

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

**BÚSQUEDA DE AGENTES ANTIVIRALES
A PARTIR DE
PLANTAS BIOACTIVAS ARGENTINAS:
EVALUACIÓN DE ANTRAQUINONAS
NATURALES Y SEMISINTÉTICAS**

Farm. María Laura Mugas

Córdoba, Argentina

2018.

Lugar de trabajo:

Farmacognosia, Dpto. Ciencias Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas e Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Universidad Nacional de Córdoba.

Instituto de Virología de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Directora: Dra. Susana Núñez Montoya

Codirectora: Dra. Marta Contigiani

Comisión Evaluadora:
Dra. Ana Santiago

Dr. Álvaro Jiménez Kairuz

Dra. Cecilia G. Cuffini

Dr. Maximiliano A. Sortino

A mis padres

A la memoria de mi tía Alicia

Agradecimientos

Habiendo logrado llegar a la cima de esta etapa, quiero agradecer a todas las personas que compartieron conmigo este ciclo.

A Susi, mi directora de tesis. Por confiar en mí, por su apoyo absoluto, por su capacidad de comprensión, amabilidad y cariño. Por darme fuerzas en momentos difíciles. Por tener la capacidad de enseñarme con amor y paciencia. Le agradezco por ser un pilar esencial en mi crecimiento como profesional.

A Brenda, mi gran guía y compañera incondicional, que trabajó par a par en esta tesis siendo un soporte fundamental. Estoy muy feliz de haber compartido esta etapa llena de alegres mates matutinos y transporte escolar. Agradezco su predisposición y por dedicarme tiempo cada vez que lo precisé. Gracias a sus sabios consejos, por transmitirme tranquilidad en momentos difíciles.

A Marta Contigiani, mi codirectora, por permitirme realizar parte de esta tesis doctoral en el Instituto de Virología Dr. José María Vanella. Quiero agradecerle los valiosos aportes y correcciones realizadas a esta tesis.

A la Dra. Ana Santiago y Dr. Álvaro Jiménez Kairuz, miembros de la comisión de tesis, por acompañarme y apoyarme en estos cinco años de crecimiento académico. Gracias por sus sugerencias y correcciones realizadas a este trabajo de tesis.

A la Dra. Cecilia Cuffini y Dr. Maximiliano Sortino, por evaluar este trabajo de tesis. Gracias a Ceci por todas sus sugerencias.

A las instituciones que apoyaron el desarrollo de esta tesis y mi formación académica: IMBIV (CONICET), Facultad de Ciencias Químicas (UNC), Instituto de Virología Dr. José María Vanella de la Facultad de Ciencias Médicas (UNC), Universidad de Patras, Universidad de São Paulo, Erasmus y Red de Macrouiversidades de América Latina y el Caribe.

Al Dr. Jose Luis Cabrera y a la Dra. Mariel Agnese, por permitirme ser parte del grupo de Farmacognosia y brindarme un lugar para realizar esta tesis.

Al Dr. Manolis Fousteris, de la Universidad de Patras, Grecia; por su predisposición en enseñarme sobre síntesis orgánica, por permitirme trabajar en su laboratorio. A la Dra. Fotini Lamari, de la Universidad de Patras, Grecia; por su hospitalidad. ευχαριστώ πολύ!

A la Dra. Janice Rodrigues Perussi, del Instituto de Química de São Carlos de la Universidad de São Paulo, Brasil; por aceptarme en su laboratorio y por contribuir a desarrollar mi espíritu crítico de investigadora. También agradezco a mis compañeros del laboratorio por asesorarme y por compartir buenos momentos. Obrigada!

A la Dra. Jacqueline Joseau y a la Ing. Agr. Laura Rojas, por trabajar en colaboración y proporcionar la especie vegetal *Galium latoramosum* Clos.

A Javi, mi guía en el Viro, por su predisposición y amabilidad para ayudarme, por tener una respuesta a todas mis preguntas y soluciones a mis inquietudes.

A mis compañeras Chulengas, por compartir y crecer juntas en esta etapa. A Dani, mi guía en este proceso de tesis, y por nuestras anécdotas vividas; a Pame por escucharme, aconsejarme y ayudarme sobre todo en el proceso de escritura; a Mica por alentarme a no decaer; a Jesi por enseñarme y ayudarme en el trabajo de mesada y a Juli por sus mates y asesorarme siempre que lo necesité.

Al gran grupo de Farmacognosia, por el compañerismo, vivencias, anécdotas y risas compartidas. A Marce por sus sabios consejos y a Mari V. por compartir la experiencia griega.

A Flor, mi compañera en el Viro, por ayudarme cada vez que lo necesité y por prepararme el mate. A Fer por sus sugerencias y por permitirme colaborar en su tesis. A todos mis otros compañeros del Viro, muchísimas gracias por compartir tantas risas y buenos momentos juntos en la cotidianeidad como también fuera del Viro.

A Aggeliki Roumana, mi compañera griega, por haberme acompañado y guiado en el laboratorio; y además por compartir tan buenos momentos fuera del ámbito académico. También agradezco a los demás integrantes del laboratorio por la buena onda. ευχαριστώ πολύ!

A Moni G., eterna compañera en esta facu, por estar siempre que la necesité.

A Lili, mi compañera colombiana, gracias por las extensas charlas y consejos, por estar siempre presente.

A los integrantes del Departamento de Farmacia en especial a Sol M., Lina, Meli Q., Cinthia, Sole G., Caro A., Meli C., Naty V., Sergio y Esteban, con quienes compartí charlas y actividades.

A Franco, mi compañero de vida, gracias por entenderme, apoyarme, aconsejarme, ayudarme y ser mi equilibrio.

A mis padres, por acompañarme y enseñarme a ser perseverante. A mis hermanos y a Viqui por ayudarme cuando los necesité. A Agustín por alegrar mis días de escritura de tesis.

A Dios por ser mi faro y guiarme a que todo esto sucediera.

RESUMEN

Frente a las escasas alternativas terapéuticas que existen en la actualidad para el tratamiento de las enfermedades virales, se planteó como objetivo de esta tesis, evaluar la capacidad antiviral *in vitro* de antraquinonas (AQs) naturales y de sus derivados semisintéticos y sintéticos sobre virus de interés sanitario para la región. Específicamente se estudiaron Herpes Simple Tipo 1 (HSV-1), West Nile (WNV) y Encefalitis Equina Venezolana (VEEV), los dos últimos responsables de producir encefalitis en humanos y equinos. Determinando además, si las AQs aisladas pueden generar efecto antiviral a través de un mecanismo de fotosensibilización, en vista que algunas han manifestado poseer propiedades fotosensibilizantes.

Se estudiaron dos especies vegetales nativas de Argentina, pertenecientes a la familia de las Rubiáceas: *Galium latoramosum* Clos, conocida como “raíz de teñir”, que no contaba con estudio químicos previos; y *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. “cegadera”, ampliamente estudiada en el grupo de investigación de Farmacognosia (Fac. Cs. Qcas., Universidad Nac. Cba.), con antecedentes de poseer AQs fotosensibilizadoras.

El estudio químico de ***G. latoramosum***, permitió aislar e identificar por primera vez la presencia en la naturaleza de **2-isobutil éster de munjistina**. Esta AQ mostró ejercer una inhibición total del HSV-1, en estadios tempranos post-adsorción viral, a una concentración que asegura la viabilidad de la célula hospedadora. Por lo tanto, esta AQ estaría impidiendo la generación de nuevas partículas virales necesarias para continuar con la infección. Mediante la caracterización química de los extractos de esta especie vegetal, se estableció que la AQ más abundante es **lucidina primeverósido**, una AQ glicosilada que no presentó actividad antiviral sobre ninguno de los virus ensayados en esta tesis. Paralelamente, a través de una purificación bioguiada se aisló **procianidina A1**, un metabolito secundario de la familia de los flavonoides, que inhibió totalmente al HSV-1. Así, se estableció que esta procianidina junto a 2-isobutil éster de munjistina son algunos de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antiherpética de la especie *G. latoramosum*.

Por otra parte, se elaboró un protocolo para analizar la fotoinactivación viral *in vitro*. Se evaluaron dos AQs fotosensibilizantes aisladas de ***H.***

pustulata: **soranjidiol** y su dímero, **bisoranjidiol**. Estos presentaron bajo efecto antiherpético *per se*, pero demostraron inactivar al HSV-1 intracelular mediante un proceso de fotosensibilización, siendo bisoranjidiol levemente más activo que su monómero. Ambas AQs produjeron una reducción de la carga viral y por lo tanto, generarían una regresión en la infección.

Aprovechando el alto rendimiento de lucidina primeverósido, purificada de *G. latoramosum*, se utilizó esta AQ glicosilada como precursor para la obtención de **nordamnacantal**. Esta AQ evidenció ser activa frente al HSV-1, demostrando que la semisíntesis es una importante herramienta para la obtención de derivados con actividad antiviral *in vitro*.

Teniendo en cuenta que el análisis químico de *G. latoramosum* estableció la presencia de xantopurpurina y que sus derivados han mostrado ser bioactivos, se desarrolló una estrategia de síntesis para la obtención de derivados de esta AQ. Así, se obtuvieron: **6-bromo-xantopurpurina**, **6-fenil-xantopurpurina**, y **6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina**. Las dos últimas con leve efecto inhibitorio sobre el HSV-1. Sin embargo, 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina se destacó como la única AQ estudiada que mostró una importante actividad sobre WNV. Se demostró indirectamente que **6-bromo-xantopurpurina** posee propiedades fotosensibilizantes, debido a que exhibió un importante efecto antiherpético fotoestimulado. Además, a la concentración activa, no causó efectos nocivos en las células hospedadoras bajo irradiación.

Cabe destacar que ninguna de las AQ evaluadas mostró actividad contra VEEV.

En consecuencia, los resultados derivados de esta tesis aportan al conocimiento fitoquímico de nuestra flora autóctona, y a su importancia en el descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos, como potenciales agentes antivirales. Además, en esta tesis se plantea la obtención de compuestos que sirvan como punto de partida para la elaboración de sustancias semisintéticas o sintéticas con efecto antiviral. Incluso, se destaca que la prospección de la flora autóctona en la búsqueda de compuestos fotosensibilizantes, impulsa al desarrollo de farmacoterapias más eficientes para el tratamiento de infecciones virales, como es la Terapia Fotodinámica Antimicrobiana.

ABSTRACT

In view of the scarce therapeutic alternatives that currently exist for the treatment of viral diseases, the aim of this thesis was to evaluate the in vitro antiviral activity of natural anthraquinones (AQs) and their semisynthetic and synthetic derivatives against viruses with interest for the health of the region. Specifically, the following viruses were studied: Herpes Simplex Type 1 (HSV-1), West Nile (WNV) and Venezuelan Equine Encephalitis (VEEV), the latter two viruses produce encephalitis in humans and equines. Being also evaluated if the isolated AQs can generate an antiviral effect by means of a photosensitization mechanism, since some have shown to possess photosensitizing properties.

Two native vegetal species from Argentina were studied, belonging to the Rubiaceae family: *Galium latoramosum* Clos, known as "raíz de teñir" (dye root), which did not have previous chemical studies; and *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. "cegadera" (blinder), widely studied by the Pharmacognosy research group (Dpto. Cs. Farmacéuticas, Fac. Cs. Qcas., Universidad Nacional de Córdoba), which has mostly photosensitizing anthraquinone derivatives.

The chemical study of *G. latoramosum*, allowed isolating and identifying for the first time the presence in nature of **munjistin-2-isobutyl ester**. This AQ showed to exert a total inhibition of the HSV-1, in early stages after viral adsorption, at a concentration that ensures the viability of the host cell. Therefore, this AQ would be preventing the generation of new viral particles required to continue with the infection. By means of the chemical characterization of the extracts obtained from *G. latoramosum*, it was established that **lucidin primeveroside** is the most abundant AQ, a non-cytotoxic glycosylated AQ that also did not show antiviral activity against any of the viruses tested in this thesis. At the same time, **procyanidin A1**, a secondary metabolite belonging to the flavonoid family that proved to completely inhibit HSV-1, was isolated by bioguided purification. Thus, it was established that this procyanidin together with munjistin-2-isobutyl ester are

some of the secondary metabolites responsible for the antiherpetic activity of the species *G. latoramosum*.

On the other hand, a protocol was developed to analyze viral photoinactivation *in vitro*. Two photosensitizing AQs isolated from *H. pustulata* were evaluated: **soranjidiol** and its dimer, **bisoranjidiol**. These compounds showed low antiherpetic effect *per se*, but they were able to inactivate the intracellular HSV-1 by means of a photosensitization process, bisoranjidiol being slightly more active than its monomer. In short, both AQs produced a reduction in viral load and, therefore, would generate a regression in the infection.

Taking advantage of the high yield of lucidin primeveroside, purified from *G. latoramosum*, this glycosylated AQ was used as a precursor for obtaining **nordamnacantal**. This AQ showed to be active against HSV-1, demonstrating that semisynthesis is an important tool for obtaining derivatives with antiviral activity *in vitro*.

Taking into account the chemical analysis of *G. latoramosum* that established the presence of xantopurpurin and considering that its derivatives have been shown to be bioactive, a synthesis strategy was developed to obtain synthetic derivatives of this AQ. Thus, **6-bromo-xantopurpurin**, **6-phenyl-xantopurpurin**, and **6-(4-methoxyphenyl)-xantopurpurin** were obtained. The latter two showed a slight inhibitory effect on HSV-1. However, 6-(4-methoxyphenyl)-xantopurpurin highlighted as the only AQ studied that exhibited a significant activity against WNV. It was indirectly demonstrated that **6-bromo-xantopurpurin** has photosensitizing properties, since it exhibited an important photostimulated antiherpetic effect. Moreover, at the active concentration, it did not cause harmful effects in the host cells under irradiation.

It should be noted that none of the evaluated AQ showed activity against VEEV.

Consequently, the results derived from this thesis contribute to the phytochemical knowledge of our native flora, and its importance in the discovery of bioactive secondary metabolites, as potential antiviral agents. In addition, this thesis proposes obtaining compounds that serve as a starting point for the production of semisynthetic or synthetic substances with antiviral effect. Even, it is emphasized that the prospection of the native flora in the search of

photosensitizing compounds, promotes the development of more efficient pharmacotherapies for the treatment of viral infections, such as the Antimicrobial Photodynamic Therapy.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN	7
I- Las infecciones virales	9
II- Los virus	10
II-1- Virus West Nile.....	12
II-2- Virus Encefalitis Equina Venezolana	15
II-3- Virus Herpes Simple Tipo 1	17
III- Tratamiento de las infecciones virales	20
IV- Los antivirales	21
V- Búsqueda de nuevos antivirales de origen natural	23
VI- Las antraquinonas.....	26
VI-1- Biosíntesis.....	28
VI-2- Antraquinonas en la familia de las Rubiáceas	30
VII- Especies vegetales estudiadas de la familia de las Rubiáceas	31
VII-1- <i>Galium latoramosum</i> Clos.	31
VII-2- <i>Heterophyllaea pustulata</i> Hook. f.	32
VIII- Otros recursos para la obtención de antraquinonas.	33
X- Terapia fotodinámica antimicrobiana	35
Capítulo 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
I- Hipótesis	39
II- Objetivos	39
II-1- General	39
II-2- Específicos	39
Capítulo 3: MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
I- Estudio químico.....	43
I-1- Material vegetal	45
I-1.1- Recolección e identificación	47
I-1.2- Preparación del material vegetal	46
I-2- EXTRACTOS VEGETALES	47
I-2.1- Obtención de extractos.....	47
I-2.2- Caracterización química de los extractos bioactivos de <i>G. latoramosum</i> : HPLC-DAD-ESI -QTOF	48

I-3- OBTENCIÓN DE LUCIDINA PRIMEVERÓSIDO A PARTIR DE <i>G. latoramosum</i>	51
I-4- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ANTRAQUINONAS	51
I-4.1- Partición	52
I-4.2- Cromatografía	52
I-4.2-A- Cromatografía en columna	52
I-4.2-B- Cromatografía en capa delgada preparativa	53
I-5- OBTENCIÓN DE DERIVADOS ANTRAQUINÓNICOS: semisíntesis y síntesis total.....	53
I-5.1- Obtención de lucidina: hidrólisis de lucidina primeverósido	54
I-5.2- Obtención de nordamnacantal: oxidación de lucidina	54
I-5.3- Obtención de derivados de xantopurpurina	55
I-5.3-A- Obtención de 6-bromo-xantopurpurina	55
I-5.3-B- Obtención de 6-fenil-xantopurpurina y 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina	57
I-6- DETERMINACIÓN DEL GRADO DE PUREZA DE ANTRAQUINONAS: HPLC-UV-Vis.....	58
I-7- IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTRAQUINONAS	60
I-7.1- Cromatografía en capa fina analítica	60
I-7.2- Técnicas espectroscópicas.....	61
I-7.2-A- Espectrofotometría UV-Vis	61
I-7.2-B- Espectrometría de masas de alta resolución	61
I-7.2-C- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	61
I-7.3- Rotación óptica.....	62
I-7.4- Punto de fusión	62
II- Estudios de actividad biológica	63
II-1- MATERIALES.....	65
II-1.1- Células y medios de cultivo	65
II-1.2- Cepas virales.....	66
II-1.3- Muestras para ensayos biológicos.....	66
II-2- METODOLOGÍAS	67
II-2.1- Evaluación de citotoxicidad <i>in vitro</i>	67
II-2.1-A- Observación del efecto citopático	67
II-2.1-B- Determinación de la viabilidad celular	68

II-2.2- Evaluación de la actividad antiviral <i>in vitro</i>	69
II-2.2-A- Determinación de la viabilidad de la célula hospedadora	69
II-2.2-B- Reducción de unidades formadoras de placas	70
II-2.3- Algoritmo de la evaluación de la actividad antiviral <i>in vitro</i>	71
II-2.3-A- Valoración de la actividad antiviral general	72
II-2.3-B- Determinación del momento de acción antiviral	73
II-2.3-B-1- Evaluación del efecto virucida	74
II-2.3-B-2-Evaluación de la actividad antiviral en la etapa pre-infección.....	75
II-2.3-B-3- Evaluación de la actividad antiviral en la etapa durante la infección	75
II-2.3-B-4- Evaluación de la actividad antiviral en la etapa post-infección	76
II-2.3-B-5- Evaluación de la actividad antiviral en las etapas inmediatamente temprana, temprana y tardía post-adsorción viral....	77
II-2.4- Evaluación de la inactivación viral fotoestimulada <i>in vitro</i>	79
II-3- MÉTODO ESTADÍSTICO	81
Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIONES	83
I- <i>Galium latoramosum</i> Clos	85
I-1- Obtención de extractos.....	87
I-2- Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de extractos	88
I-3- Evaluación de la actividad antiviral <i>in vitro</i> de extractos	90
I-4- Caracterización química de los extractos	92
I-5- Procesamiento del extracto etanólico	96
I-5.1- Purificación de lucidina primeverósido.....	96
I-5.2- Identificación de lucidina primeverósido	96
I-6- Estudios de actividad biológica de lucidina primeverósido.....	102
I-6.1- Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i>	102
I-6.2- Evaluación de la actividad antiviral <i>in vitro</i>	103
I-7- Procesamiento del extracto de Acetato de etilo	105
I-7.1- Purificación bioguiada	105
I-7.2-Identificación del compuesto bioactivo	109
I-8- Procesamiento del extracto de ButOH-AcOEt	118

I-8.1- Purificación del compuesto mayoritario: A1	118
I-8.2- Elucidación estructural del compuesto A1: Identificación de 2-isobutil éster de munjistina	119
I-9- Estudios de actividad biológica de 2-isobutil éster de munjistina	127
I-9.1- Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i>	127
I-9.2- Evaluación de la actividad antiviral <i>in vitro</i>	128
I-9.2-A- Valoración de la actividad antiviral general	128
I-9.2-B- Determinación del momento de acción antiviral de 2-isobutil éster de munjistina sobre el HSV-1	130
I-9.2-B-1- Evaluación del efecto virucida de 2-isobutil éster de munjistina sobre HSV-1	131
I-9.2-B-2- Evaluación de la actividad de 2-isobutil éster de munjistina sobre distintas etapas de la replicación del HSV-1	132
I-9.2-B-3- Evaluación de la acción de 2-isobutil éster de munjistina post-infección: Etapas inmediatamente temprana, temprana y tardía post-adsorción viral	133
I-9.3- Evaluación de otros efectos biológicos de 2-isobutil éster de munjistina: Citotoxicidad <i>in vitro</i> sobre línea celular humana de cáncer cervical	137
I-10-Discusión de resultados obtenidos para <i>G. latoramosum</i>	138
II- <i>Heterophyllaea pustulata</i> Hook. f.	141
II-1- Aislamiento, purificación e identificación de antraquinonas fotosensibilizantes	144
II-1.1- Soranjidiol	144
II-1.2- Bisoranjidiol	146
II-2- Estudios de actividad biológica de soranjidiol y bisoranjidiol.....	148
II-2.1- Evaluación de la citotoxicidad <i>in vitro</i>	148
II-2.2- Evaluación de la actividad antiviral <i>in vitro</i>	149
II-2.3- Inactivación herpética fotoestimulada <i>in vitro</i> por soranjidiol y bisoranjidiol.....	150
II-2.3-A- Evaluación de soranjidiol	150
II-2.3-B- Evaluación de bisoranjidiol	153
II-3- Discusión de resultados obtenidos para <i>H. pustulata</i>	156
III- Otros derivados antraquinónicos.....	159
III-1- Obtención, purificación e identificación de lucidina	161

III-2- Obtención, purificación e identificación de nordamnacantal.....	162
III-3- Obtención de derivados de xantopurpurina	166
III-3.1- Obtención, purificación y elucidación estructural de 6-bromo-xantopurpurina	166
III-3.2- Obtención, purificación y elucidación estructural de 6-fenil-xantopurpurina	173
III-3.3- Obtención, purificación y elucidación estructural de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina	179
III-4- Evaluación de citotoxicidad y actividad antiviral <i>in vitro</i> de derivados antraquinónicos obtenidos por síntesis	185
III-4.1- Evaluación biológica de nordamnacantal.....	186
III-4.2- Evaluación biológica de 6-bromo-xantopurpurina	188
III-4.3- Evaluación biológica de 6-fenil-xantopurpurina.....	190
III-4.4- Evaluación biológica de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.....	192
III-5- Inactivación viral fotoestimulada <i>in vitro</i>	196
III-5.1- Evaluación de lucidina primeverósido.....	197
III-5.2- Evaluación de 6-bromo-xantopurpurina	198
III-6- Discusión de resultados sobre otros derivados antraquinónicos	198
IV- Discusión general	201
Capítulo 5: CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	207
I- Conclusiones	209
II- Proyecciones	211
Capítulo 6: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	213
Trabajos publicados en eventos científicos	231
Anexo	233

ABREVIATURAS

Ac	Extracto acuoso
A_{CT}	Absorbancia del control de toxicidad
A_{CV}	Absorbancia del control viral
Agua miliQ	Agua ultrapura
A_T	Absorbancia del tratamiento
ATF	Ácido trifluoroacético
[α]_D	Actividad óptica
Acetona-d₆	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
ACOR	Herbario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-UNC
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNpol	ADN polimerasa
AQ/AQs	Antraquinona/s
ARN	Ácido ribonucleico
ATB	Antibiótico
Ben	Benceno
Bisor	Bisoranjidiol (5,5'-bisoranjidiol)
br	Señal ancha en Resonancia Magnética Nuclear
BrX	6-bromo-xantopurpurina
ButOH	Butanol
CC	Control Celular
CC₅₀	Concentración Citotóxica que reduce la viabilidad en un 50 %
CCol	Cromatografía en Columna
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CE₅₀	Concentración Efectiva que inhibe el 50 %
CORD	Museo Botánico de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales-UNC
COSY	“COrrrelation SpectroscopY” (Correlación espectroscópica H-H a un enlace)
C+	Control positivo
Cryo-EM	“cryo-electron microscopy” (criomicroscopía electrónica)
CSubT	Concentración Sub-Tóxica

CT	Control Toxicidad
CV	Control Viral
δ	Corrimiento químico
δ_H	Corrimiento químico de protón
δ_C	Corrimiento químico de carbono 13
d	Doblete
dd	Doble doblete
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetil sulfóxido
DMSO-d6	Dimetil sulfóxido deuterado
DO	Densidad Óptica
DOc	Densidad Óptica del cultivo celular control
DOt	Densidad Óptica del cultivo celular tratado
ECP	Efecto Citopático
EM	Espectrometría de Masa
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ESI	“Electron Spray Ionization” (Ionización por electro espray)
ESI-QTOF	“Electron Spray Ionization–Quadrupole Time Of Fly” (Ionización por electro espray–analizador de triple Cuadrupolo de tiempo de vuelo)
EtOH	Etanol
FE	Fase Estacionaria
FM	Fase Móvil
FOS	Foscarnet
Fr-Hex-AcOEt	Fracción hexánica del extracto de acetato de etilo
Fr-CHCl₃-AcOEt	Fracción clorofórmica del extracto de acetato de etilo
Fr-AcOEt-AcOEt	Fracción acetato de etilo del extracto de acetato de etilo
Fr-Ac-AcOEt	Fracción acuosa del extracto de acetato de etilo
FS	Fotosensibilizador
HFo	Ácido fórmico
HIV-1	“Human inmunodeficiency virus Type 1” (virus de inmunodeficiencia humana Tipo 1)
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation” (Correlación C-H a múltiples enlaces)

HPLC	“High Performance Liquid Cromatography” (Cromatografía líquida de alta resolución)
HPLC-UV	“High Performance Liquid Cromatography” (Cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta-visible)
HPLC-DAD-ESI-QTOF	“HPLC with diode-array detector and Mass Spectrometry with Electron Spray Ionization and Quadrupole Time Of Fly” (Cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos y espectrometría de masa con ionización de electro spray y Detector de triple cuadrupolo de tiempo de vuelo)
HPV-18	“Human Papiloma Virus Type 18” (Virus Papiloma Humano Tipo 18)
HR-MS	“High Resolution-Mass Spectrometer” (Espectrometría de Masa de alta resolución)
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Coherence” (Correlación C-H a 1 enlace)
HSV-1	“Herpes Simplex Virus-Type 1” (Virus Herpes Simple-Tipo 1)
IgG	Inmuno globulina G
Im	2-isobutil éster de munjistina
IMBIV-CONICET	Instituto Multidisciplinario de Bilogía Vegetal - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
IS	Índice de Selectividad
IsopOH	Isopropanol
J	constante de acoplamiento
J_o	constante de acoplamiento orto
J_m	constante de acoplamiento meta
J_p	constante de acoplamiento para
λ	Longitud de onda
Lp	Lucidina primeverósido
MC	Medio de Crecimiento
MCNC	Máxima Concentración No Citotóxica
MEM	Medio Esencial Mínimo Eagle-Earle
MEM2X	MEM de doble concentración
MeOH	Metanol

MeOH-HPLC	Metanol grado HPLC
MeOPhX	6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina
m	multiplete
MM	Medio de mantenimiento
MOI	“Multiplicity of infection” (Multiplicidad de Infección)
MS	“Mass Spectrometry” (Espectrometría de masa)
MSⁿ	Rompimiento Masa-Masa
mult.	Multiplicidad
MV	Material Vegetal
m/z	Relación masa carga
<i>n</i>-hex	<i>n</i> -hexano
Nor	Nordamnacantal (1,3-dihidroxi antraquinona-2-carbaladehído)
³O₂	Oxígeno molecular
¹O₂	Oxígeno singlete
O₂^{•-}	Radical anión superóxido
OMS	Organización Mundial de la Salud
OSB	ácido o-succinilbenzoico
overnight	Incubación toda la noche
PBS	“Phosphate-Buffered saline” (Buffer Fosfato Salino)
PCC	“Pyridinium chloro chromate” (clorocromato de piridinio)
p.f.	Punto de fusión
PhX	6-fenil-xantopurpurina
(PPh₃)₄Pd(0)	tetraquis-trifenil-fosfina-paladio
QTOF	“Quadrupole Time Of Fly” (Detector de triple cuadrupolo de tiempo de vuelo)
R²	Coeficiente de correlación
R_f	Relación de frente
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN-¹H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN-¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RN	Rojo Neutro
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute” (medio de cultivo)
s	Singlete
SFB	Suero Fetal Bovino

Sor	Soranjidiol (1,3-dihidroxi-2-metil antraquinona)
T	Tratamiento
TK	Timidina Kinasa
TMS	Tetrametil silano
TFD	Terapia Fotodinámica
TFDA	Terapia Fotodinámica Antimicrobiana
TLC	“Thin Layer Chromatography” (Cromatografía en capa fina)
TLCp	Cromatografía en capa fina preparativa
t_R	Tiempo de retención
UFP	Unidades Formadoras de Placas
UFP_{CV}	Unidades Formadoras de Placas en el Control Viral
UFP_T	Unidades Formadoras de Placas en el Tratamiento
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VC	Viabilidad Celular
VEEV	“Venezuelan Encephalitis Equine Virus” (Virus encefalitis equina venezolana)
WNV	“West Nile Virus” (Virus del Nilo del Oeste)
% I	Porcentaje de Inhibición
% P/P	gramos de extracto vegetal o antraquinona cada 100g de material vegetal o extracto
% VC	Porcentaje de Viabilidad Celular

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

I- Las infecciones virales

Las enfermedades infecciosas son el resultado de interacciones entre factores que facilitan la transmisión del agente, como hospedadores susceptibles y agentes patógenos que encuentran en estos escenarios condiciones adecuadas para su multiplicación y diseminación (OPS, 2011).

La creciente emergencia y re-emergencia de infecciones virales, representa uno de los aspectos más notorios en el campo de la salud humana (Cunningham *et al.*, 2017; Salazar *et al.*, 2017). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), han aparecido al menos 29 enfermedades nuevas que han producido la muerte de millones de personas; la mayor parte de estas son infecciones emergentes causadas por virus (OMS, 1998a). La disponibilidad actual de técnicas moleculares y el desarrollo de perspectivas epidemiológicas más amplias, ha permitido la detección de nuevas enfermedades de origen viral. Sin embargo, los agentes causales son meras variantes de tipos virales preexistentes, lo que sugiere que la diversidad viral actual es el resultado de la diversificación de unos cuantos grupos ancestrales (Lazcano, 2010).

Dentro de las enfermedades virales emergentes, los virus transmitidos por artrópodos, denominados “arbovirus”, constituyen un problema sanitario de elevado impacto para Argentina y el resto de América (Diaz L. y Vezanni D., 2016; Contigiani *et al.*, 2017). Asimismo, las enfermedades provocadas por este grupo de virus se encuentran entre las llamadas “enfermedades tropicales denunciadas no atendidas”. Este tipo de patologías se caracterizan por proliferar en entornos empobrecidos, con ambientes calurosos y húmedos; y además, suelen ser dejadas de lado cuando se establecen las agendas y los presupuestos de salud. La desatención de este tipo de enfermedades, también se produce a nivel de la investigación y el desarrollo, debido a que los incentivos para desarrollar nuevos medios de diagnóstico, medicamentos y vacunas son escasos para las enfermedades que suponen un mercado de clientes sin capacidad de pago (LaBeaud, 2008; OMS, 2010).

Entre los arbovirus que cobran especial importancia para Córdoba y en general, para toda la zona templada y subtropical de Argentina y resto de América del Sur, se destacan los que provocan encefalitis en humanos: virus West Nile (WNV) del género *flavivirus*, y virus Encefalitis Equina Venezolana

(VEEV) del género *alphavirus*. Estos dos virus, además de generar encefalitis en humanos, son patógenos de alto impacto sanitario para equinos, siendo causa de enormes pérdidas económicas (Mitchell *et al.*, 1985; Spinsanti *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2008; Ladeau *et al.*, 2008; Pisano *et al.*, 2016; Marcondes *et al.*, 2017).

Por otra parte, otro de los virus de relevante impacto sobre la salud humana, es el virus del Herpes Simple (Fatahzadeh *et al.*, 2007). Según la OMS, los virus de la familia Herpesviridae infectan el 90 % de la población, siendo el ser humano el hospedador de al menos nueve tipos de virus herpes. El virus herpes simple Tipo 1 (HSV-1) es el más prevalente, ocasiona infecciones latentes y se reactiva causando infecciones recurrentes asociadas a estados inmunodeprimidos, provocando herpes cutáneo o genital, conjuntivitis, queratitis, encefalitis o eccema herpético (Kukhanova *et al.*, 2014).

II- Los virus

Desde tiempos antiguos, en los que la naturaleza de los virus se desconocía, hasta su aislamiento e identificación a principios del siglo XX, éstos constituían un flagelo no sólo para el hombre, sino también para los animales, insectos, vegetales e incluso organismos unicelulares (bacterias, parásitos y hongos) (Castilla *et al.*, 2009).

La palabra virus deriva del latín *venom* que significa veneno. Un virus es una organización biológica, extremadamente pequeña e infecciosa. desencadena una respuesta inmune, que en algunos casos puede controlar al virus y en otros, este agente infeccioso puede causar efectos nocivos, especialmente en individuos con sistema inmune comprometido, que en el peor escenario resulta letal. Los virus están conformados por genoma ARN o ADN, que a su vez puede o no estar cubierto por una envoltura lipídica (Wagner *et al.*, 1999). Su tamaño y especializaciones varían como puede observarse en la Fig. 1.1. Las imágenes ilustran esta variedad de tamaños y especializaciones. La imagen del herpes simple es sólo la nucleocápside, se incluye en la misma escala la imagen de una molécula de inmunoglobulina (IgG) para la comparación directa.

A pesar de su aparente simplicidad y de sus dimensiones extraordinariamente reducidas, los virus son el resultado de un proceso de evolución muy sofisticado (Lazcano 2010).

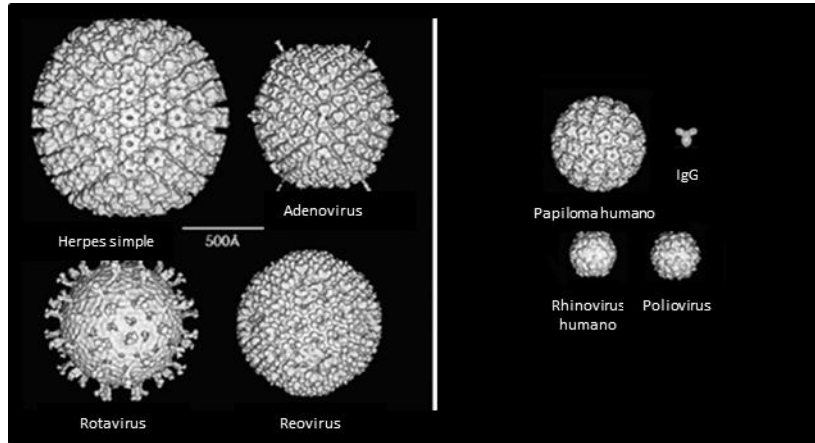


Figura 1.1. Galería de partículas virales obtenidas por criomicroscopía electrónica (cryo-EM) y reconstruidas con métodos 3D.

La barra de escala corresponde a 500 Å. (Adaptado por Knipe *et al.*, 2007, de Baker *et al.*, 1999).

A diferencia de las bacterias, hongos y parásitos, los virus no son un organismo autónomo, ya que carecen de maquinaria biosintética, sistema energético y ciertas enzimas. Por lo tanto, sólo puede replicarse dentro del entorno de la célula de otro organismo (célula hospedadora), siendo llamados parásitos obligados de la célula hospedadora (Wagner *et al.*, 1999; Castilla *et al.*, 2009).

Este agente infeccioso tiene varias estrategias de invasión. Cada especie viral tiene su propia y única configuración de moléculas de superficie que se ajustan con precisión a las membranas de las células diana, lo cual le permite su ingreso al hospedador (Wagner *et al.*, 1999). Estos atributos, variación genética, variedad en medios de transmisión, replicación eficiente dentro de las células hospedadoras, y la capacidad para persistir en el hospedador conducen su éxito en la evolución (Breitbart *et al.*, 2005; Edwards *et al.*, 2005).

La mayoría de las infecciones virales causan cambios morfológicos, denominado efecto citopático (ECP), y efectos bioquímicos en las células hospedadoras, generando alteraciones en la membrana celular, lisis celular o

apoptosis (Bekhit A E y Bekhit A A, 2014). En ciertos casos, y bajo determinadas condiciones, pueden permanecer en forma de infecciones persistentes, cohabitando con el hospedador que parasitan en forma silenciosa o con períodos de recurrencia activa (Castilla *et al.*, 2009).

En la Fig. 1.2 se muestran fotomicrografías de monocapa de células Vero (hospedadora) sin infectar (Fig. 1.2.A) en comparación con células infectadas con el virus de HSV-1 (Fig. 1.2. B y C). El ECP comenzó con la pérdida de la arquitectura nuclear, luego un redondeamiento celular focalizado, la formación de sincicios y finalmente desprendimiento celular.



(Magnificación 40x)

Figura 1.2. Efecto citopático causado por HSV-1 sobre una monocapa de células Vero. **(A)** Células sin infectar. **(B)** Células 72 h post-infección, donde se observa redondeamiento celular focalizado y la formación de la placa de lisis. **(C)** Células 96 h post-infección con efecto citopático masivo con formación de sincicios. (Konigheim, Tesis Doctoral, 2012).

Para el desarrollo de ésta tesis doctoral, se seleccionaron modelos virales totalmente caracterizados y de uso diario en investigación y diagnóstico, en el Instituto de Virología Dr. José María Vanella de la Facultad de Ciencias Médicas (Universidad Nacional de Córdoba). Estos son: VEEV y WNV, ambos con genoma ARN; y el virus HSV-1, con genoma ADN.

II-1- Virus West Nile

El WNV pertenece al género *Flavivirus* dentro de la familia *Flaviviridae*. Se trata de un virus con genoma ARN, encapsulado. La partícula

viral presenta simetría icosaédrica y un diámetro de 50 nm (Fig. 1.3.A). Una vista en sección transversal (Fig. 1.3.B), obtenida por criomicroscopía electrónica (Cryo-EM, del inglés cryo-electron microscopy) muestra la organización multicapa del virus, donde se observa la bicapa lipídica y el núcleo (ARN) (Mukhopadhyay *et al.*, 2003).

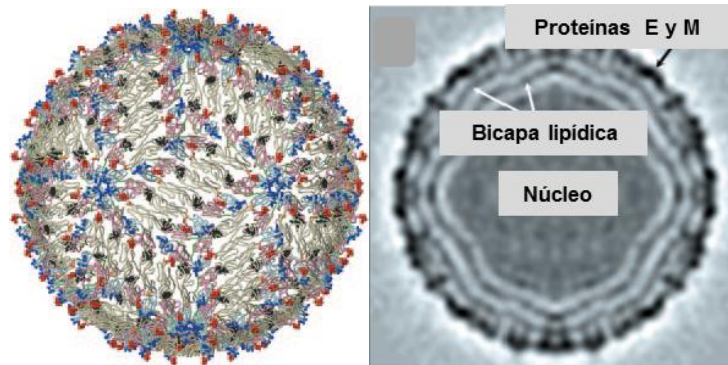


Figura 1.3. Virus West Nile. **(A)** Modelo atómico (Kanai *et al.*, 2006). **(B)** Estructura determinada por Cryo-EM (17 Å) (Mukhopadhyay *et al.*, 2003) (Imagen adaptada).

WNV se encuentra ampliamente distribuido, siendo uno de los *Flavivirus* de mayor distribución mundial. En Argentina, se introdujo posiblemente en el 2004, ya que los antecedentes comienzan con el aislamiento de 3 cepas a partir de caballos en el 2006 (Morales *et al.*, 2006), y la detección de aves infectadas en la ciudad de Córdoba a principios de 2005 (Díaz *et al.*, 2008).

Tal como se observa en la Fig. 1.4, este virus es mantenido en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave. Los principales vectores son los mosquitos del género *Culex*, mientras que las aves son los huéspedes amplificadores primarios. Humanos y caballos son huéspedes finales (Berrocal *et al.*, 2006. OMS, 2011; Contigiani *et al.*, 2017; Marcondes *et al.*, 2017).

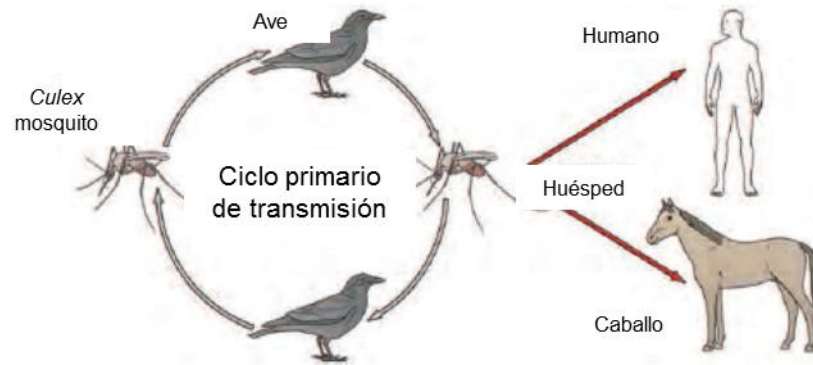


Figura 1.4. Ciclo de transmisión del WNV (Pierson y Diamond, 2013) (Imagen adaptada).

La infección del ser humano por este virus suele ocurrir como resultado de picaduras de mosquitos (Fig. 1.4), los cuales incorporan las partículas virales cuando pican a aves infectadas, en cuya sangre circula el virus durante algunos días (OMS, 2011).

