirmó, en ambos casos, una interacción sinérgica con un índice de combinación (IC) de 0,64 para la primera combinación y 0,68 para la de quercetina y el resveratrol. Los resultados indicarían que el potencial anticancerígeno de los alimentos que contienen polifenoles (Figura 6.1.) no estaría basada en los efectos de los compuestos individuales, sino en una combinación sinérgica que potenciaría los efectos contra el cáncer (Mertens-Talcott *et al.*, 2005).

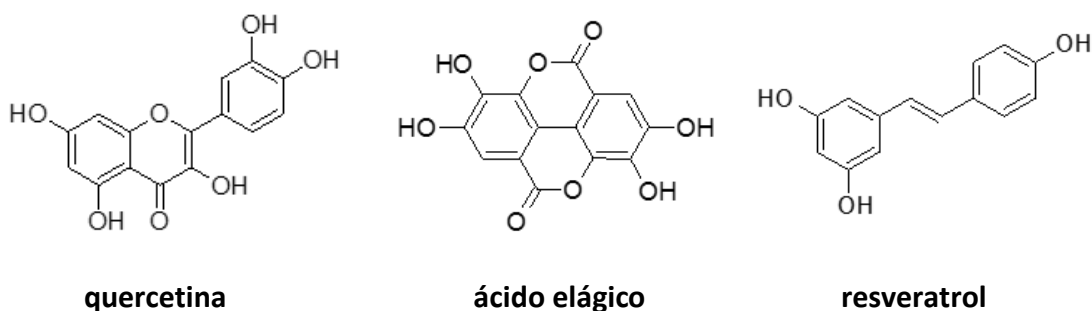


Figura 6.1. Compuestos combinados con efecto sinérgico como anticancerígenos.

An *et al.*, 2011 evaluó la actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) de taxifolina-7-O- α -L-ramnopiranosida (TR) combinado con antibióticos convencionales [ampicilina (AMP), levofloxacina (LEV), ceftazidima (CAZ) y azitromicina (AZM)]. Se observaron importantes efectos sinérgicos en las combinaciones TR/CAZ y TR/LEV, por otra parte en las combinaciones TR/AMP y TR/AZM fueron observados efectos sinérgicos y de aditivismo. Estos resultados indicaron que TR aumenta la eficacia de CAZ y LEV *in vitro*, por lo que dichas combinaciones podrían ser empleadas para el tratamiento de pacientes infectados con MRSA (Figura 6.2.).

Eumkeb *et al.*, 2012 informó la combinación del flavonoide luteolina con amoxicilina para el tratamiento de cepas de *Escherichia coli* resistentes a amoxicilina (AREC). Los resultados indicaron que luteolina tiene el potencial para revertir la resistencia bacteriana a amoxicilina en AREC y puede operar a través de tres mecanismos: inhibición de proteínas y síntesis de peptidoglicanos, la inhibición de la

actividad de ciertas β -lactamasas de espectro extendido y alteración de permeabilidad de la membrana exterior e interior. Estos resultados ofrecen el potencial para desarrollar una nueva generación de fitofármacos para tratar AREC (Figura 6.2.).

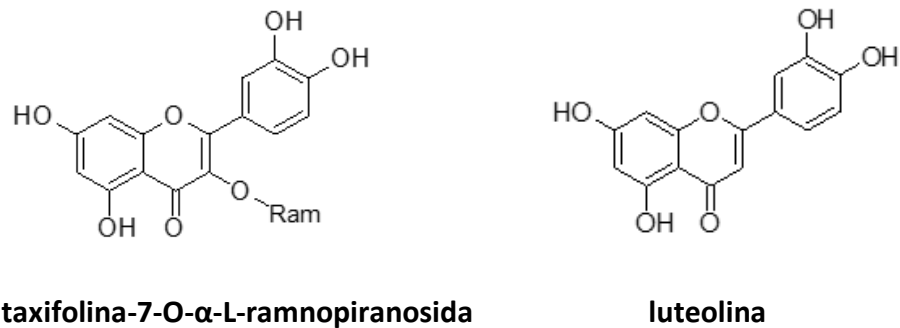


Figura 6.2. Flavonoides con efectos sinérgicos en combinación con antibióticos.

Además de los descriptos anteriormente, existen numerosos trabajos de investigación, que muestran la importancia de las terapias múltiples, para cubrir diferentes targets farmacológicos, disminuyendo las dosis y efectos adversos e incrementando el potencial farmacéutico.

Los antecedentes anteriormente expuestos, nos llevó a evaluar la combinación de compuestos naturales aislados del género *Dalea*, que resultaron ser activos sobre tirosinasa, y un agente despigmentante de la piel empleado actualmente, AK que presenta numerosos efectos adversos (hepatocarcinogenicidad, mutagenicidad, dermatitis alérgica) con el objetivo de disminuir su dosis, para, de esta manera, disminuir la incidencia de efectos adversos, siempre manteniendo la eficacia terapéutica o bien incrementándola.

Esta combinación se evaluó sobre la actividad de tirosinasa de hongos, y sobre células de melanoma de ratón B16.

6.2. Evaluación de combinaciones flavonoides/ác. kójico sobre tirosinasa de hongos

6.2.1. Metodología. Ver Capítulo 7.

6.2.2. Evaluación de las combinaciones sobre actividad Monofenolasa

Se procedió a evaluar las combinaciones:

- ✓ ácido kójico (AK)/(-)-(2S)-2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (8PP): **AK/8PP**.
- ✓ 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-3'-metilchalcona (triangularina) con ácido kójico: **AK/triangularina** (Figura 6.3).

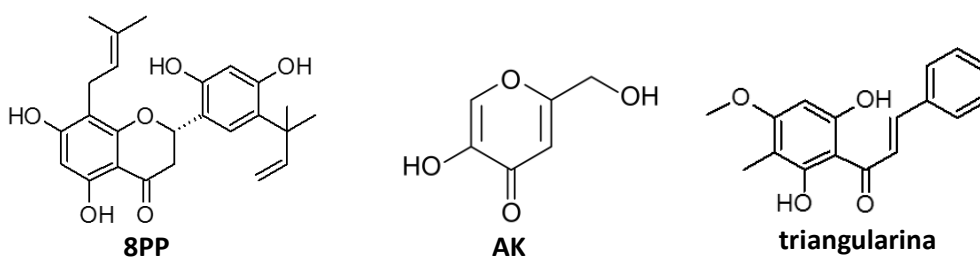


Figura 6.3. Estructuras químicas de 8PP y triangularina, aislado de partes aéreas de *Dalea elegans* y ácido kójico, blanqueador empleado actualmente.

Se decidieron preparar combinaciones de concentraciones de **8PP** de 20, 10, 5 y 2,5 μM (correspondientes a 2,5; 5; 10 y 20 veces por debajo de sus Cl_{90}) con concentraciones de **AK** de 40, 20, 10 y 5 μM (correspondientes a 2,5; 5; 10 y 20 veces por debajo de sus Cl_{90}), respectivamente, sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa. Los porcentajes de inhibición obtenidos para cada compuesto individualmente evaluado, y los resultantes de sus combinaciones se presentan en la Tabla 6.1. En ésta se puede apreciar como la inhibición ejercida por las combinaciones, en todos los casos, es mayor que la ejercida por los compuestos en forma individual.

VECES por debajo de su Cl_{90}	COMBINACIONES DE AK/8PP				
	Concentración combinada de 8PP	8PP (Cl_{90} 50 μ M)	AK/8PP	AK (Cl_{90} 100 μ M)	Concentración combinada de AK
2,5	20 μ M	71,2 \pm 8,2%	^a 90,2 \pm 2,2%	78,4 \pm 4,0%	40 μ M
5	10 μ M	46,94 \pm 1,0%	^b 82,1 \pm 1,0%	61,29 \pm 1,0%	20 μ M
10	5 μ M	27,3 \pm 1,0%	^b 65,08 \pm 1,5%	41,0 \pm 1,0%	10 μ M
20	2,5 μ M	18,5 \pm 1,6%	^b 38,34 \pm 2,4%	22,38 \pm 0,4%	5 μ M

Tabla 6.1. Valores de Cl_{90} y % de inhibición 8PP y AK individuales y de sus combinaciones, sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa de hongos: ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,001$ vs. AK.

Por otra parte, de la misma manera se combinaron concentraciones de **triangularin** de 67,2; 33,6; 16,8 y 8,4 μ M (correspondientes a 2,5; 5; 10 y 20 veces por debajo de sus Cl_{90}) con concentraciones de **AK** de 40, 20, 10 y 5 μ M (correspondientes a 2,5; 5; 10 y 20 veces por debajo de sus Cl_{90}). Los porcentajes de inhibición se presentan en la Tabla 6.2, en la que se puede apreciar como la inhibición ejercida por las combinaciones, en todos los casos, es mayor que la ejercida por los compuestos en forma individual.

VECES por debajo de su Cl_{90}	COMBINACIONES DE AK/triangularina				
	Concentración combinada de triangularina	triangularina (Cl_{90} 168 μ M)	AK/triangularina	AK (Cl_{90} 100 μ M)	Concentración combinada de AK
2,5	67,2 μ M	54,6 \pm 6,4%	^a 94,29 \pm 1,0%	78,4 \pm 4,0%	40 μ M
5	33,6 μ M	31,2 \pm 3,0%	^b 79,08 \pm 1,0%	61,29 \pm 1,0%	20 μ M
10	16,8 μ M	14,6 \pm 5,2%	^b 64,13 \pm 1,5%	41,0 \pm 1,0%	10 μ M
20	8,4 μ M	9,1 \pm 1,0%	^b 32,35 \pm 1,6%	22,38 \pm 0,4%	5 μ M

Tabla 6.2. Valores de Cl_{90} y % de inhibición triangularina y AK individuales y de sus combinaciones, sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa de hongos: ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,001$ vs. AK.

Chou & Talalay en 1983 introducen el término de *Índice de Combinación (IC)* parámetro que hace referencia a la sumatoria del cociente entre el porcentaje de inhibición de la combinación y el porcentaje de inhibición de cada compuesto individual, a la concentración evaluada, teniendo en cuenta un sistema de primer orden. Este indicador es empleado para la cuantificación de sinergismo, antagonismo o aditivismo entre principios activos combinados. Chou & Talalay proveen las bases teóricas a partir de las cuales se puede graficar y determinar cuantitativamente el efecto de la combinación de drogas, en donde un valor de $IC < 1$, 1 , y > 1 indican efecto sinérgico, aditivo y antagónico, respectivamente. La Tabla 6.2 muestra los valores de IC obtenidos para cada una de las combinaciones.

Veces CI_{90}	IC AK/8PP	IC AK/triangularina
2,5	0,756	0,309
5	0,677	0,541
10	0,723	0,514
20	0,908	0,808

Tabla 6.3. Valores de IC (Índice de combinación), para las distintas combinaciones AK/8PP y AK/triangularina.

Podemos observar que todas las combinaciones presentan un efecto sinérgico, dado por valores de $IC < 1$, en donde la actividad inhibidora de tirosinasa llevada a cabo por **AK** se ve mejorada (Tabla 6.1).

La representación de los IC versus la fracción de actividad (F_a), permiten observar la situación gráfica de una combinación sinérgica, aditiva o antagónica, tal como puede observarse en la Figura 6.5.

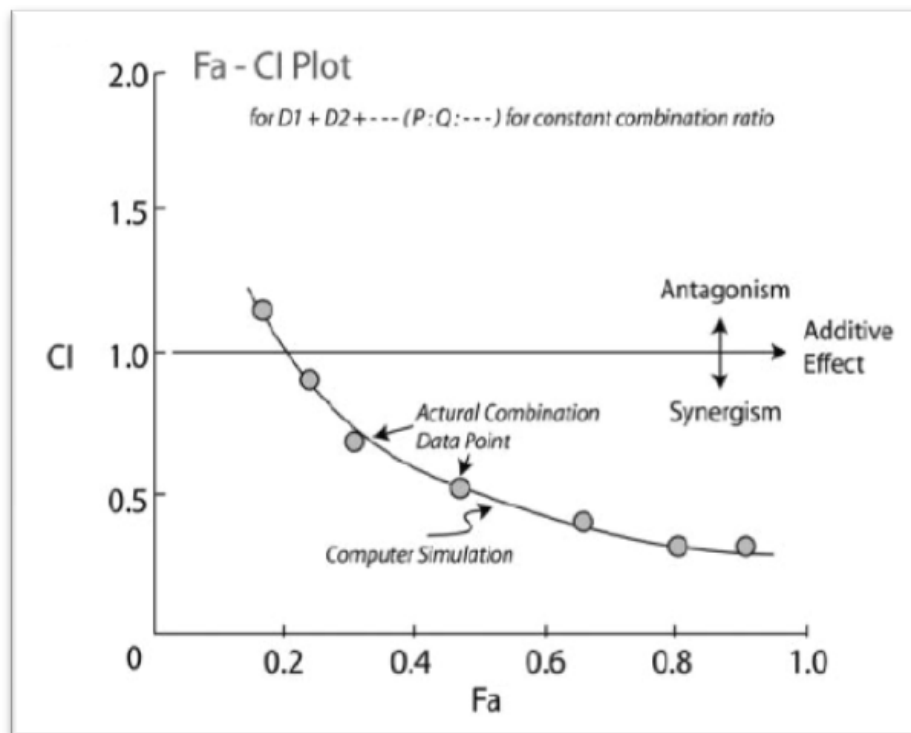


Figura 6.5. Gráfico de IC (índice de combinación) vs. fracción de actividad (Fa: %inhibición/100) (Chou & Talalay, 1983).

Para el caso de las combinaciones AK/8PP y AK/triangularina, debido a que las concentraciones combinadas guardan un radio constante, el software simula una curva, y, en concordancia con los valores de CI, muestran un efecto sinérgico para ambos casos (Figura 6.6.)