Las epidemias por WNV ocurren en la actualidad de manera regular en Europa y en la cuenca del Mediterráneo. En EE.UU., desde 1999, se han reportado más de 30.000 personas afectadas por el WNV. En Latinoamérica, el comportamiento eco-epidemiológico de este virus ha sido muy diferente. Los casos humanos y mortandad de aves/equinos han sido escasos y esporádicos, sin detectarse ninguna epidemia/epizootia de magnitud al presente (Díaz L. y Vezanni D., 2016).

En los caballos, las infecciones sintomáticas son raras y por lo común leves, pero pueden causar afección del sistema nervioso, en particular una encefalomiелitis mortal (OMS, 2011).

En humanos las infecciones por el WNV es asintomática en aproximadamente un 80 % de las personas infectadas. Sin embargo, en las restantes, se presenta como una enfermedad febril autolimitada. En los casos de enfermedad neurológica, se puede observar encefalitis, meningitis o meningoencefalitis, con mayor incidencia y mortalidad por encefalitis en personas de mayor edad y pacientes inmunocomprometidos. Se calcula que aproximadamente 1 de cada 150 personas infectadas llegan a padecer una

afección más grave por este virus. (Berrocal *et al.*, 2006; OMS, 2011; Contigiani *et al.*, 2017; Marcondes *et al.*, 2017).

El tratamiento de los pacientes con afección neuroinvasora consiste en medidas de sostén, tales como hospitalización, administración de líquidos por vía intravenosa, apoyo respiratorio y prevención de infecciones secundarias. No hay vacuna para los seres humanos (OMS, 2011).

II-2- Virus Encefalitis Equina Venezolana

El VEEV (Fig 1.5) pertenece al género *Alfavirus* dentro de la familia *Togaviridae*. Una vista en sección transversal (Fig. 1.5.B), muestra la organización multicapa del virus. El genoma ARN (verde), está contenido dentro de una nucleocápside (azul) de simetría icosaédrica (30 a 70 nm de diámetro), formada por una sola capa de proteína. La nucleocápside se encuentra envuelta por una membrana lipídica (amarillo) que deriva de la membrana plasmática de la célula del hospedador; y contiene tres glicoproteínas (E1, E2 y E3, en magenta, celeste y naranja, respectivamente) (Kuhn, 2013).

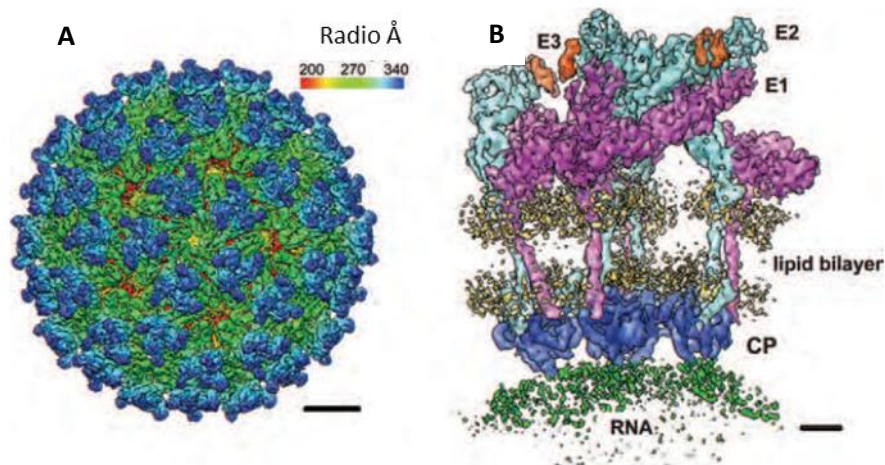


Figura 1.5. Estructura del Virus Encefalitis Equina Venezolana. **(A)** Estructura icosaédrica. **(B)** Sección transversal. (Kuhn, 2013).

El VEEV ingresa intravascularmente a los humanos por la picadura de un mosquito infectado (Pisano *et al.*, 2016; OPS, 2016).

Este virus se ha identificado serológicamente como un complejo que consta de seis subtipos (I al VI). Los subtipos enzoóticos realizan su ciclo biológico en nichos silvestres entre mosquitos vectores y roedores reservorios (Fig. 1.6), y ocasionalmente pueden causar enfermedad en humanos (Pisano *et al.*, 2016; OPS, 2016). Los virus epidémicos/epizoóticos emergen periódicamente causando brotes que afectan a humanos y equinos (Powers *et al.*, 1997). Para estos subtipos, los equinos actúan como hospedador amplificador (Pisano *et al.*, 2016; OPS, 2016).

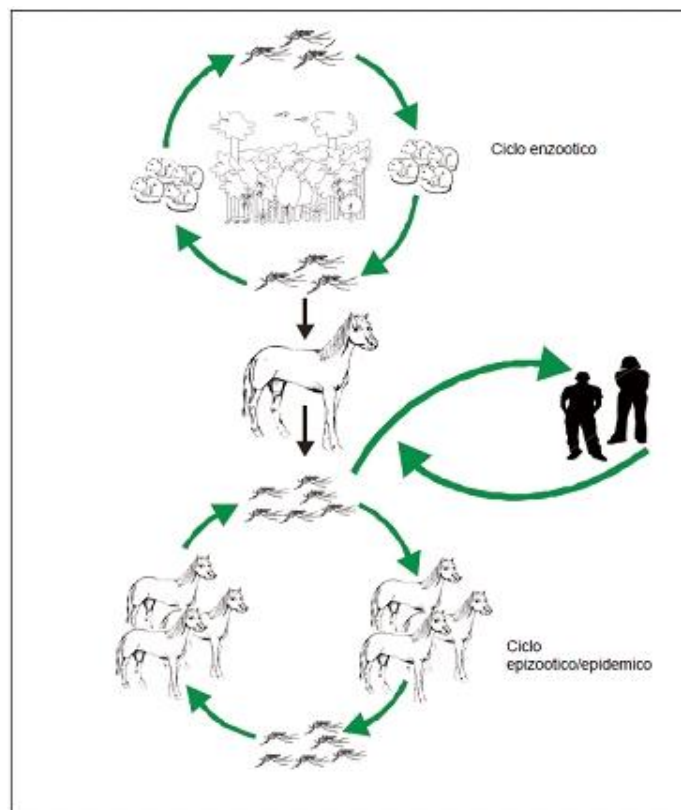


Figura 1.6. Ciclo de transmisión del Virus Encefalitis Equina Venezolana (OPS, 2016).

Este complejo posee una amplia distribución geográfica en el continente Americano, especialmente en áreas de selva húmeda tropical, donde las condiciones ecológicas, climáticas y ambientales, son propicias para el desarrollo y distribución de estos virus. Los subtipos enzoóticos de VEEV en Argentina, se detectaron en las provincias de Córdoba, Salta, Chaco, Formosa y Tucumán (Pisano *et al.*, 2010 a, b). El VEEV epizoótico reviste gran

importancia por su patogenicidad en los humanos y por las características de las epizootias y de las epidemias que genera, causando grandes problemas económicos (Pisano *et al.*, 2016; OPS, 2016).

Las infecciones en humanos pueden ser asintomáticas o producir una enfermedad aguda que se caracteriza por tener un período de incubación corto (1 a 5 días). Los síntomas y signos más frecuentes son fiebre, cefalea, dolores musculares, siendo la encefalitis una de las manifestaciones más severas, que sólo ocurren en un 4-14 % de los casos, especialmente en niños y ancianos. En los niños, en muchos casos pueden quedar secuelas como retardo mental, epilepsia, dificultad para aprender, hidrocefalia, cambios de personalidad y parálisis. En tanto que, los adultos mayores de 50 años son nuevamente más propensos a desarrollar encefalitis (OPS, 1995; Pisano *et al.*, 2016).

En mujeres con infección durante el embarazo, se ha informado un aumento de casos de abortos y nacimientos de niños con malformaciones congénitas, especialmente a nivel de sistema nervioso central (Mesa *et al.*, 2005).

En los equinos, la infección por este virus se conoce como “peste loca”, debido a los síntomas nerviosos que desarrolla como hipersensibilidad al ruido y al tacto, incoordinación, movimiento en círculo, desorientación, movimientos musculares involuntarios, depresión, somnolencia, parálisis (Griffin, 2001; Contigiani, 2005; Pisano *et al.*, 2016).

Existe una vacuna de VEEV inactivado disponible comercialmente para equinos en EE.UU (Paessler y Weaver, 2009). Sin embargo, esta vacuna podría contribuir al surgimiento de brotes a causa de su inadecuada aplicación (Pisano *et al.*, 2016). Para la población humana, no existe un medicamento específico para el tratamiento de esta virosis. Por lo tanto, éste se basa en el manejo sintomático y de soporte con anticonvulsivos (OPS, 1995; OPS 2016, Pisano *et al.*, 2016).

II-3- Virus Herpes Simple Tipo 1

El HSV-1 pertenece a la familia Herpesviridae. Tal como se observa en la Fig. 1.7, el virus está conformado por un núcleo o core que contiene el ADN viral, el cual consiste en una única molécula de doble hebra; una cápside

icosadeltaédrica; una capa amorfa de proteínas denominada tegumento, que rodea a la cápside y una envoltura proveniente de membranas celulares, la cual contiene lípidos y numerosas espículas formadas por proteínas virales (glicoproteínas) (Whitley *et al.*, 1998).

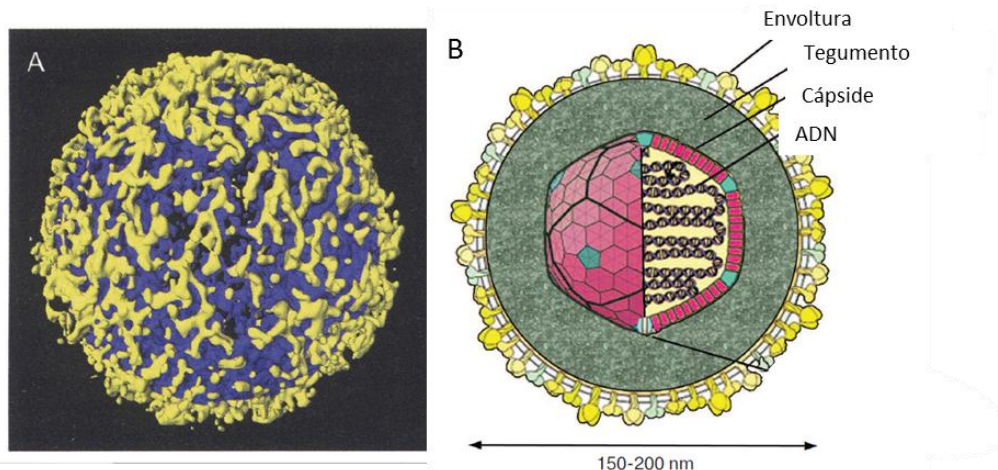


Figura 1.7. Estructura del Virus Herpes Simple Tipo-1. **(A)** Imagen obtenida por tomografía crioelectrónica, las glicoproteínas en amarillo y la membrana en azul (Roizman *et al.*, 2013). **(B)** Componentes del virión (Kukhanova *et al.*, 2014) (Imagen adaptada).

El HSV-1 tiene una tasa de infección muy alta en humanos. Se transmite de individuos infectados a individuos susceptibles durante el contacto con las mucosas o la piel; y el tipo de infección que se desarrolla es dependiente del estado inmune del hospedador. Las infecciones causadas por este virus ocurren en todo el mundo, no tiene variación estacional, y naturalmente sólo ocurren en seres humanos (Whitley y Roizman, 2001).

El sitio primario de infección es la mucosa orolabial. Después de esta infección primaria, el virus es transportado al ganglio trigeminal, donde se establece una infección latente que puede ser reactivada por varios estímulos (Egan *et al.*, 2013). Cuando se produce la reactivación, el HSV-1 es transportado de nuevo al sitio primario de la infección y provoca ulceraciones recurrentes. Durante la recurrencia, el HSV-1 puede eventualmente multiplicarse en el ojo, desencadenando queratitis ocular (Rowe *et al.*, 2013), la cual puede ocasionar ceguera y, en casos raros, infecciones cerebrales. La

encefalitis resultante por HSV-1 tiene tasas de mortalidad de hasta 70 % si no se trata (Hjalmarsson *et al.*, 2007, Whitley, 2006).

Un número limitado de antivirales están disponibles para la profilaxis o tratamiento de las infecciones por HSV-1: Aciclovir, penciclovir, brivudina, cidofovir (los cuales exhiben el mismo mecanismo de acción) y foscarnet. A diferencia de cidofovir y foscarnet, los tres primeros se administran como profármacos; y por lo tanto, deben ser activados por la timidina quinasa viral (TK) (Afshar *et al.*, 2017).

La farmacoterapia convencional comprende principalmente aciclovir (Hodge y Field, 2013). Este fármaco es un análogo nucleosídico que debe ser fosforilado por la TK antes de su incorporación en el ADN por la ADN polimerasa viral (ADNpol). Mediante estos dos pasos, el aciclovir previene el alargamiento de la cadena y por lo tanto, inhibe la síntesis de ADN viral (Dávola *et al.*, 2015).

Una consecuencia de este tratamiento, es la aparición de cepas virales resistentes. El HSV-1 puede adquirir resistencia a través de diferentes mecanismos, como ser alteraciones en los genes TK y ADNpol. Esta resistencia se presenta especialmente cuando se usa aciclovir como terapia profiláctica a largo plazo en pacientes inmunosuprimidos. Esta terapia, combinada con una respuesta deteriorada del hospedador, permite que los virus menos virulentos continúen replicándose (Andrei y Snoeck, 2013).

El tratamiento para las infecciones resistentes a aciclovir incluyen el uso combinado con foscarnet, un inhibidor directo de la ADNpol, pero también se han reportado resistencias debido a mutaciones en esta enzima (Andrei y Snoeck, 2013).

Frente a esta problemática, el desarrollo de nuevos compuestos antiherpéticos, es un desafío en química medicinal. Numerosas publicaciones demuestran el potencial de esta idea con investigaciones desarrolladas al respecto (Bag *et al.*, 2014, Vilhelmova-Ilieva *et al.*, 2014).

III- Tratamiento de las infecciones virales

Ante la presencia de este contexto, resulta factible inferir que no es fácil combatir los virus, siendo la forma más efectiva a través de vacunas. El diseño y aplicación masiva de algunas vacunas ha permitido poner freno a algunos virus causantes de epidemias, como el virus de la polio o el de la viruela. Pero la prevención no siempre es posible, ya que para algunos virus no se ha podido desarrollar vacunas (WNV, Zika) y en otros casos las vacunas que existen, no todas son verdaderamente eficaces (VEEV, Dengue) (OMS 2011; Swaminathan *et al.*, 2013; Pisano *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2018). Por este motivo, surge la necesidad de buscar compuestos antivirales para la prevención y tratamiento de estas infecciones que aún no tienen una terapéutica adecuada (Andrei y DeClerq, 1996).

En contraste con los agentes activos contra las infecciones bacterianas (antibióticos), el descubrimiento de fármacos antivirales selectivos, pareció imposible durante mucho tiempo. Los avances en la quimioterapia de las enfermedades virales son menores, y de hecho existen relativamente pocos antivirales de valor demostrado. Resulta difícil obtener un antiviral de amplio espectro debido a los atributos virales anteriormente expuestos, a lo que se suma la existencia de muchos grupos de virus (con distintos genomas) que presentan ciclos de replicación diferentes. De miles de compuestos ensayados, sólo se obtuvo un número reducido de compuestos antivirales comparado, con la cantidad de antibióticos en el mercado (Andrei y De Clerq, 1996). Chattopadhyay y Naik (2007), informaron que aunque numerosos compuestos habían sido probados en diferentes virus, sólo 37 medicamentos antivirales con licencia se encontraban en el mercado.

Según Barreto Penie *et al.* (1998) y Chattopadhyay y Naik (2007), las razones básicas de esta carencia son las siguientes:

- Los virus son parásitos intracelulares obligados que utilizan muchas vías bioquímicas y metabólicas de las células hospedadoras. Por lo tanto, resulta difícil alcanzar una actividad antiviral útil, sin afectar el metabolismo normal de la célula infectada, causando también efectos tóxicos en células no infectadas.
- El índice de selectividad (relación eficacia/toxicidad) debe ser elevado

para que el tratamiento sea aceptable, y así minimizar los efectos tóxicos.

- El surgimiento de cepas resistentes por el uso de antivirales en tratamientos prolongados.

IV- Los antivirales

Un fármaco antiviral, se define como un producto que es capaz, *in vitro* e *in vivo*, de reducir la presencia del virus infectivo en la célula hospedadora. Para que un fármaco sea efectivo debe ponerse en contacto con el virus y bloquear la adsorción a los receptores celulares, o bien penetrar en las células para alcanzar la concentración intracelular necesaria, y así actuar como tal o por modificaciones dentro de la misma para convertirse en un producto activo frente al virus, mientras que los sistemas específicos celulares queden intactos. La clave para una quimioterapia exitosa, es la inhibición de la replicación viral sin afectar, el funcionamiento de la célula hospedadora y de esta forma, minimizar la aparición de efectos adversos (Andrei y De Clerq, 1996).

De acuerdo a Hernández y Peña (2002), las cualidades ideales de un fármaco antiviral son:

- No inducir resistencia.
- No inducir persistencia o latencia en el virus.
- Selectividad.

Los mejores candidatos como drogas antivirales útiles en clínica, serían sustancias que actúen en etapas tempranas de la replicación viral. Estos compuestos, actuarían a bajas concentraciones y no interferirían en los procesos celulares (Andrei y De Clerq, 1996).

En el proceso de replicación viral, se han identificado fases específicas que son susceptibles de ser atacadas por sustancias antivirales (Fig. 1.8). Según Barreto Penie *et al.* (1998), en líneas generales son:

1) Adsorción: Es la unión del virus a la célula por medio de receptores presentes en la membrana plasmática celular y en la superficie del virus.

2) Penetración: Es el ingreso del virus a la célula permisiva. Se han descrito tres mecanismos de ingreso: endocitosis mediada por receptores, fusión de membranas y abriendo su propio camino. El mecanismo más

utilizado, tanto por los virus cubiertos como los desnudos, es la endocitosis, involucrando la maquinaria celular endocítica.

3) Desnudamiento del virus: Es el proceso de remoción de la cápside o envolturas virales que libera el ácido nucleíco. Este hecho permite que la información genética viral interactúe con la maquinaria biosintética de la célula hospedadora.

4) Síntesis de ácidos nucleicos: Se lleva a cabo por medio de una polimerasa que puede ser ARN polimerasa ARN-dependiente o ADN polimerasa ADN-dependiente.

5) Síntesis de proteínas: El ARN mensajero del virus, por medio de los ribosomas de la célula hospedadora, biosintetiza las proteínas de los capsómeros que van a constituir la cápside del virión.

6) Ensamblaje de los componentes del virus: Los capsómeros van a rodear al ácido nucleico viral para formar la nucleocápside. Las proteínas biosintetizadas se encuentran como proteínas precursoras que deben ser cortadas por enzimas para formar las proteínas estructurales finales.

7) Liberación del virus al exterior de la célula: Los virus intracelulares deben ser liberados al medio extracelular. Si son virus envueltos, estos pueden salir de la célula hospedadora mediante un proceso llamado brotación, en donde adquieren la envoltura, ya sea en el interior celular o a través de la membrana plasmática de la célula infectada. Otro mecanismo de liberación se da por citólisis, donde los virus son liberados al medio extracelular al romperse la membrana plasmática.

Knipe y Howley (2007) informan que en células de cultivo de tejidos totalmente permisivas, el proceso de replicación viral del HSV-1 toma aproximadamente de 18 a 20 h; y Tomé *et al.* (2007), indican que la replicación del ADN de este virus inicia antes de las 4 h después de la adsorción. Por lo tanto, los tiempos 0 y 2 h posteriores a la adsorción corresponden a etapas inmediatamente temprana y temprana de infección, respectivamente, y se encuentran asociadas a la síntesis y transporte de ADN, ARN o proteínas virales. Se puede suponer que 16 h post-adsorción, implica etapas tardías de la infección, las cuales se relacionan a procesos finales de morfogénesis de las nuevas partículas virales.

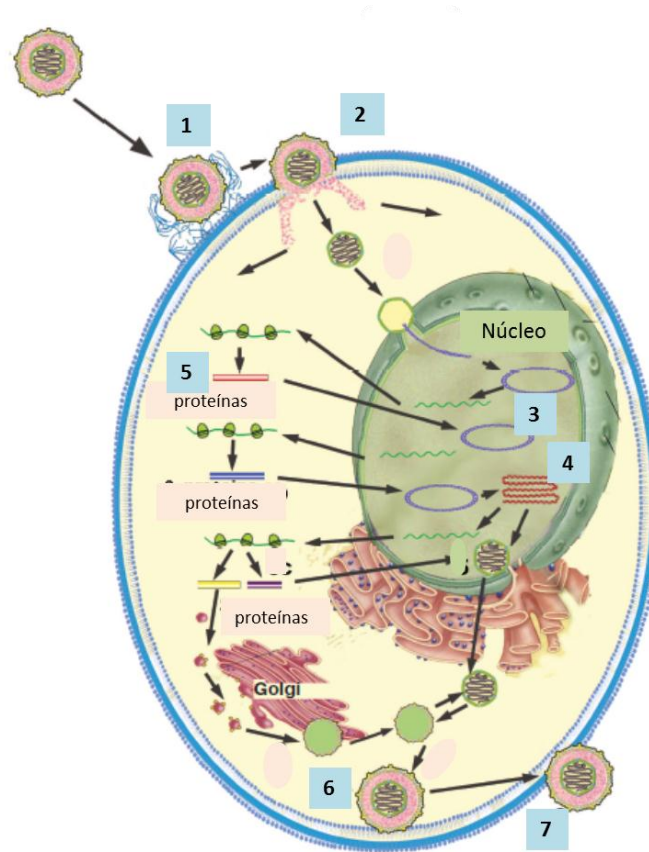


Figura 1.8. Proceso de replicación viral (Kukhanova *et al.*, 2014) (Imagen adaptada).

- 1) Adsorción. 2) Penetración. 3) Desnudamiento del virus. 4) Síntesis de ácidos nucleicos. 5) Síntesis de proteínas.
- 6) Ensamblaje de los componentes del virus. 7) Liberación del virus al exterior de la célula.

Se destaca que en la replicación de muchos virus, se ven implicadas enzimas codificadas por los éstos; y por lo tanto, deben considerarse como un blanco de acción. (Barreto Penie *et al.*, 1998).

V- Búsqueda de nuevos antivirales de origen natural

Lo anteriormente expuesto justifica la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. En este sentido, la OMS promueve fuertemente la investigación con plantas nativas para la obtención de nuevas sustancias medicinales (OMS, 1989). El proceso, que se inicia con la recolección de la planta hasta obtener un principio químicamente puro, con una determinada actividad farmacológica es largo y laborioso, y constituye el primer paso en la búsqueda de nuevos

fármacos. Implica aislar y purificar compuestos, que posteriormente deberán ser evaluados en cuanto a sus efectos biológicos y toxicológicos, a fin de establecer su potencial efecto terapéutico y la seguridad en su uso.

La búsqueda de nuevas moléculas bioactivas en plantas, para su aplicación en áreas terapéuticas como enfermedades infecciosas, inmunosupresión, oncología y enfermedades metabólicas, sigue siendo parte de la investigación farmacéutica (Newman y Cragg, 2012).

Una planta medicinal, es aquella que es utilizada en su totalidad o en parte por una etnia con fines terapéuticos (OMS, 1998). Y se define como Droga Vegetal a la planta entera o sus partes (raíces, tallos, hojas, flores y frutos), fragmentadas o trozadas, no procesadas, frescos o secos, que contienen compuestos químicos (flavonoides, antraquinonas, alcaloides, entre otros), llamados principios activos que son responsable de los efectos farmacológicos que posee la droga vegetal; y por lo tanto, se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos (ANMAT, 2004; ANMAT, 2015). Hay que destacar, que esta denominación lleva implícito en su significado, que se trata de un material bioactivo, que utilizado en dosis adecuadas puede resultar benéfico con fines terapéuticos, pero puede ser nocivo o inocuo si ello se desconoce. Por tal motivo, su administración implica un riesgo potencial y debería tener supervisión profesional, y contar con normativas que regulen y garanticen su calidad en término de eficacia, seguridad y confiabilidad (OMS, 1998).

Hasta 1985, existían por lo menos 119 distintas sustancias químicas de origen vegetal, obtenidas principalmente de unas 95 especies de plantas (Farnsworth *et al.*, 1985). Estas sustancias pueden considerarse fármacos en uso en uno o más países, como ser: atropina obtenida de *Atropa belladonna* L., cafeína de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, morfina y codeína de *Papaver somniferum* L., digoxina de *Digitalis lanata* Ehrh., efedrina de *Ephedra sinica* Stapf., entre otros (Fabricant y Farnsworth, 2000).

Según el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, el valor estimado de los productos farmacéuticos del Hemisferio Sur, derivados de especies medicinales, estaría oscilando entre los 35.000 a 47.000 millones de dólares. Se estima que cada nuevo fármaco que podría obtenerse de la

vegetación de bosques tropicales, tendría un valor promedio de 94 millones de dólares para una compañía farmacéutica privada (Martínez, 2005).

La importancia de las plantas medicinales se hace más pausable, principalmente en los países en vías de desarrollo. Más de dos tercios de las especies vegetales del mundo, de las cuales al menos 35.000 poseen valor medicinal potencial, son originarias de estos países (Martínez, 2005).

La co-evolución entre las plantas y sus enemigos naturales, incluyendo insectos, bacterias, hongos, nemátodos y virus, han hecho que las plantas por sus adaptabilidades, sinteticen una serie de principios que tendrían diferentes actividades biológicas (Briskin, 2000; Park, 2003).

El primer trabajo bibliográfico con base científica, sobre estudios de plantas medicinales de la Argentina fue *Plantae Diaphoricae* (Hieronymus, 1882). Desde entonces, las investigaciones sobre etnomedicina han proporcionado información valiosa de diferentes regiones de Argentina. Sin embargo, el conocimiento sobre la composición química y la actividad biológica de la flora medicinal debe continuar, ya que el 45 % de las especies no han sido analizadas químicamente y para el 58 % no se ha comprobado la actividad farmacológica (Barboza *et al.*, 2009).

La evaluación de la actividad antiviral de plantas es un área de investigación muy activa (Akram *et al.*, 2018). Una búsqueda de las palabras claves “antiviral y extracto” en una base de datos científica, excluyendo libros y referencias, recuperó 14.930 títulos (Bekhit A E y Bekhit A A, 2014). El aumento exponencial en el número de investigaciones sobre la actividad antiviral de extractos naturales, en el período comprendido entre 1994 y 2012, refleja la visión de la comunidad científica en la prospección de compuestos naturales para obtener fármacos antivirales, y los beneficios potenciales del uso de los recursos naturales para ese propósito (Bekhit A E y Bekhit A A, 2014).

Los derivados polifenólicos son los metabolitos secundarios más ampliamente encontrados en las plantas; y muchos de ellos han mostrado ser antivirales, pudiendo inactivar directamente al virus, efecto virucida (Vázquez-Calvo *et al.*, 2017), o inhibiendo la replicación viral dentro de la célula hospedadora, efecto antiviral (Bekhit A E y Bekhit A A, 2014; Xu *et al.*, 2017). Algunos han demostrado inhibir la unión del virus a la célula a través de

distintos mecanismos de acción, como ser: alteración de las propiedades físicas de la membrana viral (Song *et al.*, 2005) y unión a la capa de proteínas virales (Hudson *et al.*, 1990; Behrendt *et al.*, 2017). También se ha descrito que ciertos polifenoles inhiben enzimas de replicación viral (Amouroux *et al.*, 1998) y otros interrumpen la síntesis de ADN viral (Jassim *et al.*, 2003).

Dentro de los polifenoles, las antraquinonas (AQs) constituyen el grupo más numeroso de quinonas presentes en diversos géneros y especies vegetales, con una gran diversidad de efectos biológicos (Vickery M y Vickery B, 1981). Incluso no sólo se ha reportado la presencia de estos compuesto en plantas, sino también en hongos, líquenes e insectos (Kharlamova, 2009). En las plantas superiores, se encuentran principalmente en las familias Fabaceae (*Cassia*), Liliaceae (*Aloe*), Polygonaceae (*Rheum*, *Rumex*), Rhamnaceae (*Rhamnus*), Rubiaceae (*Asperula*, *Coelospermum*, *Coprosma*, *Galium*, *Morinda*, *Rubia*, *Heterophyllaea*) y Scrophulariaceae (*Digitalis*) (Wijnsma y Veerporte, 1986; Duval *et al.*, 2016).

Se destacan las AQs de la familia de las Rubiáceas por exhibir interesantes actividades biológicas *in vitro*, entre ellas antimicrobianas incluyendo antivirales (Wijnsma y Veerporte, 1986).

VI- Las antraquinonas

Las quinonas constituyen una clase de compuestos orgánicos que se caracterizan por la presencia de una dicetona cíclica (Fig. 1.9).

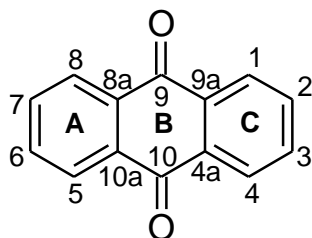


Figura 1.9. Estructura molecular de las antraquinonas.

Dentro de ellas, las 9,10-antraquinonas (9,10-dioxoantracenos) representan un importante subgrupo. Su estructura está basada en un sistema

antraceno planar y rígido, formado por tres anillos aromáticos (A-B-C), que contiene dos funciones ceto en las posiciones 9 y 10 (Malik y Müller, 2016).

La gran variedad de derivados antraquinónicos encontrados en la naturaleza difieren por los sustituyentes que poseen y por el patrón de sustitución de los anillos A y C. Generalmente, son hidroxiladas con propiedades fenólicas. Sus aglicones también presentan otros sustituyentes, como grupo metilo (-CH₃), metoxilo (-OCH₃) y grupos metil oxidados como por ejemplo hidroximetilo (-CH₂-OH), aldehído (-CHO) y carboxilo (-COOH). Muchas AQs aparecen como glicósidos combinados con diferentes azúcares. En la mayoría, el glúcido está unido a los grupos hidroxilos (O-glicósidos), y existen unos pocos donde el azúcar está unido directamente al núcleo (C-glicósidos) (Conner *et al.*, 1987). Respecto a los O-glicósidos, lo más frecuente es encontrarlos unidos a mono o disacáridos. Los monosacáridos generalmente presentes son: glucosa, rhamnosa y xilosa; y los disacáridos son: primeverósido (glucosa y xilosa), rutinósido (glucosa y rhamnosa) y genciobiósido (glucosa y glucosa). También pueden encontrarse dímeros de AQs o de antronas. Ambos tipos de estructuras, pueden estar formados por dos moléculas iguales o diferentes de AQ o de antrona, respectivamente. Las biantraquinonas se unen por cualquier posición diferente a la 9 y 10 (Suemitsu *et al.*, 1987; Alemayehu *et al.*, 1988). En cambio las biantronas, como lo es hipericina, se enlazan por C-10 y C-10' (Villar del Fresno, 1999) o C-9 y C-9' (Sibanda *et al.*, 1990).

Las AQs son utilizadas en la industria y en la cosmética como colorantes, y también en la medicina (Kharlamova, 2009) debido a que muestran una amplia gama de actividades farmacológicas, entre las que se pueden citar: efecto laxante (Fairbairn, 1976; van Gorkom *et al.*, 1999), anticancerígeno (Murdock *et al.*, 1979; Huang *et al.*, 2007; Shrestha *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2015), antiinflamatorio (Khan *et al.*, 2011), antiartrítico (Davis *et al.*, 1986), antimicótico (Wuthi-udomlert *et al.*, 2010), antibacteriano (Fosso *et al.*, 2012), antiplaquetarios (Gan *et al.*, 2008; Baqi *et al.*, 2009; Seo *et al.*, 2012), efectos neuroprotectores (Jackson *et al.*, 2013) y antivirales (Barnard *et al.*, 1995).

Se puede destacar su efecto como inhibidores del virus de la Inmuno deficiencia Humana Tipo 1 (HIV-1) (Higuchi *et al.*, 1991; Farnet *et al.*, 1996,

Deng *et al.*, 2006), poliovirus tipo 2 y 3 (Semple *et al.*, 2001), HSV-1 y 2, varicella-zoster, virus de la pseudorabia, virus influenza (Sydiskis *et al.*, 1991), y citomegalovirus (Barnard *et al.*, 1992).

Además, se ha demostrado que algunas AQs presentan propiedades fotosensibilizantes, es decir, que cuando estos compuestos naturales absorben luz a su longitud de onda (λ) de absorción, pueden reaccionar con el oxígeno molecular ($^3\text{O}_2$) para producir especies reactivas oxígeno (ERO), ya sea radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) a través de un mecanismo fotosensibilizante Tipo I, y oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) mediante un mecanismo fotosensibilizante Tipo II. En consecuencia, las ERO generadas oxidan diversas moléculas biológicas (Foote, 1991; Hudson *et al.*, 1993), generando un efecto nocivo sobre células cancerígenas o microorganismos. Sobre este mecanismo de acción se basa la Terapia Fotodinámica (TFD) aplicada a células cancerígenas o para inactivar microorganismos en la variante conocida como Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA). Por lo tanto, estas quinonas representan una potencial aplicación para la TFD/A (Comini *et al.*, 2011a; Comini *et al.*, 2011b; Rumie Vittar *et al.*, 2014; Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b).

VI-1- Biosíntesis

Las AQs naturales se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su patrón de sustitución, el cual deriva de dos vías biosintéticas diferentes que son características de determinadas y específicas familias de plantas, ya que no ocurren simultáneamente en la misma especie vegetal (Vickery M y Vickery B, 1981; Wijnsma y Verpoorte, 1986). A su vez, estos dos tipos de AQs exhiben efectos biológicos particulares que están relacionados a esta diferencia en el patrón de sustitución (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

Así, se distinguen las 1,8-dihidroxi AQs, principalmente con efecto laxante, generadas por la vía acetato-malonato. Este grupo de AQs que se presentan principalmente en forma de glucósidos se encuentran en las siguientes familias: Leguminosas (*Cassia* spp.), Rhamnáceas (*Rhamnus* spp.), Polygonáceas (*Rheum* spp.) y algunas familias de líquenes (Huneck y Yoshimura, 1996). Aunque es condición para ejercer el efecto catártico, la

presencia de dos grupos hidroxilos en posición 1 y 8 (Fig. 1.9) (Villar del Fresno, 1999), este grupo de AQs también ha demostrado poseer otras actividades biológicas como antibacteriana, antiviral, antitumoral, entre otras (Dale *et al.*, 1992; Alves *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Habeeb *et al.*, 2007; Kamei *et al.*, 2009).

El otro grupo de AQs deriva de la vía ácido siquímico- ácido O-succinilbenzoico y mevalonato (Fig. 1.10).

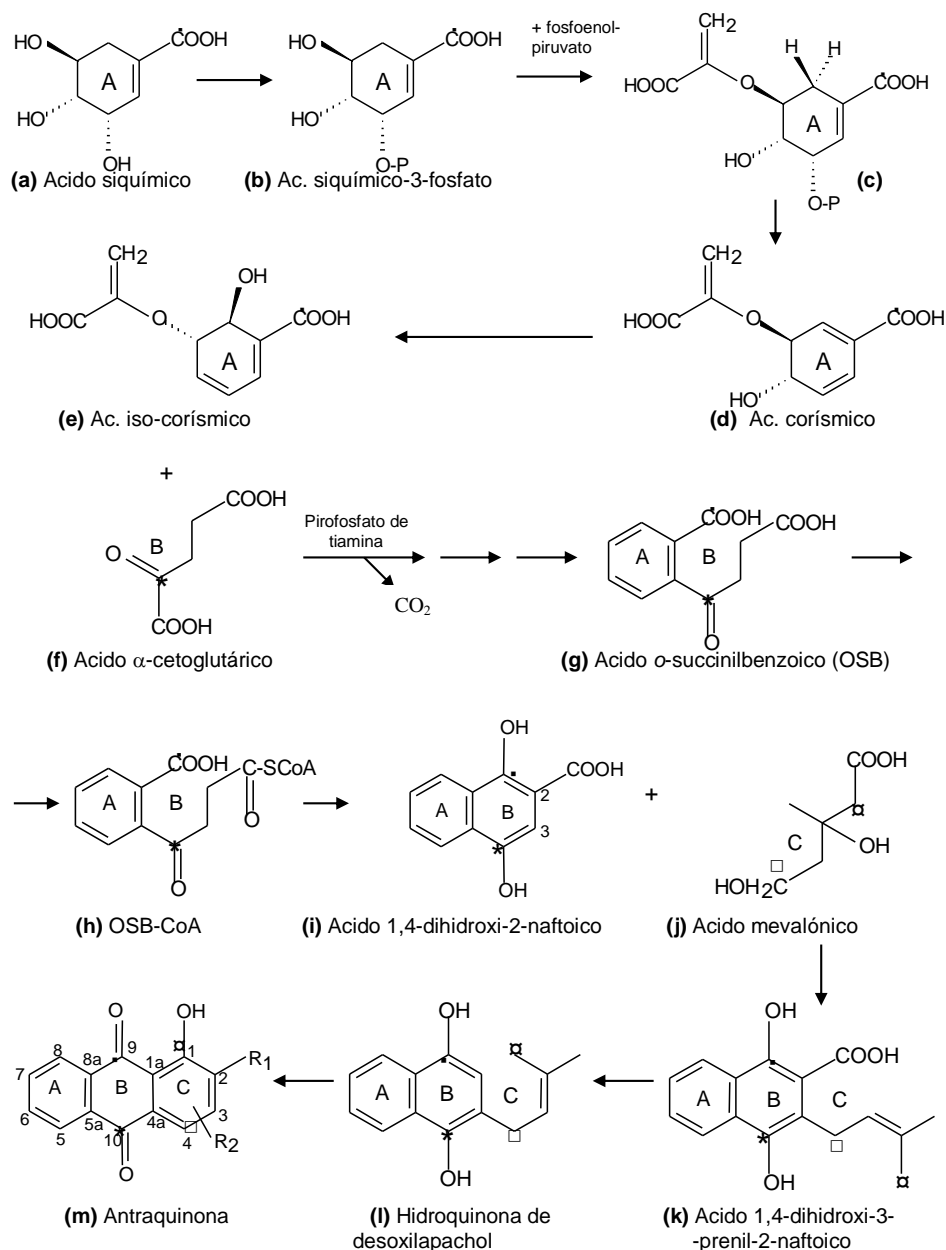


Figura 1.10. Biosíntesis de antraquinonas por la vía del ácido siquímico-mevalonato (Núñez Montoya, Tesis Doctoral, 2002) (Imagen adaptada).

El ácido siquímico es el precursor en la biosíntesis de compuestos aromáticos y es generado a partir del ácido pirúvico, un producto de la glicólisis de los carbohidratos (Herbert, 1989; Vickery M y Vickery B, 1981).

Como se observa en la Fig. 1.10, A partir del ácido siquímico (**a**) se obtiene su derivado 3-fosfato (**b**), seguidamente tiene lugar una condensación con fosfoenolpiruvato para dar un intermediario (**c**) que genera el ácido corísmico (**d**) (Herbert, 1989).

El ácido o-succinilbenzoico (OSB) (**g**) se forma a partir de ácido iso-corísmico (**e**) y el ácido α -cetoglutarico (**f**) con pirofosfato de tiamina como cofactor. El anillo B del OSB se cierra a través de su derivado coenzima A (**h**) para dar el ácido 1,4-dihidroxi-2-naftoico (**i**) (Kolkman y Leistner, 1985). Posteriormente, se incorpora ácido mevalónico (**j**) al intermediario naftalénico para formar el ácido 1,4-dihidroxi-3-prenil-2-naftoico (**k**), que por descarboxilación origina la hidroquinona de desoxilapachol (**l**). La prenilación de este ácido naftoico (**i**), también puede ocurrir en posición 2, para dar 2-prenil-1,4 naftohidroquinona (Inoue et al., 1984). Finalmente, se cierra el anillo para completar la biosíntesis de la antraquinona (Leistner, 1981).

Estas AQs son propias de las familias de las Rubiáceas, Verbenáceas, Bignoniáceas y Scrofulariáceas. En general, han sido utilizadas por años como colorantes naturales. Y además, exhiben una gran variedad de actividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antiviral, hipotensiva, antileucémica, antitumoral, entre otras) sin ser laxantes (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

Por lo tanto, los derivados antraquinónicos constituyen una familia de metabolitos secundarios con potencial uso farmacológico, cuya purificación e identificación, seguida por la evaluación de sus actividades biológicas amerita su estudio en profundidad.

VI-2- Antraquinonas en la familia de las Rubiáceas

La familia de las Rubiáceas presenta una distribución cosmopolita, con predominio en áreas intertropicales. Es una de las familias más extensas, compuesta aproximadamente por 500 géneros y 6000 especies, donde la mayoría son árboles y arbustos. Para la Argentina, hay descriptos 41 géneros y aproximadamente 123 especies (Zuloaga y Morrone, 1999).

En general, esta familia contiene compuestos quinónicos (antraquinonas, naftoquinonas, naftohidroquinonas y sus glucósidos), iridoides, cumarinas, triterpenos y flavonoides (Özgen *et al.*, 2006).

Especialmente los géneros *Rubia*, *Galium* y *Morinda* presentan gran cantidad de AQs, siendo las raíces la principal fuente. Están presentes con mayor frecuencia como aglicones y a veces en forma de glucósidos, en este último caso el azúcar es generalmente el primeverósido (glucosa-xilosa) (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

VII- Especies vegetales estudiadas de la familia de las Rubiáceas

VII-1- *Galium latoramosum* Clos

El género *Galium* (Rubiaceae), cuenta con aproximadamente 1300 especies, las cuales han sido utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento diferentes afecciones (Bolivar *et al.*, 2011). Numerosas especies de este género se destacan por haber sido utilizadas en tiempos remotos como tintóreas en distintas partes del mundo, siendo el principal cromóforo una AQ denominada alizarina (1,2-dihidroxi- antraquinona) (Giuntoli 2005; Trillo y Demaio, 2007). Para este género, se ha informado la presencia de derivados de antragalol, lucidina, munjistina, purpurina, xantopurpurina y rubiadina, entre otras AQs (El-Gamal *et al.*, 1995).

La especie *Galium latoramosum* Clos (Fig. 1.11) es una hierba o subarbusto perenne, popularmente llamada “raíz de teñir” o “chipi chapé”, que habita el centro y norte de Argentina (Buenos Aires, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Jujuy, Misiones, Santa Fe, San Luis, Tucumán) (Instituto de botánica Darwinion, 2017a). Existen antecedentes que los pueblos originarios usaban las raíces de esta especie vegetal para teñir (Giuntoli 2005; Trillo y Demaio, 2007). Además, se ha informado su uso en la medicina tradicional como inductora de aborto y anticonceptiva (Barboza *et al.*, 2009). A pesar que no posee estudios en cuanto a su composición química, se ha informado la actividad antifúngica de sus partes aéreas (Barboza *et al.*, 2009). Estos antecedentes nos motivaron a llevar cabo el estudio fitoquímico de *G. latoramosum*, aislando y purificando sus principales derivados antraquinónicos.

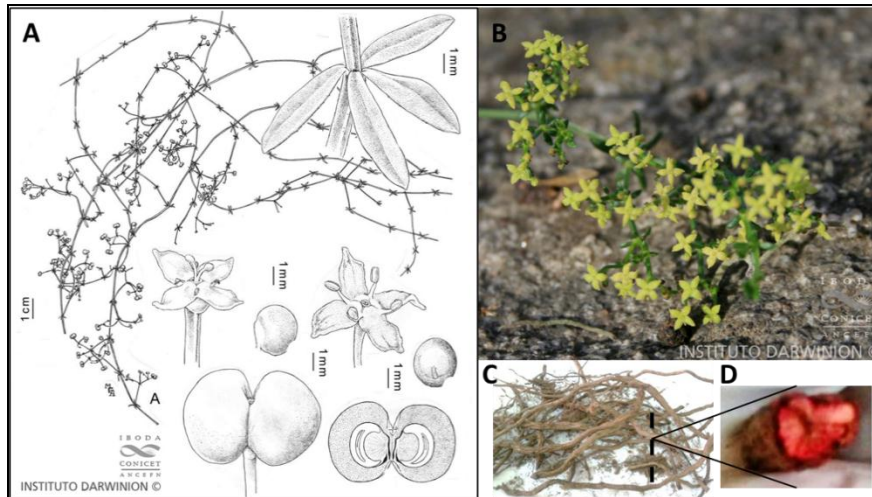


Figura 1.11. *Galium latoramosum* Clos **(A)** Ficha de identificación (Instituto de botánica Darwinion, 2017a). **(B)** Partes aéreas de la planta (Instituto de botánica Darwinion, 2017a). **(C)** Raíces. **(D)** Corte transversal de raíz.

VII-2- *Heterophyllaea pustulata* Hook. f.

El género *Heterophyllaea* está representado por sólo dos especies con hábitat en la cordillera de los Andes. *H. pustulata* Hook. f., ubicada en Bolivia y noroeste de Argentina y *H. licyoides* (Rusby) Sandwich, distribuida principalmente en Bolivia y Perú (Bacigalupo, 1993, Sandwith, 1949; Brako y Zarucchi, 1993; Missouri Botanical Garden, 2016a). Son comúnmente conocidas como “cegaderas”, debido a que producen ceguera progresiva en animales, por esta razón han sido reportadas como plantas tóxicas (Bacigalupo, 1993; Atauachi Burgos, 2005).

La especie *H. pustulata* Hook. f. (Fig. 1.12), es un arbusto erguido de 2 a 3 m de altura que vegeta en la región montañosa de Jujuy, Salta y Tucumán entre los 2500 – 3000 metros sobre el nivel del mar. Es la causante de numerosas intoxicaciones en el ganado en las provincias donde habita, ya que produce lesiones dérmicas y ceguera cuando los animales la ingieren y luego se exponen a la luz solar. Estos efectos fueron atribuidos a la presencia en esta especie de principios activos fotosensibilizadores (Hansen y Martiarena, 1967; Aguirre & Neumann, 2001).

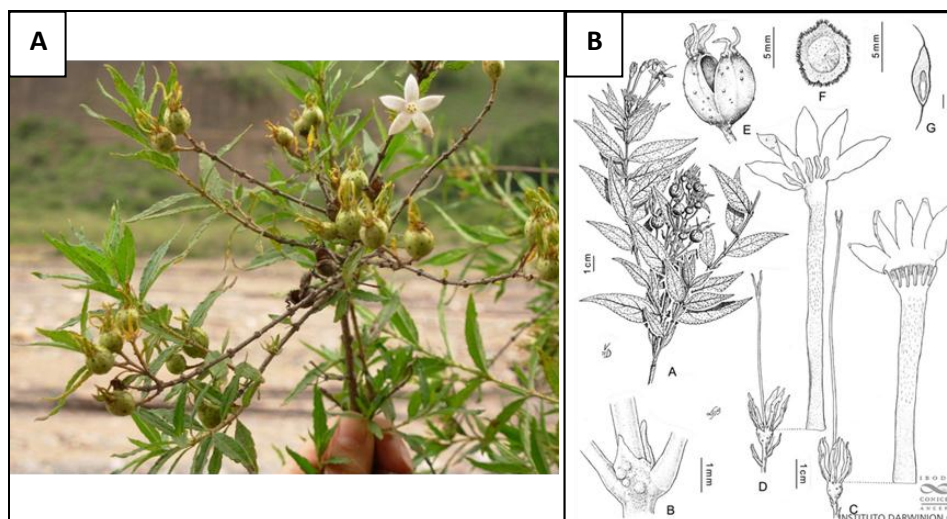


Figura 1.12. *H. pustulata* Hook. f. **(A)** Partes aéreas. **(B)** Ficha de identificación (Instituto de botánica Darwinion, 2017b).

H. pustulata cuenta con estudios químicos que permitieron establecer que sus principales metabolitos secundarios son derivados antraquinónicos con actividad fotosensibilizante, a través de mecanismos Tipo I (generación de $O_2^{\bullet-}$) o Tipo II (generación de 1O_2) (Núñez Montoya *et al.*, 2005; Comini *et al.*, 2007a). Además, esta especie cuenta con estudios de actividad biológica, algunas AQs se destacan como agentes anticancerígenos en TFD, y antibacterianos y antifúngicos en TFDA (Comini *et al.*, 2011a; Comini *et al.*, 2011b; Rumie Vittar *et al.*, 2014, Marioni *et al.*, 2016a; Marioni *et al.*, 2016b). Asimismo, extractos vegetales de *H. pustulata* enriquecidos en AQs demostraron inhibir al virus del HSV-1 (Konigheim *et al.*, 2012), antecedente que contribuyeron al desarrollo de esta tesis para estudiar la actividad antiviral de AQs presentes en la especie y su promisoría aplicación en TFDA.

VIII- Otros recursos para la obtención de antraquinonas

Las modificaciones químicas de compuestos naturales bioactivos es una de las herramientas más usadas en el descubrimiento de nuevos fármacos (Yao *et al.*, 2014). Numerosas AQs obtenidas por semisíntesis o síntesis total, han evidenciado poseer actividad, lo cual las postula como promisorios fármacos antivirales (Kraus *et al.*, 1990; Kharlamova, 2009) y antitumorales

(Wei *et al.*, 2000; Stepanov *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2014). Por lo que existe un interés continuo en el desarrollo de nuevos derivados de antraquinonas que manifiesten actividades biológicas (Malik y Müller, 2016).

La síntesis de alizarina a partir del antraceno, realizada por Graebe y Liebermann en 1868, y la elucidación de la relación entre el antraceno, AQ y alizarina efectuada por los mismos investigadores, marcó el comienzo de una nueva era en el estudio de la química de la AQ y sus derivados. Aunque la AQ había sido preparada por Laurent en 1840, a través de la oxidación de antraceno con ácido nítrico, y posteriormente por Fritzsche (1868) mediante la oxidación de antraceno con ácido crómico, poco interés se asoció a este compuesto hasta que Graebe y Liebermann anunciaron la importancia de su descubrimiento. Este hecho, rápidamente condujo a la producción de alizarina sintética y estimuló la investigación a un grado tan marcado que desde 1929, se habla de la "química de las antraquinonas" (Phillips, 1929).

Tal como describe Akrawi *et al.*, (2013), numerosos métodos han sido desarrollados para preparar AQs por vía sintética, siendo la reacción de acilación de Friedel-Crafts de anhídridos ftálicos o cloruros de ftaloilos con derivados de benceno sustituidos, el método más común (Wei *et al.*, 2000). También se ha utilizado con éxito para obtener el núcleo antraquinónico, la Anulación de Hauser (Mal *et al.*, 2007), método que se basa en la reacción entre p-benzoquinonas como aceptores y ftálicos como donantes, y la reacción de Diels-Alder entre dienos de Brassard y naftoquinonas (Brigette y Brassard, 1993).

Asimismo, las reacciones catalizadas representan potentes herramientas para la síntesis de AQs ariladas, las más utilizadas son las de Stille (Tamayo *et al.*, 1990) y Suzuki-Miyaura (Coudret *et al.*, 2009).

Estas herramientas aportaron al desarrollo de esta tesis, ya que brindaron una amplia gama de posibilidades para realizar modificaciones estructurales al núcleo antraquinónico.

IX- Terapia fotodinámica antimicrobiana

La TFDA implica la participación de tres factores indispensables: una sustancia química no tóxica, denominada fotosensibilizador (FS), la cual es activada por luz inocua a su λ de absorción, y en presencia de $^3\text{O}_2$ produce un incremento en los niveles de ERO, como $\text{O}_2^{\bullet-}$, $^1\text{O}_2$, entre otros. Las ERO así generadas, reaccionan con moléculas biológicas de su entorno directo (proteínas, lípidos, ADN), conduciendo eventualmente a la muerte de microorganismos o inactivación viral, que se traduce en la regresión de la infección (Baltazar *et al.*, 2015; Hamblin, 2016). En el caso de los virus, se pretende producir una inactivación de las partículas virales.

Debido a que la entrega de una luz visible en tejidos es casi por definición un proceso localizado, esta terapia se aplica preferentemente a infecciones circunscriptas, a través de la colocación del FS mediante aplicación tópica. Los puntos claves a tener en cuenta en esta terapia son: la selectividad del FS por el microorganismo, sin generar daño en el tejido del área de infección del hospedador y evitar el crecimiento de los patógenos que sobrevivieron después del tratamiento (Hamblin, 2009). Sin embargo, al ser necesario la concurrencia de los tres factores en esta terapia (FS, luz y $^3\text{O}_2$), si no se pudiera lograr la selectividad del FS por el microorganismo, es factible tratar sólo las células infectadas mediante la irradiación de la zona afectada, minimizando el daño las células no infectadas.

La TFDA es propuesta en general, como tratamiento tópico de infecciones virales, ya que la luz puede llegar con eficacia en lesiones accesibles, por ejemplo, de la piel, cavidad oral, entre otros. Por lo tanto, el uso de esta terapia ofrece una alternativa para curar o para tratar rápidamente las lesiones asociadas a infecciones causadas por el HSV o el HPV, incluyendo los tumores generados por este último virus (Wainwright, 2003). Se ha demostrado que la TFDA puede generar daño en el genoma viral, cambios en la estructura de las proteínas de la envoltura viral (O'Riordan *et al.*, 2005), y que los virus con envoltura lipídica son más susceptibles que los no envueltos debido a que el FS puede interactuar con los lípidos y las proteínas de esta envoltura, generando cambios irreversibles que conllevan a la inactivación del virus (Smetana *et al.*, 1998).

Un número limitado de antivirales están disponibles para la profilaxis o tratamiento de las infecciones causadas por HSV-1, entre los que se encuentra el aciclovir (Corey, 2002; De Clerq, 2004). Como se mencionó anteriormente, la resistencia a este fármaco es un problema. Se han encontrado mutaciones del gen de la TK viral, los cuales son responsables del 95 % de los casos resistentes (Latief *et al.*, 2015). La creciente prevalencia de esa resistencia y la presencia de efectos secundarios a fármacos antivirales clásicos, son las principales razones en el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la infección por HSV-1 (Perussi, 2007). Siendo una de ellas la TFDA, la cual ha demostrado ser efectiva sobre cepas del HSV-1 sensibles y resistentes a aciclovir (Latief *et al.*, 2015).

Estudios clínicos muestran que la TFDA aplicada a infecciones por HSV-1 presenta excelentes resultados, principalmente ausencia de toxicidad y efectos secundarios, un rápido alivio del dolor y del período de curación y además, disminuye la tasa de recurrencia (Tardivo *et al.*, 2005).

Estos antecedentes motivaron a iniciar estudios preliminares de inactivación fotodinámica del HSV-1, mediante el uso de AQ fotosensibilizantes.

Capítulo 2

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

I- HIPÓTESIS

Los derivados antraquinónicos de origen natural, especialmente los presentes en la familia de las Rubiáceas y sus derivados semisintéticos, son biológicamente activos y exhiben efecto antiviral en algunos casos mediante un mecanismo de fotosensibilización.

II- OBJETIVOS

II-1- OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad virucida y antiviral de derivados antraquinónicos presentes en plantas bioactivas y autóctonas de Argentina sobre virus de interés sanitario para la región.

II-2- OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar, purificar e identificar las principales AQs presentes en *Galium latoramosum* Clos (Rubiaceae).
2. Obtener AQs fotosensibilizantes puras de *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae).
3. Evaluar la actividad citotóxica, virucida y antiviral *in vitro* de las principales AQs purificadas sobre distintos modelos virales (ADN y ARN).
4. Realizar modificaciones químicas en las AQs aisladas, a fin de mejorar el efecto biológico en relación a la citotoxicidad exhibida.
5. Establecer si las AQs aisladas pueden generar efecto antiviral *in vitro* a través de un mecanismo de fotosensibilización.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

I- Estudio químico

I-1- MATERIAL VEGETAL

I-1.1- Recolección e identificación

La recolección de *Galium lateramosum* Clos (Rubiáceas) (Fig. 3.1) se realizó en Julio del 2011 en el paraje de Ongamira (Departamento de Punilla, Provincia de Córdoba, Argentina, Lat S 30°76'66" y Long O 64°43'33) por la Ing. Agrónoma Laura Rojas. El Ingeniero Agrónomo Roberto Hernández (Botánica Taxonómica, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba) identificó una muestra de herbario, la cual se depositó en el herbario ACOR de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (Universidad Nacional de Córdoba, UNC), con el código 09.III.2015, L. Rojas *et al.* LCM 999 (ACOR).



Figura 3.1. Muestra recolectada de *Galium lateramosum* Clos (Rubiáceas).

Heterophyllaea pustulata Hook. f. (Rubiáceas) (Fig. 3.2) se recolectó en mediaciones del El Alisal (Departamento de Rosario de Lerma, Provincia de Salta, Argentina), en febrero de 2013 por el Veterinario Juan Micheloud. Una muestra de herbario se depositó en el Museo Botánico de Córdoba como CORD 19759 (Marioni *et al.*, 2016a), previamente identificada por la Dra. Gloria

Barboza (Museo Botánico de Córdoba, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC e Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, IMBIV-CONICET).



Figura 3.2. Muestra recolectada de *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas).

I-1.2- Preparación del material vegetal

El material vegetal (MV) se desecó a temperatura ambiente y al abrigo de la luz, proceso que permite la eliminación de agua sin alterar los principios activos (Villar del Fresno, 1999). Una vez eliminadas las materias extrañas (vegetales, orgánicas e inorgánicas), se procedió a la separación del MV a estudiar (raíces, partes aéreas).

Se decidió trabajar con las raíces de *G. latoramosum* en base a información bibliográfica que establece que en este género, los derivados antraquinónicos se acumulan preferentemente en las raíces (Wijnsma y Verpoorte, 1986). En la Fig. 3.3, se muestra un corte transversal de la raíz de *G. latoramosum*, donde se observa el color característico de pigmentos antraquinónicos.

Se utilizaron las partes aéreas de *H. pustulata* a fin de seguir el procedimiento previamente elaborado por el grupo de Farmacognosia (Dpto. Cs. Farmacéuticas, Fac. Cs. Qcas., UNC) para la obtención AQs a partir de esta especie vegetal (Núñez Montoya *et al.*, 2003; Núñez Montoya *et al.*, 2006).



Figura 3.3. Corte transversal de raíz de *Galium latoramosum* Clos.

Posteriormente, el MV seleccionado de cada especie vegetal se procesó en un molino de cuchillas con tamiz n° 4 (Retsch KG 5657 HANN, Germany), a fin de obtener un polvo homogéneo que favorece y mejora el rendimiento de la extracción (Villar del Fresno, 1999).

I-2- EXTRACTOS VEGETALES

I-2.1- Obtención de extractos

El primer paso para iniciar el estudio químico de una especie vegetal (estudio fitoquímico), es la obtención de los metabolitos secundarios presentes en esta matriz compleja, mediante algún método de extracción; y en la medida de lo posible, con algún grado de purificación/separación. En este contexto, se aplicó una metodología que consiste en someter el MV, previamente pesado, a extracción con solventes de polaridad creciente en un extractor Soxhlet (Fig. 3.4). Este método clásico, permite de manera sencilla y económica, la extracción continua de compuestos (Duval *et al.*, 2016). A su vez, el uso de diferentes solventes permite una primera separación de los metabolitos secundarios, al obtener extractos enriquecidos en compuestos de distinta polaridad. En aquellos casos en donde se trató de evitar el sometimiento de los compuestos químicos a la temperatura de ebullición del solvente de extracción, se optó por reemplazar el aparato Soxhlet por una maceración.

Los solventes orgánicos empleados fueron previamente destilados para eliminar impurezas y restos de agua: benceno (Ben), acetato de etilo (AcOEt), etanol (EtOH), H₂O, butanol (ButOH).

Los extractos obtenidos fueron evaporados a sequedad bajo presión reducida, utilizando un evaporador rotatorio (Büchi, Suiza) o un liofilizador (Labconco LYPH LOCK 6) cuando se necesitó evitar el calentamiento de los metabolitos secundarios. El rendimiento de cada extracto se expresó como la cantidad de extracto seco obtenido en g por cada 100 g de MV desecado.

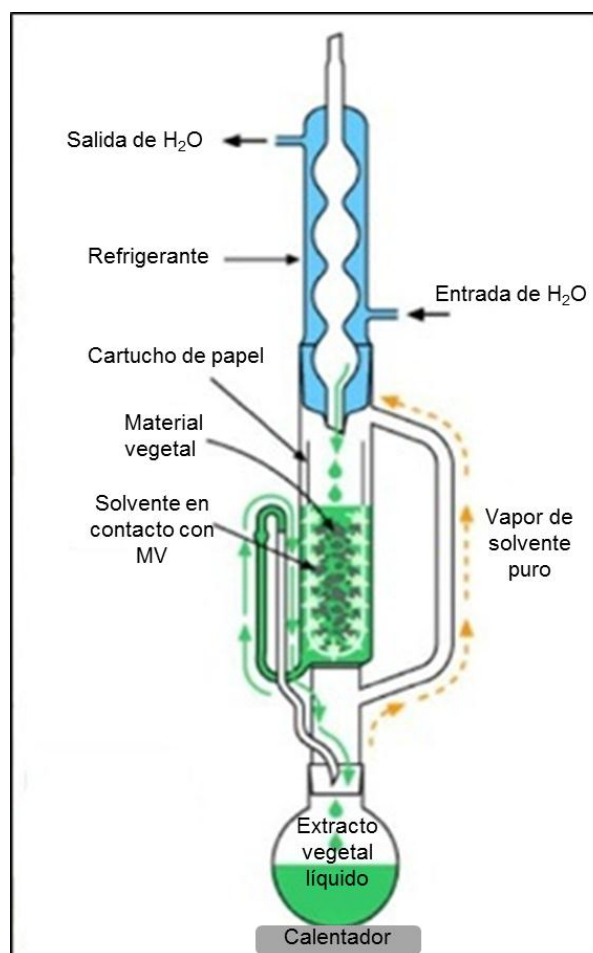


Figura 3.4. Esquema de un extractor Soxhlet.

I-2.2- Caracterización química de los extractos de *G. latoramosum*: HPLC-DAD-ESI-QTOF

Se desarrolló un análisis cualitativo mediante cromatografía líquida de alta presión (del inglés HPLC: High Pressure Liquid Chromatography) con

detector Ultravioleta-Visible (UV-Vis) con arreglo de diodos (DAD) y asociada a un espectrómetro de masas de alta resolución (del inglés HRMS: High Resolution Mass Spectrometer), con una fuente de ionización por electro spray (del inglés ESI: Electron Spray Ionization) y un analizador de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo (del inglés QTOF: Quadupole Time of Fly), con el objetivo de identificar las principales AQs presentes en cada extracto.

Los parámetros empleados para realizar la identificación fueron el tiempo de retención (t_R), el espectro UV-Vis y de HRMS con rompimientos masa/masa (MS^n). En función de la disponibilidad, la identificación se llevó a cabo contra testigos. El análisis cromatográfico se desarrolló con calibrante interno a fin de determinar la masa exacta, permitiendo la identificación de otros derivados antraquinónicos en función de la comparación de los resultados experimentales con los teóricos arrojados por el software y teniendo en cuenta parámetros como el error (≤ 10 ppm) (Clauser *et al.*, 1999).

A continuación se detallan las condiciones de trabajo del análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF:

- **Equipo:** Cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series system (Agilent, EEUU), que posee una bomba de gradiente (Agilent G1312B SL Binary), un desgasificador de solventes (Agilent G1379 B) y un inyector automático (Agilent G1367 D SL + WP). Está conectado a un detector UV-Vis-DAD (Agilent G1315 C Satarlight), asociado a un espectrómetro de masa que posee una interfaz de ESI y un analizador de tiempo de vuelo MicrOTOF Q II (BrukerDaltonics, USA) utilizado en modo espectroscopía de masa (del inglés MS: Mass Spectrometer) y MS^n .

- **Fase Estacionaria:** Columna Microsorb-MV 100-5 C18 250 x 4,6 mm (Agilent, EEUU).

- **Fase móvil:** Se usaron dos soluciones (A y B) con el gradiente mostrado en la Fig. 3.5.

A: Ácido fórmico (HFo): 0,16 M (en H₂O miliQ).

B: Acetonitrilo-HFo 0,16 M (grado HPLC).

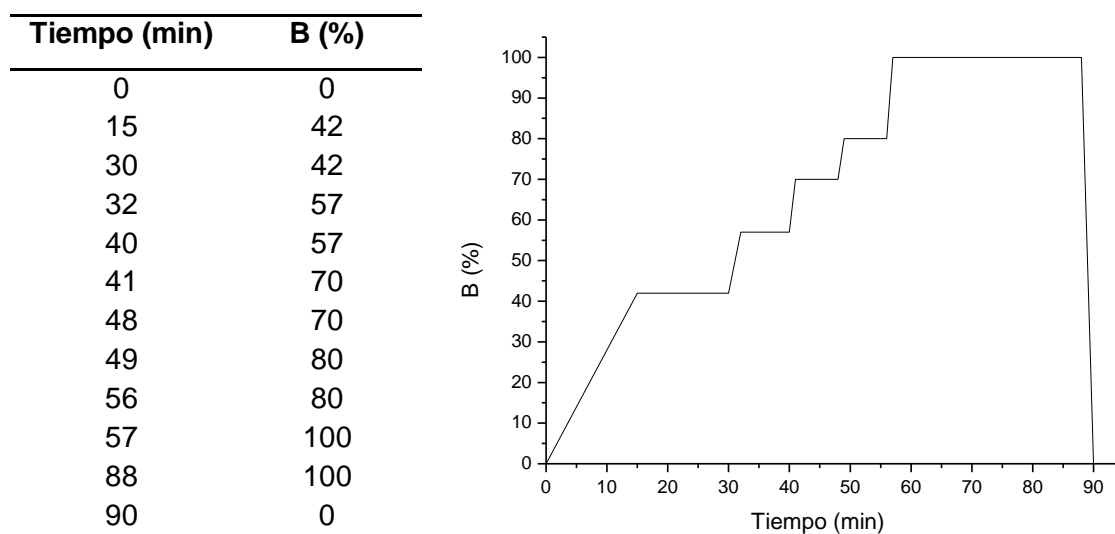


Figura 3.5. Gradiente de fase móvil utilizada en el análisis por HLPC-DAD-ESI-QTOF, expresado como porcentaje de fase móvil B (Acetonitrilo-HFo 0,16 M) en el tiempo.

- **Flujo:** constante a 0,4mL/min
- **Calibrante interno:** Solución de formiato de sodio concentración 40 mM, disuelto en una mezcla isopropanol (IsopOH)-H₂O 50:50, la cual se inyecta entre los 85-86 min.
- **Detectores:**

Detector DAD: La λ de detección se fijó a 269 nm, correspondiente a uno de los máximos de absorción de las AQs (Anouar *et al.*, 2014). Los espectros UV-Vis se registraron de 200 a 600 nm.

Detector ESI-QTOF: Se usó N₂ como gas nebulizador de secado y argón como gas de colisión, ambos a 4,0 bar, 8,0 L/min, 180 °C y 4500 V de tensión capilar. Los espectros de masas se registraron en modo de iones negativos (50 a 1000 m/z), y la detección de MSⁿ se programó para detectar los tres iones más abundantes con una energía de colisión de 10,0 eV.

- **Software para adquisición y procesamiento de espectros:** Compass Version 3.1 y Data Analysis Version 4.1, respectivamente (Bruker Daltonics GmbH, EEUU).

- **Testigos:** AQs, previamente aisladas e identificadas por el grupo de Farmacognosia mediante sus datos espectroscópicos y con una pureza

superior al 90 %, según su análisis por HPLC con detector UV-Vis (HPLC-UV-Vis): ácido ruberítrico, lucidina primeverósido, alizarina, rubiadina, 2-hidroxi-3-metil antraquinona, lucidin- ω -metil éter. Mientras que purpurina se adquirió (Sigma-Aldrich, EEUU).

- **Muestras:** Extractos de *G. latoramosum*.
- **Preparación de soluciones a inyectar:** Cada extracto seco y testigo se pesó y disolvió en metanol (MeOH) grado HPLC (MeOH-HPLC, Sintorgan S.A., Argentina) y se filtraron a través de papel Whatman N° 1.
- **Volumen de inyección:** 40 μ L

I-3- OBTENCIÓN DE LUCIDINA PRIMEVERÓSIDO A PARTIR DE *G. latoramosum*

Se siguió la metodología planteada por Henderson *et al.* (2013). Se disolvió 4,46 g del extracto EtOH seco en 343 mL de MeOH. Esta solución se mantuvo durante 1 semana a -20 °C (freezer), condición que logró la recristalización de lucidina primeverósido. Esta se constató a través de la presencia de un precipitado amarillo que se recuperó mediante filtración. La identidad se determinó por Cromatografía en Capa Fina analítica (del inglés TLC: Thin Layer Chromatography) contra testigo (I-7.1-Materiales y Métodos) con fase móvil (FM): AcOEt-MeOH-H₂O-HFo (80:11:8:1) y por Resonancia Magnética nuclear (RMN, I-7.2-C-Materiales y Métodos). La pureza se estableció por HPLC-UV-Vis (I-6-Materiales y Métodos) y el rendimiento se expresó en % P/P que corresponde a g de compuesto por 100 g de extracto seco.

I-4- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ANTRAQUINONAS

Para la obtención de AQs puras, se llevaron a cabo distintos protocolos de purificación que incluyen desde la partición de extractos para obtener sub-extractos enriquecidos en estos metabolitos, hasta la combinación de diferentes técnicas cromatografías. Todos los solventes empleados se

destilaron previamente a su uso. El rendimiento de cada AQ se expresa en % P/P (g en 100 g de extracto seco).

I-4.1- Partición

Esta metodología se seleccionó como primera etapa en la secuencia de purificación. El término partición implica la transferencia de un compuesto entre dos fases líquidas inmiscibles entre sí: una fase acuosa y otra fase orgánica. La fase acuosa puede ser disolución acuosa (extracto o solución acuosa) que es extraída con un disolvente orgánico inmiscible con el agua (fase orgánica) o también puede ser agua pura que se utiliza para extraer una disolución orgánica (extracto o solución orgánica inmiscible con el agua).

I-4.2- Cromatografía

La cromatografía es un método físico-químico que permite la separación de los componentes de una mezcla, basándose en diferentes tipos de interacciones físico-químicas entre las sustancias a separar y dos fases inmiscibles entre sí, una móvil (FM) y otra estacionaria (FE).

I-4.2-A- Cromatografía en columna

Se realizó Cromatografía de Columna (CCol) de adsorción y exclusión.

Se usó como FE Sílica gel 60 (Merck, Alemania) de 0,063-0,200 mm y Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, EEUU) de 25-100 μm , respectivamente

En todos los casos, se eluyeron con un gradiente de solventes orgánicos (FM), cuya composición en cuanto a tipo y porcentaje de solvente fue variando según la muestra a procesar.

Debido a que la mayoría de las muestras fueron en general poco solubles en el solvente de siembra (primer solvente de elución), el proceso de sembrado en la FE resultó dificultoso. Por tal motivo, se aplicó la técnica Dry loading (Stevens y Hill, 2009), en la cual se disuelve la muestra en un solvente que permite su total disolución (en nuestro caso, generalmente AcOEt). Luego, se añade sílica gel (3 veces la masa de la muestra), se concentra a sequedad y

por último, la muestra adsorbida a la sílica se adiciona como siembra de la columna cromatográfica.

Las alícuotas obtenidas por elusión, se monitorearon por medio de TLC analítica (I-7.1-Materiales y Métodos). Aquellas alícuotas que presentaron el mismo patrón cromatográfico, es decir, igual cantidad de manchas con semejante relación de frente (R_f), fueron juntadas para su posterior purificación. Así, se obtuvieron fracciones que para lograr su purificación debieron someterse nuevamente a CCol y a TLC preparativa (TLCp).

I-4.2-B- Cromatografía en capa delgada preparativa

Las fracciones de interés se purificaron mediante la combinación de dos tipos de TLCp. Primero, se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm con un espesor de 0,5 mm de sílica gel 60 G (Merck, Alemania), elaboradas manualmente en una proporción 1:1,5 sílica-H₂O. La purificación final, se realizó en cromatofolios de aluminio con sílica gel 60 y sin indicador de fluorescencia (Macherey-Nagel, MN, Alemania).

Las placas se desarrollaron en la FM que presentó mejor resolución, según la TLC analítica previamente realizada. En general, las FM utilizadas fueron *n*-hexano-AcOEt (9:1) para purificación de AQs aglicones y AcOEt-MeOH-H₂O-HFo (100:13,5:10:1) para AQs glicosiladas.

Las placas cromatográficas se visualizaron bajo luz UV (254 nm), y con vapores de NH₃ bajo la misma luz UV. Los compuestos revelados bajo estas condiciones se extrajeron de la FE con AcOEt o acetona.

I-5- OBTENCIÓN DE DERIVADOS ANTRAQUINÓNICOS: Semisíntesis y síntesis total

El rendimiento de reacción se calcula en % P/P (g de AQ real obtenida por 100 g de AQ teórica). AQ teórica es la cantidad de AQ que se espera obtener de acuerdo a la cantidad de material de partida utilizado y a la estequiometría de la reacción.

I-5.1- Obtención de lucidina: hidrólisis de lucidina primeverósido

Se siguió el procedimiento de Boldizsár *et al.* (2006), quien describe la hidrólisis de AQs glicosiladas a partir del MV o extractos. En este caso (Fig. 3.6), el material de partida fue lucidina primeverósido (**Lp**) obtenida de *G. latoramosum* (90,2 % de pureza).

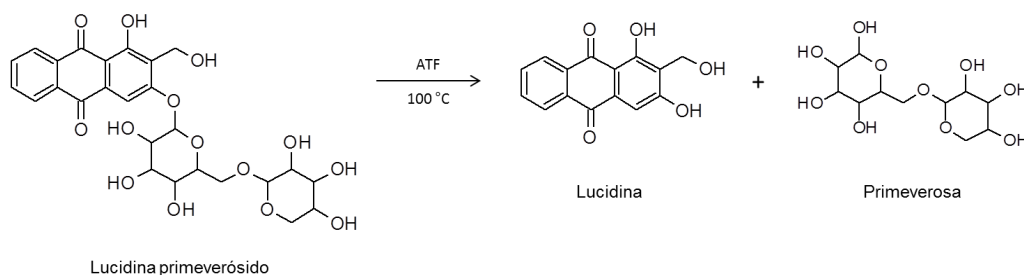


Figura 3.6. Esquema de reacción para obtención de lucidina: Hidrólisis de lucidina primeverósido.

Lp (100 mg = 0,18 mmoles), se disolvió en 20 mL de ácido trifluoroacético (ATF) 2 M. La solución se calentó a 100 °C con reflujo y agitación constante. La reacción fue monitoreada a través de TLC analítica en sílica gel (I-7.1-Materiales y Métodos), usando las siguientes FM: *n*-hexano-AcOEt (1:1) y AcOEt-MeOH-H₂O-HFo (80:11:8:1). Cuando no se detectó la presencia de **Lp** por TLC analítica (reaccionó en su totalidad), se detuvo la reacción por disminución de la temperatura (25 °C).

El producto sólido se purificó por sucesivos lavados con H₂O y diclorometano (DCM), mediante centrifugación (1000 rpm, 5 min). Y por último, los restos de solvente fueron eliminados a través evaporación a presión reducida a temperatura ambiente.

I-5.2- Obtención de nordamnacantal: oxidación de lucidina

Se siguió el procedimiento de Krohn y Vitz (2004), en donde se describe la oxidación de AQs (Fig. 3.7). Se disolvieron 30,32 mg de lucidina (0,11 mmoles) en 7,28 mL de DCM anhidro, y esta solución se trató con 217,66 mg (1 mmol) de clorocromato de piridinio conocido como PCC (del inglés, Pyridinium chloro chromate). La reacción se mantuvo a 20-25 °C bajo

agitación constante, hasta que toda la lucidina se oxidó, lo cual se comprobó por TLC analítica en sílica gel con FM: hexano-AcOEt (1:1) y AcOEt-MeOH-H₂O-HFo (80:11:8:1). El crudo de la reacción se concentró a sequedad a temperatura ambiente bajo presión reducida.

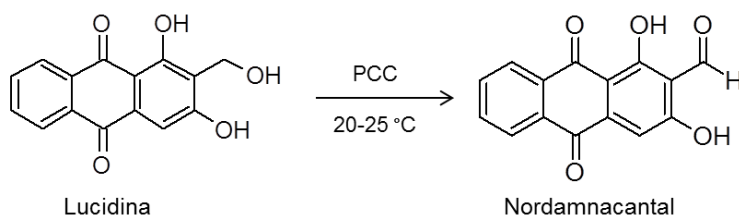


Figura 3.7. Esquema de reacción para obtención de nordamnacantal.

El sólido obtenido se disolvió en H₂O saturada con NaCl y luego, se realizaron particiones con AcOEt. La fase orgánica fue tratada con Na₂SO₄ anhidro para eliminar los restos de agua y luego, se concentró a sequedad a presión reducida en un evaporador rotatorio. Finalmente, el producto de reacción se purificó por CCol de sílica gel (I-4.2-A-Materiales y Métodos) usando DCM como FM.

I-5.3- Obtención de derivados de xantopurpurina

I-5.3-A- Obtención de 6-bromo-xantopurpurina

La obtención de 6-bromo-xantopurpurina (**BrX**) se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Zhang *et al* (2012), a través de la realización de una serie de reacciones que se describen en la Fig. 3.8.

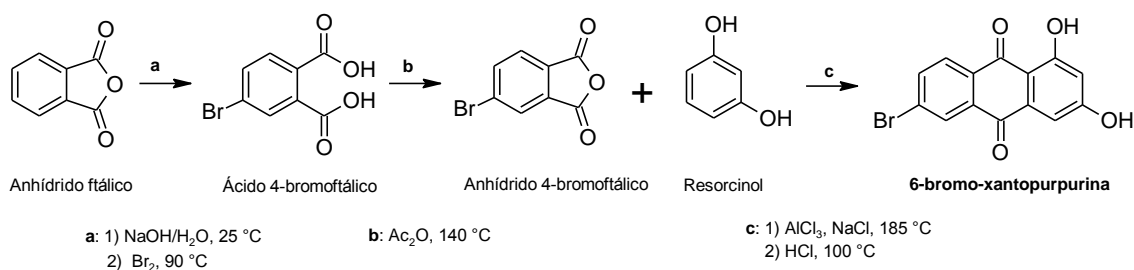


Figura 3.8. Ruta sintética para la obtención de 6-bromo-xantopurpurina.

Reacción a: Obtención de ácido 4-bromo ftálico.

A una solución de NaOH (27,00 g = 675,12 mmoles) en H₂O (225 mL), se le añadió 50,00 g de anhídrido ftálico (337,56 mmoles). Una vez que se logró la completa disolución del anhídrido ftálico, se agregaron 35 mL de bromo (661,63 mmoles) gota a gota durante 1 h y con agitación continua. La mezcla de reacción se calentó a 90 °C y se mantuvo con reflujo durante 6 h. La reacción se monitoreo a través de TLC en sílica con AcOEt-MeOH (95:5) como FM; y se detuvo mediante disminución de la temperatura, cuando se consumió el 100 % del anhídrido ftálico. Después de dejar el crudo de la reacción overnight (término del inglés utilizado para indicar durante toda la noche) a -20 °C, el producto 4-bromoftalato ácido de sodio precipitó como un sólido blanco, el cual se filtró y se lavó con agua fría. Esta sal se disolvió en agua caliente y la solución resultante se reguló a pH = 1,5, mediante la adición de HCl concentrado. Luego, se concentró a sequedad, utilizando un evaporador rotatorio. A partir de la masa sólida blanca así obtenida, se extrajo el producto ácido 4-bromoftálico, por disolución con acetona. Su identidad se confirmó por RMN de protones (RMN-¹H) (500 MHz, acetona-d₆): 11,6 (br s; 2H); 7,91 (d; J = 2,0 Hz; 1H); 7,84 (dd; J = 2,0; 8,0 Hz; 1H); 7,76 (d; J = 8,0 Hz; 1H) (Braslaw *et al.*, 2012).

Reacción b: Obtención de anhídrido 4-bromoftálico.

Una solución de ácido 4-bromoftálico (58,26 g; 237,77 mmoles) en anhídrido acético (Ac₂O, 349,56 mL) se calentó durante 5 h a 140 °C. Luego, la mezcla de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y el solvente se removió bajo presión reducida. El sólido se lavó con éter de petróleo, obteniendo anhídrido 4-bromoftálico, identidad confirmada por RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃): 7,90 (dd; 1H); 8,06 (dd; 1H); 8,17 (d; 1H) (Hinde y Hall, 1998).

Reacción c: Obtención de 1,3-dihiroxi-6-bromo antraquinona (6-bromo xantopurpurina).

El núcleo antraquinónico se obtuvo mediante la aplicación de la reacción de condensación de Friedel-Crafts (Friedel y Crafts, 1877).

Los reactivos se colocaron bajo un sistema de vacío y con calor durante 8 h con el fin de asegurar la ausencia de humedad: AlCl₃

(105,84 g = 793,81 mmoles, \leq 100 °C) y NaCl (23,52 g = 402,46 mmoles, 150 °C). Posteriormente, una mezcla de ambas sales se calentó (110 °C) en un baño de aceite hasta que se logró fundirlas. Por otro lado, una mezcla homogénea de anhídrido 4-bromoftálico (8 g = 35,24 mmoles) y resorcinol (3,88 g = 35,24 moles) se preparó y se adicionó lentamente a la mezcla de sales fundidas. La temperatura se elevó paulatinamente hasta los 185 °C y se mantuvo durante 5 h, obteniendo un derivado del ácido 2-benzoilbenzóico. La mezcla de reacción se enfrió hasta los 20 °C y se añadió lentamente HCl 10 % (320 mL), con agitación constante durante 15 min a temperatura ambiente y luego, 30 min bajo reflujo a 100 °C. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, logrando obtener el derivado antraquinónico.

El producto 1,3-dihidroxi-6-bromo antraquinona se purificó a través de particiones con AcOEt y sucesivos lavados de la fase orgánica con una solución saturada de NaCl. Luego, el producto se sometió a dos CCol de sílica gel (I-4.2-A-Materiales y Métodos). En la primera se usó DCM como FM, obteniendo 3 fracciones que se agruparon según el análisis por TLC analítica de las alícuotas de elusión. La segunda CCol se eluyó con un gradiente de *n*-hexano-AcOEt (100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 90:10), donde se obtuvieron 4 fracciones, según análisis por TLC. Finalmente, las fracciones 2 y 3 se purificaron por TLCp con FM *n*-hexano-AcOEt (97:3). La identidad se elucidó por RMN en una y dos dimensiones. Debido a que no se disponía de literatura que brindara los datos espectroscópicos específicos de esta AQ, su estructura química se confirmó gracias a los aportes bibliográficos de compuestos similares. La elucidación estructural se muestra en el punto III-3-1- Resultados.