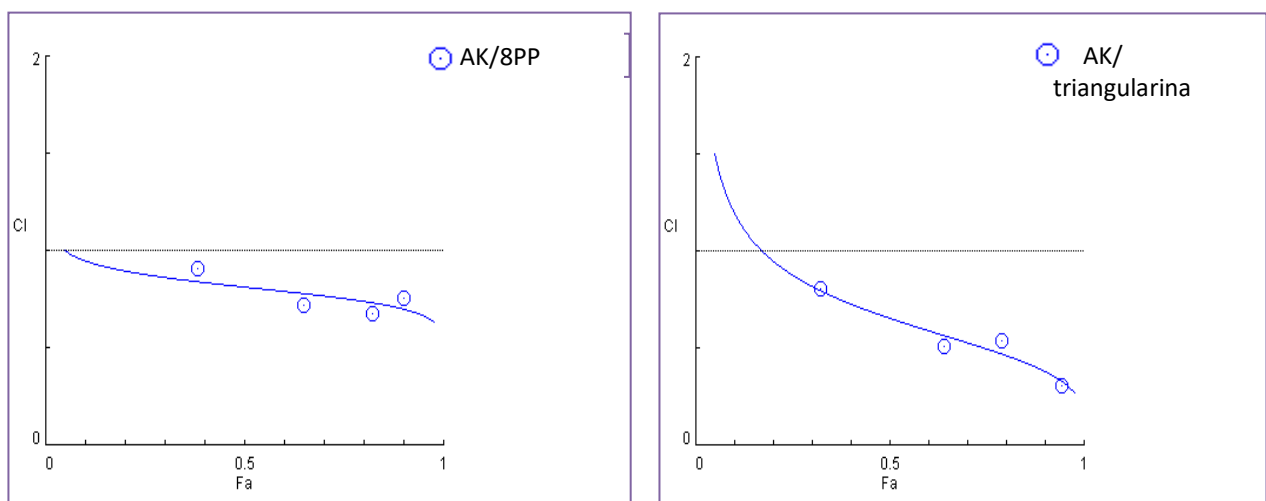


Figura 6.6. Gráficos de IC (índice de combinación) vs. fracción de actividad (Fa: %inhibición/100) para las combinaciones de AK/8PP y AK/triangularina.

De esta manera podemos apreciar como la combinación de AK con los compuestos **8PP** y **triangularina** obtenidos ambos de partes aéreas de *Dalea elegans*, presentan un importante efecto sinérgico sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa de hongos, potenciando la actividad biológica de **AK**. Dicho efecto, a su vez, se observa mayormente potenciado en la combinación de **AK** con **triangularina** frente a la combinación con **8PP**, lo que se encuentra evidenciado por los menores valores de *IC* observados en la primera. Consideramos que este efecto diferenciado podría deberse al tipo de inhibición que lleva a cabo cada compuesto sobre la enzima, en la reacción Monofenolasa. Tanto **8PP** como **AK** son inhibidores competitivos, por lo que se encontrarían compitiendo con el sustrato y entre ellos por la unión enzimática, mientras que, en el caso de **triangularina** la inhibición que presenta es de tipo Acompetitiva, uniéndose tanto a la enzima libre como al complejo enzima-sustrato, permitiendo así la unión de **AK**, simultáneamente. No obstante, otros estudios deberían realizarse para poder verificar esta teoría.

Los resultados indican que todas las combinaciones de **AK/8PP** y **AK/triangularina**, permitieron mejorar el efecto biológico de **AK**, hecho que impactaría directamente sobre la disminución de los efectos adversos que han sido informados para este compuesto, dado que podrían ser empleadas menores concentraciones de **AK** con una mayor potencia biológica.

6.2.3. Evaluación de las combinaciones sobre actividad Difenolasa

Para estudiar el efecto de la combinación sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa, se evaluaron las combinaciones de **AK/8PP** y **AK/triangularina** a concentraciones de 2,5; 5; 10 y 20 veces por debajo de sus *Cl*₉₀ individuales, de manera similar a lo indicado para la actividad Monofenolasa. En la Tabla 6.3 se muestran los porcentajes de inhibición de cada compuesto y los resultantes de sus combinaciones, en donde se observa, al igual que en la actividad Monofenolasa, una actividad inhibidora de tirosinasa mayor en las combinaciones, respecto de las ejercidas individualmente por cada compuesto.

VECES por debajo de su <i>Cl</i> ₉₀	COMBINACIONES DE AK/8PP				
	Concentración combinada de 8PP	8PP (<i>Cl</i> ₉₀ 295 μM)	AK/8PP	AK (<i>Cl</i> ₉₀ 200 μM)	Concentración combinada de AK
2,5	118 μM	58,6±0,3%	^a 94,8±3,0%	82,7±2,0%	80 μM
5	23,6 μM	21,8±2,0%	^a 56,7±2,0%	49,6±0,1%	16 μM
10	2,36 μM	5,4±0,3%	^a 12,8±2,0%	3,6±0,4%	1,6 μM
20	0,118 μM	0,95±0,3%	^a 4,2±0,2%	0,9±0,2%	0,08 μM

Tabla 6.4. Valores de *Cl*₉₀ y % de inhibición de 8PP y AK individuales y de sus combinaciones, sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa de hongos: ^ap<0,001 vs. AK.

VECES por debajo de su Cl_{90}	COMBINACIONES DE AK/triangularina				
	Concentración combinada de triangularina	triangularina (Cl_{90} 170 μ M)	AK/triangularin	AK (Cl_{90} 200 μ M)	Concentración combinada de AK
2,5	68 μ M	51,5 \pm 0,4%	^b 87,5 \pm 0,3%	82,7 \pm 2,0%	80 μ M
5	13,6 μ M	11,5 \pm 0,5%	^a 57,7 \pm 0,8%	49,6 \pm 0,1%	16 μ M
10	1,36 μ M	1,2 \pm 0,1%	^a 3,6 \pm 0,9%	3,6 \pm 0,4%	1,6 μ M
20	0,068 μ M	0,3 \pm 0,1%	1,4 \pm 0,3%	0,9 \pm 0,2%	0,08 μ M

Tabla 6.5. Valores de Cl_{90} y % de inhibición de triangularina y AK individuales y de sus combinaciones, sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa de hongos: ^a $p < 0,001$ ^b $p < 0,05$ vs. AK.

La Tabla 6.6 muestra los valores de IC obtenidos para cada una de las combinaciones con compuestos naturales que presentaron cambios estadísticamente significativos en el % de inhibición de tirosinasa frente a AK.

Veces Cl_{90}	IC AK/8PP	IC AK/triangularina
2,5	0,202	0,567
5	0,760	0,662
10	0,962	0,691
20	0,206	-----

Tabla 6.6. Valores de IC (Índice de combinación), para las distintas combinaciones.

Todas las combinaciones mostraron un $IC < 1$, lo que manifiesta un efecto sinérgico.

Al analizar el gráfico de IC vs. F_a para ambas combinaciones **AK/8PP** y **AK/triangularina**, en la Figura 6.7, se expone claramente un efecto sinérgico de las mismas. En este caso, las concentraciones combinadas no presentaron un radio constante, por lo que en los gráficos, el software no simula una curva, y sólo observamos la ubicación de los puntos experimentales.

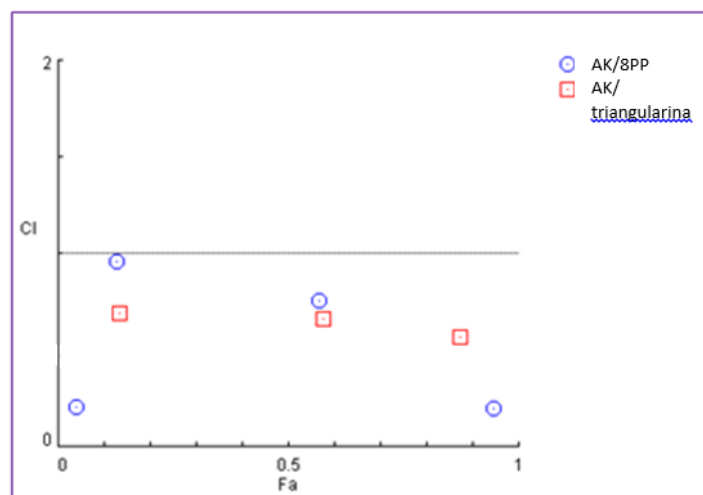


Figura 6.7. Gráficos de IC (índice de combinación) vs. fracción de actividad (Fa: %inhibición/100) para las combinaciones de AK/8PP y AK/triangularina.

Así, la combinación de **AK** con los compuestos **8PP** y **triangularina**, sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa de hongos, presentan un importante efecto sinérgico, lo cual reforzaría lo demostrado para la actividad Monofenolasa, pudiendo estos compuestos ser empleados posiblemente para potenciar la actividad biológica de **AK**, pudiendo disminuir sus efectos adversos.

6.3. Evaluación de las combinaciones flavonoides/ác. kójico sobre células de melanoma de ratón B16F0

Con el objetivo de emplear un modelo más cercano a lo que sucedería en células de melanoma humano, es que se decidió evaluar la combinación de **8PP** y **triangularina** con **AK** sobre células de melanoma de ratón.

6.3.1. Metodología. Ver Capítulo 7.

6.3.2. Evaluación de la combinación de 8PP y triangularina con AK sobre actividad Difenolasa de tirosinasa intracelular

En este caso fue evaluado el efecto de la combinación en la actividad Difenolasa de tirosinasa de acuerdo a lo indicado en las págs. 119-120, en el cuál se detalla que la actividad Monofenolasa en línea celular sería muy baja o nula.

Debido a que en este modelo no contábamos con la estimación de las CI_{90} para cada compuesto (puesto que no fue alcanzado el 90% de inhibición), las concentraciones de cada uno de ellos en la combinación, fueron seleccionadas, de la siguiente manera:

- ✓ **8PP** y **triangularina**, acorde a sus MCNC (Máximas Concentraciones No Citotóxicas) y a la mitad de la misma,

✓AK, eligiendo dos concentraciones, en donde se observaba un rango de inhibición del 20-40% sobre tirosinasa intracelular en células de melanoma de ratón B16 .

Acorde con lo indicado, las combinaciones realizadas fueron las siguientes:

Nº de combinación	AK/8PP (µM)	AK/triangularina (µM)
1	500/5	500/50
2	2000/5	2000/50
3	500/10	500/100
4	2000/10	2000/100

El análisis fue llevado a cabo de la misma manera que para el punto 6.2, se empleó el software Compusyn desarrollado por Chou *et al.* (Figura 6.7).

En la tabla 6.7 y 6.8. se pueden apreciar los valores de porcentaje de inhibición obtenidos para cada compuesto individualmente, como así también tras sus combinaciones, sobre tirosinasa intracelular. En esta tabla se observa un incremento de la actividad de AK estadísticamente significativo, en las combinaciones 1 y 3 con 8PP y en las 1, 2 y 3 cuando es combinado con triangularina.

COMBINACIÓN AK/8PP	COMBINACIONES DE AK/8PP				
	Concentración combinada de 8PP	8PP	AK/8PP	AK	Concentración combinada de AK
1	5 µM	31,8±0,8%	^a 36,5±1,0%	21,6±0,1%	500 µM
2	5 µM	31,8±0,8%	39,3±2,0%	37,6±0,1%	2000 µM
3	10 µM	34,2±1,5%	^a 40,2±1,0%	21,6±0,1%	500 µM
4	10 µM	34,2±1,5%	40,7±4,0%	37,6±0,1%	2000 µM

Tabla 6.7. Valores de CI_{90} y % de inhibición de 8PP y AK individuales y de sus combinaciones, sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa intracelular de línea celular de melanoma de ratón B16: ^ap<0,001 vs. AK.

COMBINACIÓN AK/T	COMBINACIONES DE AK/triangularina				
	Concentración combinada de triangularina	triangularina	AK/ triangularina	AK	Concentración combinada de AK
1	50 µM	16,2±0,2%	^a 32,2±4,0%	21,6±0,1%	500 µM
2	50 µM	20,1±0,1%	^b 32,7±1,0%	37,6±0,1%	2000 µM
3	100 µM	16,2±0,2%	^a 38,3±2,0%	21,6±0,1%	500 µM
4	100 µM	20,1±0,1%	43,9±6,0%	37,6±0,1%	2000 µM

Tabla 6.8. Valores de CI_{90} y % de inhibición de triangularina y AK individuales y de sus combinaciones, sobre la actividad Difenolasa de tirosinasa intracelular de línea celular de melanoma de ratón B16: ^a $p < 0,001$; ^b $p < 0,01$; vs. AK.

En la tabla 6.9. se expresan los valores de los IC, de las combinaciones 1 y 3 para **AK/8PP** y 1, 2 y 3 para **AK/triangularina** que mostraron diferentes % de inhibición estadísticamente significativos con respecto al llevado a cabo por **AK** de manera individual.

Veces CI_{90}	IC AK/8PP	IC AK/triangularina
1	0,538	0,474
2	-----	0,544
3	0,922	0,995

Tabla 6.9. Valores de IC (Índice de combinación), para las distintas combinaciones.

En la Figura 6.7, puede observarse que los puntos experimentales correspondientes al gráfico de IC vs. Fa. de las distintas combinaciones, denotan un efecto sinérgico, tanto para **AK/8PP** como para **AK/triangularina**.

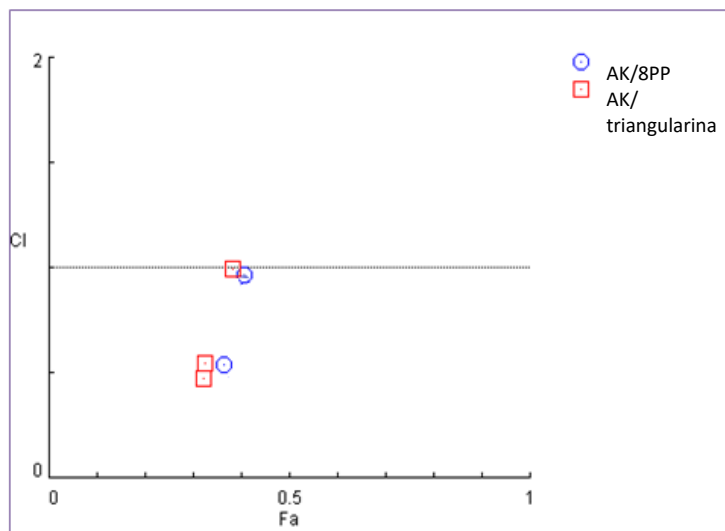


Figura 6.7. Gráficos de IC (índice de combinación) vs. fracción de actividad (Fa: %inhibición/100) para las combinaciones de AK/8PP y AK/triangularina.