I-5.3-B- Obtención de 6-fenil-xantopurpurina y 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina

Los derivados de xantopurpurina con sustitución en posición -6 se obtuvieron mediante la reacción de acoplamiento Suzuki–Miyaura, siguiendo el procedimiento general de esta reacción aplicada para AQs descripta por Qiao *et al.* (2007). Primero, se preparó y desgasificó una mezcla de NaCO₃ (0,25 mmoles) en 0,30 mL de agua, 3,10 mL de Ben y 0,30 mL de EtOH. Esta mezcla fue agregada bajo atmosfera de N₂ dentro de un balón que contenía los

MeOH-HPLC (Sintorgan S.A., Argentina) y luego, cada solución se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 1. Las muestras se inyectaron manualmente con un volumen de 20 μ L. Para detectar cada AQ, se usa $\lambda = 269$ nm. La adquisición de los cromatogramas y el análisis de los datos se realizaron mediante el software Star Chromatography Workstation 6.41 (Varian, EEUU). El software calcula el grado de pureza, teniendo en cuenta el área debajo de la curva de cada señal.

Se usaron dos FM diferentes para identificar y determinar las diferentes AQs, dependiendo si provenían de *G. latoramosum* o *H. pustulata*. En la Tabla 3.1 y Figs. 3.5 y 3.10 se especifican las condiciones de elusión de cada FM. La condición 1, es la misma usada para HPLC-DAD-ESI-QTOF y en general, se utilizó para AQs de *G. latoramosum*; mientras que la condición 2 se usó para AQs de *H. pustulata*. Los solventes empleados fueron grado HPLC (Sintorgan, Argentina).

Tabla 3.1. Condiciones de elusión de la FM para HPLC-UV-Vis.

Condición	FM	Flujo	Gradiente de elusión
1	A: HFo 0,16 M (en H ₂ O miliQ) B: acetonitrilo-HFo 0,16 M	0,4mL/min	Fig. 3.5
2	A: HFo 0,16 M B: metanol-HFo 0,16 M	Flujo variable, según gradiente de la Fig. 3.10	

Tiempo (min)	%B	Flujo (mL/min)
0	48	1
2	48	1
6	78	0.8
8	78	0.8
10	84	0.5
40	84	0.5
41	100	0.7
45	100	0.7

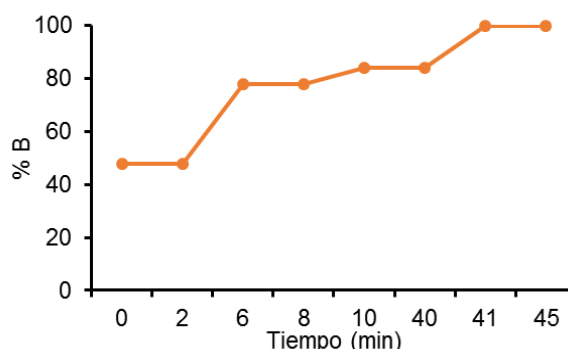


Figura 3.10. Gradiente de fase móvil utilizada en el análisis por HPLC-UV-Vis, condición 2, expresado como porcentaje de fase móvil B (MeOH-HFo 0,16 M) en el tiempo.

I-7- IDENTIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE ANTRAQUINONAS

I-7.1- Cromatografía en capa fina analítica

Mediante TLC (del inglés “Thin Layer Chromatography”) analítica se puede determinar la relación de frente (R_f) de cada compuesto en distintas FM. Los valores de R_f constituyen una característica de cada compuesto en un determinado sistema cromatográfico; y por lo tanto, se pueden utilizar para la identificación de sustancias contra testigo (co-cromatografía) y como criterio de pureza. El R_f , se define como el cociente entre la distancia recorrida por un compuesto determinado sobre la distancia recorrida por el frente de la FM.

En la Tabla 3.2 se exponen las condiciones de los sistemas cromatográficos utilizados para la identificación de AQs.

Tabla 3.2. Sistemas cromatográficos usados para la identificación de antraquinonas.

Tipos de antraquinonas	Aglicones	Glicósidos
FE	Cromatofolios de aluminio con sílica gel 60 y sin indicador de fluorescencia (Macherey-Nagel, MN, Alemania).	
FM	<i>n</i> -hexano-AcOEt-HFo (75:25:1) <i>n</i> -hexano -AcOEt (95:5) <i>n</i> -hexano -AcOEt (8:2) <i>n</i> -hexano -AcOEt (7:3) <i>n</i> -hexano -AcOEt (1:1) Ben-AcOEt (95-5) Ben-AcOEt (8-2)	AcOEt-MeOH-H ₂ O-HFo (100:13,5:10:1) <i>n</i> -hexano -AcOEt (7:3) <i>n</i> -hexano -AcOEt (1:1)
Revelado	Luz UV a 254 nm y vapores de NH ₃ en combinación con luz UV (254 nm).	

I-7.2- Técnicas espectroscópicas

La espectroscopía abarca una serie de técnicas, cuyos datos permiten identificar compuestos químicos. Se detallan las utilizadas en este trabajo de tesis.

I-7.2-A- Espectrofotometría UV-Vis

Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro CaryWin UV-VIS 50 (Varian, Inc., Agilent Technologies, USA). El rango de lectura (220 a 600 nm), se eligió debido a que las AQ muestran dos bandas de absorción principales: una en el entre 220-350 nm y otra banda a longitudes de onda más largas, cerca de 400 nm (Anouar *et al.*, 2014). Se emplearon celdas de cuarzo, ya que dicho material no interfiere con la radiación utilizada. Como solvente, se utilizó EtOH o MeOH, todos de grado espectroscópico. Los valores de λ se expresaron en nm.

I-7.2-B- Espectrometría de masas de alta resolución

Los espectros HRMS se obtuvieron por infusión directa en un espectrómetro MicroTOF QII (BrukerDaltonics, EEUU), equipado con una fuente ESI y un analizador QTOF. Se empleó la técnica de ionización en modo negativo y positivo. Se utilizó el software Compass 1.3 SR1 para la adquisición de los espectros. El análisis de los datos se realizó con Data Analysis 4.1 (Bruker Daltonics GmbH, EEUU). Las muestras se prepararon en MeOH-HPLC.

I-7.2-C- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los espectros de RMN de protones (RMN- ^1H) como de ^{13}C (RMN- ^{13}C) en una y dos dimensiones; se dispuso de dos espectrómetros. Un espectrómetro Bruker 400 Advance II (Bruker, Alemania) con 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C y un espectrómetro Bruker 600 Advance III HD Ascend TM (Bruker, Alemania) con 600 MHz para ^1H y 150,9 MHz para ^{13}C . Este último estuvo disponible durante la pasantía realizada en el

Laboratorio de Química Medicinal del Departamento de Farmacia de la Universidad de Patras en Grecia.

Tetrametilsilano (TMS) se utilizó como estándar interno. Las soluciones de cada AQ se prepararon en tubos de vidrio 7"x 5 mm (Sigma-Aldrich) con solventes deuterados de grado espectroscópicos (Sigma-Aldrich, EEUU): cloroformo deuterado (CDCl_3), acetona deuterada (acetona-d6) y dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d6).

Los corrimientos químicos (δ) se informaron en ppm en relación a TMS y los valores de las constantes de acoplamiento (J) se expresaron en Hz. Los experimentos bidimensionales se llevaron a cabo según protocolos del software estándar Bruker (Alemania). Los espectros fueron procesados con el software MestRe Nova.

I-7.3- Rotación óptica

La actividad óptica ($[\alpha]_D$) se midió en un polarímetro Jasco P-1010 (Tokio, Japón) y las medidas se tomaron usando la línea D de sodio (589 nm), a una temperatura de 25 °C. Las muestras de AQs se disolvieron en MeOH-HPLC. Se empleó una celda de 10 cm de longitud.

I-7.4- Punto de fusión

El punto de fusión (p.f.) es una constante física característica de cada compuesto. Por lo tanto, se utiliza para caracterizar nuevas estructuras. Se determinó con un equipo Kofler con placa calentable (Leitz, Wetzlar, Alemania), el cual tiene anexo una termocupla Eden HI 8056 que trabaja en un rango de 25 a 200 °C \pm 3 °C.

II- Estudio de actividad biológica

II-1- MATERIALES

II-1.1- Células y medios de cultivo

En la Tabla 3.3 se muestran las líneas celulares usadas con sus respectivos medios de crecimiento (MC) y de mantenimiento (MM). La preparación de los medios se encuentra en el anexo.

Tabla 3.3. Líneas celulares usadas.

Abreviatura	Vero	HeLa
Nomenclatura	76 ATCC CRL-587	229 ATCC CCL-2.1
Características	Línea celular de riñón de mono verde africano, <i>Cercopithecus aethiops</i> (heteroploide).	Línea celular de adenocarcinoma de cérvix humano, persistentemente infectadas con Virus Papiloma Humano 18 (HPV18).
Medio de crecimiento	Medio Esencial Mínimo Eagle-Earle (MEM) con aminoácidos no esenciales (Invitrogen, EEUU), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Natocor, Argentina), 1 % L-glutamina (Gibco, EEUU) y 50 µg/mL gentamicina (Klonal, Argentina) como antibiótico (ATB),	Medio RPMI 1640 ("Roswell Park Memorial Institute", Gibco, EEUU), suplementado con 10 % SFB, 1 % L-glutamina y 50 µg/mL de ATB
Medio de mantenimiento	MEM con aminoácidos no esenciales, suplementado con 2 % de SFB, 1 % L-glutamina y 50 µg/mL de ATB.	RPMI 1640, suplementado con 2 % SFB, 1 % L-glutamina y 50 µg/mL de ATB,

Ambas líneas celulares fueron mantenidas en estufa (Sanyo, IncuSafe MCO 17 AC, Japón), con atmosfera húmeda conteniendo 5 % CO₂ a 37 °C. Para cada ensayo se preparó una suspensión celular que contenía $\approx 1,0 \pm 0,6 \times 10^5$ cel/mL. Se utilizaron distintos volúmenes de esta solución para

sembrar los diferentes tamaños de placas: 0,5 mL por pocillo para placas de 48 pocillos y 0,1 mL en placas de 96 pocillos.

II-1.2- Cepas Virales

Se utilizaron cepas de virus con genoma ARN y ADN que se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Cepas virales usadas.

Genoma	ARN		ADN
Nombre	Virus West Nile	Virus Encefalitis Equina Venezolana	Virus Herpes simple tipo 1
Abreviatura	WNV	VEEV	HSV-1
Familia	Flaviviridae	Togaviridae	Herpesviridae
Cepa	E7229/06	vacunal TC- 83 subtipo I-AB ¹	cepa Kos (ATCC N° VR-1493D)
Característica	Aislado de caballos enfermos ²		
Título del stock viral³	4×10^7 UFP/mL	1×10^7 UFP/mL	9×10^6 UFP/mL

1 Berge *et al.*, 1961

2 Morales *et al.*, 2006;

3 expresado como Unidades Formadoras de Placas (UFP) en 1 mL.

Cada stock viral se diluyó con MM para obtener una suspensión infectiva de 100 UFP/mL, que se inoculó sobre las células hospedadoras Vero.

II-1.3- Muestras para ensayos biológicos

Se prepararon soluciones stock en dimetilsulfóxido (DMSO, Tetrahedron, Argentina) de cada extracto vegetal (100 mg/mL) y AQ (10 mg/mL). A partir de estas soluciones madres se realizaron diluciones con MM o Buffer Fosfato salino (En inglés: Phosphate-Buffered saline, PBS), asegurándose que la cantidad de DMSO no supere el 1-2 %, ya que esa concentración no es citotóxica (Konigheim, Tesis Doctoral, 2012; Konigheim *et al.*, 2012).

II-2- METODOLOGÍAS

II-2.1- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

Dentro de la batería de ensayos *in vitro* que se utilizan para evaluar la toxicidad aguda de una sustancia, se encuentran los llamados ensayos de citotoxicidad que utilizan cultivos celulares. La citotoxicidad celular se define como una alteración en la estructura y en las funciones celulares básicas que llevan a la producción de un daño, el cual puede ser detectado a través de la proliferación o supervivencia celular (Repetto, 2002). El valor predictivo de los estudios de citotoxicidad, se basa en la idea que cuando se afectan funciones celulares básicas, que son comunes a todas las células, la determinación del daño celular es una medida aproximada de la toxicidad general del compuesto.

El objetivo de este estudio fue establecer un rango de concentraciones en donde la toxicidad de los extractos y las AQs puras sea baja o nula sobre las células hospedadoras (Vero), para luego evaluar en ese mismo rango de concentraciones la actividad antiviral en células Vero infectadas y el efecto tóxico sobre células HeLa.

Para ello, una monocapa de células Vero, crecida en placas de 96 pocillos (24 h de incubación, 95 % de confluencia), se expusieron a 15 concentraciones ($n = 3$) decrecientes de los diferentes extractos y AQs durante 72 h (37 °C y CO₂ 5 %). Las monocapas incubadas sólo con MM ($n = 3$) y otras con MM con 2 % DMSO ($n = 3$) se incluyeron como control celular (CC). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

La citotoxicidad se evaluó a través la utilización de dos metodologías que se explican a continuación.

II-2.1-A- Observación del efecto citopático

Con esta metodología se observa los cambios que se producen en la morfología de las células tratadas en comparación a las no tratadas (CC), mediante microscopía óptica de fase invertida (microscopio Olympus IX 51, Japan) (Riva y López, 1993). La observación se realizó varias veces al día durante el período de incubación (72 h), detectando las siguientes alteraciones morfológicas que se definen como efecto citopático (ECP) (Ooi *et al.*, 2004):

- Cambios en el tamaño y la forma (redondeo).
- Lisis celular.
- Presencia de gránulos visibles y vacuolas en el citoplasma.
- Retracción de la membrana.
- Desprendimiento de células con la consecuente pérdida de la monocapa.

La presencia de algunos de estos cambios morfológicos en la monocapa es una medida cualitativa de la citotoxicidad, que permite estimar las concentraciones que comienzan a ser nocivas.

II-2.1-B- Determinación de la viabilidad celular

La evaluación de la viabilidad celular (VC) se llevó a cabo mediante el ensayo de captación de Rojo Neutro (RN) (Borenfreund y Puerner, 1985).

Al finalizar la incubación (72 h) arriba mencionada, se removió el medio y se agregó una solución de RN (50 µg/mL en MEM). Luego, se incubó (37 °C y CO₂ 5 %) durante 3 h. Posteriormente, el colorante contenido en los lisosomas y endosomas de las células viables, se extrajo con una solución de agua-EtOH-ácido acético (50:49:1) durante 15 min con agitación continua.

La densidad óptica (DO) del colorante extraído, se midió en un lector de microplacas (BioTek ELx800), realizando las lecturas a 540 nm. Los porcentajes de VC (% VC) se determinaron en base a los valores obtenidos para los CC, tomados como 100 % VC y utilizando la siguiente fórmula:

$$\% VC = (DO_t / DO_c \times 100)$$

Donde:

- DO_t, densidad óptica del cultivo celular tratado.
- DO_c, densidad óptica del cultivo celular control.

A partir de los valores obtenidos con esta fórmula, se confeccionaron curvas de viabilidad, en las cuales se grafica el % VC en función de las concentraciones testeadas (µg/mL o mM). A partir de estos gráficos se estimaron los valores de concentración citotóxica 50 (CC₅₀), Máxima

Concentración No Citotóxica (MCNC) y concentración sub-tóxica (CSubT) para cada extracto y AQ.

La CC_{50} se define como la concentración que produce un 50 % de VC. La MCNC se define como la mayor concentración en la cual no se observa ECP al cabo de 3 días consecutivos de incubación. Según el criterio de Liu *et al.*, 2009, la MCNC es aquella donde la viabilidad celular es mayor al 90 %. Se considera CSubT aquella que causa entre el 10 y 20 % de muerte celular y produce leves cambios morfológicos observados por microscopía (menos del 20 % de retracción y redondeamiento, con inclusiones citoplasmáticas, leve vacuolización y membranas nucleares intactas) (Cholewa *et al.*, 1994).

II-2.2- Evaluación de la actividad antiviral *in vitro*

La evaluación de la actividad antiviral de un extracto o compuesto consiste en establecer si posee capacidad para reducir o anular la multiplicación viral. Esta inactivación viral se puede estudiar por dos metodologías:

II-2.1-A- Determinación de la viabilidad de la célula hospedadora

El efecto antiviral se traduce en un aumento de la viabilidad de las células hospedadoras infectadas y tratadas con las muestras a testear (Extracto o AQ pura), denominado tratamiento (T), en relación a las células infectadas y no tratadas que constituyen el Control Viral (CV).

La VC se evaluó mediante el ensayo de captación de RN, con previa observación del ECP (II-2.1-Materiales y Métodos), ya que el proceso de replicación viral en las células trae aparejado la disminución de la viabilidad (Semple *et al.*, 1998).

El porcentaje de inhibición viral (% I) se cuantificó a través de la siguiente fórmula:

$$\% I = (A_T - A_{CV}) / (A_{CT} - A_{CV}) \times 100$$

Donde:

A_T , media de las absorbancias de los T (células infectadas y tratadas con extracto/AQ).

A_{CT} , media de las absorbancias de los controles de toxicidad (CT, células no infectadas y tratadas con extracto/AQ).

A_{CV} , media de las absorbancias de los CV (células infectadas y no tratadas).

II-2.1-B- Reducción de unidades formadoras de placas

Algunos virus son capaces de formar placas de lisis cuando se multiplican en sistemas de cultivo celular recubiertos por un medio semisólido. Debido a la consistencia semisólida del medio de cultivo, la difusión de las partículas virales formadas de *novo* es muy limitada. Por lo tanto, la infección está restringida a las células vecinas que abandonó la partícula infectante. Esto provoca la formación de una zona de lisis celular masiva, denominada placa de lisis, la cual es visible a simple vista. De esta manera, cada placa se considera iniciada por una simple partícula viral (del Barrio Alonso, 2008). Así, la actividad antiviral puede ser medida como la capacidad de una muestra (extracto/AQ) para reducir el número de unidades formadoras de placas (UFP) respecto al CV (del Barrio Alonso, 2008).

Los virus se inocularon por triplicado sobre una monocapa confluyente de células Vero (95 % de confluencia). Tras 1 h de incubación a 37 °C (CO₂ al 5 %) para permitir la adsorción viral, se agregó una solución semisólida de AQ a su MCNC (T, n = 3), constituida por partes iguales de agarosa al 1 % y MEM de doble concentración (MEM2x). Se incluyeron pocillos con monocapa celular tratada con la solución semisólida de AQ como CT (n = 3). Se dejaron pocillos con monocapa celular infectada (n = 3) como CV y sin infectar (n = 3) como CC, que se cubrieron con la solución semisólida de agar (Agarosa al 1 %-MEM2x, 1:1).

Luego de aproximadamente 3-5 días de incubación (37 °C y CO₂ al 5 %), tiempo necesario para observar las UFP, las células se fijaron con formol al 10 %. Las UFP se revelaron con una solución de cristal violeta al 1 %, ya que la monocapa de células viables se tiñe de color violeta con este colorante que ingresa sólo en las células vivas. Por lo tanto, cada punto blanco corresponde a una UFP. El número de UFP se cuantificó para estimar el % I, en base a los valores obtenidos en los CV, mediante el uso de la siguiente fórmula:

$$\% I = (UFP_{CV} - UFP_T) \times 100 / UFP_{CV}$$

Donde:

UFP_{CV}, cantidad de UFP en el CV.

UFP_T, cantidad de UFP en el T.

II-2.3- Algoritmo de la evaluación de la actividad antiviral *in vitro*

En la Fig. 3.11 se muestra el diseño experimental planteado para evaluar la capacidad antiviral de una muestra (Extracto/AQ).

La evaluación general garantiza que ningún sitio posible de acción antiviral quede excluido durante la investigación, incluyendo la acción directa inactivante sobre las partículas virales (efecto virucida) y la intervención en el ciclo de replicación viral (efecto antiviral). Para aquellas muestras que presentaron actividad antiviral general (Resultado +), se realizaron ensayos específicos orientados a discernir si la muestra analizada posee efecto virucida o antiviral. Y en este último caso, se estableció en qué momento del ciclo de replicación viral ejerce su acción (del Barrio Alonso, 2008; Tomé *et al.*, 2007).

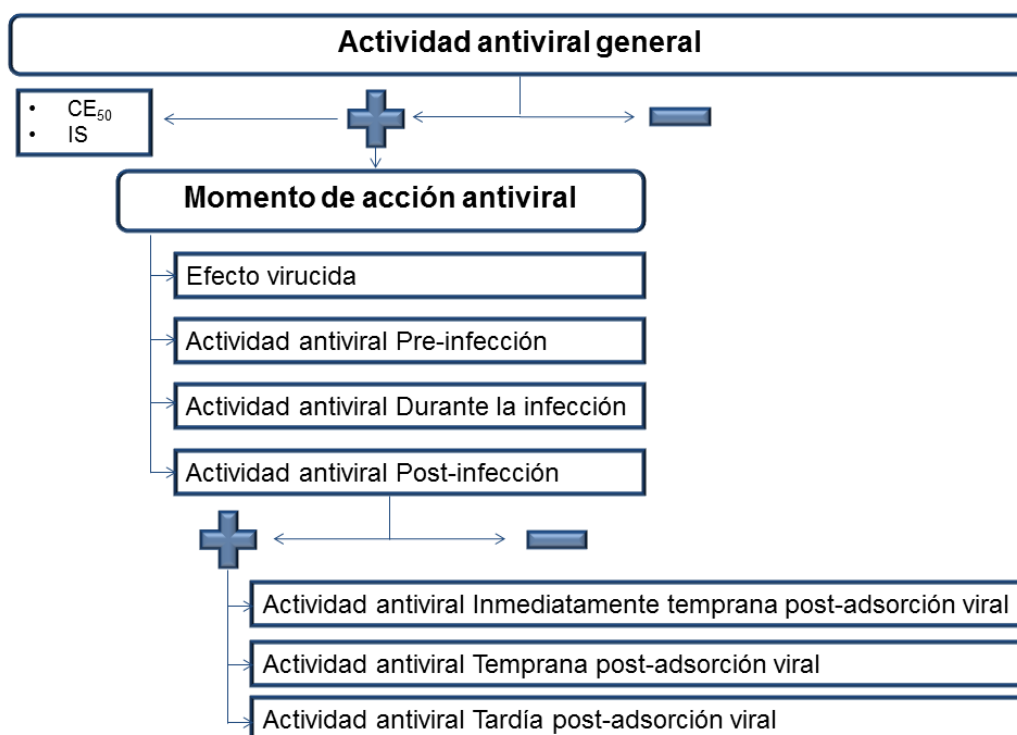


Fig 3.11. Algoritmo para evaluar la actividad antiviral *in vitro* de una muestra.

CE₅₀: concentración efectiva 50. IS: índice de selectividad. (+) Resultado positivo: observación de efecto antiviral; (-) Resultado negativo: ausencia de efecto antiviral.

II-2.3-A- Valoración de la actividad antiviral general

El objetivo de este ensayo fue evaluar si los extractos y las AQs tenían la capacidad para actuar sobre alguno de los modelos virales en estudio.

Cada extracto y AQ se evaluó en un rango de concentraciones, preparando diluciones a partir de la CC_{50} , MCNC o CSubT, según el estudio a realizar. Algunas veces se ensayaron sólo una o dos concentraciones no citotóxicas (MCNC o CSubT).

Como control positivo (C+, inhibidores de referencia) para el HSV-1 se utilizó aciclovir (Fada Aciclovir, polvo liofilizado para vía intravenosa, Argentina). No se incluyeron controles positivos para los virus WNV y VEEV debido a que no existe en el mercado un fármaco para el tratamiento de las infecciones producidas por estos virus.

La monocapa de células Vero se desarrolló en placas de 96 pocillos, incubándose 24 h hasta alcanzar el 95 % de confluencia. El medio se descartó y la monocapa celular se infectó con 10 μ L/pocillo de la suspensión viral (100 UFP/mL), durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, se agregó por triplicado 100 μ L/pocillo de diferentes diluciones de los extractos o AQ (T). Se incluyeron CV, CC y CT por triplicado. Seguidamente, la placa se incubó (37 °C y CO₂ al 5 %) hasta que se observó ECP masivo en los CV (\approx 3 días para el HSV-1 y VEEV, 5 días para el WNV).

El % I viral se cuantificó a través del punto II-2.2-A-Materiales y Métodos.

A partir de la curvas de % I en función de diferentes concentraciones, se estimó la concentración efectiva 50 (CE_{50}), la cual se define como la concentración de muestra (extracto o AQ) que inhibe el 50 % de las partículas virales.

Para la valoración de un agente antiviral, es necesario estimar el índice de selectividad (IS), el cual indica cuan apta es una muestra (extracto o AQ) para disminuir la replicación viral, sin causar daño a las células hospedadoras. Este índice se define como el cociente entre la concentración que produce toxicidad en el 50 % de las células hospedadoras (CC_{50}) y la concentración que inhibe en un 50 % la replicación viral.

$$IS = CC_{50} / CE_{50}$$

Mientras mayor es el IS mejor es el antiviral desde el punto de vista de su seguridad e inocuidad. Para un producto natural, no existe un valor de corte para esta magnitud. Sin embargo, algunos autores consideran que un IS mayor a 2 sería suficiente para convertirse en un potencial antiviral (Tsuchiya *et al.*, 1985, DeClercq, 1993).

II-2.3-B- Determinación del momento de acción antiviral

Para aquellas AQs que presentaron actividad antiviral general, se evaluó si poseen efecto virucida (destruye o inactiva la partícula viral por acción directa sobre esta) o si actúan en alguna de las etapas del ciclo de replicación, desde la adsorción del virus a la célula hospedadora hasta la liberación del virus fuera de la célula Fig. 3.12.

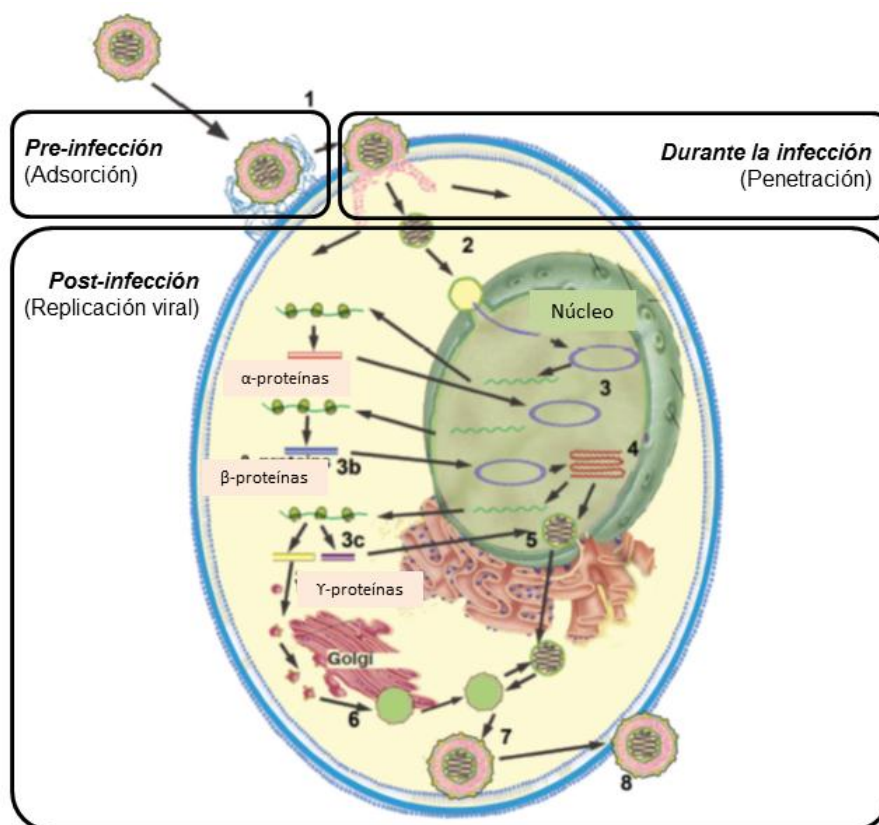


Figura 3.12. Etapas del ciclo de replicación del HSV-1 (Kukhanova *et al.*, 2014), (Imagen adaptada).

Para esto se llevaron a cabo ensayos de adición, es decir, ensayos en donde la solución de AQ se pone en contacto con las partículas virales a

distintos tiempos. La solución de AQ de concentración no citotóxica se añadió al stock viral y posteriormente, se inoculó sobre las células hospedadoras (efecto virucida). La solución de AQ se agregó sobre cultivos celulares independientes a diferentes tiempos: antes (pre-infección), durante y después de la infección con el virus (post-infección).

1) Evaluación del efecto virucida

El objetivo de este ensayo fue determinar si las AQs tienen capacidad para destruir o inactivar por acción directa a los virus. La acción inactivante directa de un producto sobre las partículas se evalúa mediante el tratamiento de suspensiones virales de título conocido. El efecto virucida conlleva una disminución brusca en el título infectivo residual de la suspensión tratada con la muestra a analizar, con respecto a suspensiones virales no tratadas (CV) (del Barrio y Parra, 2000; Fernández *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2005; del Barrio Alonso, 2008).

Se determinó el efecto directo de la AQ para inactivar las partículas virales, utilizando la prueba de reducción de UFP (Fig. 3.13).



Figura 3.13. Metodología para evaluación del efecto virucida.

Para ello, se mezclaron 50 μL del stock viral con 50 μL de la solución de AQ a su MCNC (T) y 50 μL del stock viral con 50 μL de MEM (CV). Tanto los T como los CV se incubaron 1 h (37 °C y CO₂ 5 %) y posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (factor 1/10). Cada dilución (n = 2) se inoculó sobre una monocapa confluyente de células Vero (95 % confluencia). Tras 1 h de incubación (37 °C y CO₂ 5 %) para permitir la adsorción viral, se agregó la solución semisólida y se incubó 2-3 días (37 °C y CO₂ 5 %). Al finalizar la incubación, se procedió para visualizar las UFP como se explicó en el punto II-

2.2-B-Materiales y Métodos. Se considera que un compuesto es virucida cuando los T presentan menor número de UFP respecto a su correspondiente CV. Los resultados se analizaron mediante el % I, obtenido por comparación entre el número de UFP en los T con los CV.

2) Evaluación de la actividad antiviral en la etapa pre-infección

En este ensayo se determinó si las AQs logran bloquear la adsorción del virus a la célula Vero (Fig. 3.12). Monocapas de células Vero se trataron con 250 μ L de una solución de AQ a su MCNC ($n = 4$), durante 1 h (37 °C y CO₂ 5 %). A continuación, la solución de AQ en MEM se removió y las células se infectaron durante 1 h (37 °C y CO₂ 5 %) con 25 μ L/pocillo del virus (100 UFP/mL). Posterior a ello, se agregó medio semisólido, se incubó 2-3 días y se prosiguió como en el ensayo de reducción de UFP (punto II-2.2-B-Materiales y Métodos) para visualizar las placas de lisis (Fig. 3.14).

Se considera que un compuesto actúa en la etapa pre-infección, cuando los T presentan menor número de UFP respecto a su CV.

Los resultados se analizaron mediante el % I, obtenido por comparación entre el número de UFP en los T ($n = 4$) con los CV ($n = 3$). En el ensayo se incluyeron CC ($n = 1$), CT ($n = 2$) y control positivo (C+, aciclovir, $n = 2$).

3) Evaluación de la actividad antiviral en la etapa durante la infección

Se determinó si las AQs intervienen en los procesos de penetración (Fig. 3.12). Para esto, a las monocapas de células Vero se les agregó en forma simultánea 25 μ L/pocillo del virus (100 UFP/mL) y 250 μ L de AQ a su MCNC ($n = 4$). Después de 1 h de incubación (37 °C y CO₂ 5 %), se removió el MEM con virus y AQ y luego, se agregó el medio semisólido. Al finalizar la incubación por 2-3 días, se procedió como en el ensayo de reducción de UFP (punto II-2.2-B-Materiales y Métodos) para visualizar las placas (Fig. 3.14).

Se considera que un compuesto actúa durante la infección, cuando los T presentan menor número de UFP respecto a su CV.

Los resultados se analizaron mediante el % I, obtenido por comparación entre el número de UFP en los T (n = 4) con los CV (n = 3). En el ensayo se incluyeron CC (n = 1), CT (n = 2) y C+ (aciclovir, n = 2).

4) Evaluación de la actividad antiviral en la etapa post-infección

Se evalúa si la AQ interfiere en alguno de los procesos de replicación del virus dentro de la célula hospedadora (Fig. 3.12). Monocapas de células Vero se infectaron durante 1 h (37 °C y CO₂ 5 %) con 25 µL/pocillo del virus (100 UFP/mL). Luego de transcurrido este tiempo de infección (ingreso del virus a la célula hospedadora), se extrajo el MEM y se lavó la monocapa con 100 µL de PBS (se eliminó el virus extracelular). A continuación, los cultivos celulares se trataron con 250 µL de AQ a su MCNC (n = 4), preparada en un medio semisólido compuesto por 50 % de MEM2X al 1 % DMSO y 50 % agarosa. Finalizada la incubación (2-3 días), se procede según el ensayo de reducción de UFP (punto II-2.2-B-Materiales y Métodos) para visualizar las placas (Fig. 3.14).

Se considera que un compuesto actúa durante la etapa post-infección, cuando los T presentan menor número de UFP respecto a su CV.

Los resultados se analizaron mediante el % I, obtenido por comparación entre el número de UFP en los T (n = 4) con los CV (n = 3). En el ensayo se incluyeron CC (n = 1), CT (n = 2) y C+ (aciclovir, n = 2).

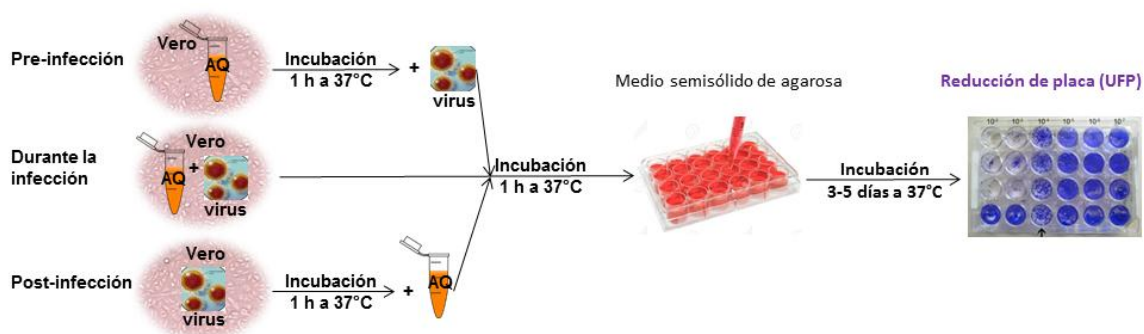


Figura 3.14. Metodología para evaluación de la actividad antiviral en las etapas pre, durante y post-infección viral.

5) Evaluación de la actividad antiviral en las etapas inmediatamente temprana, temprana y tardía post-adsorción viral

Para aquellas AQ que mostraron poseer actividad en etapas post-infección, se profundizó este estudio analizando etapas inmediatamente temprana, temprana y tardía post-adsorción viral (Fig 3.15). Para ello, se siguió la metodología descrita por Tomé *et al*, 2007.

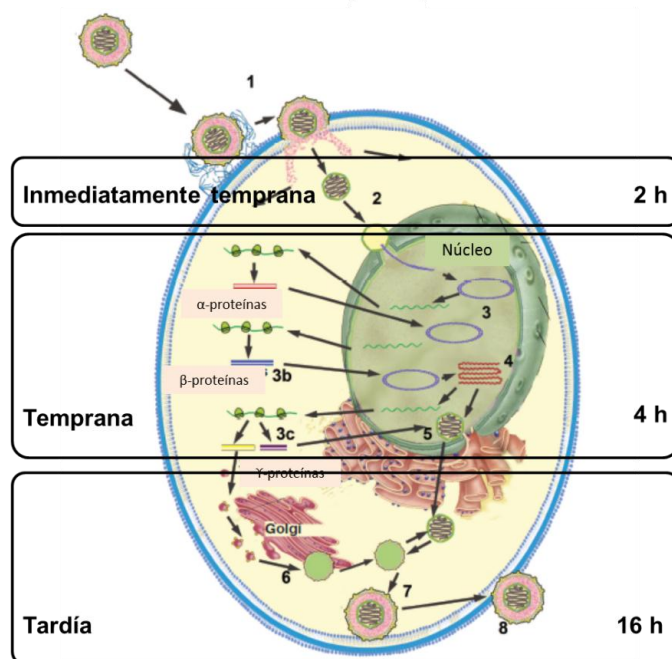


Figura 3.15. Etapas del ciclo de replicación del HSV-1 post-adsorción (Kukhanova *et al.*, 2014). (Imagen adaptada).

Todas las veces que se realizó este ensayo, se necesitó sincronizar el ingreso del virus a la célula (Fig. 3.16). Para lograr esto, se incubó el virus (25 μ L/pocillo, 100 UFP/mL) con la monocapa celular durante 1 h a 4 °C. Al cabo de este tiempo, se logró la adhesión del virus a la célula, se lavó 2 veces la monocapa con PBS y se incubó (37 °C y CO₂ 5 %) durante diferentes tiempos: 2 h (inmediatamente temprana), 4 h (temprana) y 16 h (tardía). Al finalizar cada uno de estos tiempos de incubación, se añadió 250 μ L/pocillo de una solución de AQ a su MCNC (n = 4).

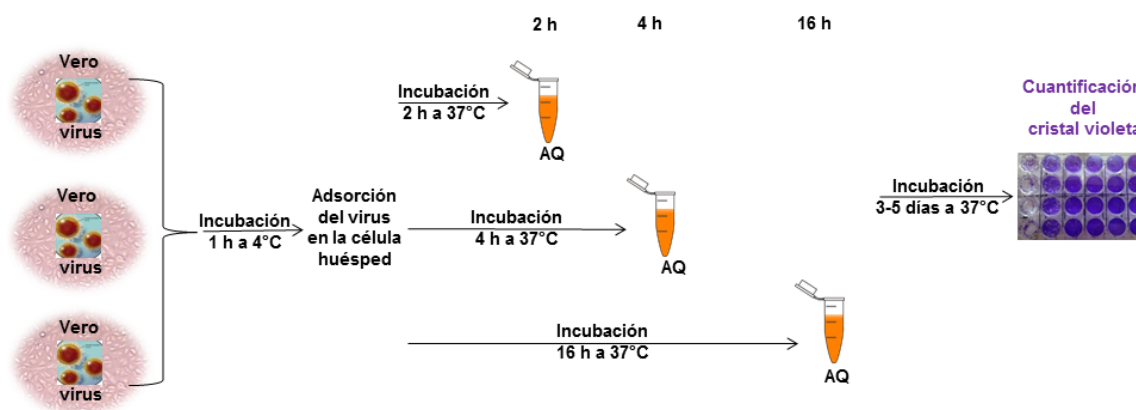


Figura 3.16. Metodología para evaluación de la actividad antiviral en las etapas inmediatamente temprana (2 h), temprana (4 h) y tardía (16 h), post-adsorción viral.

Una vez finalizado el tiempo de incubación necesario para observar efecto viral (2-3 días), las células viables se cuantificaron con una solución de cristal violeta al 10 % en agua destilada, que se dejó actuar durante 10 min. El colorante se extrajo con una solución de EtOH. La DO de las soluciones coloreadas resultantes se midió en el lector de microplacas previamente usado a 570 nm.

Se considera que un compuesto actúa durante las etapas inmediatamente tempranas, temprana y tardía post-adsorción viral, cuando los T ($n = 4$) presentan mayor DO respecto a su CV ($n = 4$).

Los resultados se analizaron mediante el % I, calculado como se describe en el punto II-2.2-A-Materiales y Métodos. Además, en el ensayo se incluyeron CT ($n = 2$) y C+ (aciclovir, $n = 2$).

Cuantificación de partículas virales inactivadas

Para confirmar los resultados obtenidos en las etapas post-adsorción, se determinó la cantidad de partículas virales inactivadas post-tratamiento. Para ello, 24 h post-adsorción, se lisaron las células mediante 2 ciclos de congelado-descongelado, con el fin de extraer las partículas virales. Luego, las muestras se centrifugaron bajo refrigeración a 1000 rpm durante 5 min. Los sobrenadantes se sometieron a diluciones seriadas (factor 1/10). Cada dilución fue inoculada sobre una monocapa confluyente de células Vero ($n = 2$). Tras 1 h

de incubación (37 °C y CO₂ 5 %) para permitir la adsorción viral, se agregó la solución semisólida. Los resultados se analizaron 48 a 72 h después de incubación con la técnica UFP (II-2.2-B-Materiales y Métodos), comparando T con CV.

Con este ensayo se determinó la cantidad de partículas virales que inactivó la AQ, cuando actúa sobre las etapas inmediatamente temprana, temprana y tardía post-adsorción viral.