De esta manera podemos apreciar como la combinación de **AK** con los compuestos **8PP** y **triangularina** obtenidos ambos de *Dalea elegans*, presentan un efecto sinérgico sobre la actividad de tirosinasa intracelular en células de melanoma de ratón B16, potenciando la actividad biológica de **AK**.

Estos resultados indicarían que la combinación entre estos compuestos naturales y **AK**, no sólo es viable en un modelo *in vitro* como lo es la tirosinasa aislada de hongos, sino también en un modelo *ex in vivo*, cuya homología entre la tirosinasa de células de melanoma de ratón B16 y la tirosinasa de melanoma humano es alta y permite emplearlo para acercarnos aún más a lo que sucedería en un modelo experimental de melanoma humano.

6.4. Conclusiones

- Se observó que la actividad inhibidora de tirosinasa de hongos del **AK**, en la reacción Monofenolasa, se vió incrementada, al ser éste combinado con **8PP** y **triangularina**. Los **IC** calculados para las combinaciones **AK/8PP** y **AK/triangularina** presentan un efecto sinérgico. Del análisis cuantitativo de los **IC**, se desprende que la combinación **AK/triangularina** sería más potente, hecho que podría estar relacionado al tipo de inhibición que lleva a cabo cada compuesto sobre la enzima, en la reacción Monofenolasa. Mayores estudios deberán realizarse para aseverar esta teoría.
- Estas combinaciones, al ser evaluadas sobre la actividad inhibidora de tirosinasa de hongos en la reacción Difenolasa, mostraron un aumento de la actividad del **AK** y sus **IC** manifiestan un efecto sinérgico.
- La actividad inhibidora de tirosinasa en células de melanoma de ratón B16 (Difenolasa), mostrada por el **AK**, se vió incrementada, al ser combinado con **8PP** y **triangularina**, indicando así un mayor efecto inhibidor de **AK**. Un efecto sinérgico es observado al analizar los **IC** de las combinaciones.

- Estos resultados demuestran que los compuestos **8PP** y **triangularina** presentaron un efecto **sinérgico** al ser combinados cada uno con **AK**, blanqueador actualmente comercializado con numerosos efectos adversos, en los distintos modelos evaluados. Esto permitiría mediante estudios posteriores, una mejora en la terapéutica de este blanqueador, disminuyendo los efectos adversos que presentaría el **AK** a las dosis utilizadas.

CAPÍTULO 7: MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Procesamiento del material vegetal

7.1.1. Recolección e identificación

D. elegans fue recolectada en el Departamento Punilla, localidad de Mayu Sumaj, Provincia de Córdoba, Argentina. En todos los casos, fueron recolectadas plantas completas (raíces, tallos, hojas y flores). Se preparó un ejemplar de herbario que fue depositado en el Museo Botánico de la Universidad Nacional de Córdoba e identificado por personal botánico perteneciente al Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET), como CORD Peralta 2.

D. pazensis fue hallada y recolectada el mes de marzo de 2013 en Yotala, localidad cercana a la ciudad de Sucre, Bolivia [(19°08'53" S 65°15'48" O a 2543 metros sobre el nivel del mar (msnm)]. Esta especie es un arbusto perenne de aproximadamente 1 m. de altura, raíces pivotantes de color amarillo, flores violetas sentadas en una espiga. Fue identificada por personal especializado perteneciente al Museo Botánico del sur de Bolivia (HSB) y depositado un ejemplar de herbario identificado como 961A (Portal E. & López C.D.) en dicho museo.

7.1.2. Desecado, selección y molienda

El material vegetal fue desecado al abrigo de la luz, en un lugar fresco y aireado durante 20 días en nuestro laboratorio. Con cierta frecuencia fue revuelto a fin de que las zonas intermedias obtuvieran una ventilación adecuada. Una vez seco, se descartó toda materia extraña. Se seleccionaron las raíces de *D. elegans* y *D. pazensis*, como así también las partes aéreas de *D. elegans* y fueron sometidas a molienda en un molino a cuchillas Retsch-Muhle, con tamiz N° 6.

7.1.3. Obtención de extractos vegetales

El procesamiento del material vegetal de *D. elegans*, fue realizado de la siguiente manera:

- Se llevó a cabo una extracción de las raíces de esta especie. Para ello, se pesaron 60g de la droga vegetal y se realizó su extracción mediante el método continuo de soxhlet, empleando solventes de polaridad creciente: hexano, benceno, acetato de etilo y etanol. Posteriormente, el solvente de cada extracto fue removido empleando evaporación a presión reducida. La reacción de Shinoda (que permite la identificación de presencia de flavonoides) mostró una coloración rojiza intensa en el extracto bencénico, lo que se condice con una importante presencia de metabolitos flavonoideos.
- Se realizó la extracción de 60,25 g de folíolos desecados, siguiendo el mismo procedimiento de extracción e identificación cualitativa de flavonoides, empleado para raíces, observándose en el extracto bencénico una significativa presencia de flavonoides.

Para comenzar el estudio *D. pazensis*, se procedió de la siguiente manera:

- Se emplearon las raíces de esta especie como material de partida. Para ello, se pesaron 35 g. de la droga vegetal y se llevó a cabo su extracción mediante el método continuo de soxhlet, utilizando solventes de polaridad creciente: hexano, benceno, acetato de etilo y etanol. Cada solvente fue removido luego,

empleando evaporación a presión reducida, obteniéndose Extracto hexano (0,41 g), benceno (0,51 g), acetato de etilo (0,53 g) y etanol (1,06 g). La reacción de Shinoda mostró una coloración rojiza intensa en el extracto bencénico, lo que nos dió el indicio de una elevada presencia de metabolitos flavonoideos.

7.1.4. Determinación cualitativa de la presencia de flavonoides

Para esta determinación, fue empleada la reacción de Shinoda, para lo cual el extracto seco fue retomado con 2 mL de agua destilada. Se le agregaron 8 gotas de HCl (c) y limaduras de Mg. La reacción es considerada positiva al observar una coloración rojiza que por el agregado de n-BuOH (0,5 mL), permanece en dicha fase.

7.2. Metodología para la purificación y determinación estructural de los flavonoides obtenidos de especies del género *Dalea*

7.2.1. *Dalea elegans*

Para el aislamiento y purificación de flavonoides se procesó el extracto bencénico de las raíces, dado su resultado positivo en la reacción de Shinoda. El mismo fue redisolto en n-hexano:AcOEt (99:1) y sujeto a cromatografía en columna (CC), utilizando sílica gel como fase estacionaria y eluída sucesivamente con gradiente de polaridad creciente de n-hexano:AcOEt (100:0 a 0:100) y finalmente EtOH. Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía en capa delgada con fluorescencia (CCD) utilizando n-hexano:AcOEt (7:3) como fase móvil contra testigo de **1**, aquellas que mostraron la presencia de **1**, fueron unificadas y purificadas en CCD preparativa, empleando como sistema de solventes n-hexano: AcOEt (7:3), obteniéndose de esta manera un residuo anaranjado que constituyó el compuesto **1** (7,5 mg).

En cuanto a las partes aéreas, de acuerdo a la reacción de Shinoda, se trabajó con el extracto bencénico, obtenido de partes aéreas. 1,3 g del mismo fueron redisolto en Hex:AcOEt y sujetos a CC, utilizando sílica gel como fase estacionaria y eluída sucesivamente con gradiente de polaridad creciente de Hex:AcOEt (90:10 a 0:100). De dicha columna se obtuvieron, 20 fracciones.

La fracción 2 presentó un precipitado de coloración amarilla, el cuál fue purificado empleando CCD con sílica gel como fase estacionaria, y Hex/Acet/ AcOEt (8:1:1) como FM, de allí se obtuvieron 5,6 mg del compuesto **4**.

En la fracción 3 se observó la presencia de cristales amarillos y rojos, se llevó a cabo la purificación de dicha fracción por cromatografía en capa delgada con fluorescencia (CCD), utilizando Hex:AcOEt (70:30), y de allí se obtuvieron 72 mg del compuesto **2**. A su vez, de dicha purificación se obtuvieron 9,1 mg de un compuesto **3**.

La fracción 7 presentó dos compuestos de coloración blanca, observados en CCD con fluorescencia, los cuales fueron obtenidos mediante la purificación de la fracción en CCD con Cl₃CH/EtOH (97:3) como FM. Se obtuvo 13,6 mg del compuesto **5** y 11,3 mg del compuesto **6**.

7.2.2. *Dalea pazensis*

El extracto bencénico fue sujeto a cromatografía en columna, empleando sílica gel como fase estacionaria y eluída con n-hexano/acetato de etilo (100:0 a 0:100), así se obtuvieron 5 fracciones.

La fracción 4 condujo a la obtención de tres compuestos: **1** (4 mg), **2** (6 mg) y **3** (16,4 mg), por purificación empleando CCD preparativa [n-Benceno/acetato de Etilo (95:5)].

La fracción 2 fue purificada empleando CCD, con sílica gel como fase estacionaria y Cloroformo/etanol (95:5) como fase móvil. Se obtuvo de esta purificación el compuesto **4** (4 mg).

7.2.3. Métodos cromatográficos

✓Cromatografía en columna (CC)→ La cromatografía en columna de adsorción se realizó usando como fase estacionaria sílica gel 60 (Merck) de 70 - 230 mesh ASTM.

✓Cromatografía en capa delgada (CCD)→

a) Técnica analítica: Se llevó a cabo con cromatofolios Merck de aluminio con sílica gel 60 con indicador de fluorescencia (F254). Las placas fueron visualizadas mediante iluminación con luz UV a $\lambda=254$ nm.

b) Técnica preparativa: La cromatografía en capa delgada preparativa fue llevada a cabo en placas preparadas manualmente, en vidrios de 20 x 20 cm, con una capa de 0,5 mm de sílica gel con fluorescencia (GF254, Merck), o en cromatofolios de iguales características a los del punto **a)**, pero de un tamaño de 20 x 20 cm. Los compuestos purificados por CCD fueron desadsorbidos de la sílica con AcOEt.

7.2.4. Métodos espectroscópicos

Los compuestos fueron identificados y sus estructuras químicas fueron determinadas a partir de evaluaciones espectroscópicas y espectrofotométricas, principalmente, Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en una y dos dimensiones (1D y 2D, respectivamente), como así también Espectrometría de Masas de Alta Resolución.

✓Espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-V)→ Los espectros de absorbancia en UV-V, fueron adquiridos con las muestras disueltas en etanol (EtOH) P.A., en un espectrofotómetro Shimadzu A-160, utilizando celdas de cuarzo.

✓Espectroscopía de infrarrojo (IR)→ Los espectros de absorbancia en Infrarrojo (IR) se obtuvieron colocando las muestras en discos de bromuro de potasio (KBr), en un espectrofotómetro Nicolet 5SXC.

✓Espectrometría de masas (HRMS)→ fueron obtenidos los espectros de masas en un espectrómetro QTOF (microTOF-Q11 Series, Bruker) equipado con una interface de ionización por electrospray (ESI).

✓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 fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker Advance II 400 (400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C), utilizando TMS como estándar interno. Para estos experimentos los flavonoides fueron disueltos en CDCl_3 o Acetona- d_6 y se

utilizaron tubos de vidrio 7 in. x 5mm Sigma-Aldrich. Los datos para la identificación mediante RMN fueron analizados a través de los programas de Bruker 1D WIN-NMR versión 6.0 y 2D WIN-NMR versión 6.04, TOPSPIN Bruker 3.5 y Portable MestReNova 6.0.2.

- ✓ Rotación óptica → La rotación óptica para cada compuesto aislado fue medida en un polarímetro Jasco P-1010. Fue empleado MeOH P.A. como solvente.
- ✓ Dicroísmo circular → Los espectros de Dicroísmo Circular (DC) se obtuvieron con un espectropolarímetro Jasco J-810. Los compuestos fueron disueltos en MeOH P.A. Las mediciones espectrales de estos estudios se analizaron y graficaron a través del programa Microsoft Excel 2007.

7.3. Ensayos farmacológicos

7.3.1. Ensayo de inhibición y estimulación *in vitro* de tirosinasa aislada de hongos

- ✓ La metodología fue llevada a cabo espectrofotométricamente, según el procedimiento descrito por Peralta *et al.*, (2011). El medio de ensayo consistente en 0,25 mL de solución de tirosinasa de hongo (250 U/mL, SIGMA), y 0,75 mL de solución control [tampón de fosfato (pH 6.8), 10 mM] o la muestra a evaluar (cada flavonoide disuelto en DMSO (concentración final de 0,1 % v/v) y subsecuentemente diluido hasta la concentración a evaluar con el tampón arriba mencionado) fueron mezclados y preincubados a 25°C durante 10 minutos. Luego, 0,50 mL de una solución de L-tirosina (1,7 mM, SIGMA) o L-Dopa (2,55 mM, SIGMA) (para evaluar actividad Monofenolasa o Difenolasa respectivamente) fueron añadidos. La absorbancia fue medida a 475nm luego de 20 minutos de incubación a 25°C.
- ✓ El control estuvo constituido por la mezcla de reacción antes mencionada, sin el agregado de los compuestos a evaluar. ácido kójico (MP Biomedicals, 155157) fue utilizado como inhibidor de referencia. Cada evaluación se realizó por duplicado en tres experimentos independientes. El porcentaje de inhibición y estimulación fueron calculados según las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Inhibición} = [(Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{muestra}}) / Abs_{\text{control}}] \times 100$$

$$\% \text{ Estimulación} = [(Abs_{\text{muestra}} - Abs_{\text{control}}) \times 100 / Abs_{\text{control}}]$$

donde Abs_{control} corresponde a la absorbancia del control y Abs_{muestra} es la absorbancia en presencia de la muestra a evaluar.