II-2.4-Evaluación de la inactivación viral fotoestimulada *in vitro*

Aquellas AQ que presentaron baja actividad antiherpética (< 50 % I), se estudiaron con el fin de determinar si logran inactivar al HSV-1 a través de un proceso de fotoestimulación. Para tal fin, se desarrolló en esta tesis una metodología que permitió llevar a cabo este estudio (Fig. 3.17).

El ensayo se realizó en 2 placas distintas, una de ellas (placa 1) se utilizó para evaluar los efectos de citotoxicidad que genera la metodología y la otra (placa 2) para determinar la inactivación viral.

La inactivación viral se evaluó sobre una monocapa de células Vero infectadas durante 1 h (37 °C y CO₂ 5 %) con 10 µL/pocillo de HSV-1 (100 UFP/mL). Post-infección, el tratamiento (T) consistió en añadir 100 µL de una solución de AQ (MCNC en PBS) por triplicado y se incubó durante 4 h (37 °C y CO₂ 5 %) para asegurar el ingreso de la AQ a la célula. Luego, las células se sometieron a dos condiciones distintas: oscuridad e irradiación.

El sistema de irradiación consistió en una lámpara actínica Philips TL 20W/52, con un rango de emisión de 380-480 nm y máximo de emisión a 420 nm (Philips, Alemania). La placa multipocillo se ubicó a 20 cm por encima de la lámpara y se irradió durante 15 min. La potencia fue de 0,65 mW cm⁻², por lo que la dosis aplicada fue de 0,59 J cm⁻².

En el ensayo se incluyeron los siguientes controles, tanto en condiciones de oscuridad como irradiación:

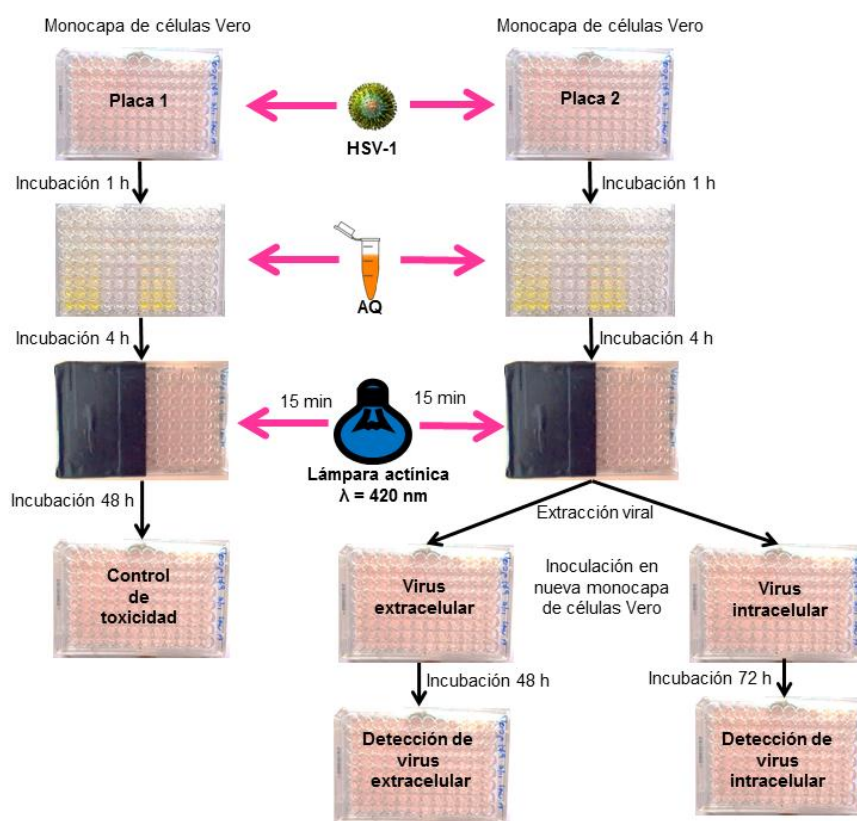
CC: monocapa celular sin tratamiento.

CT: monocapa sin infectar y tratada con AQ.

CV: monocapa celular infectada sin tratamiento.

Posterior a la irradiación, a ambas placas se agregó 100 μ L de MEM en cada pocillo.

La placa 1 se incubó durante 48 h (37 °C y CO₂ 5 %), con observación del ECP. Finalizada la incubación, la VC se determinó a través de los puntos II-2.1-A y B-Materiales y Métodos.



Todas las incubaciones fueron a 37 °C y CO₂ 5 %

Figura 3.17. Metodología para evaluar la inactivación viral fotoestimulada en la célula hospedadora.

En la placa 2, se extrajo el sobrenadante de cada pocillo, el cual contenía las partículas virales extracelulares, y se inoculó en una nueva monocapa celular que se incubó durante 48 h, para evaluar si tenía la capacidad de infectar nuevamente. De la misma manera, se procedió con el virus intracelular. Para ello, luego de retirar el sobrenadante, se lisaron las células (mediante la ayuda de un scraper y en baño frío) con el fin de extraer las partículas virales. Finalmente, estas se colocaron en una nueva monocapa de células Vero que se incubó durante 72 h. Los resultados se analizaron por

observación del ECP (y determinación de la VC (II-2.2-A y B-Materiales y Métodos), calculándose el % I.

II-3- METODO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como los promedios con sus desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Todos los valores se expresaron como (media \pm desviación estándar). Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico computacional Origin 6.0 y el Test de Student según el caso, con un valor de significancia de $p \leq 0,05$. Los valores de MCNC, CSubT, CC₅₀ y CE₅₀ se obtuvieron a partir de las curvas de dosis-respuesta, con un análisis de regresión no lineal (sigmoidal Origin, $R^2 > 0,9$).

Capítulo 4

RESULTADOS

Y

DISCUSIONES

I- Antraquinonas

de

Galium latoramosum Clos

I-1- Obtención de extractos

En la Fig. 4.1 se muestra el rendimiento de los extractos obtenidos a partir de 118 g de raíces desecadas y fragmentadas de *G. latoramosum*.

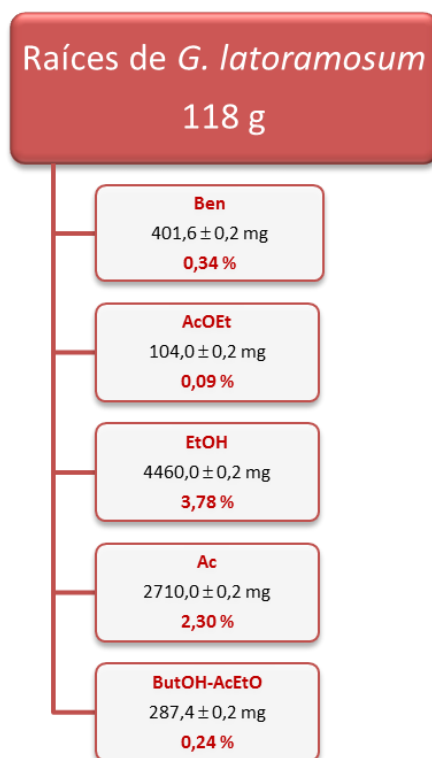


Figura 4.1. Extractos obtenidos a partir de raíces de *Galium latoramosum* Clos.

Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), Ac (extracto acuoso), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo). Rendimiento % P/P, expresado sobre material vegetal seco.

En primer lugar, se obtuvieron 4 extractos de polaridad creciente, según II-punto I-2.1-Materiales y Métodos. Dado que luego de la extracción con agua, se observó que las raíces aún contenían pigmentos, se sometieron a una maceración con *n*-ButOH-AcOEt (8:2) hasta agotar el MV. Para obtener el rendimiento de cada extracto, se concentraron a sequedad en un evaporador rotatorio, con excepción del extracto ButOH-AcOEt que se liofilizó. El extracto EtOH presentó el mejor rendimiento.

Una fracción de cada extracto se apartó para su utilización en los ensayos de bioactividad; en tanto que la fracción remanente se reservó para los estudios químicos. De esta manera, se inició el estudio de esta especie vegetal, evaluando en primer lugar la citotoxicidad y actividad antiviral *in vitro* de los extractos. Esto permitió identificar los extractos bioactivos, y a partir de

ellos realizar la purificación de los principales derivados antraquinónicos, con el fin de identificar aquellos con efectos biológicos, principalmente antiviral.

I-2- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro* de extractos

En la Tabla 4.1 se exponen los valores obtenidos para la CC_{50} , la CSubT (asegura 80 % de VC) y la MCNC (asegura más del 90 % de VC) (Liu *et al.*, 2009) sobre la línea celular Vero. Todas estas concentraciones se obtuvieron de las curvas dosis respuesta de % VC vs concentraciones de extractos (Fig. 4.2), siguiendo la metodología de captación de RN descrita en II-2-1-B-Materiales y Métodos.

Tabla 4.1. Valores de CC_{50} , CSubT y MCNC para los extractos de *G. latoramosum*.

Extractos	Línea celular Vero		
	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CSubT ($\mu\text{g/mL}$)	MCNC ($\mu\text{g/mL}$)
Ben	206,5 \pm 4,8	121,2 \pm 19,3	80,3 \pm 24,1
AcOEt	256,0 \pm 30,4	193,6 \pm 21,1	172,8 \pm 19,8
EtOH	977,9 \pm 36,1	399,6 \pm 23,7	156,0 \pm 18,8
Ac	Nd	Nd	218,2 \pm 70,5
ButOH-AcOEt	51,3 \pm 7,2	23,5 \pm 6,6	3,5 \pm 4,4

Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), Ac (extracto acuoso), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo)

CC_{50} : Concentración citotóxica al 50 %, CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

Nd: No detectado

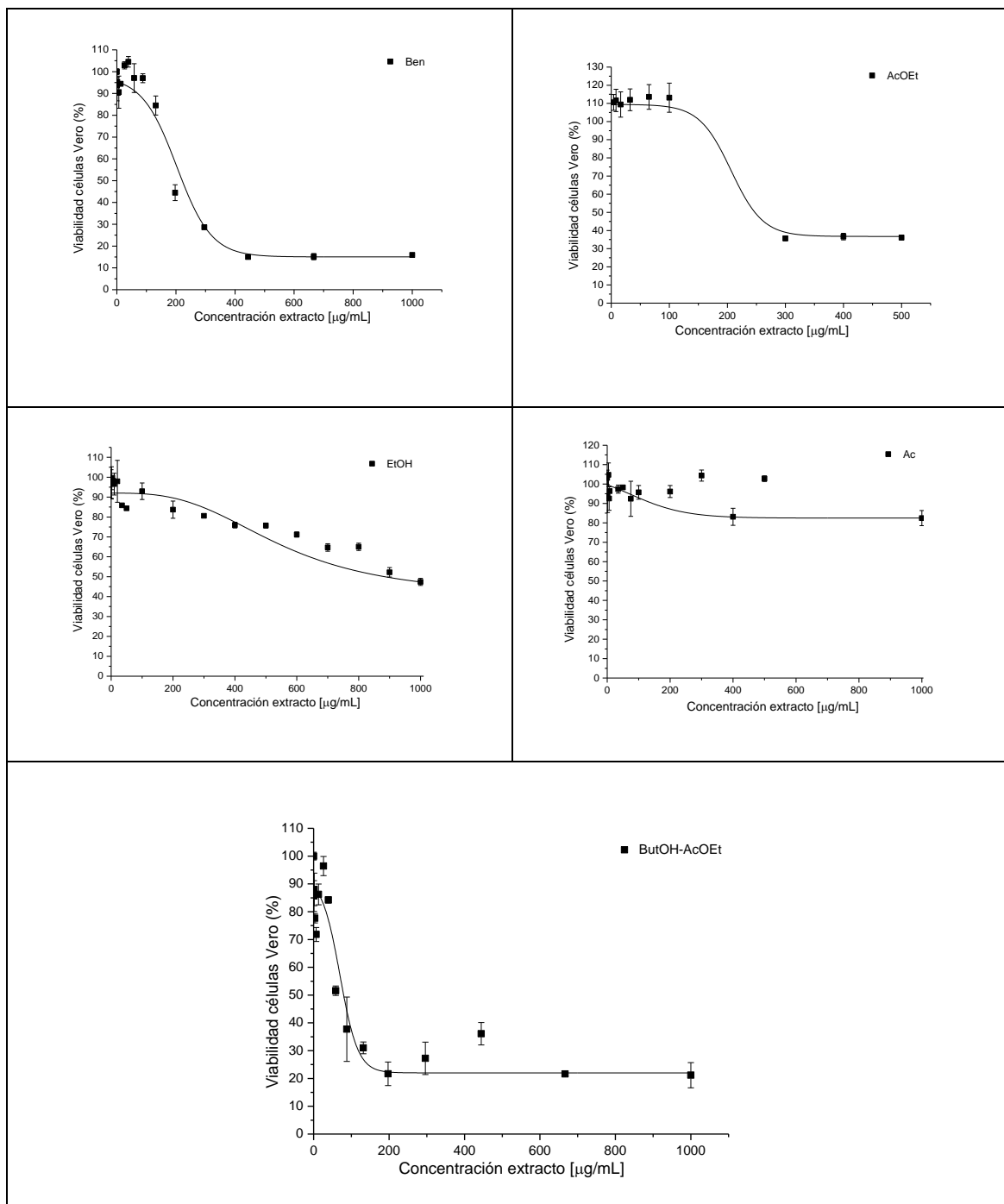


Figura 4.2. Curvas de porcentaje de viabilidad de células Vero vs concentraciones de extractos de *G. latoramosum*.

Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), Ac (extracto acuoso), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo)

A partir del análisis de estos gráficos se estableció el intervalo de concentraciones no citotóxicas sobre las células hospedadoras, delimitado por la MCNC, la cual se seleccionó para evaluar la actividad antiviral de los extractos.

A partir del análisis de los valores de las CC_{50} de cada extracto, se estableció que el extracto ButOH-AcOEt es el más citotóxico. Está ampliamente demostrado que regulando la dosis, un compuesto tóxico puede ser beneficioso en su uso como antimicrobiano o antitumoral (Harborne *et al.*, 1996; Towers and Hudson, 1987). Existen varios ejemplos de compuestos de origen natural, aislados de plantas tóxicas que son empleados en la terapéutica. Entre ellos, se pueden citar a los glicósidos cardiotónicos (digoxina, digitóxina), aislados de la especie tóxica *Digitalis lanata* Ehrh. (Escrofulariáceas) (Fabricant y Farnsworth, 2000). Dado estos antecedentes, se seleccionó el extracto ButOH-AcOEt para realizar el aislamiento de AQs potencialmente bioactivas.

I-3- Evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de extractos

La actividad antiviral de los extractos, a su MCNC, se evaluó frente a HSV-1 (virus tipo ADN), WNV y VEEV (virus tipo ARN). La viabilidad de las células infectadas, tratadas y no tratadas con los extractos se estableció mediante la metodología II-2.3-A -Materiales y Métodos.

Debido a que la replicación viral en las células Vero trae aparejado una disminución de la viabilidad de éstas, aquellas concentraciones de extractos que mantuvieron la viabilidad de las células infectadas por encima de la viabilidad de sus respectivos CV (células infectadas no tratadas), significa que lograron inhibir al virus. Por lo tanto, se consideran extractos con actividad antiviral *in vitro* (Gescher *et al.*, 2011).

En la Fig. 4.3 se observa que los extractos de *G. latoramosum* no evidencian actividad antiviral frente a los virus ARN (WNV y VEEV), ya que las viabilidades de las células infectadas y tratadas con cada extracto tuvieron viabilidad similar a los CV.

En contraparte, si se observó efecto antiviral frente al HSV-1. El extracto AcOEt mantuvo la viabilidad de las células infectadas al mismo valor que el CC (células no infectadas), mientras que el efecto antiviral de los extractos Ben y EtOH fue menor (VC por encima del CV).

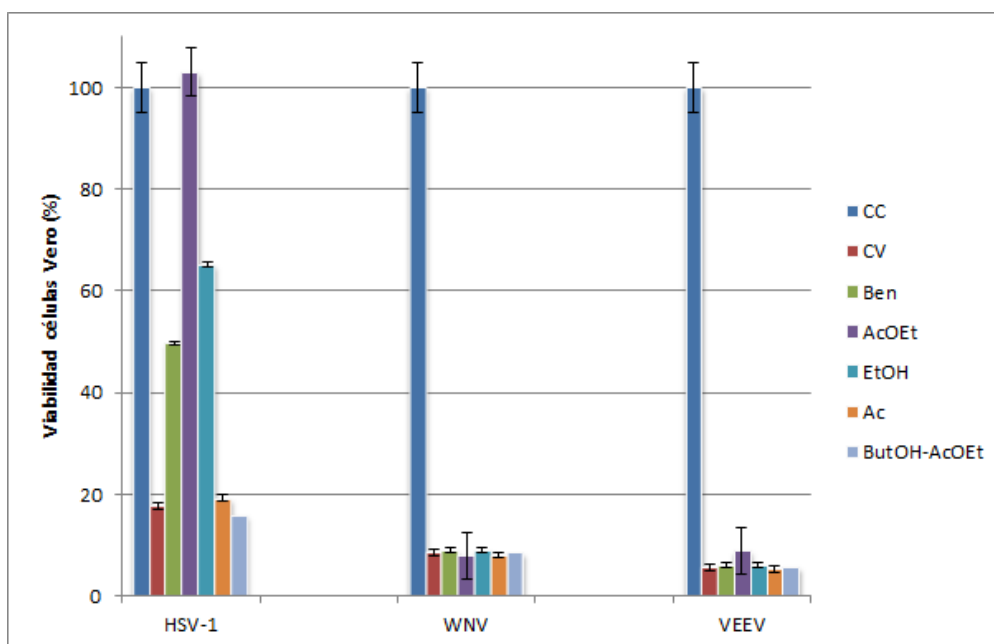


Figura 4.3. Actividad antiviral *in vitro* de los extractos de *G. latoramosum*.

Porcentaje de viabilidad de células Vero infectadas y tratadas con extractos a su MCNC.

CC (control celular), CV (control viral), Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), Ac (extracto acuoso), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo).

En la Tabla 4.2, se muestra la VC en términos de % I viral junto con los valores de IS para los extractos activos. Para el extracto de AcOEt, su efecto representa aproximadamente un 99 % I. El extracto Ben logró una inhibición del 52 %, mientras que el extracto EtOH un 59 %. Este último extracto presentó el mejor IS, lo cual indica la efectividad de este extracto como antiviral y su baja citotoxicidad.

Tabla 4.2. Porcentaje de inhibición viral (% I) e índice de selectividad (IS) de los extractos de *G. latoramosum*, ensayados a su máxima concentración no citotóxica (MCNC).

Extractos MCNC (µg/ml)	Actividad Antiviral de extractos de <i>G. latoramosum</i>			
	Virus ADN		Virus ARN	
	HSV-1		WNV	VEEV
	% I	IS	% I	% I
Ben	52,7 ± 0,5	2,6	SI	SI
AcOEt	99,8 ± 1,2	6,7	SI	SI
EtOH	59,2 ± 0,4	31,7	SI	SI
Ac	SI*	SI	SI	SI
ButOH-AcOEt	SI	SI	SI	SI

* SI: Sin inhibición.

Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), Ac (extracto acuoso), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo)

I-4- Caracterización química de los extractos de *Galium latoramosum* Clos

Se realizó la caracterización química de los extractos que resultaron bioactivos: Ben, AcOEt, EtOH y ButOH-AcOEt (Tabla 4.1 y 4.2), en cuanto a su contenido de derivados antraquinónicos, con el fin de diagramar el aislamiento de las principales AQs.

A través del análisis cualitativo por HPLC-DAD-ESI-QTOF, como se indica en el punto I-2.2-Materiales y Métodos, se identificaron algunas AQs presentes en cada extracto utilizando compuestos testigos. En la Tabla 4.3 se muestran los datos obtenidos para las AQs testigos y sus datos cuando fueron identificadas en los extractos. La presencia de otros derivados antraquinónicos se realizó mediante la utilización de calibrante interno y por comparación con datos bibliográficos (Tabla 4.4). Las estructuras de las AQs identificadas se muestran en la Fig. 4.4.

En la Fig. 4.5 se muestran los patrones cromatográficos de los extractos bioactivos, comparados con los cromatogramas de los testigos lucidina primeverósido, ácido ruberítrico y alizarina. Se determinó que lucidina primeverósido (**Lp**) es la AQ predominante en los extractos que mostraron actividad antiherpética *in vitro* (AcOEt y EtOH).

Tabla 4.3. Antraquinonas identificadas en extractos obtenidos de raíces de *G.latoramosum*, mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF y contra compuestos testigos.

Antraquinona	Datos de compuestos testigos				Identificación de AQs en extractos							
	[M-1] (m/z)	t _R (min)	Fragmentos MS ⁿ (m/z)	UV-Vis (nm)	t _R (min)	[M-1]** (m/z)	Fragmentos MS ⁿ (m/z)	UV-Vis (nm)	Identificado en extracto *** Error (ppm) [msigma]			
									Ben	AcOEt	EtOH	ButOH- AcOEt
Lucidina primeverósido	563,1478	23,9 ± 0,1	319-311-269	249 (sh), 265, 407 (1)	23,8 ± 0,6	563,1425 ± 0,0031	311-269	247, 265, 406	--	5,3 [18,5]	0,3 [13,2]	0,9 [16,0]
Ácido ruberítrico	533,1377	24,2 ± 0,2	239	260, 334 (sh), 415 (1)	Nd	--	--	--	--	--	--	--
Lucidina-ω-metil éter	283,0642	49,9 ± 0,2	251	281, 341 (sh), 411 (2)	Nd	--	--	--	--	--	--	--
Lucidina	269,0446	42,0 ± 0,5	251	280, 337 (sh), 411 (3)	42,7 ± 0,5	269,0449 ± 0,0005	251	280, 331 (sh), 410	--	2,9 [27,7]	4,7 [11,3]	1,7 [22,8]
Nordamnacantal	267,0289	60,5 ± 0,2	239	261, 296, 422 (3)	Nd	--	--	--	--	--	--	--
Purpurina	255,0288	67,4 ± 0,1	227	260, 298, 462 (sh), 482, 508 (sh) (4)	67,5 ± 0,4	255,0284	227	248, 287, 337 (sh), 419	--	--	--	5,9 [22,8]
Rubiadina	253,0483	53,1 ± 0,1	225	246, 279, 410 (5)	Nd	--	--	--	--	--	--	--
Alizarina	239,0359	43,8 ± 0,2	211	253, 278, 324 (sh), 429 (1)	43,2 ± 0,2	239,0368	Nd	251, 279, 334 (sh), 410	--	7,6 [24,3]	--	--
2-OH-3-Me-AQ	237,0575	48,5 ± 0,1	Nd *	276, 334 (sh), 382 (5)	Nd	--	--	--	--	--	--	--

(1) Datos UV-Vis coincidente con bibliografía: Cuoco *et al.*, 2011. (2) Koyoma *et al.*, 1991. (3) Wijnsma y Verpoorte, 1986. (4) Zoran *et al.*, 2013. (5) Núñez Montoya, Tesis Doctoral, 2002.

* Nd: No detectado.

** Corresponde al valor medio ± desviación estándar de los valores encontrados en distintos extractos.

*** Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo).

Tabla 4.4. Antraquinonas identificadas por comparación con datos bibliográficos.

Antraquinona	[M-1] (m/z) Teórico	Datos experimentales				Identificación de AQs en extractos *			
		t _R (min)	[M-1] (m/z)	Fragmentos MS ⁿ (m/z)	UV-Vis (nm)	Ben	AcOEt	EtOH	ButOH-AcOEt
Xantopurpurina	239,0339	59,8 ± 0,2	239,0358	211-195-186	259, 286, 420 (1)	3,7 [22,3]	Nd**	Nd	Nd
hidroxi-hidroxi-etil-metoxi AQ	297,0757	56,0 ± 0,8	297,0761	251	283, 321 (sh), 411 (2)	Nd	2,5 [19,7]	3,0 [11,7]	3,1 [24,2]
7-formil-antragalol-1,3-dimetil éter	311,0550	24,3 ± 0,5	311,0586	245-177	264, 334,5, 410 (2)	Nd	Nd	8,2 [4,1]	Nd
8-hidroxi-3-metoxi-7-metil 1,2 metilenedioxy AQ	311,0550	44,7 ± 0,3	311,0553	268	278, 331 (sh), 411 (2)	Nd	Nd	Nd	2,5 [27,9]
Damnacantol	283,0601	32,0 ± 0,3	283,0630	253-210	278, 336, 369 (sh) (2)	Nd	Nd	Nd	6,3 [28,0]

(1) Datos UV-Vis semejante con bibliografía: Abeysekera *et al.*, 2014. (2) Wijnsma y Verpoorte, 1986.

* Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo).

** Nd: No detectado.

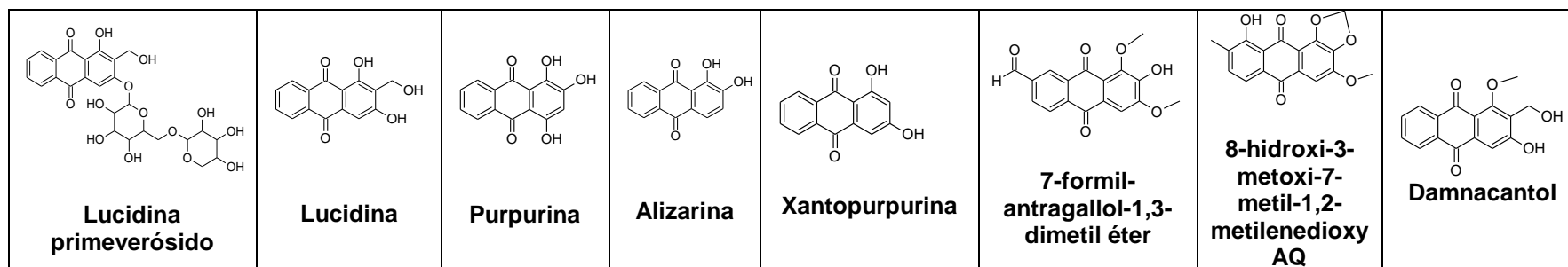


Figura 4.4. Estructuras de las AQs identificadas en los extractos bioactivos de *G. latoramosum*.

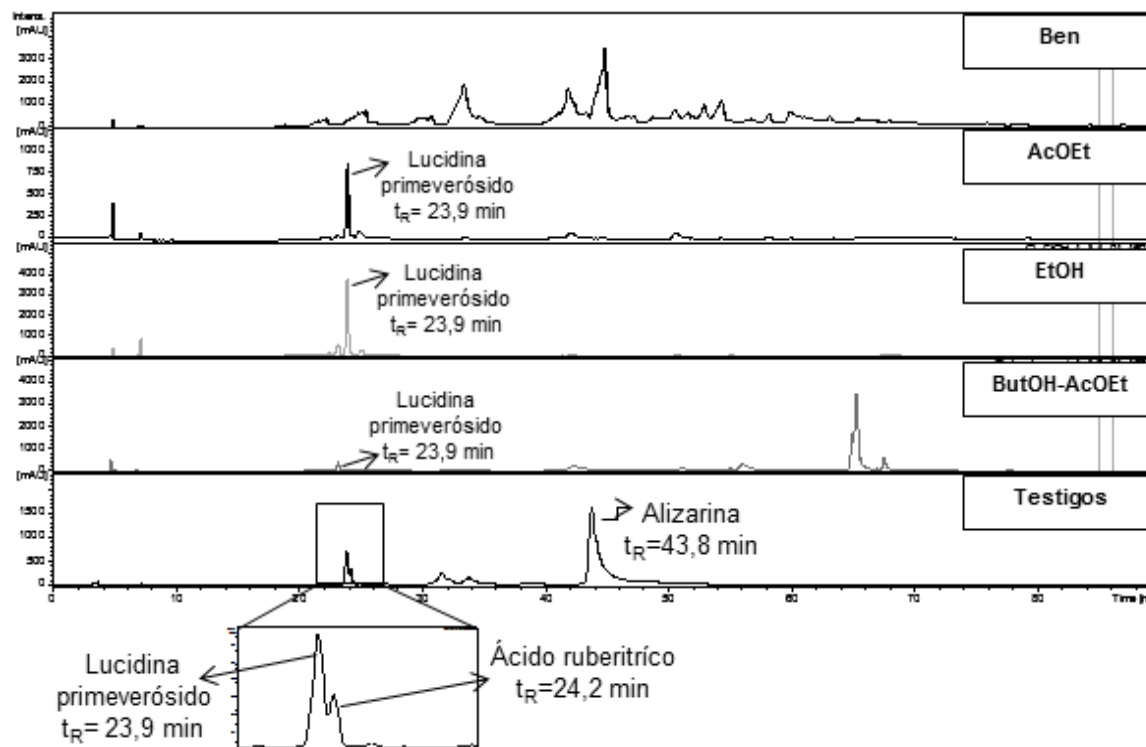


Figura 4.5. Cromatogramas de los extractos de *G. latoramosum* en comparación con testigo de lucidina primeverósido, ácido ruberitríco y alizarina, mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF.

Ben (extracto bencénico), AcOEt (extracto de acetato de etilo), EtOH (extracto etanólico), ButOH-AcOEt (extracto de butanol y acetato de etilo), Testigos (lucidina primeverósido y alizarina).

Lp corresponde aproximadamente al 41,3 % y 65,5 % del contenido antráquinónico en los extractos AcOEt y EtOH, respectivamente. Con el objetivo de establecer si esta AQ es la responsable del efecto exhibido por los extractos, se procedió a su aislamiento y purificación a partir del extracto EtOH que presentó mayor proporción de **Lp**.

I-5- Procesamiento del extracto etanólico

I-5.1- Purificación de lucidina primeverósido

Siguiendo el procedimiento descrito en el punto I-3-Materiales y Métodos, se logró purificar $198,9 \pm 0,2$ mg de un compuesto amarillo a partir del extracto EtOH, con un rendimiento de 4,48 %. Según su análisis por HPLC-UV-Vis (condición 2 de elución, I-6-Materiales y Métodos), se estableció una pureza de $90,2 \pm 0,3$ % (Fig. 4.6).

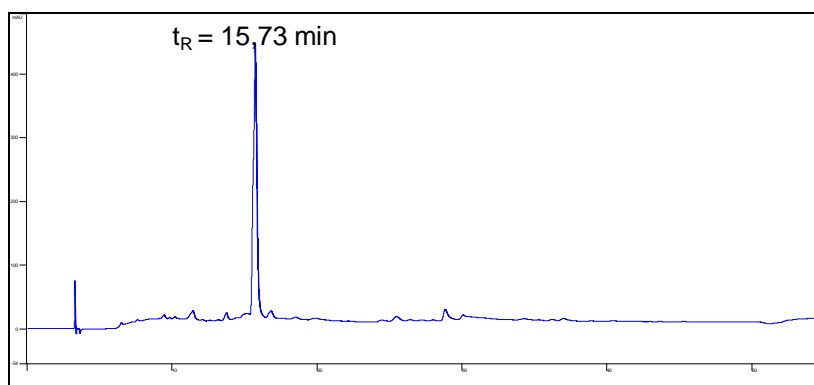


Figura 4.6. Cromatograma de lucidina primeverósido en HPLC-UV-Vis.

I-5.2- Identificación de lucidina primeverósido

Mediante el análisis de los datos espectroscópicos y por TLC contra testigo (I-7.1-Materiales y Métodos), este compuesto se identificó como **Lp** (Fig. 4.7). Los resultados obtenidos fueron coincidentes con los informados en referencia bibliográfica para esta AQ (Demagos *et al.*, 1981; El-Emary y Backheet, 1998, Cuoco *et al.*, 2011, Henderson *et al.*, 2013), la cual ya ha sido reportada para la el género *Galium* (Zhuravlev y Borisov, 1969).

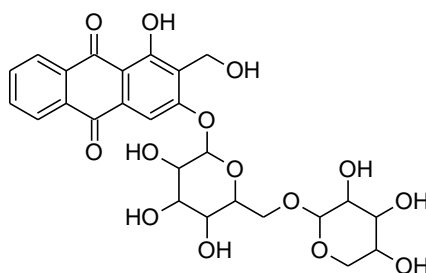


Figura 4.7. Estructura molecular de lucidina primeverósido.

El espectro de UV-Vis en MeOH (Fig. 4.8) muestra un máximo a 405 nm, indicando la presencia de grupos hidroxilos (OH) fenólicos en posición *peri* al grupo carbonilo (C=O), que se caracteriza por presentar una banda media entre 400-420 nm (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

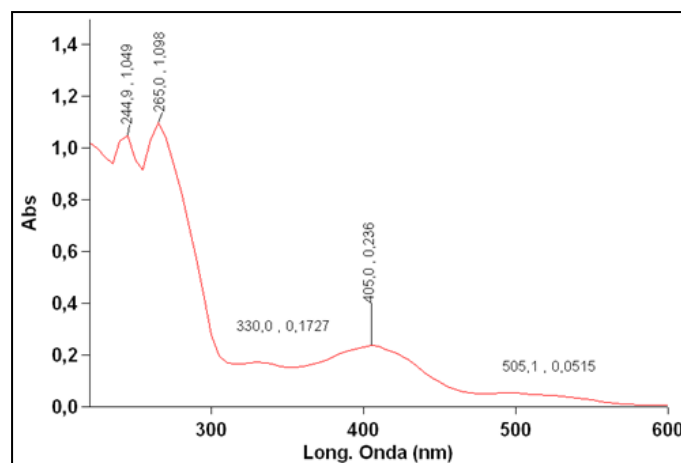


Figura 4.8. Espectro UV-Vis de lucidina primeverósido en metanol.

El espectro de RMN-¹H (Fig. 4.9. A-C) muestra señales con corrimiento químico (δ_H) entre 8,26 a 7,49 para 5 protones aromáticos (H-Ar) en posición 4, 5, 6, 7 y 8, deduciendo que se trata de una AQ trisustituida. Un singlete a δ_H 13,03 indica la presencia de un OH en posición *peri* al grupo C=O (Wijnsma y Verpoorte, 1986), el cual se asignó al OH-1. Entre δ_H 4,49 y 4,67 se observan 2 dobletes con constante de acoplamiento (J) de 11 Hz, pertenecientes al grupo hidroximetilo (-CH₂OH) en posición 2, tal como lo describe Özgen *et al* (2006). El grupo primeverósido en posición 3, se confirmó por la presencia de 2 dobletes asignados a los protones anoméricos de la glucosa y xilosa: δ_H 5,12 ($J = 6,92$ Hz) y δ_H 4,15 ($J = 7,32$ Hz), respectivamente. Además, los protones

del glúcido se constataron mediante la presencia de varios multipletes en la región δ_H 5,49 a 3,01 (Demagos *et al.*, 1981; Özgen *et al.*, 2006).

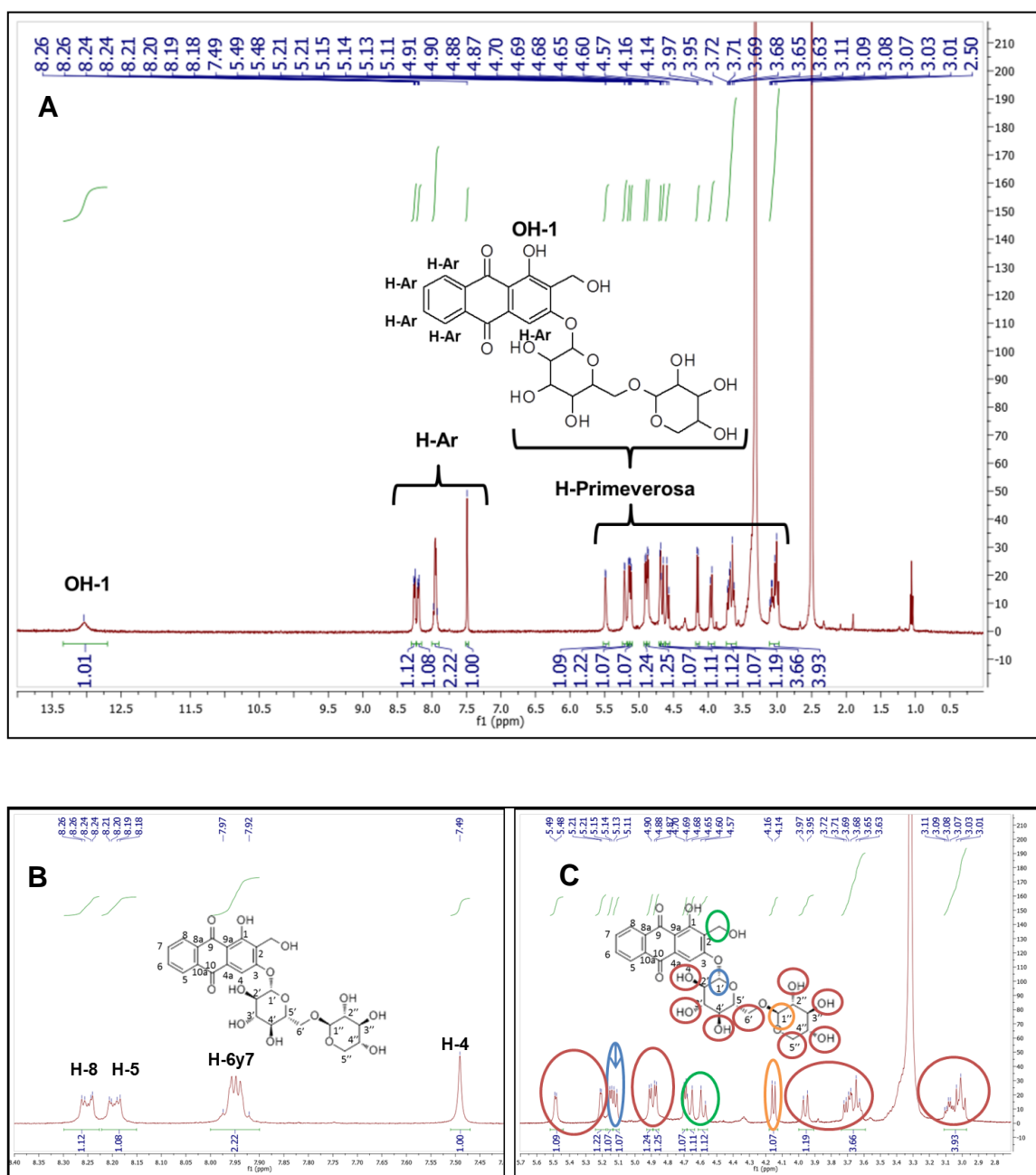


Figura 4.9. (A) Espectro de RMN-¹H de lucidina primeverósido (400 MHz, DMSO-d₆). (B) Ampliación en zona de protones aromáticos. (C) Ampliación en zona de protones del azúcar primeverosa.

El esqueleto carbonado se confirmó por RMN-¹³C (Fig. 4.10). Dos señales correspondientes a C=O de la quinona a δ_C 187,1 (C-9) y 181,5 (C-10)

confirmaron el OH-1, que causa un desplazamiento paramagnético en la señal del C-9 (ca. 5 ppm) debido a la generación de un puente hidrógeno (Wijnsma y Verpoorte, 1986). Las señales a δ_C 161,9 y 162,0 indican enlace C-O que son asignadas a los C-1 (C-OH) y C-3 (C-O-primeverosa) del núcleo antraquinona. El C del grupo CH₂OH presentó δ_C a 50,9 (Henderson *et al.*, 2013). La asignación de los carbonos restantes se describen en en la Tabla 4.5.

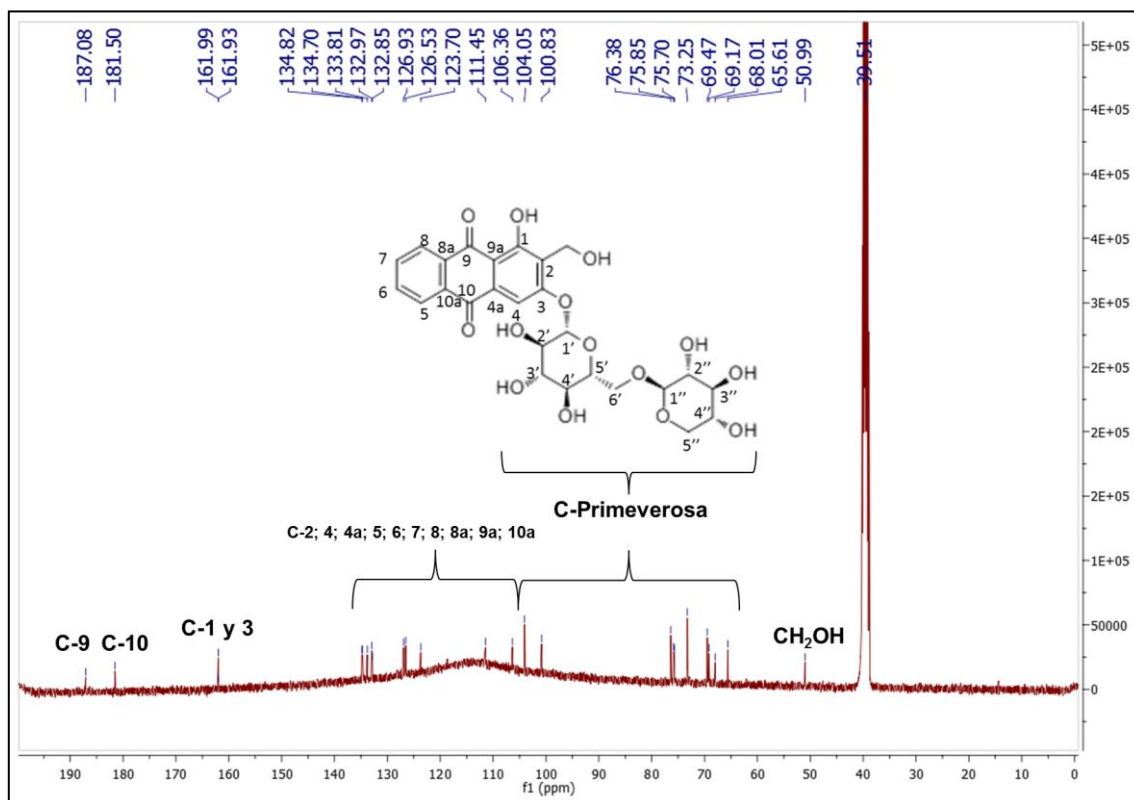


Figura 4.10. Espectro de RMN-¹³C de lucidina primeverósido (400 MHz, DMSO-d₆).

En el espectro de masa (Fig. 4.11. A y B), se observa la presencia del ión m/z [M+Na] de 587,1374 (calculado 587,1371) que confirma el peso molecular 564,49 g/mol correspondiente a C₂₆H₂₈O₁₄.

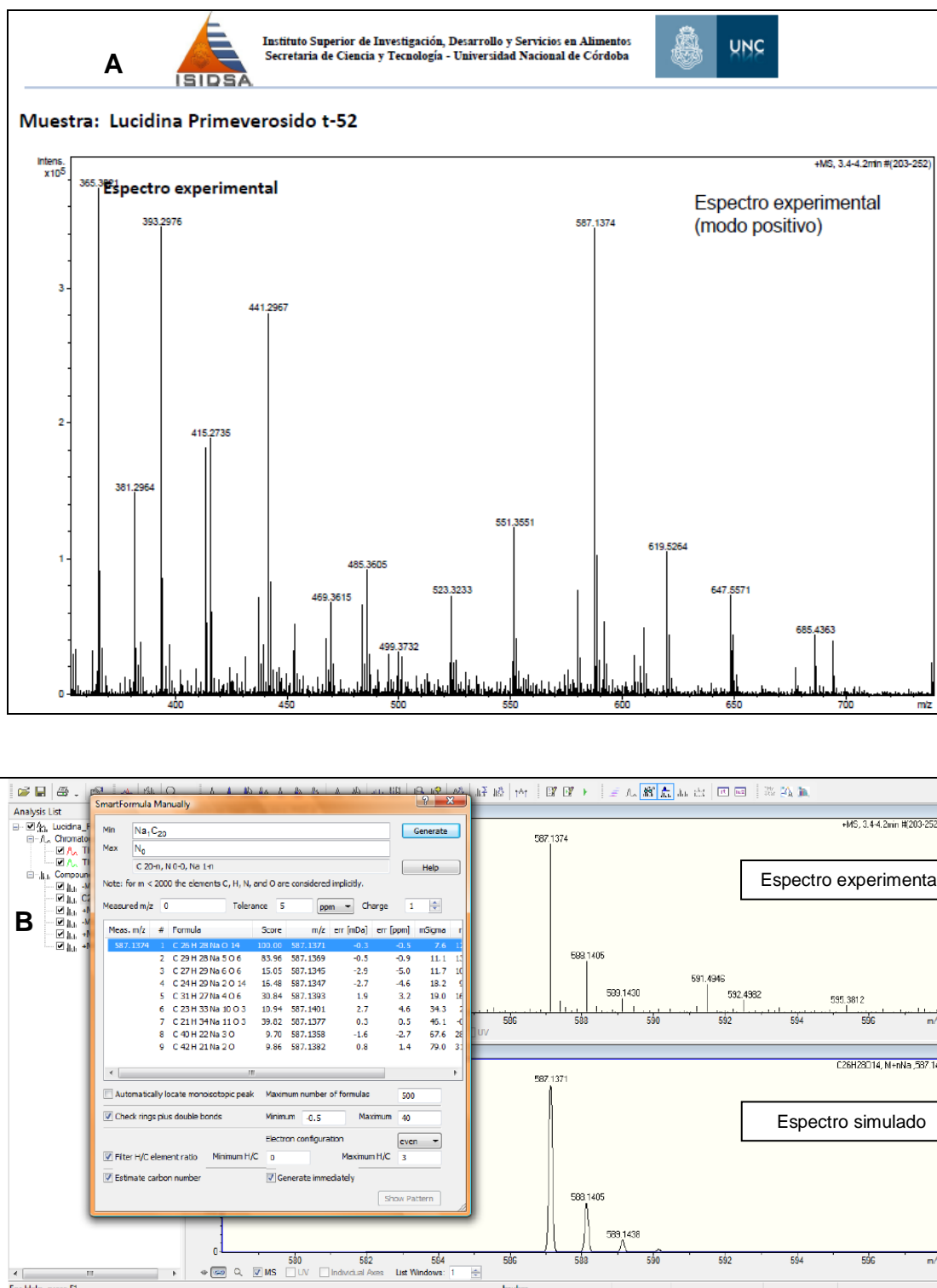
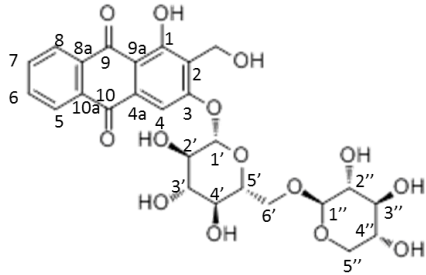


Figura 4.11. (A) y (B) Espectro de masa de alta resolución de lucidina primeverósido.

En la Tabla 4.5, se resumen todos los datos espectroscópicos del compuesto identificado como **Lp**. Además, se muestran sus valores de R_f contra testigo de **Lp**, utilizando diferentes fases móviles.

Tabla 4.5. Datos espectroscópicos y cromatográficos de lucidina primeverósido.

Lucidina primeverósido																																																					
																																																					
HRMS	Peso Molecular = 564,49 g/mol Fórmula Molecular = C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄																																																				
UV-Vis (MeOH) λ_{\max} (nm) [log ϵ]	244,9 [1,0]; 265,0 [1,1]; 330,0 (sh) [0,2]; 405,0 [0,2]; 505,1 (sh) [0,1] [1]																																																				
RMN-¹H (DMSO-d ₆) δ (ppm) J (Hz)	4,15 [1H; d ($J = 7,32$); H-1'' xylosa] 4,59 [1H; d ($J = 11,40$); $\underline{CH_2}$ OH] 4,67 [1H; d ($J = 11,08$); $\underline{CH_2}$ OH] 5,12 [1H; d ($J = 6,92$); H-1' glucosa] 5,49-3,01 [protones de los grupos azúcar] 7,49 [1H; s; H-4] 7,95 [2H; m; H-6 y H-7] 8,19 [1H; dd ($J_o = 6,38$, $J_m = 2,36$); H-5] 8,25 [1H; dd ($J_o = 6,38$, $J_m = 2,36$); H-8] 13,03 [1H; s; OH-1] [2]																																																				
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td>C-1</td><td>161,9</td><td>C-10a</td><td>132,9</td></tr> <tr> <td>C-2</td><td>123,7</td><td>$\underline{CH_2}$-OH</td><td>50,9</td></tr> <tr> <td>C-3</td><td>162,0</td><td>Primeverosa</td><td></td></tr> <tr> <td>C-4</td><td>106,4</td><td>C-1''</td><td>104,1</td></tr> <tr> <td>C-4a</td><td>133,8</td><td>C-1'</td><td>100,8</td></tr> <tr> <td>C-5</td><td>126,9</td><td>C-3''</td><td>76,4</td></tr> <tr> <td>C-6</td><td>134,8</td><td>C-3'</td><td>75,9</td></tr> <tr> <td>C-7</td><td>134,7</td><td>C-5'</td><td>75,7</td></tr> <tr> <td>C-8</td><td>126,5</td><td>C-2' y C-2''</td><td>73,2</td></tr> <tr> <td>C-8a</td><td>132,8</td><td>C-4''</td><td>69,5</td></tr> <tr> <td>C-9</td><td>187,1</td><td>C-4'</td><td>69,2</td></tr> <tr> <td>C-9a</td><td>111,4</td><td>C-6'</td><td>68,0</td></tr> <tr> <td>C-10</td><td>181,5</td><td>C-5''</td><td>65,6 [3]</td></tr> </table>	C-1	161,9	C-10a	132,9	C-2	123,7	$\underline{CH_2}$ -OH	50,9	C-3	162,0	Primeverosa		C-4	106,4	C-1''	104,1	C-4a	133,8	C-1'	100,8	C-5	126,9	C-3''	76,4	C-6	134,8	C-3'	75,9	C-7	134,7	C-5'	75,7	C-8	126,5	C-2' y C-2''	73,2	C-8a	132,8	C-4''	69,5	C-9	187,1	C-4'	69,2	C-9a	111,4	C-6'	68,0	C-10	181,5	C-5''	65,6 [3]
C-1	161,9	C-10a	132,9																																																		
C-2	123,7	$\underline{CH_2}$ -OH	50,9																																																		
C-3	162,0	Primeverosa																																																			
C-4	106,4	C-1''	104,1																																																		
C-4a	133,8	C-1'	100,8																																																		
C-5	126,9	C-3''	76,4																																																		
C-6	134,8	C-3'	75,9																																																		
C-7	134,7	C-5'	75,7																																																		
C-8	126,5	C-2' y C-2''	73,2																																																		
C-8a	132,8	C-4''	69,5																																																		
C-9	187,1	C-4'	69,2																																																		
C-9a	111,4	C-6'	68,0																																																		
C-10	181,5	C-5''	65,6 [3]																																																		
TLC analítica FM = R _f	AcOEt-MeOH-H ₂ O-HFo (100:13,5:10:1) = 0,4 <i>n</i> -hexano -AcOEt (7:3) = 0 <i>n</i> -hexano -AcOEt (1:1) = 0																																																				

[1] Datos UV-Vis coincidentes con bibliografía: El-Emary y Backheet, 1998, Cuoco *et al.*, 2011.

[2] Datos espectroscopia de RMN-¹H coincidentes con bibliografía: Demagos *et al.*, 1981; El-Emary y Backheet, 1998, Henderson *et al.*, 2013.

[3] Datos espectroscopia de RMN-¹³C coincidentes con bibliografía: Demagos *et al.*, 1981; El-Emary y Backheet, 1998, Henderson *et al.*, 2013.

I-6- Estudios de actividad biológica de lucidina primeverósido

Una vez aislada y purificada, se procedió a ensayar el efecto citotóxico de **Lp** sobre las células hospedadoras de virus, para su posterior evaluación como agente antiherpético.

I-6.1- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

Mediante el ensayo de captación de RN (II-2.1-B-Materiales y Métodos), se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* de **Lp** sobre la línea celular Vero. **Lp** no resultó citotóxica debido a que en el rango de concentraciones evaluadas, 15,6 – 1000 $\mu\text{g/mL}$ (27,68 - 1771,48 μM), no logró disminuir la VC al 50 %. Tal como se observa en los tres experimentos graficados en la Fig. 4.12.

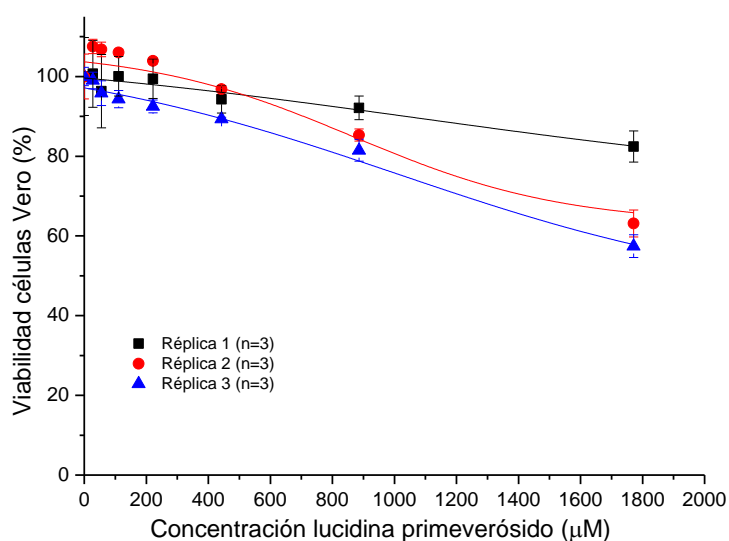


Figura 4.12. Curvas de porcentaje de viabilidad de células Vero vs concentración de lucidina primeverósido.

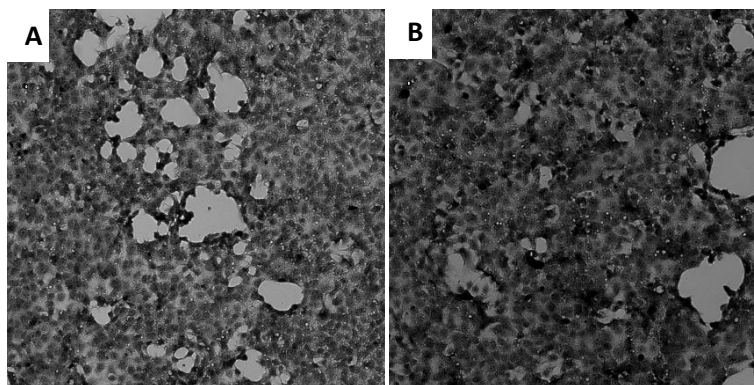
A través de las curvas dosis respuesta (Fig. 4.12), se estimaron los valores para la CC_{50} , C_{SubT} y MCNC (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Valores de CC₅₀, CSubT y MCNC para lucidina primeverósido.

AQ	Línea celular Vero		
	CC ₅₀ (μ M)	CSubT (μ M)	MCNC (μ M)
Lucidina primeverósido	> 1771,5	905,5 \pm 90,1	566,3 \pm 21,2

CC₅₀: Concentración citotóxica al 50 %, CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

En la Fig. 4.13 se observa la ausencia de ECP (II-2.1-A-Materiales y Métodos) en las células Vero cuando se trataron con la CsubT de **Lp**. Por tanto, se decidió usar esta concentración como punto de partida para realizar las diluciones necesarias para evaluar la actividad antiviral *in vitro*.



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.13. Efecto citopático de lucidina primeverósido (**Lp**) en células Vero. **(A)** Control celular. **(B)** Monocapa celular tratada con Lp a su CSubT (905,5 μ M).

I-6.2- Evaluación de la actividad antiviral *in vitro*

Dado que algunos compuestos una vez purificados pueden presentar un espectro de acción diferente al exhibido por el extracto de donde se purificaron, se aprovechó la cantidad obtenida de **Lp** para ensayar su actividad antiviral, no sólo sobre HSV-1, sino además sobre los otros modelos virales propuestos (WNV y VEEV), mediante la metodología descrita en II-2.3-A del capítulo Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos indican que **Lp** no fue activa contra ninguno de los virus probados (Fig. 4.14). La viabilidad de las células infectadas con cada modelo viral y tratadas con diferentes concentraciones de esta AQ (\leq CSubT), presentaron similar viabilidad a las células infectadas y no tratadas (CV, ordenada al origen de cada tratamiento).

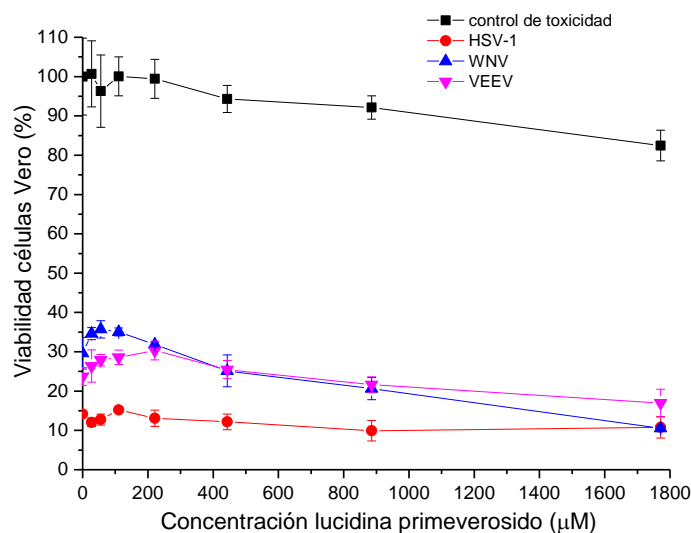


Figura 4.14. Actividad antiviral *in vitro* de lucidina primeverósido sobre células Vero infectadas con virus.

HSV-1: (virus Herpes Simple Tipo 1), WNV (virus West Nile), VEEV (virus Encephalitis Equino Venezolana).
Control celular (ordenada al origen del control de toxicidad). Control viral (ordenada al origen de cada tratamiento).

Frente a estos resultados, se decidió trabajar con el extracto de AcOEt que logró el mayor % I viral (Tabla 4.2), a fin de obtener el o los metabolitos secundarios que le confieren el efecto antiviral observado.

I-7- Procesamiento del extracto de Acetato de etilo

I-7.1- Purificación bioguiada

En la Fig. 4.15, se muestra el esquema de purificación del extracto de AcOEt, bioguiado por efecto antiherpético (I-4.1 y I.4.2-B-Materiales y Métodos).

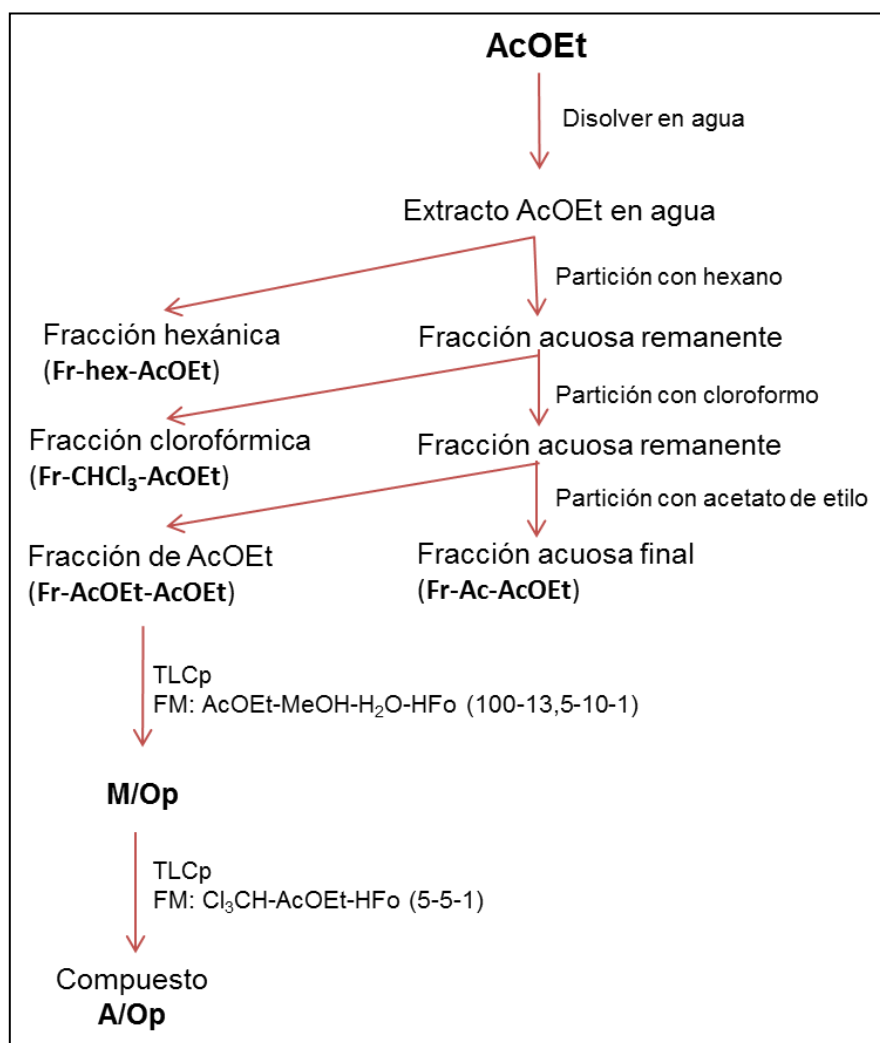


Figura 4.15. Esquema de purificación del extracto de AcOEt, obtenido de raíces de *G. latoramosum*, bioguiado por actividad antiviral.

Colores visualizados a simple vista y bajo luz UV: M/Op (Marrón /Opaco), A/Op (Amarillo/Opaco).

Se obtuvieron cuatro fracciones a partir del extracto AcOEt (20 mg): hexánica (Fr-hex-AcOEt), clorofórmica (Fr-CHCl₃-AcOEt), AcOEt (Fr-AcOEt-AcOEt) y acuosa final (Fr-Ac-AcOEt).

Posteriormente, se evaluaron en cuanto a su actividad antiviral, mediante la metodología descrita en II-2.3-A-Materiales y Métodos. En cada gráfico de la Fig. 4.16, se compara la viabilidad de las células no infectadas sometidas a diferentes concentraciones de cada fracción (Control de toxicidad, línea negra) respecto de las células infectadas y tratadas (Tratamiento, línea roja). La actividad antiviral se analizó en el rango de concentraciones no citotóxicas (recuadro azul). Aquellos tratamientos que evidenciaron mayor viabilidad celular que el CV (ordenada al origen del tratamiento), se consideraron fracciones activas contra HSV-1. De esta manera, se observó que Fr-AcOEt-AcOEt fue la más activa; y por este motivo, se seleccionó para continuar el estudio biodirigido.

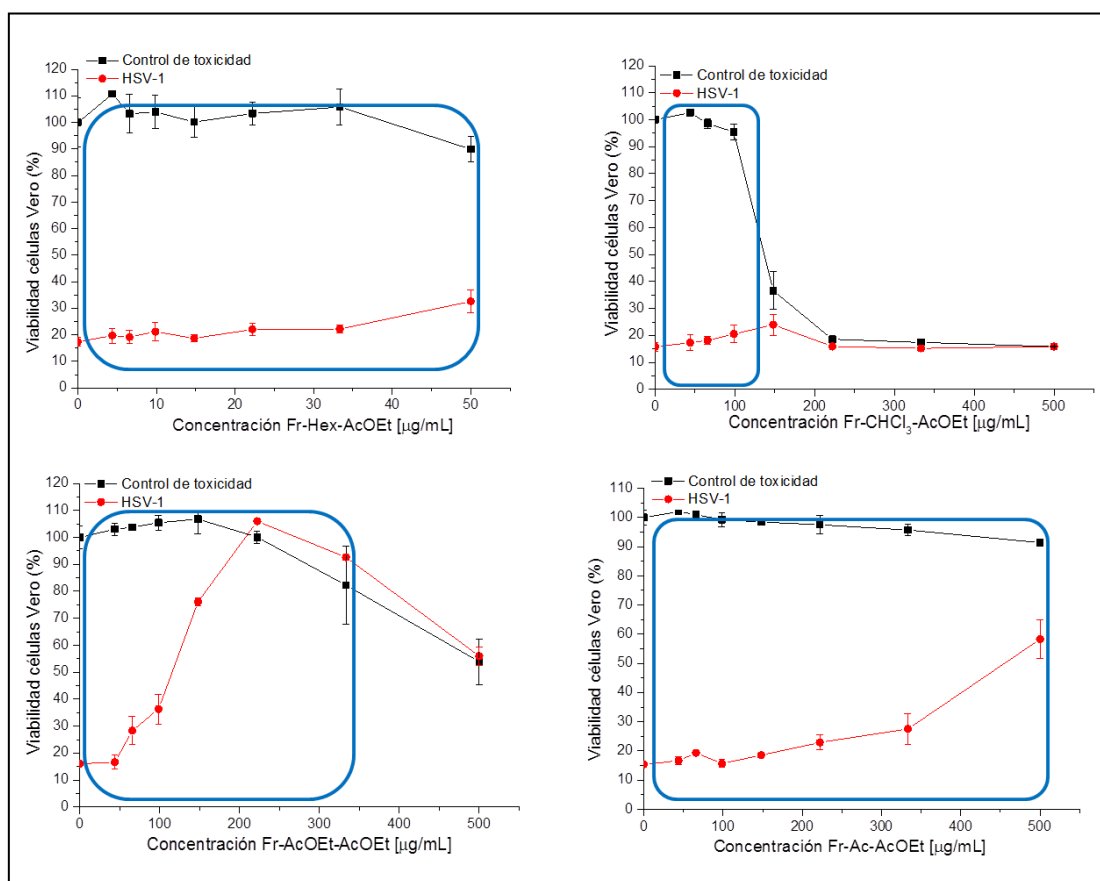


Figura 4.16. Actividad antiherpética *in vitro* de las fracciones obtenidas del extracto de AcOEt sobre células infectadas con HSV-1.

Control celular (ordenada al origen del control de toxicidad). Control viral (ordenada al origen del tratamiento).

El análisis por TLC analítica de cada una de estas fracciones con la FM: AcOEt-MeOH-H₂O-HFo (100-13,5-10-1), permitió direccionar la purificación de la Fr-AcOEt-AcOEt (Fig. 4.17).

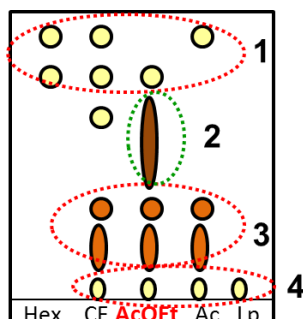


Figura 4.17. TLC analítica de las fracciones obtenidas a partir de la partición del extracto AcOEt.

Hex: Fr-hex-AcOEt, **CF:** Fr-CHCl₃-AcOEt, **AcOEt:** Fr-AcOEt-AcOEt, **Ac:** Fr-Ac-AcOEt, **Lp:** lucidina primeverósido testigo.

Mediante el revelado de la placa bajo luz UV, se observó que la fracción activa, Fr-AcOEt-AcOEt, contiene:

1: compuesto amarillo de mayor R_f, también observado en las fracciones no activas.

2: compuesto M/Op (marrón/opaco, bajo luz UV), presente sólo en Fr-AcOEt-AcOEt, que se denominó sub-fracción M/Op.

3: compuestos de menor R_f también presentes en fracciones no activas.

4: Lp, compuesto no activo.

Atentos a la información obtenida, postulamos que el compuesto M/Op sería responsable de la actividad antiherpética. Para corroborar esto, se aisló a través de TLCp con FM: AcOEt-MeOH-H₂O-HFo (100-13,5-10-1).

Como muestra la Fig. 4.18, el compuesto M/Op logró inhibir al 100 % la replicación del herpes, ya que a la MCNC ($38,7 \pm 9,1 \mu\text{g/mL}$) la viabilidad de las células infectadas fue de $91,2 \pm 6,5 \%$.

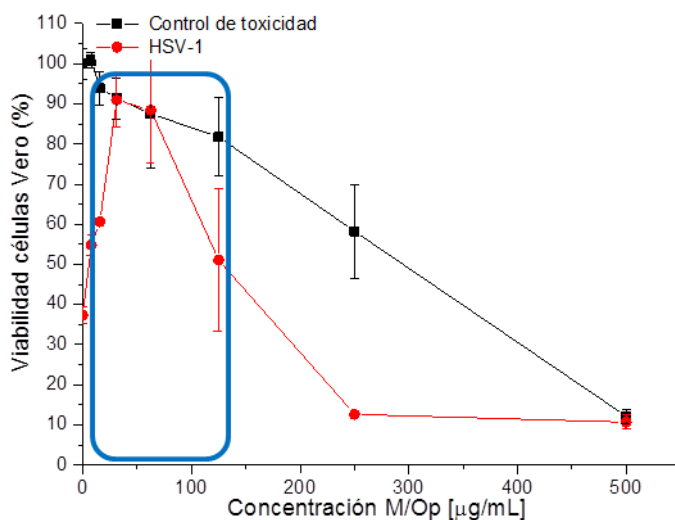


Figura 4.18. Actividad antiherpética *in vitro* de M/Op obtenido de la fracción AcOEt del extracto de AcOEt sobre células infectadas con HSV-1.

Control celular (ordenada al origen del control de toxicidad). Control viral (ordenada al origen del tratamiento).

El análisis por TLC analítica en diferentes FM del compuesto M/Op, demostró no ser un compuesto puro (Fig. 4.19).

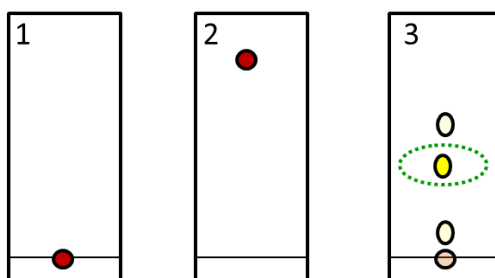


Figura 4.19. TLC analítica de M/Op obtenido de la Fr-AcOEt-AcOEt.

1) *n*-hex-AcOEt-HFo (75-25-1) 2) AcOEt-MeOH-H₂O-HFo (100-13,5-10-1) 3) Cl₃CH-AcOEt-HFo (5-5-1)

Se observa que contiene principalmente un compuesto que se visualiza a simple vista amarillo, y opaco bajo la luz UV (A/Op) con $R_f = 0,3$ en FM3, el cual se denominó A/Op.

Se obtuvieron 1,16 mg de A/Op a través de su purificación por TLCp con FM: Cl₃CH-AcOEt-HFo (5-5-1). Esta cantidad de compuesto sólo alcanzó para evaluar su actividad antiviral (Fig. 4.20) y para iniciar los estudios de elucidación estructural.

La Fig. 4.20 muestra que el compuesto A/Op logró un 100 % de inhibición viral a su MCNC ($500,0 \pm 45,1 \mu\text{g/mL}$).

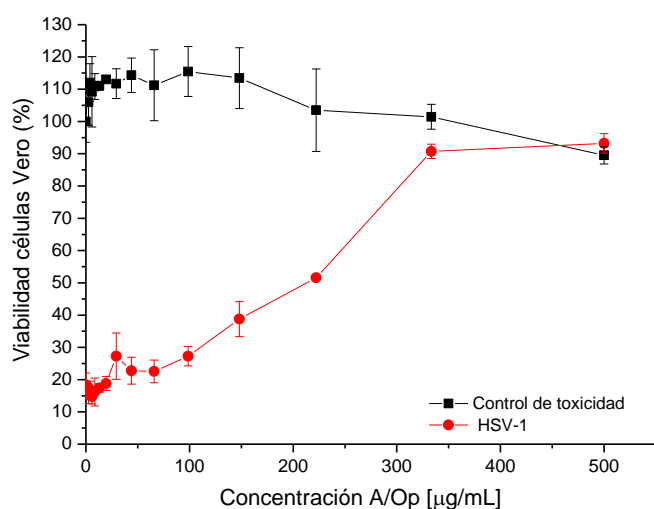


Figura 4.20. Actividad antiherpética *in vitro* del compuesto A/Op obtenido del extracto de AcOEt sobre células infectadas con HSV-1.

Control celular (ordenada al origen del control de toxicidad). Control viral (ordenada al origen del tratamiento).

I-7.2- Identificación del compuesto bioactivo

Se realizó la caracterización de A/Op por Rf (Tabla 4.7), espectrofotometría UV-Vis (Fig. 4.21) y RMN (mono y bidimensional) (Tabla 4.8).

Tabla 4.7. Valores de Rf para compuesto A/Op en diferentes fases móviles.

FM	Rf A/Op
<i>n</i> -hex-AcOEt-HFo (75-25-1)	$0,0 \pm 0,1$
AcOEt-MeOH-H ₂ O-HFo (100-13,5-10-1)	$0,6 \pm 0,1$
Cl ₃ CH-AcOEt-HFo (5-5-1)	$0,3 \pm 0,1$

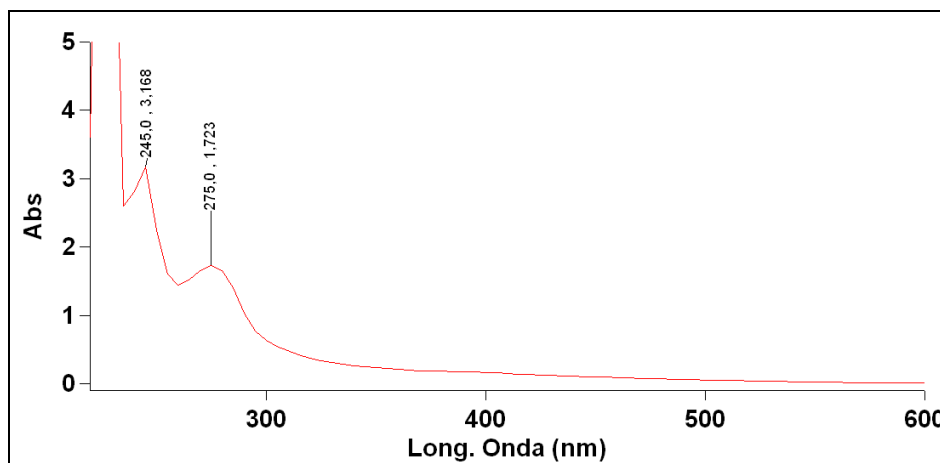


Figura 4.21. Espectro UV-Vis del compuesto A/Op (EtOH).

Debido a que el proceso de purificación bioguiado partió del extracto AcOEt y como su procesamiento llevó a la obtención de compuestos polares, se propuso que la estructura a elucidar podría ser un polifenol. Mediante el análisis por RMN-¹H (Fig. 4.24), se estableció que se trata de una estructura aromática (δ_{H} entre 7,54 y 5,92). Además, a partir de los espectros bidimensionales (Fig. 4.25-27) se estimó que este compuesto no es una AQ, ya que no presenta las señales característica de los grupos C=O correspondientes a las quinonas (δ_{C} entre 183 y 192) (Wijnsma y Vepoorte, 1986).

Dentro del grupo de los polifenoles se encuentran los flavonoides, una familia de compuestos también encontrados en el género *Galium* (Zhao *et al.*, 2008). Los flavonoides se subdividen en distintos subgrupos: auronas, isoflavonas, chalconas, flavanonas, flavona, flavonoles, flavonololes, dihidrochalconas, antocianidinas, catequinas, proantocianidinas, flavanos y leucoantocianidinas (Barron y Ibrahim, 1996).

Se compararon los espectros de absorción UV-Vis de la muestra A/Op (Fig. 4.21) y de distintos tipos de flavonoides (Harbone, 1957; Yanagida *et al.*, 1999), determinando que el perfil de A/Op es similar al de catequinas y proantocianidinas (también conocidas como taninos condensados).

A través de su análisis por RMN (mono y bidimensional) y por comparación con datos bibliográficos, se pudo concluir que se trata de una procianidina A1 (Fig. 4.27 y Tabla 4.8).

Las procianidinas son un subgrupo de proantocianidinas que se caracterizan por ser oligómeros (dímeros o trímeros), formados exclusivamente

de unidades de (+)-catequina (con estereoquímica 2-3-*trans*) y (-)-epicatequina (con estereoquímica 2-3-*cis*) (Fig. 4.22).

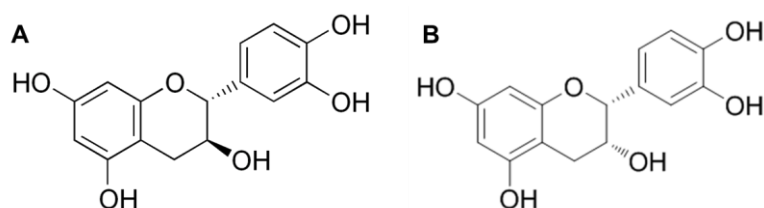


Figura 4.22. Estructura molecular de catequina **(A)** y epicatequina **(B)**.

En las procianidinas tipo B, las unidades monoméricas se unen por un enlace simple entre C4-C8 o C4-C6 de la unidad superior con la inferior. Las procianidinas tipo A, además de esta unión presentan un enlace simple entre C2 del monómero superior y el OH-7 u OH-5 de la unidad inferior (C2-O-C7 o C2-O-C5) (Appeldoorn *et al.* 2009; Dixon *et al.* 2004).

El RMN-¹H del compuesto aislado (Fig. 4.23 presenta un sistema de acoplamiento AB a δ_H 4,22 (d, $J = 4,4$ Hz, H-3) y 4,28 (d, $J = 4,7$ Hz, H-4), que corresponden a los protones del anillo C (H-3C y H-4C en Tabla 4.8).

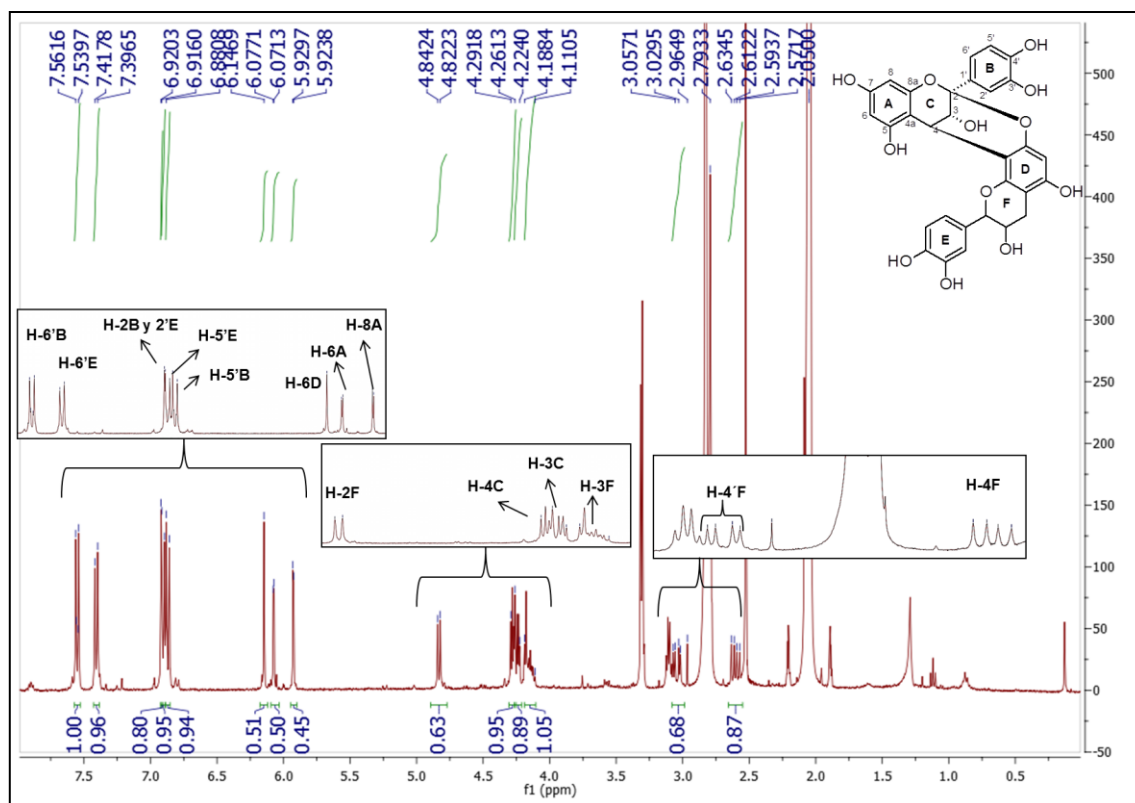


Figura 4.23. Espectro de RMN-¹H de procianidina A1 (400 MHz, acetona-d₆).

Los dobletes meta-acoplados en 6,07 ppm ($J = 2,3$) y 5,92 ppm ($J = 2,4$) pertenecen a los H-6 y H-8 respectivamente del anillo A (H-6A y H-8A). Un singlete a δ_{H} 6,14 indica la presencia de un protón aromático residual (H-6 en el anillo D). Dos sistemas AMX en la región aromática (δ_{H} 6,92-7,54) corresponden a los protones aromáticos de los anillos B y E (H-2'; H-5' y H-6'). Los protones del anillo F se visualizan como un doblete a 4,83 ppm (H-2, $J = 8$), un multiplete para el H-3 a 4,14 ppm y dos doble-dobletes a 2,60 ppm ($J = 8,9; 16,3$) y 3,04 ppm ($J = 5,3; 16,3$) para los H-4 y H-4', respectivamente. Estos datos espectrales permiten deducir que se trata de una procianidina de tipo A, con unión C2-O-C7.

En la Fig. 4.24 se muestra el espectro COSY de procianidina A, donde se visualizan las correlaciones H/H, resumidas en la Tabla 4.8.