- ✓ Los valores de CI_{50} fueron calculados utilizando un gráfico no lineal de respuesta en función de la concentración.
- ✓ Los compuestos a evaluar fueron disueltos en DMSO P.A.
- ✓ Los tubos conteniendo las mezclas de reacción se incubaron a 25°C en un baño termostático Vicking.

- ✓ La medición espectrofotométrica se llevó a cabo en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 a 475 nm.
- ✓ Los resultados fueron procesados y graficados mediante el uso del software OriginPro 8 ó GraphPad Prism 6, a partir del cual se obtuvieron los valores de CI_{50} o CE_{50} .

7.3.2. Evaluación de mecanismo cinético de acción sobre tirosinasa aislada de hongos

- ✓ Se determinó el mecanismo cinético de inhibición sobre la actividad Monofenolasa de tirosinasa, dado que los compuestos fueron más activos sobre esa reacción. Fueron evaluados los parámetros cinéticos de la enzima en ausencia y presencia de los flavonoides más activos, **8PP** y **triangularina**. El protocolo empleado fue el mismo descrito en el punto 7.2.1. excepto que se emplearon variaciones en la concentración de L-tirosina (250, 500, y 1000 mM) y de **8PP** (0, 1 y 5 μ M) o **triangularina** (0, 10 y 25 μ M).
- ✓ El tipo de inhibición fue determinado evaluando los perfiles de Lineweaver–Burk, y las constantes de inhibición (K_i o K_{is}) fueron determinadas evaluando el gráfico de K_m o V_m aparente versus la concentración del inhibidor, respectivamente.
- ✓ Los resultados fueron procesados y graficados mediante el uso del software GraphPad Prism 5.0.

7.3.3. Evaluación de actividad inhibidora de 8PP y triangularina sobre tirosinasa aislada de células de melanoma de ratón B16F0

- ✓ Compuestos: **8PP** y **triangularina**.
- ✓ Inhibidor de referencia: ácido kójico
- ✓ Línea celular: se utilizaron células de melanoma de ratón B16F0 (ATCC), proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo Celular del Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, UNC.
- ✓ Medios de cultivo y soluciones:
 - Para los experimentos las células fueron cultivadas en el botellas de 25 o 75 cm^3 (BIOFIL) en medio líquido DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, SIGMA- ALDRICH, D6429) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Natocor) y 1% de penicilina/estreptomicina (Klonal), mantenidas en estufa (Sanyo, Incu Safe MCO 17 AC) a 37°C y un ambiente humidificado con 5% de CO_2 . La composición del medio DMEM, de acuerdo a SIGMA-Aldrich Argentina es la siguiente:

Component	D6429 [1x] g/L		
		L-Serine	0.042
Inorganic Salts		L-Threonine	0.095
Calcium Chloride	0.2	L-Tryptophan	0.016
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	L-Valine	0.094
Potassium Chloride	0.4	Vitamins	
Sodium Bicarbonate	3.7	Choline Chloride	0.004
Sodium Chloride	6.4	Folic Acid	0.004
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	<i>myo</i> -Inositol	0.0072
Amino Acids		Niacinamide	0.004
L-Arginine • HCl	0.084	D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	Pyridoxal • HCl	—
L-Glutamine	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004
Glycine	0.03	Riboflavin	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	Thiamine • HCl	0.004
L-Isoleucine	0.105	Other	
L-Leucine	0.105	D-Glucose	4.5
L-Lysine • HCl	0.146	HEPES	—
L-Methionine	0.03	Phenol Red • Na	0.0159
L-Phenylalanine	0.066	Pyruvic Acid • Na	0.11

- Solución tampón de sales de fosfato PBS (Phosphate buffered saline): fue preparado con 0,20 g de KCl, 8 g de NaCl, 1,48 g de K₂H₂PO₄ y 0,24 g KHPO₄. Se distribuyó en envases de 200 mL y se esterilizó en autoclave.
 - Solución de Tripsina preparada al 0,05% (GISCO BRL) y 0,02% versene (ThermoFisher) en PBS.
- ✓ Para llevar a cabo la medición de la actividad inhibidora de los compuestos naturales sobre tirosinasa de células B16F0, se midió la formación de un aducto estable de color rosa oscuro entre 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) y dopaquinona a 490nm, empleando el protocolo descrito por Winder *et al.*, (1991) cada 5 minutos durante 30 minutos.
- Para ello, a botellas de 75 cm³ con un 80% de confluencia, se las procedió a lavar con PBS y recogerlas previo tratamiento con tripsina durante 5 minutos y posterior centrifugación a 2000 r.p.m, 10 minutos a 4 °C.
 - Como resultado de dicho proceso, se obtuvo un pellet de coloración marrón en el fondo del eppendorf. Dicho pellet fue disuelto con tampón de solubilización celular (TPisol) [tampón de Na₂HPO₄/ (pH 6,8), 10 Mm, 1% TRITON™ SIGMA (X100), 1% Fenilmetanosulfonilo fluorado (PMSF) SIGMA (P7626), 1% Iodoacetamida (IAA) SIGMA (I1149)] y sometido a agitación durante 40 minutos a 4°C, y posterior centrifugación a 14.000 r.p.m durante 30 minutos, de esta manera se obtuvo un sobrenadante rico en tirosinasa.
 - A continuación, se llevó a cabo la mezcla de reacción conteniendo el compuesto natural a evaluar disuelto en DMSO (>0,5%) o 0,3 µL DMSO

para los wells control, 40 μ L de extracto celular B16F0, 40 μ L de sustrato L-Dopa (2,55 mM, SIGMA) y 100 μ L de 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH) SIGMA (M8006), midiéndose la aparición del aducto MBTH-dopaquinona espectrofotométricamente a 490nm, en lector de microplacas (BioTek ELx800).

- El control estuvo constituido por la mezcla de reacción antes mencionada, sin el agregado de los compuestos a evaluar. Ácido kójico (MP Biomedicals, 155157) fue utilizado como inhibidor de referencia. Cada evaluación se realizó por duplicado en tres experimentos independientes. El porcentaje de inhibición sobre tirosinasa aislada de células B16F0 fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(Abs_{\text{muestra}}/Abs_{\text{control}}) \times 100]$$

- ✓ donde Abs_{control} corresponde a la absorbancia del control y Abs_{muestra} es la absorbancia en presencia de la muestra a evaluar.
- ✓ Los resultados fueron procesados y graficados mediante el uso del software OriginPro 8, a partir del cual se obtuvieron los valores de CI_{50} .
- ✓ Los valores de CI_{50} fueron calculados utilizando un gráfico no lineal de respuesta en función de la concentración.

7.3.4. Viabilidad de células de melanoma de ratón B16F0 tras tratamiento con 8PP, triangularina y AK

- ✓ Los compuestos naturales evaluados, la línea celular y los medios de cultivo y soluciones se indican en la sección 7.2.3 del presente Capítulo.
- ✓ En cuanto a la determinación de la viabilidad celular, se empleó el Método de reducción de Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa a un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Esta metodología se llevó a cabo de acuerdo a lo indicado por Mosman *et al.*, (1983), adaptada a las siguientes condiciones de trabajo:
 - Fueron sembradas placas de 96 pocillos con 1×10^4 células B16F0 por pocillo, transcurridas 24 hs en estufa de cultivo a 37°C, 5% CO_2 se procedió descartar el medio condicionado y agregar los compuestos a evaluar disueltos en DMSO (>0,5%) en medio de cultivo DMEM completo nuevo, a las diferentes concentraciones, cada una de ellas por triplicado.
 - Luego de 24 horas, el medio fue removido y se agregó una solución de MTT (5mg/mL en solución salina de fosfatos, PBS) durante 30 minutos a 37°C, 5% CO_2 .
 - Por último, el MTT se extrajo durante 15 minutos en agitación continua con isopropanol, midiéndose a 595 nm en lector de microplacas (BioTek ELx800) la aparición de los cristales de formazán solubilizados.

- Fueron calculados los porcentajes de viabilidad celular y la máxima concentración no citotóxica (MCNC), tomando al control como 100% de viabilidad celular.
- Los datos fueron procesados empleando el software OriginPro 8.

7.3.5. Evaluación de la acción de 8PP y triangularina sobre el contenido de melanina extracelular en células de melanoma de ratón B16F0

- ✓ Los compuestos naturales evaluados, la línea celular, los medios de cultivo y soluciones se indican en la sección 7.2.3 del presente Capítulo.
- ✓ Para llevar a cabo la medición de la actividad inhibidora por parte de los compuestos naturales sobre células B16F0, se midió espectrofotométricamente cada 5 minutos durante 30 minutos, la formación del aducto 3-metil-2-benzotiazolinona (MBTH)-dopaquinona a 490nm, empleando el protocolo descrito por Winder *et al.*, (1991).
- ✓ Para ello, a botellas de 75 cm³ con un 80% de confluencia, se las procedió a lavar con PBS y recogerlas previo tratamiento con tripsina durante 5 minutos y posterior centrifugación a 2000 r.p.m, 10 minutos a 4°C.
- ✓ Como resultado de dicho proceso, se obtuvo un pellet de coloración marrón en el fondo del eppendorf. Dicho pellet (extracto celular) fue disuelto en medio de cultivo DMEM completo.
- ✓ Fueron sembradas placas de 24 pocillos con una densidad de 1x10⁵ células B16F0 por pocillo en medio de cultivo DMEM completo en estufa de cultivo a 37°C, 5% CO₂.
- ✓ Transcurridas 24 horas, se procedió descartar el medio condicionado y agregar los compuestos a evaluar disueltos en DMSO (>0,5%) en medio de cultivo DMEM completo nuevo, a las diferentes concentraciones, cada una de ellas por triplicado.
- ✓ Luego de 24 horas, los medios condicionados fueron recogidos y se les midió en un lector de microplacas (BioTek ELx800) el contenido de Melanina extracelular a 490nm.
- ✓ El medio condicionado correspondiente a los pocillos control (ausencia de muestras evaluadas) fueron considerados como 100% de Melanina extracelular.
- ✓ El % de Melanina extracelular para los pocillos tratados con los compuestos a evaluar, fue calculado empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Melanina extracelular} = [(Abs_{\text{muestra}} \times 100) / Abs_{\text{control}}]$$

- ✓ donde Abs_{control} corresponde a la absorbancia del control y Abs_{muestra} es la absorbancia en presencia de la muestra a evaluar.

7.3.6. Actividad inhibidora de tirosinasa de 8PP y triangularina sobre células de melanoma de ratón B16F0

- ✓ Una vez recogidos los medios para la medición de melanina extracelular, las células fueron lavadas con PBS y lisadas con tampón solubilizante (TPisol) y agitación durante 40 minutos a 4°C.

- ✓ 60 µL del extracto celular fueron colocados en cada pocillo de placas de 96 pocillos conteniendo 40 µL L-DOPA 10 mM en tampón de Na₃PO₄ (pH 6,8), 10 mM y 100 µL de MBTH.
- ✓ El control estuvo constituido por la mezcla de reacción antes mencionada, sin el agregado de los compuestos a evaluar. Ácido kójico (MP Biomedicals, 155157) fue utilizado como inhibidor de referencia. Cada evaluación se realizó por duplicado en tres experimentos independientes. El porcentaje de inhibición de la melanogénesis fue calculado según la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(Abs_{\text{muestra}} / Abs_{\text{control}}) \times 100]$$

- ✓ donde Abs_{control} corresponde a la absorbancia del control y Abs_{muestra} es la absorbancia en presencia de la muestra a evaluar.
- ✓ Los datos fueron procesados empleando el software OriginPro 8, estimando las CI₅₀ en cada caso.

7.3.7. Cuantificación de proteínas

- ✓ Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas presentes en los extractos celulares obtenidos para los experimentos de la sección 7.2.3 a la 7.2.5, con el objetivo de trabajar a concentraciones constantes de proteínas.
- ✓ Fue llevada a cabo empleando el Método Bradford que consiste en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul de Coomassie G-250 (SIGMA, B6916), a la proteína, comparando esta unión con la de diferentes cantidades de una proteína estándar (Albúmina de Suero Bovino (BSA), Laboratorio de Hemoderivados, UNC). La cuantificación se ha llevado a cabo midiendo la absorbancia en lector de microplacas (BioTek ELx800) a 595 nm, y obteniendo una curva de calibración de la proteína estándar. Con esta curva de calibración, se puede interpolar la concentración de proteínas en una muestra al medir su absorbancia a 595 nm (Bradford, 1976; Stoscheck, 1990).

7.3.8. Evaluación de la combinación de flavonoides activos del género *Dalea* y AK sobre tirosinasa

Fue llevada a cabo empleando tirosinasa aislada de hongos y sobre células de melanoma de ratón B16F0. Las metodologías empleadas son las descritas en las secciones 7.2.1. y 7.2.6.

La diferencia radicó en que se emplearon combinaciones de **8PP** y **triangularina** con **AK** a concentraciones de 2,5; 5; 10 y 20 veces por debajo de sus CI₉₀, (**8PP**: 20, 10, 5 y 2,5µM; **triangularina**: 67,2; 33,6; 16,8 y 8,4µM; **AK**: 40, 20, 10 y 5 µM) para el caso del ensayo sobre tirosinasa aislada de hongos; y las MCNC y la mitad de las mismas de cada producto natural (**8PP**: 10 y 5 µM; **triangularina**: 100 y 50 µM), combinándolos individualmente con concentraciones de **AK** de 500 y 2000 µM, para el ensayo sobre células de melanoma de ratón B16.

Los valores de % de inhibición se expresaron como la media ± D.S. Los resultados se analizaron mediante análisis unidireccional de la varianza (ANOVA)

seguido de la prueba Tukey para comparaciones múltiples empleando GraphPad InstStat.

7.4. Otro equipamiento utilizado

En el revelado de las CCD se utilizó una lámpara UV Spectroline ENF-240C/FE.