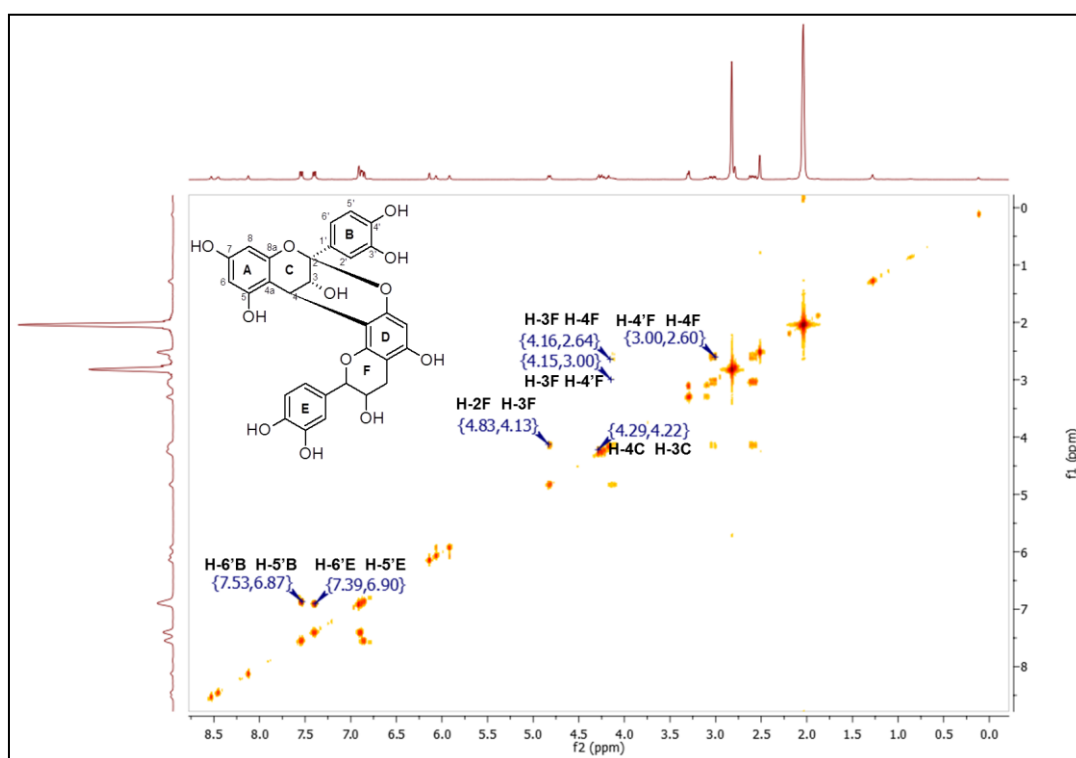


Figura 4.24. Espectro de COSY de procianidina A1 (400 MHz, acetona- d_6).

El esqueleto carbonado se dedujo de los espectros HSQC-DEPT y HMBC (Fig. 4.25 y Fig. 4.26). La señal del carbono cuaternario a δ_{C} 100,4 corroboró que se trata de una procianidina A, ya que esta señal es característica para el C-2 del anillo C (C-2C) involucrado en el enlace C2-O-C7

(Tabla 4.8) (Jacques *et al.*, 1974; Lv *et al.*, 2015). Además, se observan señales para los carbonos de los anillos A y D (150–160 ppm, 96–108 ppm), B y E (116–119 ppm, 130–133 ppm), y para C y F (20–38 ppm, 67–100 ppm), tal como lo describe Lv *et al.* (2015).

En el espectro HSQC de procianidina A (Fig. 4.25) se destaca la presencia de un sólo C con $\delta_c \approx 80$ ppm, que indicaría que esta señal pertenece al C-2 del anillo F (C-2F en Tabla 4.8). La ausencia de una segunda señal con este δ_c , evidencia que la posición 2 del anillo C corresponde a un carbono cuaternario.

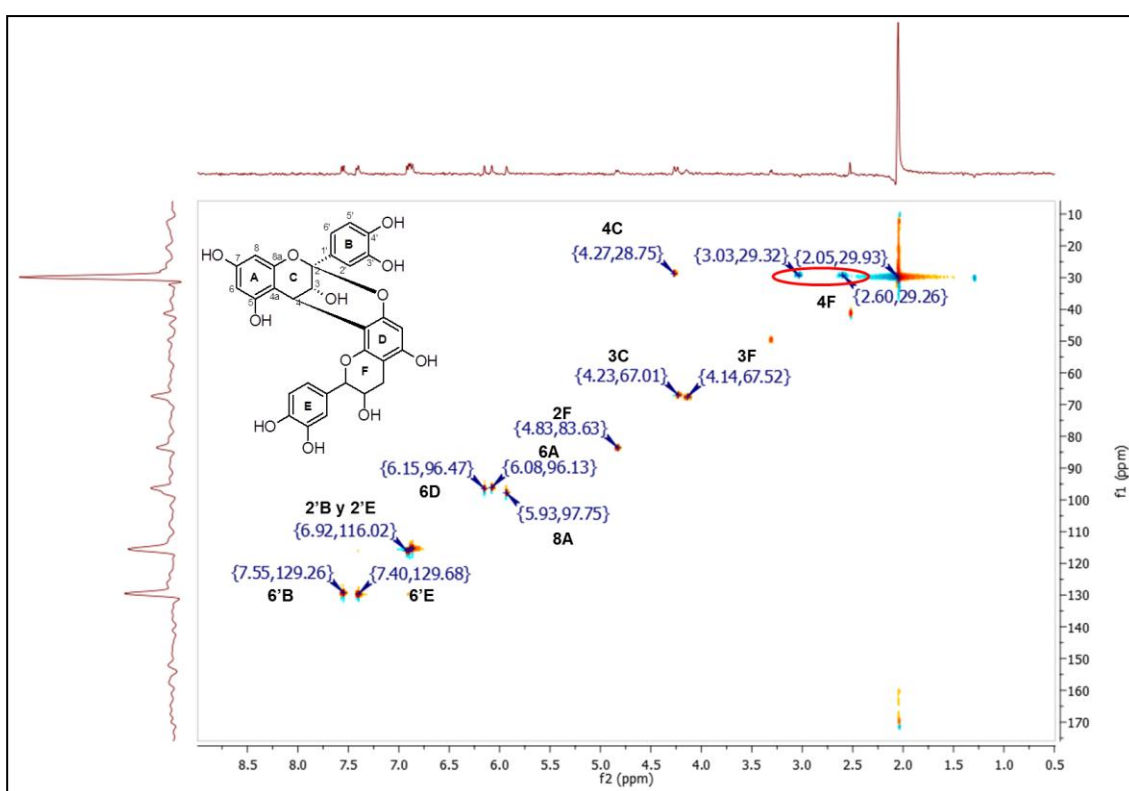


Figura 4.25. Espectro de HSQC de procianidina A1 (400 MHz y 100 MHz, acetona-d₆).

El espectro HMBC de procianidina A (Fig. 4.26) muestra que el C-2C tiene un $\delta_c = 100,4$ ppm, asignado por las correlaciones H-4C/C-2C y H-6'B/C-2C. Esta información, junto a la señal a $\delta_c = 152,3$ ppm asignada al carbono 7D, confirman el enlace carbono 2C y el oxígeno de la posición 7D; lo que corrobora la vinculación tipo A de esta procianidina (Lv *et al.*, 2015).

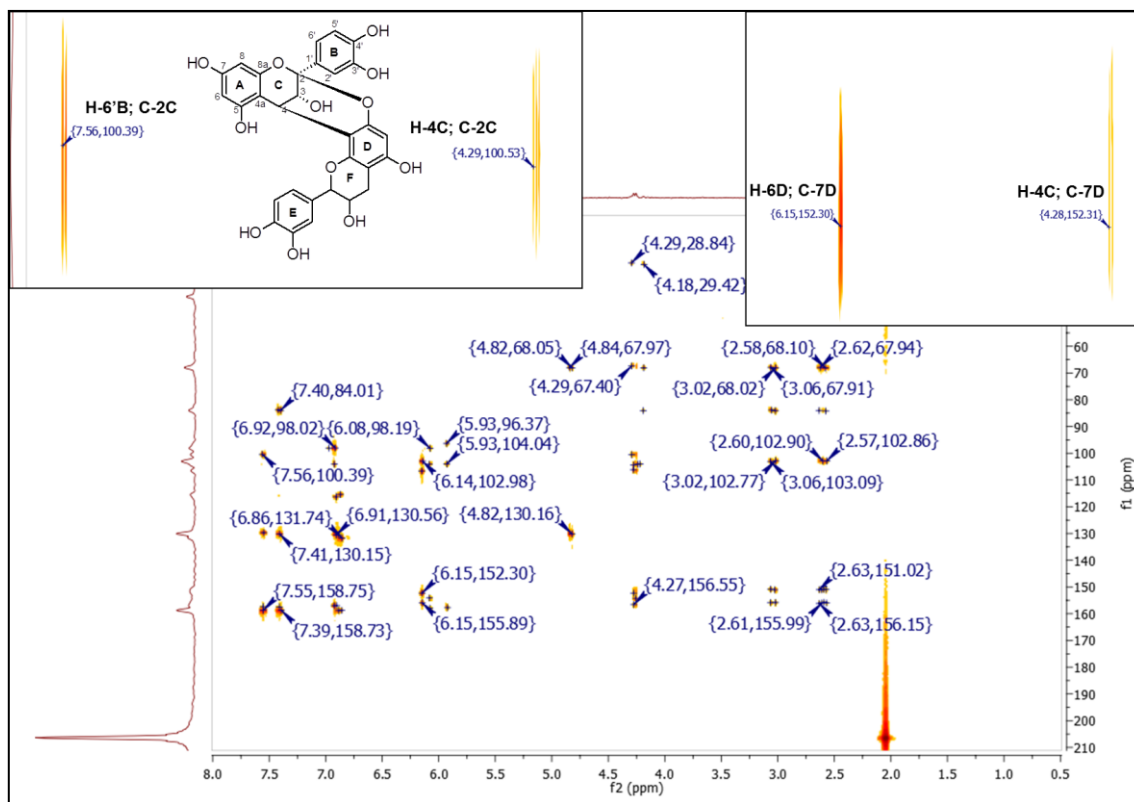


Figura 4.26. Espectro de HMBC de procianidina A1 (400 MHz y 100 MHz, acetona-d₆).

Para establecer si se trata de procianidina A1 [epicatequina-(2-O-7;4-8)-catequina] o procianidina A2 (epicatequina-(2-O-7;4-8)-epicatequina), se puede determinar la estereoquímica del enlace C2-C3 de ambos monómeros: *trans* para (+)-catequina y *cis* para (-)-epicatequina (Appeldoorn *et al.* 2009; Santo Buelgas *et al.*, 2000). En general, la estereoquímica en posición 2-3 es usualmente deducida por la constante de acoplamiento del H-2 (Balas *et al.*, 1995). Un valor grande entre 8-10 Hz para J_{H-2} indica una unidad de catequina (2,3-*trans*); mientras que un valor pequeño de 2 Hz o un singlete ancho, indican una unidad de epicatequina (2,3-*cis*) (Balas *et al.*, 1995; Appeldoorn *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015). De similar manera, si el protón H-4 resuena como un doblete con J grande, se concluye que la estereoquímica 3,4 es *trans*; mientras que la observación de un singlete ancho, no permite determinar la estereoquímica (Balas *et al.*, 1995).

Las constantes de acoplamiento observados para el compuesto obtenido, J_{H2} del anillo F (8,0 Hz, Tabla 4.8), indican la presencia de una unidad catequina como monómero inferior, siendo necesario corroborar la unidad

superior como epicatequina (Wang et al 2015). Por su parte, la J_{H3-H4} ($\approx 4,6$ Hz, Tabla 4.8) indicaría estereoquímica 3-4 *trans*, siendo muy probable la estereoquímica 3-2 *cis* por el impedimento estérico con la unión C2-O-C7; por tanto, se podría deducir una unidad (-)-epicatequina como monómero superior. Al comparar los datos espectroscópicos de RMN- 1H y ^{13}C con los informados en bibliografía, se concluye que son coincidentes con los informados para procianidina A1 (Fig. 4.22) (Wang et al., 2015).

En la Tabla 4.8 se muestra la asignación de cada uno de los átomos pertenecientes a procianidina A1 (Fig. 4.27), mediante el análisis de RMN.

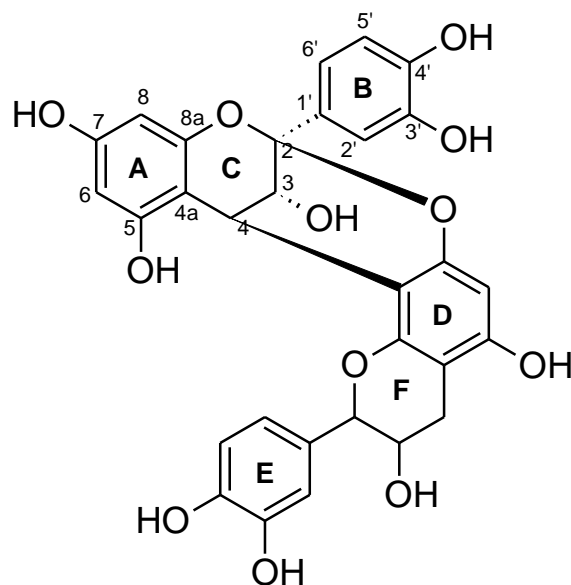


Figura 4.27. Estructura molecular de procianidina A1.

Tabla 4.8. Datos de RMN-¹H y ¹³C y correlaciones COSY y HMBC para procianidina A1.

Posición	δ_c , tipo	δ_H , mult., (<i>J</i> en Hz)	COSY ^a	HMBC ^b
2C	100,4; C	-	-	-
3C	67,0; CH	4,22; d (<i>J</i> = 4,4)	4C	4aA; 8D
4C	28,8; CH	4,28; d (<i>J</i> = 4,7)	3C	4aA; 2C; 8D
4aA	104,0; C	-	-	-
5A	157,9; C	-	-	-
6A	96,2; CH	6,07; d (<i>J</i> = 2,3)		8A; 4aA; 5A; 7A
7A	154,1; C	-	-	-
8A	97,8; CH	5,92; d (<i>J</i> = 2,4)		8A; 4aA; 7A
8aA	157,7; C	-	-	-
1'B	129,7; C	-	-	-
2'B	116,0; CH	6;92; d (<i>J</i> = 1,7)	-	1'B; 3'B
3'B	156,90	-	-	-
4'B	158,8; C	-	-	-
5'B	115,4; CH	6,87 d (<i>J</i> = 8,8)	6'B	6'B; 4'B
6'B	129,3; CH	7,54 d (<i>J</i> = 8,8)	5'B	2C; 1'B; 4'B
2F	83,6; CH	4,83; d (<i>J</i> = 8,0)	3F	3F; 1'E; 4F
3F	67,5; CH	4,14; m	2F; 4F	2F; 4F
4F	29,4; CH	2,60; dd (<i>J</i> = 8,9; 16,3)	3F	3F; 4aD
4'F	29,4; CH	3,04; dd (<i>J</i> = 5,3; 16,3)	3F	3F; 4aD
4aD	102,9; C	-	-	-
5D	155,9; C	-	-	-
6D	96,5; CH	6,14; s	-	4aD; 5D; 7D; 8D
7D	152,3; C	-	-	-
8D	106,6; C	-	-	-
8aD	156,6; C	-	-	-
1'E	130,6; C	-	-	-
2'E	116,0; C	6;92; d (<i>J</i> = 1,7)	-	1'E; 3'E
3'E	156,9; C	-	-	-
4'E	158,8; C	-	-	-
5'E	116,0; CH	6,90; d (<i>J</i> = 8,6)	6'E	6'E; 4'E; 3'E; 1'E
6'E	129,7; CH	7,40; d (<i>J</i> = 8,5)	5'E	1'E; 2C; 4'E

Espectros realizados en acetona-*d*₆.

^aCOSY corresponde a las correlaciones de protones con los protones indicados.

^bHMBC corresponde a la correlación del protón asignado a los carbonos indicados.

La masa obtenida del compuesto A/Op sólo fue suficiente para evaluar la actividad antiviral, realizar análisis por espectrofotometría UV-Vis y espectroscopía RMN. Será necesario optimizar el protocolo de purificación, a fin de mejorar el rendimiento de obtención. De modo que se pueda confirmar la elucidación estructural de esta procianidina A1, específicamente en cuanto a determinar su masa exacta y la configuración absoluta mediante Dicroísmo circular; incluyendo además, profundizar los estudios de actividad antiherpética.

Tal como lo informaron algunos autores (Xu *et al.*, 2010; Terlizzi *et al.*, 2016) esta clase de compuestos exhiben actividad antiherpética.

I-8- Procesamiento del extracto de ButOH-AcOEt

I-8.1- Purificación del compuesto mayoritario: A1

Este extracto se seleccionó por presentar mayor actividad citotóxica, con el objetivo de aislar Aqs bioactivas. Una alícuota (12,18 mg) se sometió a una CCol, eluída con un gradiente de *n*-hexano (*n*-hex) y AcOEt (100, 95:5 y 90:10). La elución de la columna se siguió por TLC, usando como FM *n*-hex-AcOEt-HFo (75-25-1). El revelado con luz UV y vapores de NH₃ permitió agrupar las alícuotas de elución en 3 fracciones: A-C.

La fracción B se diferenció de las otras por poseer compuestos que al ser revelados con vapores de NH₃, cambiaban a color naranja-rojizo, lo cual indica la presencia de derivados antraquinónicos (Bladt y Zgainski *et al.*, 1984). Así, a partir de esta fracción, se purificó un compuesto amarillo mayoritario (A1 = 0,52 mg) por TLCp en *n*-hex-AcOEt (90-10), con un rendimiento de 4,25 %.

La pureza de A1 (Fig. 4.28) se estimó en un 90 ± 0,3 %, mediante HPLC-UV-Vis, condición 1 de elución de FM (I-6-Materiales y Métodos).

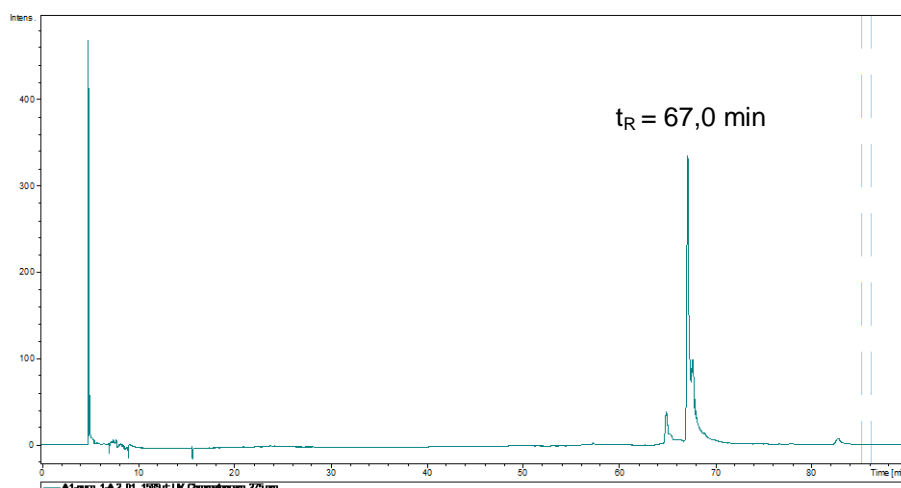


Figura 4.28. Cromatograma de A1 en HPLC-UV.

En TLC analítica, este compuesto se visualizó como una mancha amarilla en el visible y naranja bajo luz UV que se intensificó con los vapores de NH₃, con un valor de R_f = 0,92 en *n*-hex-AcOEt-HFo (75-25-1).

La reacción de Bornträger fue positiva para este compuesto (Bladt S. y Zgainski *et al.*, 1984; Inoue *et al.*, 1963), lo cual permitió estimar que se trataría de un derivado antraquinónico.

I-8.2- Elucidación estructural del compuesto A1: 2-isobutil éster de munjistina

Para dilucidar la identidad del compuesto A1 se realizó espectroscopía RMN (mono y bidimensional), HRMS, completando su caracterización físico-química con espectrofotometría UV-Vis y determinación de su punto de fusión e índice rotación específica.

A1 se obtuvo en forma de agujas amarillas con un $[\alpha]_D^{20} = +4,26$ y punto de fusión = 173-176 °C.

El espectro de UV-Vis en EtOH (Fig. 4.29), muestra una banda a 415 nm, característica para grupos hidroxilos (OH) fenólicos en posición *peri* al grupo carbonilo (C=O) (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

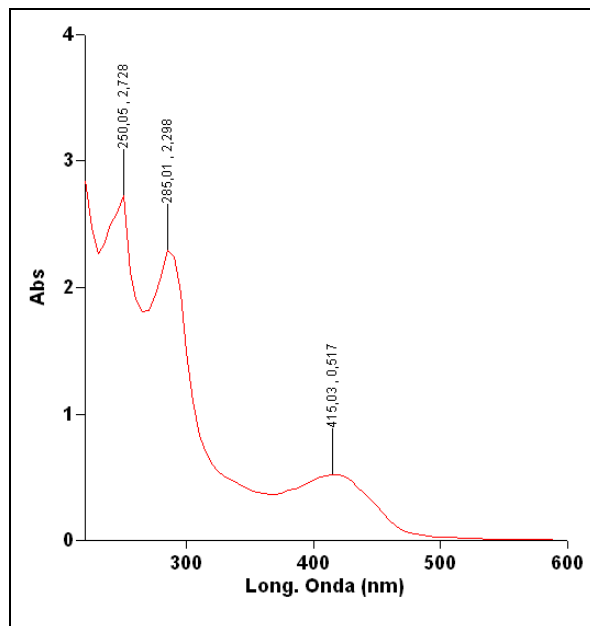


Figura 4.29. Espectro UV-Vis del compuesto A1 en metanol.

El análisis de HRMS determinó la presencia del ión molecular $[M-H]^-$ con m/z de 339,0855, correspondiente a la fórmula molecular $C_{19}H_{16}O_6$ (calculado 339,0863) (Fig. 4.30).

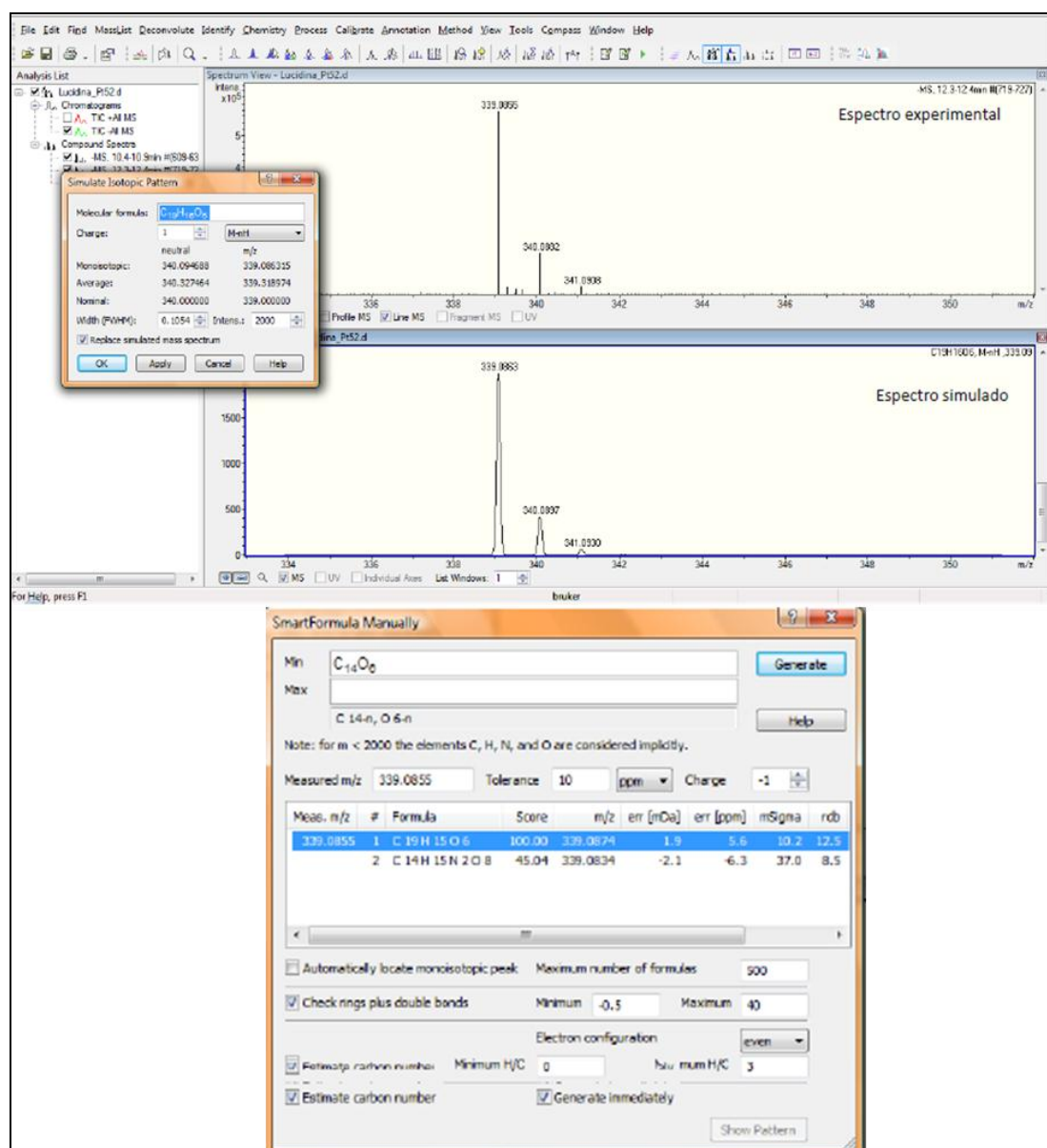


Figura 4.30. Espectro de masa de alta resolución del compuesto A1.

El espectro de RMN-¹H (Fig. 4.31) muestra señales (7,29-8,35 ppm) para 5 protones aromáticos en posición 4, 5, 6, 7 y 8, sugiriendo una AQ trisustituida. Dos singletes con corrimiento químico (δ_H) 14,26 y 12,12 indican la presencia de 2 grupos -OH, y considerando el patrón de sustitución se deduce que sólo uno de ellos se encuentra en posición *peri* al grupo C=O y el otro es un -OH libre (Wijnsma y Verpoorte, 1986). Ambas señales aparecen en campos más bajos que lo esperado, lo que indica que hay un entorno químico que produce el desapantallamiento de los protones de estos grupos -OH. Esto puede deberse a un grupo electronegativo adyacente a ambos -OH, por lo tanto es posible que ese grupo se encuentre en posición -2.

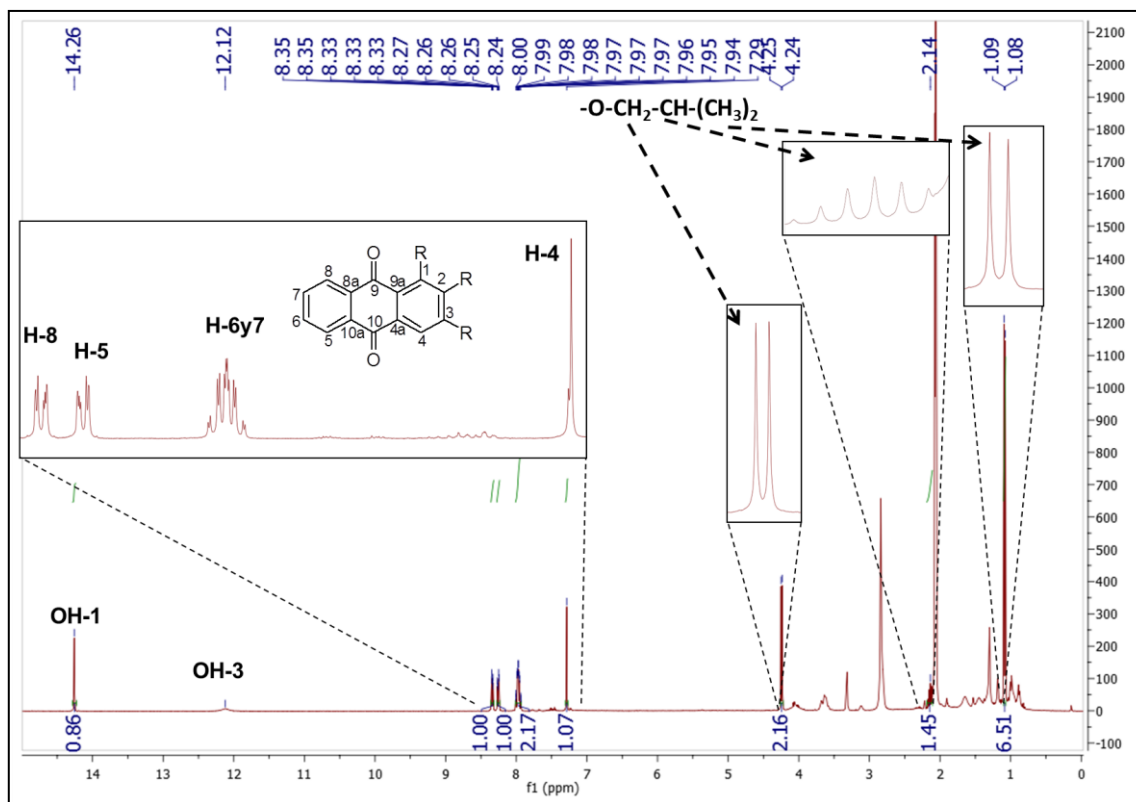


Figura 4.31. Espectro de RMN- ^1H del compuesto A1 (400 MHz, acetona- d_6).

Las otras señales observadas en el espectro de protones (Tabla 4.9), muestran la presencia de un grupo isobutilo [$-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$]: un doblete a δ_{H} 4,24 ($J = 4$ Hz) perteneciente a un grupo metilo ($-\text{CH}_2$), un multiplete a δ_{H} 2,14 para un metileno ($-\text{CH}$), y finalmente un doblete a δ_{H} 1,09 ($J = 4$ Hz) que integra para 6 protones correspondiente a un grupo *gem*-dimetilo (*gem*- diCH_3). El desplazamiento del $-\text{CH}_2$ a campos bajos indica que este metilo se encuentra unido a un átomo electronegativo, como ser oxígeno (Pretsch *et al.*, 2005). La secuencia $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ se confirmó por las correlaciones entre H-2'/H-3', H-3'/*gem*- diCH_3 del espectro COSY Fig. 4.32 (Tabla 4.9). Las otras correlaciones H-H corroboran la posición de los 5 protones aromáticos.

El esqueleto carbonado se dedujo de los espectros HSQC-DEPT y HMBC (Fig. 4.33 y Fig. 4.34). Dos señales correspondientes a carbonilos a δ_{C} 181,4 (C-10) y 187,0 (C-9) confirman el OH-libre y el OH-*peri* respectivamente, este último -OH causa un desplazamiento paramagnético en la señal del C-9 (ca. 5 ppm) debido a la generación de un puente hidrógeno (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

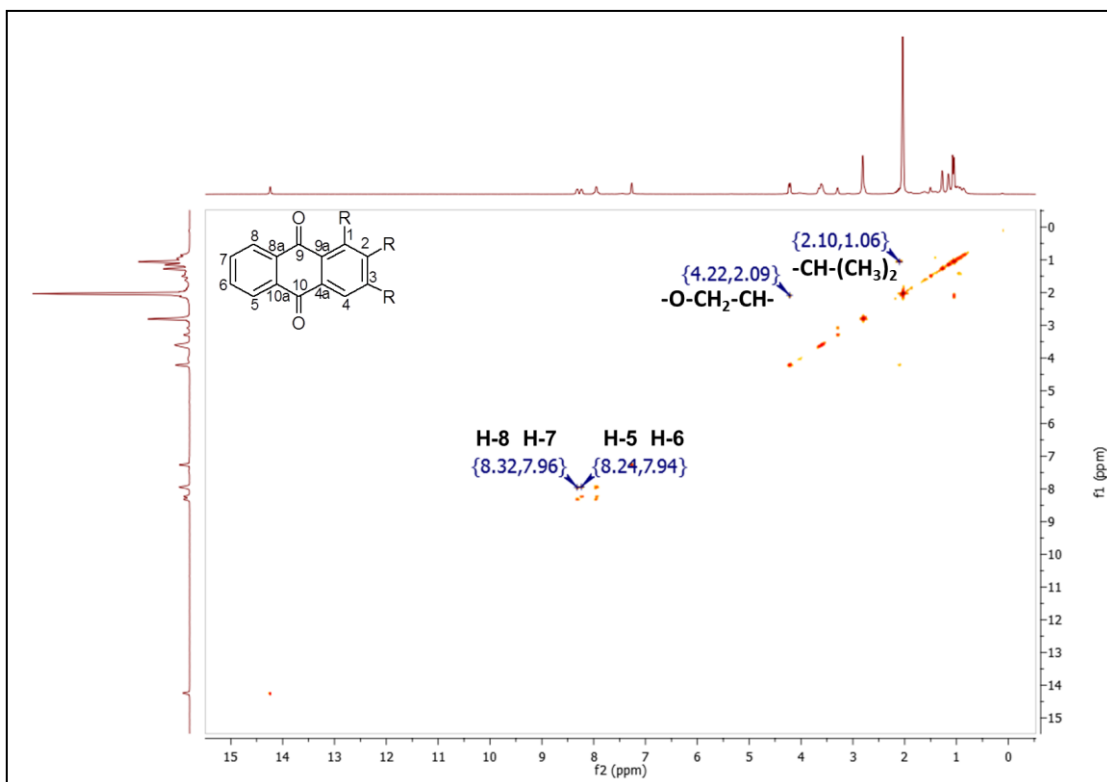


Figura 4.32. Espectro COSY del compuesto A1 (400 MHz, acetona-d₆).

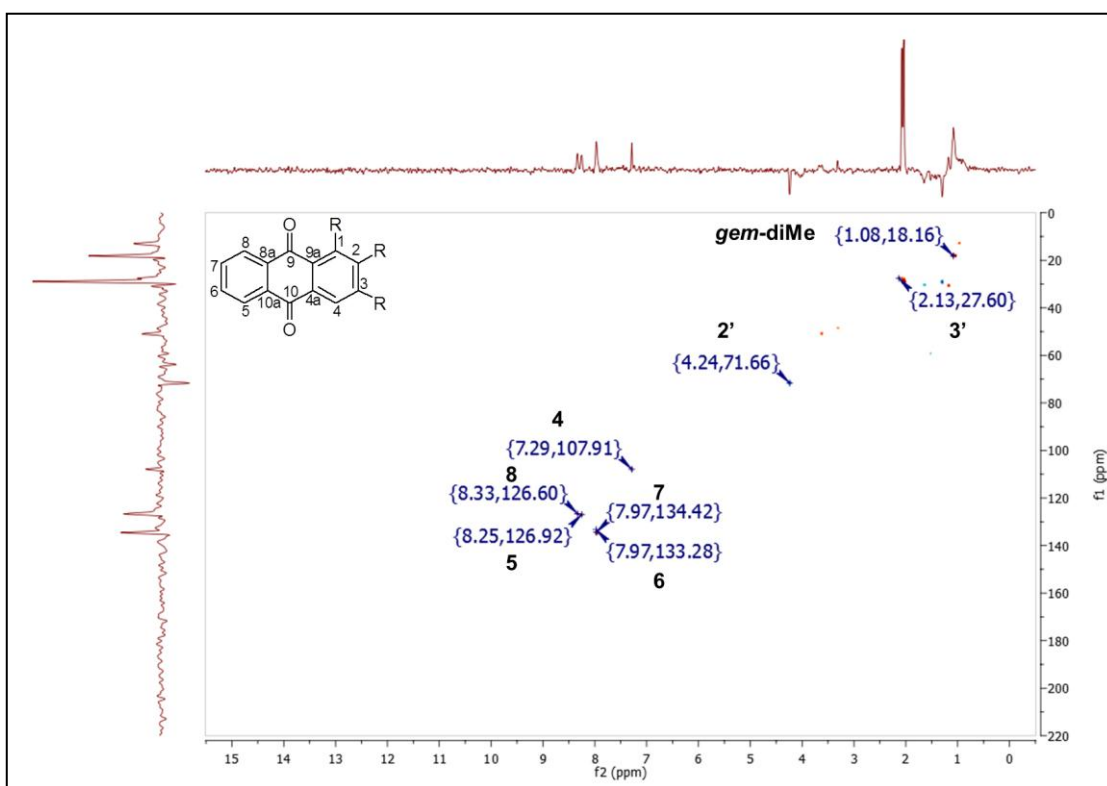


Figura 4.33. Espectro HSQC-DEPT del compuesto A1 (400 MHz y 100 MHz, acetona-d₆).

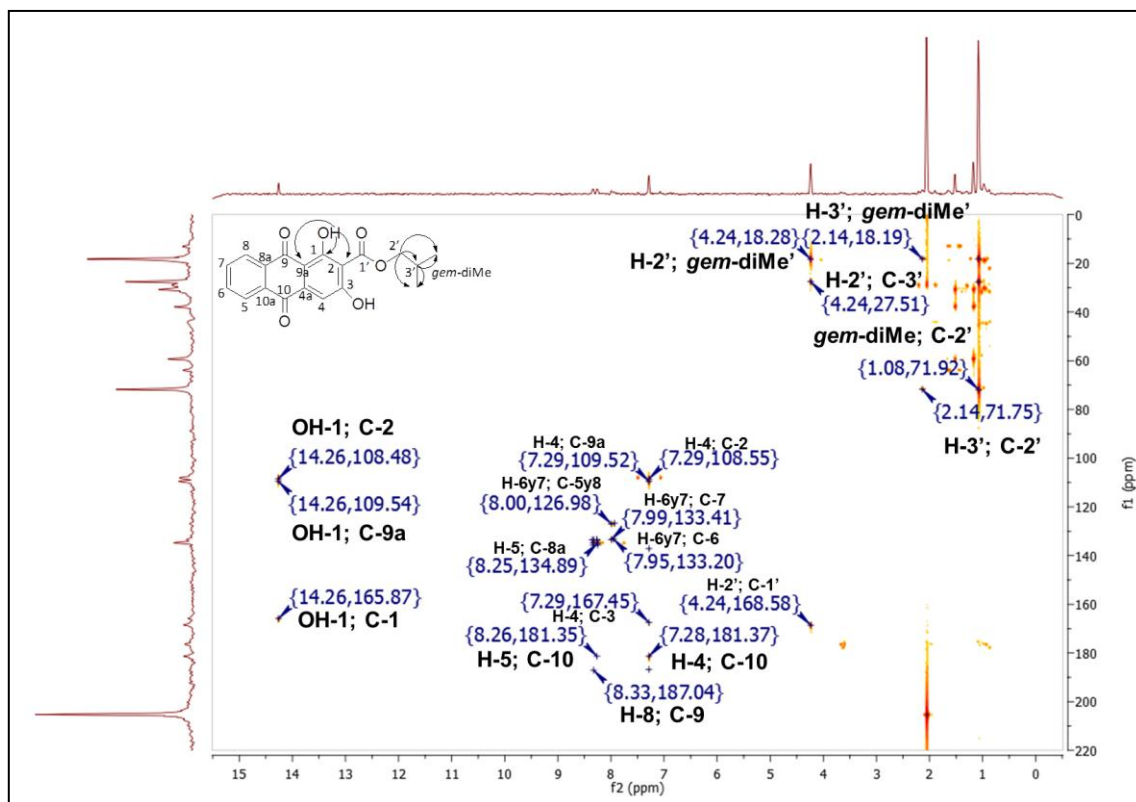


Figura 4.34. Espectro HMBC del compuesto A1 (400 MHz y 100 MHz, acetona-d₆).

La señal a δ_c 168,7 confirma el grupo carboxílico (-COO) y la señal δ_c a 71,7 indica que el 2'-CH₂ se encuentra adyacente a un grupo C=O, ya que el desplazamiento químico es característico para este tipo de uniones (COO-CH₂) (Pretsch *et al.*, 2005). Por lo tanto, se estableció que el sustituyente en posición 2 es un grupo carboxi-isobutílico [-COO-CH₂-CH-(CH₃)₂]. La localización de este sustituyente en posición -2 también explica el desplazamiento químico de los 2 grupos -OH fenólicos (*peri*-OH y 3-OH) a campos más bajos tal como fue reportado por Banthorpe y White (1995). Fig. 4.35 muestra las principales correlaciones C-H, obtenidas del espectro HMBC.

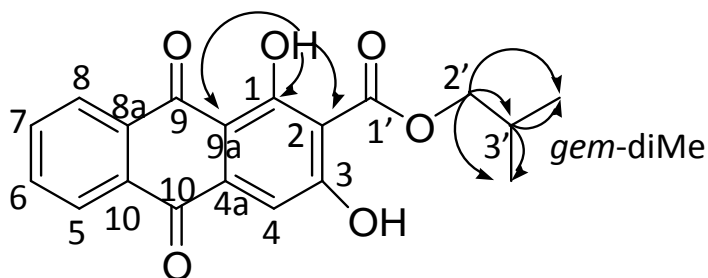


Figura 4.35. Principales correlaciones entre C y H obtenidas del espectro HMBC del compuesto A1.

Tabla 4.9. Datos de RMN-¹H y -¹³C y correlaciones COSY y HMBC para 2-carboxiisobutil-1,3-dihidroxi antraquinona.

Posición	δ_c , tipo	δ_H , mult., (J en Hz)	COSY ^b	HMBC ^a
1	165,9; C	-	-	-
2	108,5; C	-	-	-
3	167,5; C	-	-	-
4	107,9; CH	7,29; s	-	2; 3; 4a; 9; 9a; 10
4a	137,1; C	-	-	-
5	126,9; CH	8,26; dd ($J_o = 6,7$; $J_m = 2,5$; $J_p = 1,2$)	6	6; 7; 8a; 10; 10a
6	133,3; CH	7,97; m	5; 7	5; 6; 7; 8
7	134,4; CH	7,97; m	6; 8	5; 6; 7; 8
8	126,6; CH	8,34; dd ($J_o = 6,7$; $J_m = 2,5$; $J_p = 1,2$)	7	6; 7; 8a; 9; 10a
8a	134,9; C	-	-	-
9	187,0; C	-	-	-
9a	109,5; C	-	-	-
10	181,4; C	-	-	-
10a	135,6; C	-	-	-
1-OH	-	14,26; s	-	1; 2; 9a
1'	168,6; C	-	-	-
2'	71,7; CH ₂	4,24; d ($J_o = 4$)	3'	1'; 3'; gem-diMe
3'	27,6; CH	2,14; m	2', gem-diMe	2'; gem-diMe
gem-diMe	18,2; CH ₃	1,09; d ($J = 4$)	3'	2'; 3'; gem-diMe
3-OH	-	12,12; br	-	-

Realizado en Acetona-*d*₆.^aHMBC corresponde a la correlación del protón asignado a los carbonos indicados.^bCOSY corresponde a las correlaciones de protones con los protones indicados.