Tanto en los estudios químicos como en los ensayos farmacológicos, la homogeneización de las muestras se llevó a cabo mediante un lavador ultrasónico Testlab tb02 y un equipo vortex Deltalab.

Para la evaporación a presión reducida de las muestras se empleó un equipo rotatorio Buchi R-114 con baño de agua.

Las mediciones de pH de tampones y soluciones fueron desarrolladas a través de un equipo Altronix TPX2, con tampones de calibración de pH 4, 7 y 10 Cicarelli.

Para las centrifugaciones, se empleó un equipo microcentrífuga Cavour VT-1675.

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

8.1. Conclusiones generales

En esta Tesis Doctoral se profundizaron los estudios químicos y farmacológicos de *Dalea elegans* Gillies ex Hook. y fueron, a su vez, iniciados en *Dalea pazensis* (Rusby), especie endémica de Bolivia de la cual no habían sido informado datos.

Respecto del estudio químico de *Dalea elegans*, de sus raíces fue aislado e identificado (-)-(2S)-2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**8PP**) ya informado para esta especie (Peralta et al., 2014). A partir de las partes aéreas y fue aislada una flavanona prenilada informada previamente por nuestro grupo: (-)-(2S)-8-prenilpinocembrina (**8P**) (Peralta et al., 2014) junto con tres flavanonas metoxiladas y una chalcona, informadas anteriormente para otras especies vegetales, pero por primera vez para *D. elegans*: (-)-(2S)-6,8-dimetilpinocembrina (**demetoximateucinol**), (-)-(2S)-7-hidroxi-5-metoxi-6-metilflavanona (**comptonina**), 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-3'-metilchalcona (**triangularina**),

Extendiendo el estudio químico hacia la otra especie del género (*D. pazensis*), de las raíces, fueron aisladas y dilucidadas cuatro flavanonas preniladas, dos de ellas resultaron ser nuevas estructuras en esta familia de metabolitos secundarios: (-)-(2S)-3',4'-dihidroxi-6,2'-diprenilpinocembrina (**pazentina A**), (-)-(2S)-4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-6-prenilpinocembrina (**pazentina B**), junto a dos flavanonas preniladas ya informadas para otras especies de este género, pero no para esta especie: (-)-(2S)-4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**Me8PP**), (-)-(2S)-2',4'-dihidroxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina (**8PP**).

Los compuestos aislados y purificados de estas dos especies, fueron evaluados sobre ambas reacciones catalizadas por tirosinasa de hongos. Respecto a la reacción Monofenolasa, **8PP** y **triangularina** fueron los compuestos más activos. **8PP** mostró ser **dos veces más activo** que el inhibidor de referencia ácido kójico, y **triangularina** presentó actividad moderada. Asimismo, se ha dado a conocer el mecanismo cinético de acción que llevan a cabo estos compuestos sobre esta reacción. En el caso de **8PP**, su mecanismo de acción cinético resultó ser **Reversible** y de tipo **Competitivo**; para **triangularina** se observó una inhibición **Reversible** y de tipo **Acompetitiva**. En ambos casos, la constante de inhibición obtenida demuestra una significativa afinidad de tirosinasa de hongos por estos compuestos naturales. Los demás compuestos ensayados presentaron una actividad moderada (**8P**, **demetoximateucinol** y (-)-(2S)-4'-hidroxi-2'-metoxi-5'-(1''',1'''-dimetilalil)-8-prenilpinocembrina), baja (**comptonina**, (-)-(2S)-7-hidroxi-5-metoxi-6,8-dimetilflavanona y **pazentina A**), o fueron inactivos (**pazentina B**) sobre tirosinasa. La razón de esta variabilidad en la actividad biológica respondería a la diferencia en los requisitos estructurales que cada compuesto posee respecto a los descriptos como necesarios (resorcinol 4-sustituído en el anillo B (Lee et al., 2004) y anillo floriglucinol 4-sustituído en el anillo A (Peralta et al., 2011) para presentar actividad como inhibidores de tirosinasa. En relación a la actividad Difenolasa, si bien los flavonoides aislados de *D. elegans* fueron también activos sobre esta reacción, fue en menor magnitud que sobre la Monofenolasa, hecho que se relacionaría a la conformación que adopta la enzima en cada reacción en su sitio activo para unirse al sustrato. **Me8PP** y **pazentina B** presentaron un efecto estimulador sobre la actividad Difenolasa catalizada por tirosinasa. A su vez, **Me8PP** tuvo un efecto dual,

siendo inhibidor sobre la reacción Monofenolasa, y estimulador sobre la reacción de Difenolasa.

8PP y **triangularina** adicionalmente inhibieron la actividad Difenolasa de tirosinasa aislada de células de melanoma de ratón B16F0, siendo **trece y tres veces más activos** que ácido kójico, respectivamente.

A su vez, **8PP** y **triangularina** generaron una disminución en el Porcentaje de Melanina extracelular a sus MCNC en células de melanoma de ratón B16F0, observándose que para producir una disminución de aproximadamente un 50% de la melanina extracelular, las concentraciones necesarias de **8PP** y **triangularina** fueron de 1 y 25 μ M, mientras que para el inhibidor de referencia la concentración necesaria fue de 2000 μ M. Por lo que **8PP** y **triangularina**, serían **dos mil y ochenta veces más activos** que ácido kójico, respectivamente. Si bien fue observado que **AK** presentó una menor citotoxicidad sobre dichas células, los resultados muestran que estos compuestos naturales ejercen el mismo efecto, que dicho inhibidor de referencia, a menores concentraciones.

Obtenidos estos resultados, se decidió evaluar si la disminución provocada se debía a la capacidad de dichos compuestos de inhibir a la enzima intracelular. **8PP** resultó ser **doscientas veces más activo** que ácido kójico y **triangularina cinco veces**, en su inhibición sobre tirosinasa intracelular. Esto demostraría que este sería uno de los mecanismos relacionados a la capacidad que ellos mostraron de disminuir la melanina extracelular. Serían necesarios mayores estudios que permitan evaluar si dichos compuestos además de llevar a cabo una inhibición de la actividad de tirosinasa por unión a su sitio activo, inhiben la expresión transcripcional y proteica de las enzimas que regulan la biosíntesis de melanina (Tyr, Tyrp1 y Tyrp2) y establecer así cuales serían los mecanismos a través de los cuales estos compuestos ejercerían su acción.

Por otra parte, fue evaluada la actividad inhibidora de tirosinasa de combinaciones entre **8PP** y **triangularina** con el inhibidor ácido kójico, con el objetivo de mejorar la terapéutica de este compuesto blanqueador, disminuyendo las dosis empleadas y por lo tanto los efectos adversos. Tras dicha evaluación, se obtuvo en ambas combinaciones significativos **efectos sinérgicos**, tanto al ser evaluada su actividad sobre tirosinasa aislada de hongos, como sobre tirosinasa intracelular de células de melanoma de ratón B16F0. Esto permitiría mediante estudios posteriores, una mejora en la terapéutica disminuyendo los efectos adversos que presentaría a las dosis utilizadas de ácido kójico.

Estos compuestos de tipo flavonoideo obtenidos de las dos especies de *Dalea* se presentan como **importantes inhibidores** de una de las enzimas implicadas en la **biosíntesis de Melanina**, proyectándose como **potenciales agentes** para el **tratamiento de desórdenes que cursen con hiperpigmentación, como así también en cáncer de piel.**

8.2. Proyecciones

En este trabajo de tesis se profundizó el estudio químico y de actividad biológica de *Dalea elegans*, estudiando raíces y de partes aéreas de la misma. Por otra parte fueron iniciados los estudios químicos sobre el extracto bencénico de raíces de *Dalea pazensis*. Se obtuvieron resultados alentadores en cuanto al aislamiento y determinación de compuestos químicos, no obstante es prioritario proseguir esta investigación mediante el aislamiento y determinación estructural de otros flavanoides que podrían estar presentes en estas dos especies vegetales y extender, en lo posible, el estudio a otras especies del género.

Estudios de Docking Molecular, que permitan definir el modo de unión de los compuestos flavonoideos al sitio activo de tirosinasa, serían un gran aporte al conocimiento del mecanismo de acción de dichos compuestos.

Desde el punto de vista farmacológico, resultaría importante indagar acerca de la acción de los compuestos naturales obtenidos sobre células de melanoma humano, para así poder acercarnos a un modelo que se asemejaría a lo que ocurre en desórdenes de pigmentación en humanos.

También resulta ampliamente interesante mayores estudios que permitan evaluar si dichos compuestos inhiben la expresión transcripcional y proteica de las enzimas que regulan la biosíntesis de melanina (Tyr, Tyrp1 y Tyrp2) y establecer así cuales serían los mecanismos a través de los cuales estos compuestos ejercerían su acción.

Asimismo, se ha informado que compuestos inhibidores de tirosinasa tendrían importancia en los procesos neurodegenerativos de neuronas dopaminérgicas, que conllevan al desarrollo de la patología de Parkinson. Esto sería debido a que la oxidación inicial catalizada por tirosinasa, de L-Dopa a o-dopaquinona, o de o-dopaquinona a sus metabolitos tóxicos, contribuiría a la degeneración de neuronas dopaminérgicas y, por consiguiente, al desarrollo de Parkinson. La enfermedad de Parkinson (EP) es consecuencia de un proceso neurodegenerativo complejo, caracterizada por la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNc) del mesencéfalo, así como la presencia de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy, que están formados por agregados insolubles de proteína alfa-sinucleína anormalmente plegada. La EP constituye la segunda enfermedad neurodegenerativa más grave, afectando fundamentalmente a la población de adultos mayores a 55 años, aunque se han descrito casos de EP de inicio joven (<40 años). Se trata de una enfermedad de distribución universal aunque se han sugerido diferencias interétnicas como un mayor riesgo en poblaciones hispanas. A pesar de que existe un arsenal terapéutico amplio que permite un control sintomático en cada una de las fases de progresión de la enfermedad, aún no se ha encontrado un tratamiento curativo o de aletargamiento de la misma. Por otra parte, los tratamientos farmacológicos existentes presentan numerosos efectos adversos, tal es el caso de Levodopa/Carbidopa que produce náuseas, hipotensión, fluctuaciones motoras, alucinaciones, psicosis y disquinesias; trihexifenidilo genera deterioro cognitivo, gastrointestinales; pramipexol provoca náuseas, edema en las extremidades inferiores, somnolencia, trastornos de control de impulsos, entre otros. Por lo que, sería sumamente de interés el estudio de los productos naturales obtenidos de especies del

género *Dalea* durante el desarrollo de esta tesis doctoral, que resultaron activos sobre dicha enzima como inhibidores, sobre modelos de desarrollo de Parkinson.

8.3. Trabajos científicos publicados

- Peralta M.A., Santi M.D., Agnese A.M., Cabrera J.L., Ortega M.G. 2014. Flavanoids from *Dalea elegans*: Chemical reassignment and determination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity. *Phytochemistry Letters*, 10: 260-267.
- María D. Santi, Mariana A. Peralta, Caterine S. Mendoza, José Luis Cabrera, María G. Ortega. 2017. Chemical and bioactivity of flavanones obtained from roots of *Dalea pazensis* Rusby. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.058>.

CAPÍTULO 9: REFERENCIAS

9.1. Referencias Bibliográficas

- Agnese A. M., Guglielmo H. A., Cabrera J.L. 2009. "Flaveria bidentis and Flaveria haunanii, effects and bioactivity of sulphate flavonoids". En *Recent Progress in Medicinal Plants*. Ed. Studium Press (Houston) Texas, EE.UU. ISBN: 1-9336991-3-2. , Chap. 1: 1-17.
- Agrawal A.D. 2011. Pharmacological Activities of Flavonoids: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 4 (2): 1394-1398.
- Alchorne M.M.A., Abreu M.A.M.M. 2008. Dermatologia na pele negra. *An Bras. Dermatol.*, 83: 7-20.
- Ansaloni R., Wilches I., León F., Orellana A., Peñaherrera E., Tobar V., de Witte P. 2010. Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23, (1): 89-97.
- Amado N.G., Fonseca B.F., Cerqueira D.M., Neto V.M., Abreu J.G. 2011. Flavonoids: potential Wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. *Life Sci.*, 89 (15-16): 545-554.
- Amor E., Villaseñor I., Nawaz S., Hussain M.S., Choudhary I., 2005. A dihydrochalcone from *Syzygium samarangense* with anticholinesterase activity. *Philipp. J. Sci.* 134 (2): 105-111.
- An J., Zuoa G.Y., Haob X.Y., Wanga G.C., Li Z.S. 2011. Antibacterial and synergy of a flavanonol rhamnoside with antibiotics against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine*, 18: 990– 993.
- Andriantsitohaina R., Auger C., Chataigneau T. 2012. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br. J. Nutr.*, 108 (9): 1532-1549.
- Aranganathan S., Nalini N. 2012. Antiproliferative Efficacy of Hesperetin (Citrus Flavanoid) in 1, 2-Dimethylhydrazine- Induced Colon Cancer. *Phytother. Res.*, 27 (7): 999-1005.
- Arango A.I., y Gonzalez J.G. 1994. Flavanonas preniladas de *Dalea caerulea*. *Revista Colombiana de Química*, 23: 1-6.
- Arct J. & Pytkowska K. 2008. Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clin. Dermatol.*, 26 (4): 347–357.
- Argyropoulou A., Samara P., Tsitsilonis O., Skaltsa H. 2012. Polar constituents of *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) and their cytotoxic/cytostatic activity. *Phytother Res.*, 26 (12): 1800–1806.
- Arung E.T., Shimizu K., Tanaka H., Kondo R. 2010. 3-Prenyl luteolin, a new prenylated flavone with melanin biosynthesis inhibitory activity from wood of *Artocarpus heterophyllus*. *Fitoterapia*, 81: 640–3.
- Assini J.M., Mulvihill E.E., Huff M.W. 2013. Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol*, 24 (1): 34–40.
- Awale S., Linn T.Z., Li F. 2011. Identification of chrysopterin from *Vitex negundo* as a potential cytotoxic agent against PANC-1 and a panel of 39 human cancer cell lines (JFCR- 39). *Phytother Res.*, 25 (12): 1770–1775.
- Barneby R.C. 1977. Daleae Imagines—An illustrated revision of *Errazurizia* Philippi, *Psoralea* Rydberg, *Marina* Liebmann, and *Dalea* Lucanus emend. Barneby, including all species of Leguminosae tribe *Amorpheae* Borissova ever referred to *Dalea*. *Mem. New York Bot. Gard.*, 27: 1–891.
- Basnet P., Kadota S., Shimizu M., Xu H.X., Namba T. 1993. 2'-Hydroxymatteucinol, a new C-methyl flavanone derivative from *Matteucia orientalis*; potent hypoglycemic activity in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rat. *Chem. Pharm. Bull.* 41 (10): 1790–1795.
- Bellet J.S., Prose N.S. 2005. Vitiligo em crianças: uma revisão de classificação, hipóteses sobre patogênese e tratamento. *An Bras. Dermatol.*, 80: 631-636.
- Belofsky G., Percivill D., Lewis K., Tegos G., Ekart J., 2004a. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. *J. Nat. Prod.*, 67: 481-484.

- Belofsky G., French A., Wallace D., Dodson S. 2004b. New geranyl stilbenes from *Dalea purpurea* with in vitro opioid receptor affinity. *J. Nat. Prod.*, 67: 26-30.
- Belofsky G., Carreno R., Lewis K., Ball A., Casadei G., Tegos G. 2006a. Metabolites of the "Smoke Tree", *Dalea spinosa*, potentiate antibiotic activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* 69:261-264.
- Belofsky G., Carreno R., John D.T., Goswick S.M. 2006b. Activity of Isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the Opportunistic Ameba *Naegleria fowleri*. *Planta Med.* 72: 383-386.
- Belofsky G., Kolaczowski M., Adams E., Schreiber J., Eisenberg V., Coleman C.M., Ferreira D. 2013. Fungal ABC transporter-associated activity of isoflavonoids from the root extract of *Dalea formosa*. *J. N. Prod.*, 76(5): 915–925.
- Belofsky G., Aronica M., Foss E., Diamond J., Santana F., Darley J., Ferreira D. 2014. Antimicrobial and antiinsectan phenolic metabolites of *Dalea searlsiae*. *J. Nat. Prod.*, 77 (5): 1140–1149.
- Biavatti M.W. 2009. Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical sciences*, 45: 371-378.
- Borrelli F., Romano B., Fasolino I. 2012. Prokinetic effect of a standardized yarrow (*Achillea millefolium*) extract and its constituent choline: studies in the mouse and human stomach. *Neurogastroenterol. Motil.*, 24 (2): 164–171.
- Borrelli F., Izzo A.A. 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res.*, 14 (8): 581–591.
- Bouchard B., del Marmol V., Jackson I.J., Cherif D., Dubertret, L. 1994. Molecular characterization of a human tyrosinase-related-protein-2 cDNA. Patterns of expression in melanocytic cells. *Eur. J. Biochem.*, 219 (1): 127-134.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Briganti S., Camera E., Picardo M., 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigm. Cell Res.*, 16: 101–110.
- Brozyna A., VanMiddlesworth L., Slominski A. 2008. Inhibition of melanogenesis as a radiation sensitizer for melanoma therapy. *Int. J. Cancer*, 123: 1448–1456.
- Burkart A., 1952. Las leguminosas argentinas Silvestres y Cultivadas, second ed. Acme Agency, Buenos Aires.
- Cabanes J., Garcia-Canovas F., Lozano J.A., Garcia-Carmona F. 1987. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. *Biochim. Biophys. Acta* 923: 187-195.
- Cabanes J., Chazarra S., Garcia-Carmona F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 982-985.
- Cafaratti M., Ortega, M.G., Scarafia M.E., Ariza Espinar, L., Juliani H. 1994. Prenylated flavanones from *Dalea elegans*. *Phytochemistry*, 36: 1083–1084.
- Camacho F. 1998. Aspectos anatomofisiológicos cutáneos. En: Tratado de dermatología (I) Armijo, M. y Camacho, F., Eds. Grupo Aula Médica, S.A., Madrid (España): 3-33.
- Campos-Esparza M.d.R., Torres-Ramos M.A. 2010. Neuroprotection by natural polyphenols: molecular mechanisms. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, 10 (4): 269–277.
- Capasso R., Borrelli F., Aviello G., Capasso F., Izzo A.A. 2008. Inhibitory effect of the herbal antidepressant St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on rat gastric motility. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 376 (6): 407–414.
- Capasso R., Aviello G., Romano B., Atorino G., Pagano E., Borrelli F. 2009. Inhibitory effect of quercetin on rat trachea contractility in vitro. *J. Pharm. Pharmacol.*, 61 (1): 115–119.
- Chang T.S. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 10 (6): 2440–2475.
- Chen J.S., Wei C., Marshall M.R. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.*, 39: 1897-1901.

- Chen C., Lin L., Yang W., Bordon J., Wang, H.D. 2015. An Updated Organic Classification of Tyrosinase Inhibitors on Melanin Biosynthesis. *Current. Organic Chemistry*, 19 (1): 4–18.
- Cherniack E.P. 2011. Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition*, 27 (6): 617–623.
- Chiari M.E., Vera D.M.A., Palacios S.M., Carpinella M.C. 2011. Tyrosinase inhibitory activity of a 6-isoprenoid-substituted flavanone isolated from *Dalea elegans*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19 (11): 3474–3482.
- Choi Y.H., Jin G.Y., Guo H.S. 2012. Silibinin attenuates allergic airway inflammation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 427(3): 450–455.
- Chou T.C. 2006. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studie. *Pharmacol Rev.*, 58: 621–681.
- Choudhary N., Bijjem K.R., Kalia A.N. 2011. Antiepileptic potential of flavonoids fraction from the leaves of *Anisomeles malabarica*. *J. Ethnopharmacol.*, 135 (2): 238–242.
- Dajas F. 2012. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *J. Ethnopharmacol.*, 143 (2): 383–396.
- Densmore, F. 2005. *Strength of the Earth: The Classic Guide to Ojibwe Uses of Native Plants*. Minnesota Historical Society Press, St. Paul.
- Di Carlo G., Autore G., Izzo A.A. 1993. Inhibition of intestinal motility and secretion by flavonoids in mice and rats: structure-activity relationships. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45 (12): 1054–1059.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F., Autore G. 1994. Effects of quercetin on the gastrointestinal tract in rats and mice. *Phytotherapy Res.* 8 (1): 42–45.
- Dominguez X.A., Franco R., Zamudio A., Barradas D.M., Watson W.H., Zabel V., Merijanian A. 1980. Flavonoids from *D. scandens* var. paucifolia and *D. thyriflora*. *Phytochemistry*, 19: 1262-1263.
- Dreyer D.L., Munderloh K.P., Thiessen W.E. 1975. Extractives of *Dalea* species (Leguminosae). *Tetrahedron*, 31 (4): 287–293.
- Elingold I., Isollabella M.P., Casanova M.B., Celentano A.M., Perez C., Cabrera J.L., Diez RA., Dubin M. 2008. Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. *Chem. Biol. Interact.*, 171: 294-305.
- Estrada A.E., Villarreal J.A., López L. 2011. A new species of *Dalea* ser. Versicolores (Leguminosae: Amorpheae) from Durango, Mexico. *Brittonia*, 63 (4): 465–468.
- Estrada A.E., Villarreal J.A. 2016. A new species of *Dalea* (Fabaceae, Faboideae) from Jalisco, México. *Phytotaxa*, 246 1: 90–92.
- Eumkeb G., Siriwong S., Thumanu K. 2012. Synergistic activity of luteolin and amoxicillin combination against amoxicillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 117:247-53
- Fenoll L.G., Rodriguez-Lopez J.N., Garcia-Sevilla F., Tudela J., Garcia-Ruiz P.A., Varon R., Garcia-Canovas F. 2000a. Oxidation by mushroom tyrosinase of monophenols generating slightly unstable o-quinones. *Eur. J. Biochem.*, 267: 5865-5878.
- Fenoll L.G., Rodriguez-Lopez J.N., Varon R., Garcia-Ruiz P.A., Garcia-Canovas F., Tudela J. 2000b. Action mechanism of tyrosinase on meta- and para-hydroxylated monophenols. *Biol. Chem.*, 381: 313-320.
- Fenoll L.G., Rodriguez-Lopez J.N., Varon R., Garcia-Ruiz P.A., Garcia-Canovas F., Tudela J. 2000c. Kinetic study of the oxidation of 3-hydroxyanisole catalysed by tyrosinase. *Biophys. Chem.*, 84: 65-76.
- Fenoll L.G., Rodriguez-Lopez J.N., Varon R., Garcia-Ruiz P.A., Garcia-Canovas F., Tudela J. 2002. Kinetic characterization of the reaction mechanism of mushroom tyrosinase on tyramine/dopamine and L-tyrosine methyl ester/L-dopa methyl ester. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34: 1594-1607.

- Fenoll L.G., Penalver M.J., Rodriguez-Lopez J.N., Varon R., Garcia-Canovas F., Tudela, J. 2004. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 235-226.
- Freitas S., Costa S., Azevedo C. 2011. Flavonoids inhibit angiogenic cytokine production by human glioma cells. *Phytother. Res.*, 25 (6): 916-921.
- Fu B., Li H., Wang X., Lee F.S.C., Cui S. 2005. Isolation and Identification of Flavonoids in *Licorice* and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 7408-7414.
- Gadotti V.M., Schmelting L.O., Machado C. 2005. Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercitrin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves. *J. Pharm. Pharmacol.*, 57 (10): 1345-1351.
- Gálvez J., Sánchez de Medina F., Jiménez J. 1995. Effect of quercitrin on lactose-induced chronic diarrhoea in rats. *Planta Med.*, 61 (4): 302-306.
- Gharzouli K., Holzer P. 2004. Inhibition of guinea pig intestinal peristalsis by the flavonoids quercetin, naringenin, apigenin and genistein. *Pharmacology*, 70 (1): 5-14.
- George S., Ajikumaran Nair S., Johnson A.J., Venkataraman R., Baby S. 2015. O-prenylated flavonoid, an antidiabetes constituent in *Melicope lunuankenda*. *Journal of Ethnopharmacology*, 168: 158-163.
- Gibellini L., Pinti M., Nasi M. 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evid.- Based Complement. Alternat. Med.*, 2011 (3): 591356.
- Gould K.S., Lister C. 2006. Capítulo 8: Flavonoids functions in plant. En: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Editado por Andersen, OM., Markham, KR. Taylor and Francis Group, p. 398.
- Goh M.J., Park J.S., Bae J.H., Kim D.H., Kim H.K., Na Y.J. 2012. Effects of ortho-dihydroxyisoflavone derivatives from Korean fermented soybean paste on melanogenesis in B16 melanoma cells and human skin equivalents. *Phytother. Res.*, 26 (8): 1107-1112.
- Gonzalez A.G., Aguiar Z.E., Luis J.G., Rivera A., Calle J., Gallo G. 1992. A C-methyl chalcone from *D. caerullea*. *Phytochemistry*, 31: 2565-2566.
- Grimes P.E. 2009. Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 28: 77-85.
- Gomes A., Couto D., Alves A. 2012. Trihydroxyflavones with antioxidant and anti-inflammatory efficacy. *Biofactors*, 38 (5): 378-386.
- Guabiraba R., Campanha-Rodrigues A.L., Souza A.L. 2010a. The flavonoid dioclein reduces the production of pro-inflammatory mediators in vitro by inhibiting PDE4 activity and scavenging reactive oxygen species. *Eur. J. Pharmacol.*, 633 (1-3): 85-92.
- Guglielmone H., Nuñez S.C., Agnese A.M., Cabrera J.L. 2002. "Anticoagulant effect and action mechanism of sulphated flavonoids from *Flaveria bidentis*". *Thrombosis Research*, 105 (2): 183.
- Guglielmone H., Agnese A.M., Nuñez S.C., Cabrera J.L. 2005. "Inhibitory effects of sulphated flavonoids isolated from *Flaveria bidentis* on platelet aggregation. *Thrombosis Research*, 115 (6): 495-502.
- Guglielmone H., Agnese A.M., Nuñez S.C., Pellizas C.G., Fuentes M., Cabrera J.L., Donadio A.C. 2015. Quercetin 3, 7, 3', 4'-tetrasulphate inhibits the Plasminogen activator inhibitor-1 but not the tissue-type plasminogen activator expression in human normal fibroblasts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 20 (2): 1355-59.
- Guo J., Xue C., Duan J.A., Qian D., Tang Y., You Y. 2011. Anticonvulsant, antidepressant-like activity of *Abelmoschus manihot* ethanol extract and its potential active components in vivo. *Phytomedicine*, 18 (14): 1250-1254.
- Habtemariam S., Cowley R.A. 2012. Antioxidant and anti- α -glucosidase compounds from the rhizome of *Peltiphyllum peltatum* (Torr.) *Engl. Phytother. Res.*, 26 (11): 1656-1660.
- Hanrahan J.R., Chebib M., Johnston G.A. 2011. Flavonoid modulation of GABA (A) receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 163 (2): 234-245.

- Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry H. The Flavanoids. London: Chapman and Hall; 1975.
- Harbone J.B., Mabry T.J., 1982. The Flavonoids: Advances in Research, first ed. New York, London.
- Hariprasath L., Raman J., Nanjian R. 2012. Gastroprotective effect of *Senecio candicans* DC on experimental ulcer models. *J. Ethnopharmacol.*, 140 (1): 145-150.
- Herrera-Ruiz M., Zamilpa A., González-Cortazar M. 2011. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima crassifolia*. *Phytomedicine*, 18 (14): 1255-1261.
- Huang W.C., Liou C.J. 2012. Dietary acacetin reduces airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration by modulating eotaxin-1 and th2 cytokines in a mouse model of asthma. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 2012: 910520.
- Hyun S.K., Lee W.H., Jeong D.M., Kim Y., Choi J.S. 2008. Inhibitory Effects of Kurarinol, Kuraridinol, and Trifolirhizin from *Sophora flavescens* on Tyrosinase and Melanin Synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* 31 (1): 154-158.
- Ikemura M., Sasaki Y., Giddings J.C., Yamamoto J. 2012. Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in strokeprone spontaneously hypertensive rats. *Phytother. Res.*, 26 (9): 1272-1277.
- Ismaya W.T., Rozeboom H.J., Weijn A., Mes J.J., Fusetti F., Wichers H.J., Dijkstra B.W. 2011. Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry*, 50: 5477-5486.
- Izzo A.A., Di Carlo G., Mascolo N., Capasso F., Autore G. 1994. Antiulcer effect of flavonoids. Role of endogenous PAF. *Phytotherapy Res.*, 8 (3): 179-181.
- Jäger A.K., Saaby L. 2011. Flavonoids and the CNS. *Molecules*, 16 (2): 1471-1485.
- Jiang R., Miyamoto A., Martz A. 2011. Retrochalcone derivatives are positive allosteric modulators at synaptic and extrasynaptic GABA (A) receptors *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 162 (6): 1326-1339.
- Jayaraj R., Deb U., Bhaskar A.S., Prasad G.B., Rao P.V. 2007. Hepatoprotective efficacy of certain flavonoids against microcystin induced toxicity in mice. *Environ. Toxicol.*, 22 (5): 472-479.
- Jones Q.R., Warford J., Rupasinghe H.P., Robertson G.S. 2012. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. *Trends Pharmacol. Sci.*, 33 (11): 602-610.
- Jun N., Hong G., Jun K., 2007. Synthesis and evaluation of 2', 4', 6'-trihydroxychalcones as a new class of tyrosinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 15: 2396-2402.
- Jung H.A., Jin S.E., Park J.S., Choi J.S. 2011. Antidiabetic complications and anti-Alzheimer activities of sophoflavescenol, a prenylated flavonol from *Sophora flavescens*, and its structure-activity relationship. *Phytother. Res.*, 25 (5): 709-715.
- Khatib S., Nerya O., Musa R., Shmuel M., Tamir S., Vaya J. 2005. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the importance of a 2, 4-substituted resorcinol moiety. *Bioorg. Med. Chem.*, 13: 433-441.
- Karim N., Curmi J., Gavande N. 2012. 2'-methoxy-6- methylflavone: a novel anxiolytic and sedative with subtype selective activating and modulating actions at GABA (A) receptors. *Br. J. Pharmacol.*, 165 (4): 880-896.
- Kenneth R., Eckhard W., Gerhard S., 1987. Structure revision for two C-methyl flavanones from *Pityrogramma pallid*. *J. Plant Physiol.* 131: 45-48.
- Kim D.S., Hwang E.S., Lee J.E., Kim S.Y., Kwon S.B., Park K.C. 2003. Sphingosine-1-phosphate decreases melanin synthesis via sustained ERK activation and subsequent MITF degradation. *J. Cell Sci.*, 116 (Pt 9): 1699-1706.
- Kim J.A., Jung Y.S., Kim M.Y., Yang S.Y., Lee S., Kim Y.H. 2011. Protective effect of components isolated from *Lindera erythrocarpa* against oxidative stress-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes. *Phytother. Res.*, 25(11): 1612-1617.

- Kim S.M., Kang K., Jho E.H. 2011. Hepatoprotective effect of flavonoid glycosides from *Lespedeza cuneata* against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Phytother. Res.* 25 (7): 1011-1017.
- Kim J.H., Park D.K., Lee C.H., Yoon D.Y. 2012. A new isoflavone glycitein 7-O- β -D-glucoside 4''-O-methylate, isolated from *Cordyceps militaris* grown on germinated soybeans extract, inhibits EGF-induced mucus hypersecretion in the human lung mucoepidermoid cells. *Phytother. Res.*, 26 (12): 1807-1812.
- Kollias N., Sayre R.M., Zeise L., Chedekel R. 1991. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 9: 135.
- Kulka M. 2009. The potential of natural products as effective treatments for allergic inflammation: implications for allergic rhinitis. *Curr. Top. Med. Chem.*, 9 (17): 1611-1624.
- Lee N.K., Son K., Chang H., Kang S., Park H., Heo M., Kim H. 2004. Prenylated flavonoids as tyrosinase inhibitors. *Arch Pharm Res.* 27: 1132-1135.
- Lehàr J., Krueger A.S., Avery W., Heilbut A.M., Lisa M., Price E.R. Synergistic drug combinations improve therapeutic selectivity. 2009. *Nat. Biotechnol.*, 27 (7):659-66.
- Li H.F., Guan X.Y., Yang W.Z. 2012. Antioxidant flavonoids from *Epimedium wushanense*. *Fitoterapia* 83 (1): 44-48.
- Lin Y.P., Hsu F.L., Chen C.S., Chern J.W., Lee M.H. 2007. Constituents from the *Formosan apple* reduce tyrosinase activity in human epidermal melanocytes. *Phytochemistry.*, 68 (8): 1189-1199.
- Liu Y., Kempf V., Samokhvalov A., Simon J.D. 2003. *Pigment Cell. Res.*, 16: 608.
- Liu C., Wang Y., Xie S. 2011. Liquiritigenin induces mitochondria-mediated apoptosis via cytochrome c release and caspases activation in HeLa Cells. *Phytother. Res.*, 25 (2): 277-283.
- Liu T., Zhao J., Ma L., Ding Y., Su D. 2012. Hepatoprotective effects of total triterpenoids and total flavonoids from *Vitis vinifera* L. against immunological liver injury in mice. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 2012: 969386.
- Macêdo C.L., Vasconcelos L.H., Correia A.C. 2011. Spasmolytic effect of galetin 3,6-dimethylether, a flavonoid obtained from *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. *J Smooth Muscle Res.*, 47 (6): 183.
- Mansoor T.A., Ramalho R.M., Luo X., Ramalhete C., Rodrigues C.M., Ferreira M.J. 2011. Isoflavones as apoptosis inducers in human hepatoma HuH-7 cells. *Phytother. Res.*, 25 (12): 1819-1824.
- Markham K.R. 1982. Techniques of Flavonoids Identification. *Academic Press.*, Londres.
- Marrassini C., Anesini C., Ferraro G. 2011. HPLC fingerprint of a flower extract of *Tilia viridis* and correlation with antiproliferative and antioxidant activity. *Phytother. Res.*, 25 (10): 1466-1471.
- Shimokoriyama M., 1962. Flavanones, chalcones, and aurones. In *The Chemistry of Flavonoid compounds*. T. Gesissman, p. 286, Londres.
- Mason H.S. 1948. The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.*, 172: 83-90.
- Mason H.S. 1956. Structures and functions of the phenolase complex. *Nature* 177: 79-81.
- Mertens-Talcott S.U., Percival S.S. 2005. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Letters* 218: 141-151.
- Middleton E. Jr, Kandaswami C., Theoharides T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 52 (4): 673-751.
- Moerman D.E. *Native American Ethnobotany*. Timber Press Ink, London 1998, pp.192-193.
- Moerman D.E. *Native American Medicinal Plants: an ethnobotanical dictionary*. Timber Press Ink, London, 2009, p. 166.
- Mojzis J., Varinska L., Mojzisova G., Kostova I., Mirossay L. 2008. Antiangiogenic effects of flavonoids and chalcones. *Pharmacol. Res.*, 57 (4): 259-265.

- Moon P.D. & Kim H.M. 2012. Antiinflammatory effects of traditional Korean medicine, JinPi-tang and its active ingredient, hesperidin in HaCaT cells. *Phytother. Res.*, 26 (5): 657-662.
- Mukne A.P., Viswanathan V., Phadataré A.G. 2011. Structure pre-requisites for isoflavones as effective antibacterial agents. *Pharmacogn. Rev.*, 5 (9): 13-18.
- Muñoz-Muñoz J.L., García-Molina F., Varon R., Tudela J., García-Cánovas F., Rodríguez-López José N. 2011. Kinetic cooperativity of tyrosinase. A general mechanism. *ABP*, 3 (58): 303-311.
- Mustafa K., Perry N., Weavers R. 2005. Lipophilic C-methylflavonoids with no Bring oxygenation in *Metrosideros* species (Myrtaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 33: 1049-1059.
- Naish-Byfield S., Riley P.A. 1992. Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem. J.*, 288: 63-67.
- Nanayakkara N.P.D., Burandt C.L., Jacob M.R. 2002. Flavonoids with activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from *Dalea scandens* var. *paucifolia*. *Planta Med.*, 68: 519-522.
- Nerya O., Vaya J., Musa R., Izrael S., Ben-Arie R., Tamir S. 2003. Glabrene and isoliquiritigenin as tyrosinase inhibitors from *licorice* roots. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (5): 1201-1207.
- Nerya O., Musa R., Khatib S., Tamir S., Vaya J. 2004. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: The effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochem.*, 65 (10): 1389-1395.
- Nguyen N.T., Nguyen M.H.K., Nguyen H.X., Nguyen Bui N.K., Nguyen M.T.T. 2012. Tyrosinase Inhibitors from the wood of *Artocarpus heterophyllus*. *J. Nat. Prod.*, 75: 1951-1955.
- Nicolle E., Souard F., Faure P., Boumendjel A. 2011. Flavonoids as promising lead compounds in type 2 diabetes mellitus: molecules of interest and structure-activity relationship. *Curr. Med. Chem.*, 18 (17): 2661-2672.
- Njoo M.D., Westerhof W., Bos J.D., Bossuyt P.M. 1999. *Arch. Dermatol.*, 135: 1514-1521.
- Ocete M.A., Gálvez J., Crespo M.E. 1998. Effects of morin on an experimental model of acute colitis in rats. *Pharmacology*, 57 (5): 261-270.
- Ohguchi K., Akao Y., Nozawa Y. 2006. Stimulation of Melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70: 1499-1501.
- Olivares-Sánchez Ma. Concepción. Determinantes estructurales del procesamiento y la actividad catalítica de tirosinasa. [Tesis Doctoral]. Murcia: España; 2003.
- Ortega M.G., Scarafia M.E., Juliani H. 1996. Prenylated flavanones from *Dalea elegans*. *Fitoterapia*, 67: 81.
- Osaki S. 1963. The mechanism of tyrosine oxidation by mushroom tyrosinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100: 378-384.
- Parhiz H., Roohbakhsh A., Soltani F., Rezaee R., Mehrdad I. 2014. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother. Res.*, 29 (3): 323-331.
- Park S.E., Sapkota K., Kim S., Kim H., Kim S.J. 2011. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *Br. J. Pharmacol.*, 164 (3): 1008-1025.
- Park M.Y., Ji G.E., Sung M.K. 2012. Dietary kaempferol suppresses inflammation of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Dig. Dis. Sci.*, 57(2): 355-363.
- Parvez S., Kang M., Chung H.S., Bae H. 2007. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health cosmetics and agriculture industries. *Phytother. Res.* 21: 805-816.
- Peñalver M.J., Hiner A.N., Rodríguez-López J.N., García-Canovas F., Tudela J. 2002. Mechanistic implications of variable stoichiometries of oxygen consumption during tyrosinase catalyzed oxidation of monophenols and odiphenols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1597: 140-148.
- Peralta Mariana Andrea. Estudios químicos y farmacológicos en especies argentinas del género *Dalea*. [Tesis Doctoral]. Córdoba: Argentina; 2011.

- Peralta M.A., Ortega M.G., Agnese A.M., Cabrera J.L. 2011. Prenylated Flavanones with anti-tyrosinase activity from *Dalea boliviana*. *J. Nat. Prod.*, 74: 158-162.
- Peralta M.A., Calise M., Fornari M.C., Ortega M.G., Diez R.A., Cabrera J.L., Pérez, C. 2012. A prenylated flavanone from *Dalea elegans* inhibits rhodamine 6 G efflux and reverses fluconazole-resistance in *Candida albicans*. *Planta Medica*, 78 (10): 981-987.
- Peralta M.A., Santi M.D., Agnese A.M., Cabrera J.L., Ortega M.G. 2014. Flavanoids from *Dalea elegans*: Chemical reassignment and determination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity. *Phytochemistry Letters*, 10: 260-267.
- Peralta M.A., da Silva M.A., Ortega M.G., Cabrera J.L., Paraje, M.G. 2015. Antifungal activity of a prenylated flavonoid from *Dalea elegans* against *Candida albicans* biofilms. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 22 (11), 975-80.
- Pérez C., Tiraboschi I.N., Ortega M.G., Agnese A.M., Cabrera J.L. 2003. Further antimicrobial studies of 2´4´-dihidroxy-5´-(1´-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin from *Dalea elegans*. *Pharm. Biol.*, 41: 171-174.
- Prasad S., Phromnoi K., Yadav V.R., Chaturvedi M.M., Aggarwal B.B. 2010. Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer. *Planta Med.*, 76 (11): 1044-1063.
- Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C., Herrera A., Martínez R. 2005. Determinación estructural de compuestos orgánicos. Masson: Barcelona, p. 222.
- Procházková D., Bou sová I., Wilhelmová N. 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82 (4): 513-523.
- Proctor P.H., 1989. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, CRC Press: Boca Ratón.
- Prota G. 1980. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. *J. Invest. Dermatol.*, 75(1): 122-127.
- Prota G., d'Ischia M., Napolitano A. 1998. The chemistry of melanins and related metabolites. En: *The pigmentary system. Physiology and Pathophysiology*. Nordlund, J.J., Boissy, R.E., Hearing, V.J., King, R.A. y Ortonne, J.P., Eds. Oxford Univ. Press, NY, USA, 307-332.
- Qi M.Y., Kai-Chen, Liu H.R., Su Y.H., Yu S.Q. 2011. Protective effect of Icaritin on the early stage of experimental diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating transforming growth factor b1 and type IV collagen expression in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 138 (3): 731-736.
- Qin L., Wu Y., Liu Y., Chen Y., Zhang P. 2014. Dual Effects of Alpha-Arbutin on Monophenolase and Diphenolase Activities of Mushroom Tyrosinase. *PLoS ONE* 9 (10): e109398.
- Ramesar S.V., Drewes S.E., Gathiram P., Moodley J., Mackraj I. 2012. The effect of Kraussianone-2 (Kr2), a natural pyrano- isoflavone from *Eriosema kraussianum*, in an L-NAME-induced preeclamptic rat model. *Phytother. Res.*, 26 (9): 1375-1380.
- Raper H.S. 1928. The aerobic oxidases. *Physiol. Rev.*, 8: 245-258.
- Rathee P., Chaudhary H., Rathee S., Rathee D., Kumar V., Kohli K. 2009. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 8 (3): 229-35.
- Rescigno A., Sollai F., Pisu B., Rinaldi A., Sanjust E. 2002. Tyrosinase inhibition: general and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 17: 207-218.
- Rodriguez-Lopez J.N., Tudela J., Varon R., Garcia-Carmona F., Garcia-Canovas F. 1992. Analysis of a kinetic model for melanin biosynthesis pathway. *J. Biol. Chem.*, 267: 3801-3810.
- Rogerio A.P., Dora C.L., Andrade E.L. 2010. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. *Pharmacol. Res.*, 61 (4): 288-297.
- Romano B., Pagano E., Montanaro V., Fortunato A.L., Milic N., Borrelli F. 2013. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytotherapy Research*, 27 (11): 1588-1596.

- Ros J.R., Rodríguez-Lopez J.N., García-Canovas F. 1994a. Tyrosinase: Kinetic analysis of the transient phase and the steady-state. *Biochim. Biophys. Acta*, 1204: 33-42.
- Ros J.R., Rodríguez-Lopez J.N., Varon R., García-Canovas F. 1994b. Kinetics study of the oxidation of 4-tertbutylphenol by tyrosinase. *Eur. J. Biochem.*, 222: 449-452.
- Rusby H.H. 1893. On the collections of Mr. Miguel Bang in Bolivia. *Mem. Torrey Bot. Club*, 3 (3): 1-67.
- Rusby H.H. 1927. Descriptions of new genera and species of plants collected on the Mulford biological exploration of the Amazon valley, 1921–1922. *Mem. New York Bot. Gard.*, 7 (3): 205-387.
- Ryu Y.B., Westwoodb I.M., Kanga N.S., Kima H.Y., Kima J.H., Moonc Y.H., Parka K.H. 2008. Kurarinol, tyrosinase inhibitor isolated from the root of *Sophora flavescens*. *Phytomedicine*, 15: 612-618.
- Sarojini B.K., Narayana B., Ashalatha B.V., Indira J., Lobo K.G. 2006. Synthesis, crystal growth and studies on non-linear optical property of new chalcones. *J. Cryst. Growth*, 295: 54-59.
- S. Ito. 2003. A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Res.*, 16: 230.
- Seito L.N., Ruiz A.L., Vendramini-Costa D. 2011. Antiproliferative activity of three methoxylated flavonoids isolated from *Zeyheria montana* Mart. (Bignoniaceae) leaves. *Phytother. Res.*, 25 (10): 1447-1450.
- Seo S.Y., Sharma V.K., Sharma N. 2003. Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2837-2853.
- Serafini M., Peluso I., Raguzzini A. 2010. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr. Soc.*, 69 (3): 273-8.
- Shaffer C.V., Cai S., Peng J., Robles A.J., Hartley R.M., Powell D.R., Mooberry S.L. 2016. Texas native plants yield compounds with cytotoxic activities against prostate cancer cells. *Journal of Natural Products*, 79 (3): 531-40.
- Shi Y., Wu D., Sun Z. 2012. Analgesic and uterine relaxant effects of isoliquiritigenin, a flavone from *Glycyrrhiza glabra*. *Phytother. Res.*, 26 (9): 1410-1417.
- Shim S.H. 2011. 20S proteasome inhibitory activity of flavonoids isolated from *Spatholobus suberectus*. *Phytother. Res.*, 25 (4): 615-618.
- Shimizu K., Kondo R., Sakai K., Lee S.H., Sato, H. 1998. The inhibitory components from *Artocarpus incisus* on melanin biosynthesis. *Planta Med.* 64: 408–412.
- Shimizu K., Kondo R., Sakai K. 2000. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations. *Planta Med.* 66: 11-15.
- Shoji T., Kobori M., Shinmoto H., Tanabe M., Tsushida T. 1997. Progressive effects of phloridzin on melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 61: 1963-1967.
- Slade D., Ferreira D., Marais J.P.J. 2005. Circular dichroism, a powerful tool for the assessment of absolute configuration of flavonoids. *Phytochemistry* 66: 2177–2215.
- Slominski A., Zbytek B., Slominski R. 2009. Inhibitors of melanogenesis increase toxicity of cyclophosphamide and lymphocytes against melanoma cells. *Int. J. Cancer.*, 124 (6): 1470–1477.
- Solano F., Briganti S., Picardo M., Ghanem G. 2006. Hypopigmentating agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. *Pigment Cell Res.*, 19: 550-571.
- Solano F. & García-Borrón J.C. 2006. Enzymology of Melanin Formation. In: *The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology*. Second Edition, Chapter 14, 261-281, Oxford University Press, Oxford.
- Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.*, 96: 2563-2606.
- Son J.K., Park J.S., Kim J.A., Kim Y., Chung S.R., Lee S.H. 2003. Prenylated flavonoids from the roots of *Sophora flavescens* with tyrosinase inhibitory activity. *Planta Med.*, 69: 559-561.

- Spencer J.P., Vafeiadou K., Williams R.J., Vauzour D. 2012. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Mol. Aspects Med.*, 33 (1): 83-97.
- Stoscheck C.M. 1990. Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*, 182: 50-69
- Suzuki Y., Ishihara M., Segami T., Ito M. 1998. Anti-ulcer effects of antioxidants, quercetin, alpha-tocopherol, nifedipine and tetracycline in rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 78 (4): 435-441.
- Tai S.S., Lin C.G., Wu M.H., Chang T.S. 2009. Evaluation of depigmenting activity by 8-hydroxydaidzein in mouse B16 melanoma cells and human volunteers. *Int. J. Mol. Sci.*, 10:4257-4266.
- Takahashi M., Takara K., Toyozato T., Wada K. 2012. A novel bioactive chalcone of *Morus australis* inhibits tyrosinase activity and melanin biosynthesis in B16 melanoma cells. *J. oleo Sci.*, 61 (10): 585-592.
- Tallarida R.J. 2012. Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. *Genes & Cancer*, 2 (11): 1003-1008.
- Tang D.Q., Wei Y.Q., Yin X.X. *et al.* 2011. In vitro suppression of quercetin on hypertrophy and extracellular matrix accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured by high glucose. *Fitoterapia*, 82 (6): 920-926.
- Tropicicos.org. Missouri Botanical Garden. 2009. <<http://www.tropicicos.org/Name/40021469>>.
- Tschirch A. 1909. Handbuch der Pharmakognosie, Erste Abteilung, Leipzig, Verlag von Chr. Herm. Tauchnitz, 3.
- Uriarte-Pueyo I., Calvo M.I. 2011. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors. *Curr. Med. Chem.*, 18 (34): 5289-5302.
- Vanneste W.H. & Zubersbühler A. 1974. Copper-containing oxygenases. En: *Molecular mechanism of oxygen activation*. Hayaishi O. (Ed) Academic Press, New York, pp., 371-399.
- Vaya J., Belinky P.A., Aviram M. 1997. Antioxidant constituents from *licorice* roots: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation. *Free Radical Biol. Med.*, 23 (2): 302-313.
- Wallace T.C. 2011. Anthocyanins in cardiovascular disease. *Adv. Nutr.*, 2 (1): 1-7
- Wasowski C., Loscalzo L.M., Higgs J., Marder M. 2012. Chronic intraperitoneal and oral treatments with hesperidin induce central nervous system effects in mice. *Phytother. Res.*, 26 (2): 308-312
- Whyte A.R. & Williams C.M. 2015. Effects of a single dose of a flavonoid-rich blueberry drink on memory in 8 to 10 years old children. *Nutrition*, 31 (3): 531-534.
- Winder A.J. & Harris H. 1991. New assays for the tyrosine hydroxylase and dopa oxidase activities of tyrosinase. *Eur J. Biochem.*, 98: 317-326.
- Xu S.L., Choi R.C., Zhu K.Y. 2012. Isorhamnetin, a flavonol aglycone from *Ginkgo biloba* L., induces neuronal differentiation of cultured PC12 cells: potentiating the effect of nerve growth factor. *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 2012: 278273.
- Yan R.Y., Cao Y.Y., Chen C.Y. *et al.* 2011. Antioxidant flavonoids from the seed of *Oroxylum indicum*. *Fitoterapia*, 82 (6): 841-848.
- Yang T., Luo F., Shen Y. 2012. Quercetin attenuates airway inflammation and mucus production induced by cigarette smoke in rats. *Int. Immunopharmacol.*, 13 (1): 73-81.
- Yin N., Ma W., Pei J., Ouyang Q., Tang C. 2014. Synergistic and Antagonistic Drug Combinations Depend on Network Topology. *PLoS ONE*, 9 (4): e93960.
- Zajc I., Filipi C.M., Lah T.T. 2012. Xanthohumol induces different cytotoxicity and apoptotic pathways in malignant and normal astrocytes. *Phytother. Res.*, 26 (11): 1709-1713.
- Zecca L., Gallorini, M., Schunemann V., Trautwein, A.X., Gerlach, M., Riederer, P., Vezzoni, P., Tampellini, D. 2001. *J. Neurochem.*, 76: 1766.
- Zhang L.M., Yao J.Z., Li Y. 2012. Anxiolytic effects of flavonoids in animal models of posttraumatic stress disorder. *Evid.-Based Complement Alternat. Med.*, 2012: 623753.

- Zhang X.H., Ma Z.G., Rowlands D.K. *et al.* 2012. Flavonoid myricetin modulates GABA (A) receptor activity through activation of Ca (2+) channels and CaMK-II pathway. *Evid. Based Complement Alternat. Med.*, 2012: 758097.
- Zheng X.K., Zhang L., Wang W.W., Wu Y.Y., Zhang Q.B., Feng W.S. 2011. Anti-diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ. *J. Ethnopharmacol.*, 137 (1): 662-668.
- Zheng Z.P., Tan H.Y., Chen J., Wang M. 2013. Characterization of tyrosinase inhibitors in the twigs of *Cudrania tricuspidata* and their structure-activity relationship study. *Fitoterapia*, 84 (0): 242-247.
- Zimmermann G.R., Lehár J., Keith C.T. Multi-target therapeutics: when the whole is greater than the sum of the parts. 2007. *Drug Discov.*, 12 (1-2): 34-42.
- Zuloaga F.O., Morrone O., 1999. Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II. En: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Hollowell, V.C. (Eds.). *Botanical Garden Press*, St. Luis, 670-671.

9.2 Referencias de Figuras y Fotografías

- Fotografía de Anza-Borrego (1995). *Dalea emoryi*. Desert Natural History Association. California. [Fig. 2.2]. Recuperado de http://www.abdnha.org/pages/03flora/family/fabaceae/psorothamnus_emoryi.htm
- Fotografía de Dick Culbert (2013). *Dalea coerulea*. An Andean species, found from Colombia to northern Peru. Photo from near Bogota, Colombia. [Fig. 2.2]. Recuperado de www.dixpix.ca/meso_america/Flora/faboid/index.html
- Fotografía de Richard Thomas (1971). *Dalea purpurea* — Purple prairie clover. At Wind Cave National Park, South Dakota, U.S. [Fig. 2.2]. Recuperado de http://www.nps.gov/wica/photosmultimedia/photo%2Dgallery%2Dwildflowers%2Ehtm?eid=133240&aid=170&root_aid=170&sort=title&startRow=55#e_133240
- Fotografías de José Luis Cabrera (2005, 2011, 2013). *Dalea boliviana*, *Dalea elegans*, *Dalea pazensis*. Provincia de Jujuy, departamento Humahuaca, a orillas de la Ruta Provincial 13, de Iturbe a Iruya, a ocho kilómetros pasando Iturbe (Argentina) ; Provincia de Córdoba Departamento Punilla, localidad de Mayu Sumaj (Argentina), Yotala, localidad cercana a la ciudad de Sucre (Bolivia) [Fig. 2.2].
- Fotografía de autor desconocido (2012). Nativo Dakota. Recuperado de <http://vidadelosnativosamericanos-dakota1.blogspot.com.ar/>
- Terese, Winslow (2008). Esquema de organización de la piel [Figura 2.25]. Recuperado de <https://www.cancer.gov/>.
- Ross M.H. [Figura 2.26]. Recuperado de Histología. Texto y Atlas.
- Alejandro González- Orive (2012). Ruta biosintética actual de eumelanina y feomelanina [Figura 2.27]. Recuperado de <https://www.riull.ull.es>.
- Fotografía de Ariza S.A, de Hart A.A. (2008). Léntigo Maligno. Recuperado de Rev. Asoc. Col. Dermatol. 16 (2):135-142.
- Fotografía de Loyna V. (2007). Efélides. Recuperado de Wikipedia.org.
- Fotografía de Artero López E. (2012). Nevo. Recuperado de oftalmologia-avanzada.blogspot.com.ar.
- Fotografía de Casanova J.M. (2012). Melanoma Maligno. Recuperado de dermatoweb2.udl.es.

- Michael W. King (2016). Tipos de inhibición enzimática Reversible. [Figura 5.6]. Recuperado de <http://themedicalbiochemistrypage.org/enzyme-kinetics.php>.
- S. Sillagi (2008). Línea celular de melanoma de ratón B16-F0 en DMEM High Glc, 10% FSB Y 1% Penicilina/Estreptomina. [Figura 5.15]. Recuperado de <http://cellbank.nibiohn.go.jp/legacy/celldata/jcrb0202.htm>.