Además, a partir del HRMS (Fig. 4.36) se confirmó la presencia del grupo COO-CH₂-CH-(CH₃)₂ a través de los siguientes rompimientos: 283,2614 [M - CH₂-CH-(CH₃)₂]⁻ y 265,0139 [M-1 - HOCH₂CH(CH₃)₂]⁻ (100).

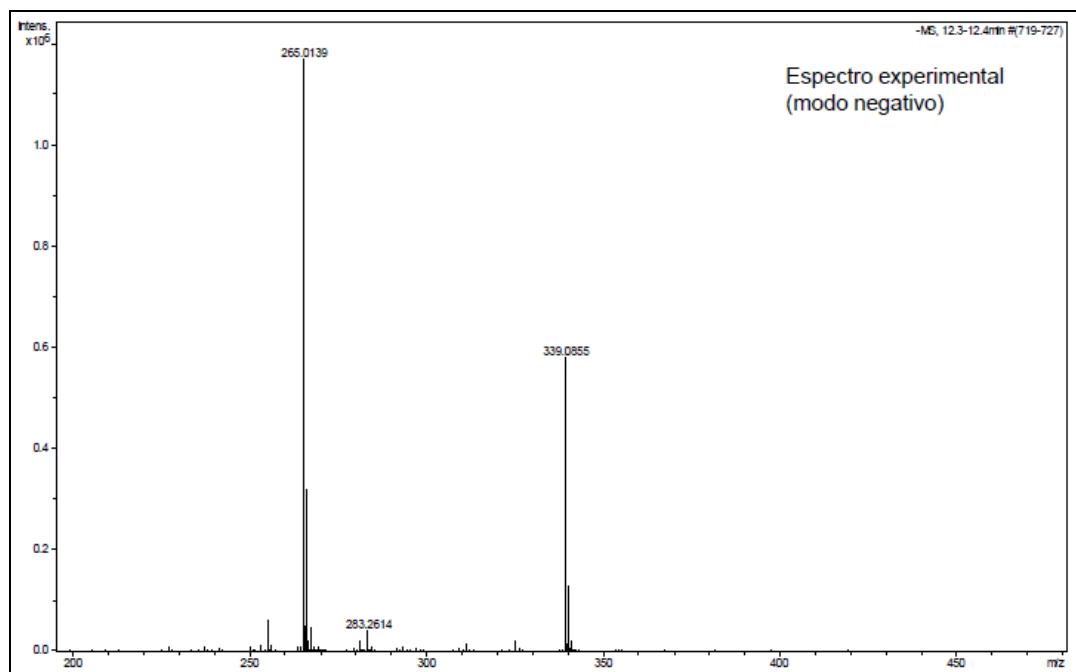


Figura 4.36. Espectro de masa de alta resolución del compuesto A1, principales rompimientos MS^n .

A partir del análisis de estos datos, la estructura química se elucidó como: 2-carboxi-isobutil-1,3-dihidroxi antraquinona o 2-isobutil éster de munjistina (**Im**) (Fig. 4.35), un nuevo derivado antraquinónico.

La Tabla 4.10 muestra los datos obtenidos por HPLC-DAD-ESI-QTOF para esta AQ, la cual también se identificó en el extracto de AcOEt obtenido de raíces de *G. latoramosum* por esta metodología (I-2.2-Materiales y métodos).

Tabla 4.10. Identificación de 2-isobutil éster de munjistina en el extracto de AcOEt, obtenido de las raíces de *G.latoramosum*, mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF.

2-isobutil éster de munjistina	[M-1] (m/z)	t_R (min)	Fragmentos MS^n	UV-Vis (nm)
AQ pura	339,0860	67,1 ± 0,3	265; 237	250; 285; 415
AQ en extracto AcOEt	339,0875	67,4 ± 0,3	265	278; 416

La identificación de esta AQ en el extracto AcOEt, se corroboró por comparación de los datos experimentales con los teóricos calculados por el programa Brucker Daltonics 4.1 (Fig. 4.37). De este modo, se confirmó que este compuesto está presente en las raíces de esta especie vegetal y no es afectado por procesos de purificación.

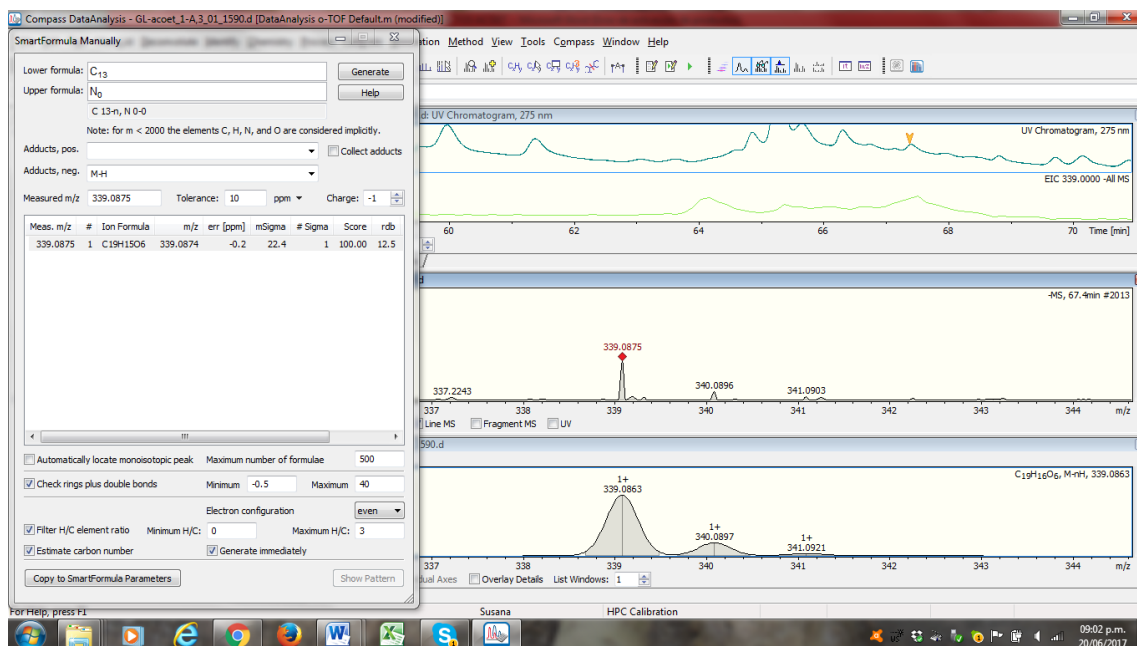


Figura 4.37. Correlación de los datos experimentales de 2-isobutil éster de munjistina obtenidos por HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF con los teóricos calculados por el programa Brucker Daltonics 4.1, en presencia de calibrante formiato de sodio.

Además, se destaca que en ningún extracto se pudo identificar la presencia de munjistina, mediante la búsqueda del pico $[M-1] = 283$ m/z. Esto descarta la posibilidad que sea un derivado de munjistina (Fig. 4.38) producido durante el proceso de purificación.

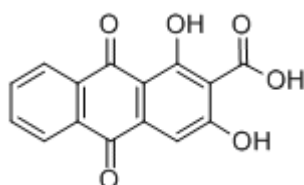


Figura 4.38. Estructura molecular de munjistina.

I-9- Estudios de actividad biológica de 2-isobutil éster de munjistina

I-9.1- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

A partir de las curvas de porcentaje de VC en función de concentración de **Im** sobre células Vero (Fig. 4.39), obtenidas por el ensayo de captación de RN (II-2.1-B-Materiales y Métodos), se estimaron las concentraciones citotóxicas y no citotóxicas de esta AQ sobre las células hospedadoras de virus (Tabla 4.11).

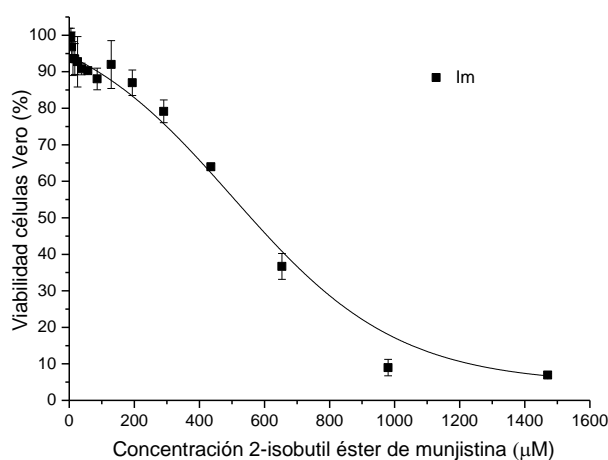


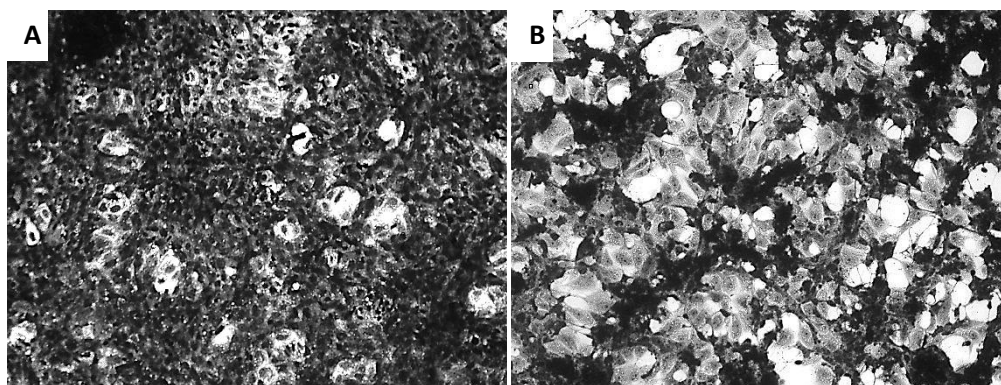
Figura 4.39. Curvas de porcentaje de viabilidad de células Vero vs concentración de 2-isobutil éster de munjistina (**Im**).

Tabla 4.11. Valores de CC₅₀, CSubT y MCNC para 2-isobutil éster de munjistina.

AQ	Línea celular Vero		
	CC ₅₀ (μM)	CSubT (μM)	MCNC (μM)
2-isobutil éster de munjistina	529,5 ± 23,6	258,1 ± 4,6	122,0 ± 9,6

CC₅₀: Concentración citotóxica al 50 %, CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

En la Fig 4.40 se observa el ECP (II-2.1-A-Materiales y Métodos) causado por **Im** a su CC₅₀ comparado con el control de células.



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.40. Efecto citopático de 2-isobutil éster de munjistina (**Im**) en células Vero. **(A)** Control celular. **(B)** Monocapa celular tratada con **Im** a su CC_{50} (529,5 μ M)

I-9.2- Evaluación de la actividad antiviral *in vitro*

I-9.2-A- Valoración de la actividad antiviral general

Debido a que se evaluaba una AQ pura, se decidió estudiar la actividad antiviral frente a los tres modelos virales usados (HSV-1, WNV y VEEV), mediante la metodología descrita en II-2.3-A del capítulo Materiales y Métodos.

Tal como se observa en la Fig. 4.41, **Im** solo inhibió el efecto del HSV-1.

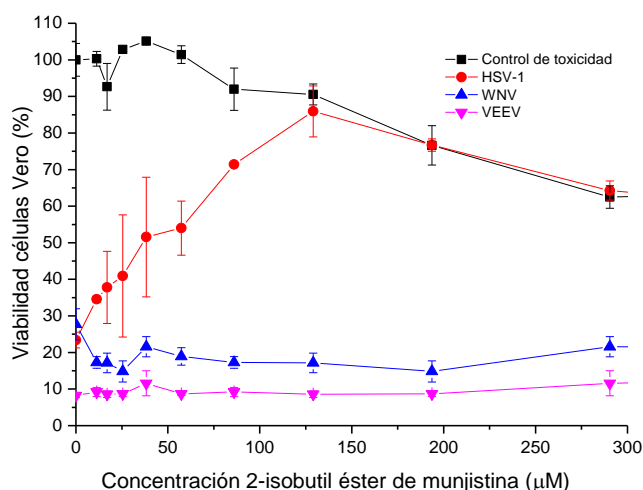
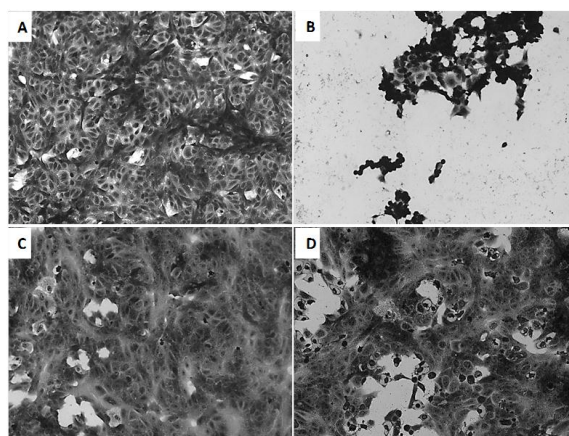


Figura 4.41. Actividad antiviral *in vitro* de 2-isobutil éster de munjistina sobre células Vero infectadas con virus.

HSV-1: (virus Herpes Simple Tipo 1), WNV (virus West Nile), VEEV (virus Encephalitis Equino Venezolana). Control celular (ordenada al origen del control de toxicidad). Control viral (ordenada al origen de cada tratamiento).

Esta inhibición también puede ser observada en la Fig. 4.42, donde el ECP viral en el tratamiento (Fig. 4.42.D) se encuentra reducido comparado a su respectivo CV (células afectadas por el HSV-1 y sin tratar, Fig. 4.42.B).



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.42. Efecto citopático causado por HSV-1 en células Vero. **(A)** Control celular: no infectadas y sin tratar. **(B)** Control viral: células infectadas y sin tratar. **(C)** Control de toxicidad: células no infectadas y tratadas con 2-isobutil éster de munjistina (**Im**) a la MCNC (122,0 μM) y **(D)** Tratamiento: células infectadas y tratadas con **Im** a la MCNC.

A través de la elaboración de una curva de inhibición del HSV-1 a distintas concentraciones de **Im** (Fig. 4.43), se determinaron los % I a las concentraciones no citotóxicas de la AQ y el IS (Tabla 4.12). Estos datos fueron comparados con el fármaco utilizado habitualmente en la terapéutica para tratar infecciones herpéticas.

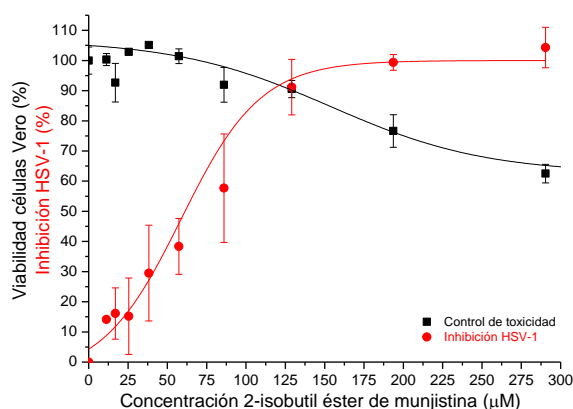


Figura 4.43. Curva de inhibición del HSV-1 y curva de citotoxicidad sobre células Vero por acción de 2-isobutil éster de munjistina.

Im logró un significativo % I del HSV-1 a su MCNC (Tabla 4.12), llegando a una inhibición del 100 % a su CSubT. Además, presenta un buen IS, ya que para productos naturales, algunos autores consideran que un IS mayor a 2 sería suficiente para convertirse en un potencial antiviral (Tsuchiya *et al.*, 1985, DeClercq, 1993).

Tabla 4.12. Porcentaje de inhibición viral (% I) e índice de selectividad (IS) de 2-isobutil éster de munjistina (**Im**) sobre HSV-1.

Actividad antiherpética	Im			Aciclovir (15,08 µM)
	CC ₅₀	CSubT	MCNC	
% I	100	98,9 ± 2,8	90,9 ± 7,5	100
IS (CC ₅₀ /CE ₅₀)	8,7	Nc	Nc	> 20

Nc: no corresponde

I-9.2-B- Determinación del momento de acción antiviral de 2-isobutil éster de munjistina sobre el HSV-1

Con el fin de profundizar el efecto antiherpético de esta AQ, se evaluó si **Im** posee efecto virucida (inactiva la partícula viral por acción directa sobre esta) o si actúa sobre diferentes etapas del ciclo de replicación del HSV-1 (Fig. 4.44). Es decir, se pretendió establecer si **Im** impide el ingreso de la partícula viral a la célula hospedadora (efecto antiviral pre-infección, impide adsorción del virus a la membrana celular), actúa durante su ingreso a la célula (efecto antiviral, impide penetración) o una vez que el virus ingreso a la célula (efecto antiviral post-infección).

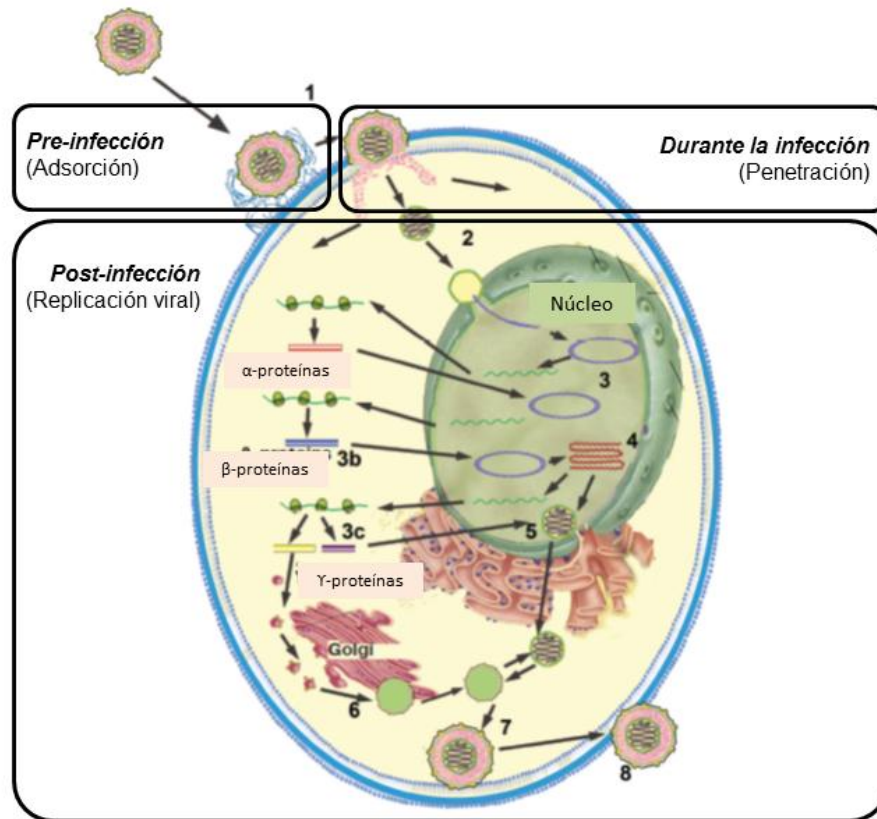


Figura 4.44. Etapas del ciclo de replicación del HSV-1 (Kukhanova *et al.*, 2014).
(Imagen adaptada).

I-9.2-B-1- Evaluación del efecto virucida de 2-isobutil éster de munjistina sobre HSV-1

Para evaluar el efecto virucida se llevó a cabo la metodología descrita en II-2.3-B-1-Materiales y Métodos.

En la Fig. 4.45, se observan las UFP producidas por las diluciones del stock viral (CV, n = 2), en comparación con las respectivas diluciones del tratamiento (HSV-1 + **Im** a su MCNC). Se observa que las diluciones -3 a -8 de los tratamientos (T) presentaron la misma cantidad de partículas virales (UFP) que su correspondiente dilución del CV. Por lo tanto, **Im** no posee efecto virucida.

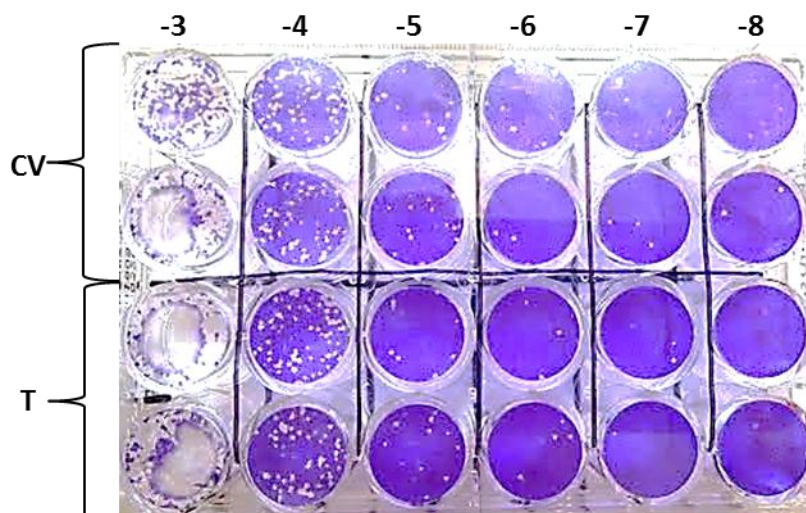


Figura 4.45. Efecto virucida *in vitro* de 2-isobutil éster de munjistina sobre HSV-1.

I-9.2-B-2- Evaluación de la actividad de 2-isobutil éster de munjistina sobre distintas etapas de la replicación del HSV-1

Se evaluó si **Im** actúa en alguna de las etapas comprendidas desde la adhesión del virus a la célula hospedadora, hasta la liberación de las nuevas partículas virales fuera de la célula. Para ello, se aplicó la metodología descrita en el punto II-2.3-B-2,3 y 4-Materiales y Métodos.

En la Fig. 4.46 se observa el CV (células infectadas no tratadas) en comparación al CC (células no infectadas ni tratadas); las células infectadas y tratadas con aciclovir (C+); las células no infectadas y tratadas con **Im** (control de toxicidad, CT) y las células infectadas y tratadas con **Im** (T).

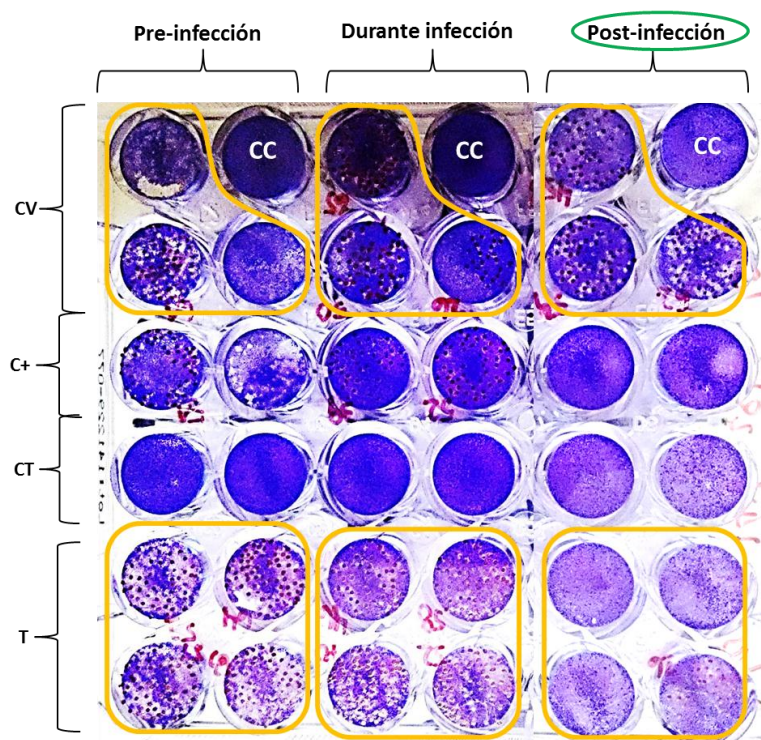


Figura 4.46. Actividad antiviral de 2-isobutil éster de munjistina a su MCNC (122,0 μM) en etapas pre, durante y post-infección con HSV-1.

Los resultados (Fig. 4.46) mostraron que en las etapas previas y durante el ingreso del virus a la célula, no hubo diferencia en el número de UFP entre los tratamientos y sus respectivos CV. Por lo tanto, **Im** no actuó en estos estadios. En cambio, en la etapa post-infección se pudo observar que el tratamiento no presentó ninguna UFP. Por lo cual, **Im** actúa en esta etapa, es decir, luego de que el virus ingreso a la célula.

I-9.2-B-3- Evaluación de la acción de 2-isobutil éster de munjistina post-infección: Etapas inmediatamente temprana, temprana y tardía post-adsorción viral

En las células de cultivo de tejidos totalmente permisivas, el proceso de replicación del virus del HSV-1 toma aproximadamente de 16 a 20 h (Knipe y Howley, 2007). Alrededor de las 2 a 4 primeras horas, se sintetizan las proteínas inmediatamente tempranas (Whitley *et al.*, 1998). Por esta razón, se decidió investigar si **Im** actúa en etapas inmediatamente tempranas (antes de 2 h de incubación), tempranas (de 2 a 4 h) y tardías post-adsorción viral

(después de 16 h) (Fig. 4.47). Para poder llevar a cabo dicho estudio, se aplicó la metodología descrita en II-2.3-B-5-Materiales y Métodos.

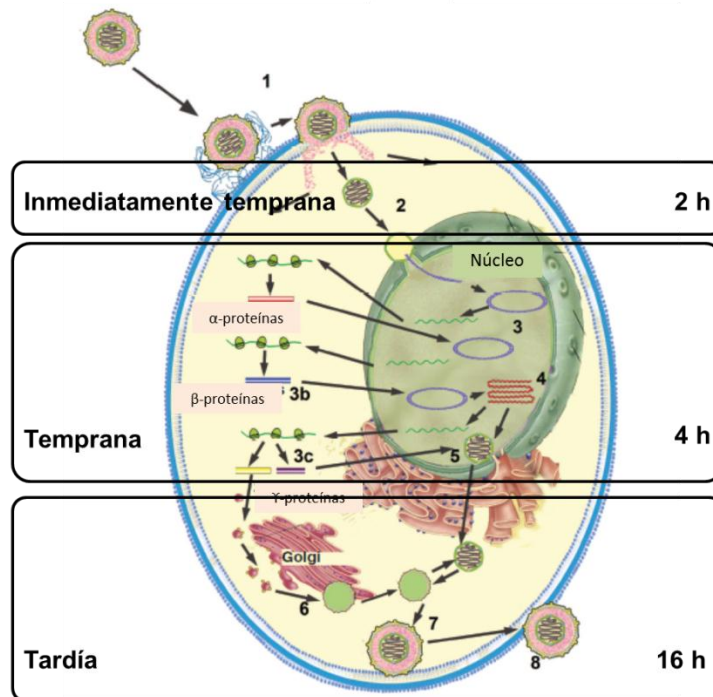


Figura 4.47. Etapas del ciclo de replicación del HSV-1 post-adsorción (Kukhanova *et al.*, 2014). Imagen modificada.

Los datos se obtuvieron por cuantificación con cristal violeta de cada uno de los pocillos, tal como se describe en el punto II-2.2-A-Materiales y Métodos. Los resultados, tal como lo muestra la Fig. 4.48, evidencian que **Im** actúa en etapas tanto inmediatamente tempranas como tempranas post-adsorción viral, mostrando similares % I de $88,40 \pm 1,17$ y $83,90 \pm 0,36$; respectivamente.

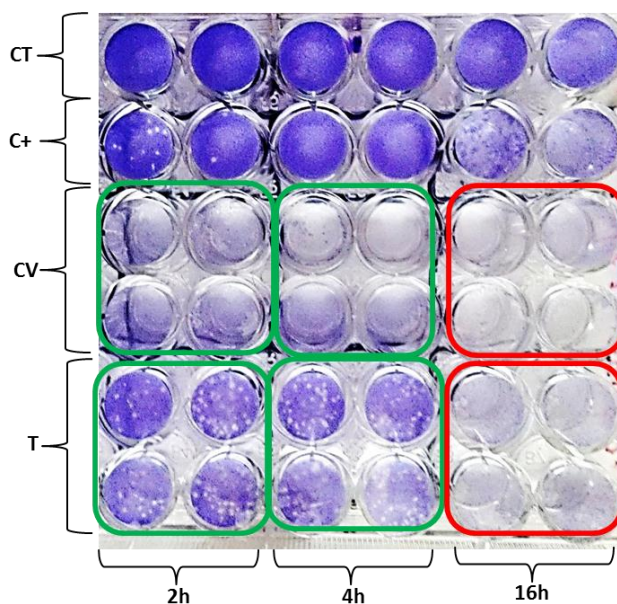


Figura 4.48. Actividad antiviral de 2-isobutil éster de munjistina a su MCNC (122,0 μ M) en etapas inmediatamente temprana (2 h), temprana (4 h) y tardía (16 h) post-adsorción del HSV-1.

CT: control de toxicidad **Im** (MCNC), C+: control positivo, aciclovir CV. control viral, T: tratamiento con **Im** (MCNC).

Para corroborar estos resultados, se decidió determinar la cantidad de partículas virales que inactivó **Im**. Para esto, se titularon los tratamientos y los CV a las 2 y 4 h, tal como se indica en II-2.3-B-5-Materiales y Métodos. Los resultados se exponen en la Fig. 4.49, donde se observa las UFP generadas por las diferentes diluciones (0 a 5) de los T y CV.

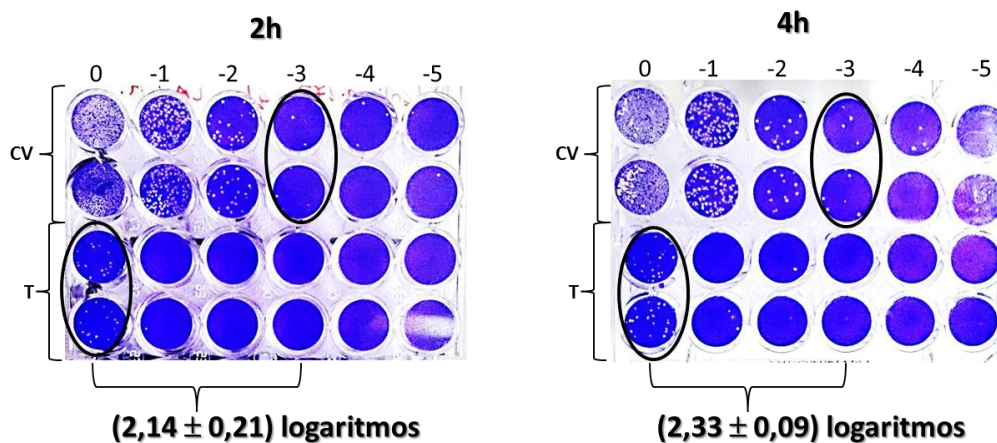


Figura 4.49. Titulación de las partículas virales de los controles virales (CV) y los tratamientos (T) del HSV-1 con 2-isobutil éster de munjistina a su MCNC (122,0 μ M) en etapas inmediatamente temprana (2 h) y temprana (4 h) post-adsorción viral.

Se identificaron las diluciones correspondientes a los CV y T que presentaron el menor número de UFP (1 UFP = 1 partícula viral). En ambas etapas, se observó que en los tratamientos hay una disminución de las partículas virales de 2 logaritmos con respecto al CV. Esto significa que aproximadamente se inactivaron el 99 % de las partículas del HSV-1 en estadios tempranos post-adsorción viral (Fig. 4.50).

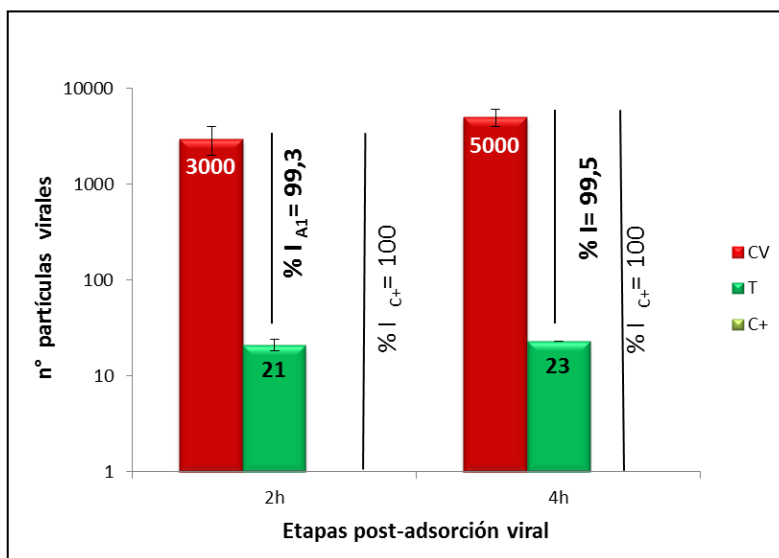


Figura 4.50. Actividad antiviral de 2-isobutil éster de munjistina a su MCNC (122,0 μ M) en etapas inmediatamente temprana (2 h) y temprana (4 h) post-adsorción del HSV-1, expresada como disminución de partículas virales.

CV. control viral. T: tratamiento y C+: control positivo, aciclovir.

Finalmente, se puede concluir que **Im** inhibe al HSV-1 luego de que éste ingresó a la célula; y principalmente durante estadios tempranos post-adsorción, entre 2 y 4 h luego de su ingreso. Estos resultados motivan a continuar profundizando los estudios antivirales de **Im**, específicamente sobre el posible mecanismo de acción anti-herpética de esta AQ, ya que los estadios tempranos post-adsorción están asociados a la síntesis y transporte de ADN, ARN o proteínas virales (Tomé *et al.*, 2007). Por lo tanto, **Im** podría estar interfiriendo en alguno de estos procesos.

I-9.3- Evaluación de otros efectos biológicos de 2-isobutil éster de munjistina: Citotoxicidad *in vitro* sobre línea celular humana de cáncer cervical

A fin de ampliar el estudio biológico de la AQ natural aislada que resultó bioactiva, **Im**, se evaluó su efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa. Esto se realizó bajo la metodología descrita en II-2.1-B-capítulo Materiales y Métodos. Los resultados se compararon con los de citotoxicidad en células mamíferas no tumorales (Vero) (Fig. 4.51).

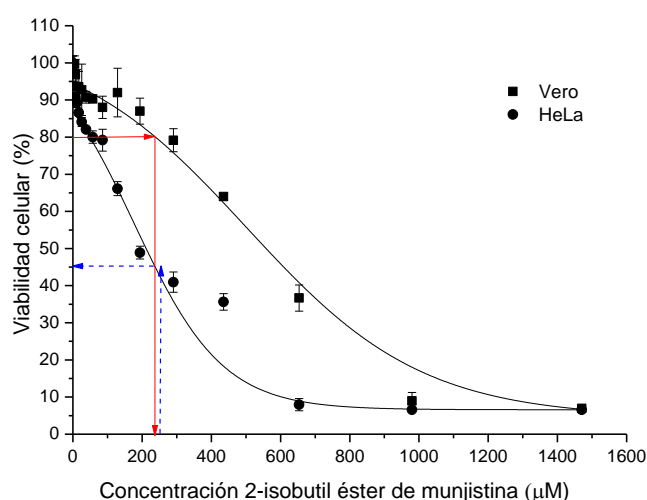


Figura 4.51. Viabilidad celular vs concentraciones de 2-isobutil éster de munjistina sobre células Vero y HeLa.

A partir de dichas curvas dosis-respuesta, se estimó la CC_{50} , la C_{SubT} y la MCNC, las cuales permitieron comparar la citotoxicidad exhibida por los compuestos sobre cada tipo celular (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Valores de CC_{50} , C_{SubT} y MCNC para 2-isobutil éster de munjistina sobre células HeLa y Vero.

Concentración (µM)	2-isobutil éster de munjistina	
	Vero	HeLa
CC₅₀	529,5 ± 23,6	240,7 ± 16,9
CSubT	258,1 ± 4,6	71,5 ± 4,2
MCNC	122,0 ± 9,6	12,8 ± 5,0

CC₅₀: Concentración citotóxica al 50 %, CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

Im logró disminuir la viabilidad de las células de cáncer cervical al $45,0 \pm 1,7$ % a concentraciones levemente tóxicas en células epiteliales no tumorales (CSubT_{vero}). Por esta razón, **Im** sería un buen candidato para continuar sus estudios como posible agente para el tratamiento de tumores causados por el HPV-18.

I-10- Discusión de resultados obtenidos para *G. latoramosum*

La especie *G. latoramosum* no evidenció actividad antiviral frente a los virus de genoma ARN ensayados en este trabajo: VEEV y WNV. Sin embargo, mostró efecto sobre el HSV-1, un virus con genoma ADN (Fig. 4.3 y Tabla 4.2).

Mediante el análisis HPLC-DAD-ESI-QTOF de los extractos, se estableció que la AQ mayoritaria es lucidina primeverósido (Fig. 4.5). Una AQ glicosilada muy poco citotóxica sobre células Vero (Fig. 4.11) que no posee actividad sobre los virus estudiados (Fig 4.13). Por lo cual, no se puede atribuir como responsable del efecto antiherpético exhibido por los extractos.

Siguiendo con el estudio del extracto con mayor efecto antiherpético (AcOEt), se llevó a cabo una purificación bioguiada por esta actividad biológica. Así se logró obtener un compuesto que se reveló en TLC como A/Op, el cual demostró inhibir las partículas del HSV-1 en un 100 % (Fig. 4.20). La purificación de este compuesto tuvo bajo rendimiento, aproximadamente menor al 5 %. Debido a esto, la masa obtenida de este compuesto sólo alcanzó para realizar su caracterización mediante R_f en diferentes FM (Tabla 4.7), espectrofotometría UV-Vis (Fig. 4.21) y RMN (Tabla 4.8). A partir del análisis de sus datos espectroscópicos, este metabolito secundario se identificó como procianidina A1. Sin embargo es necesario obtener mayor cantidad para poder establecer la configuración absoluta de este compuesto.

El principal inconveniente que se presentó en el estudio de *G. latoramosum*, fue el proceso de purificación de sus pigmentos, a fin de obtener la masa necesaria para realizar los estudios espectroscópicos indispensables para su elucidación estructural. Se observó que los pigmentos quedaban retenidos en la FE (sílica gel). Incluso se probaron otros tipos de cromatografía,

como la cromatografía de exclusión (FE: geles filtrantes), pero en estas condiciones no hubo buena resolución.

Simultáneamente, se realizó el estudio químico del extracto que presentó mayor citotoxicidad sobre células Vero: ButOH-AcOEt. Esta decisión se tomó sobre la base que regulando la dosis, un compuesto tóxico puede ser beneficioso ejerciendo un efecto terapéutico, específicamente como potencial agente antimicrobiano o antitumoral (Harborne *et al.*, 1996; Towers and Hudson, 1987). Así, el estudio químico del extracto bioactivo ButOH-AcOEt, permitió la purificación e identificación de 2-isobutil éster de munjistina (**Im**), una AQ informada por primera vez para esta familia de compuestos naturales. Mediante el análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF de los extractos, se pudo determinar que se trata de un metabolito secundario de esta especie vegetal y no un producto generado en el proceso de aislamiento y purificación, ya que se detectó en otro extracto (AcOEt) (Tabla 4.10) y no se pudo establecer la presencia de munjistina.

Esta nueva AQ, **Im**, resultó activa contra el HSV-1, consiguiendo un $90,9 \pm 7,5$ % I a su MCNC y logrando una inhibición del 100 % a su CSubT (Tabla 4.12).

Aunque no existe un valor de IS establecido para estimar la proyección de un compuesto como fármaco antiviral, DeClercq (1993) y Tsuchiya (1985), entre otros autores, consideran que para productos naturales, un valor de IS mayor a 2 es suficiente para proponer el compuesto como potencial agente antiviral. Por lo tanto, para **Im**, el valor calculado para su $IS = 8,7$ permite estimar que se trata de un metabolito secundario con potencialidad como agente antiviral.

En la búsqueda de nuevos fármacos antivirales, específicamente antiherpéticos, es difícil encontrar sustancias que exhiban un mejor IS que aciclovir ($IS > 20$) (Cheng *et al.*, 2008). Sin embargo, en las últimas décadas nos enfrentamos al desarrollo de resistencia del HSV-1, especialmente en paciente inmunocomprometidos (enfermos de SIDA, pacientes en tratamiento oncológico, entre otros) (Andrei y Snoeck, 2013). En este último tiempo, sólo cinco fármacos han sido aprobados y clínicamente utilizados para tratar estas infecciones (Corey, 2002; De Clerq, 2004). Además, es necesario recalcar que las infecciones persistentes y recurrentes pueden derivar en condiciones

patológicas de mayor gravedad como neumonía, encefalitis y meningitis (Fatahzadeh *et al.*, 2007; Carballal y Oubiña, 1996; Broks *et al.*, 1996). La creciente prevalencia a la resistencia de aciclovir y la presencia de efectos secundarios a fármacos antivirales clásicos, son las principales razones en el desarrollo de nuevas estrategias para combatir la infección por HSV. En este contexto, la indagación de sustancias con efecto contra el HSV se justifica sobradamente, ya sea mediante la evaluación de compuestos conocidos o de nuevas entidades químicas, específicamente aisladas de la naturaleza.

En virtud de la significativa actividad antiherpética exhibida por **Im**, se profundizó el estudio de este efecto, estableciéndose que no ejerce una acción virucida (Fig. 4.37), es decir que no presenta una acción directa sobre la partícula viral. Además, se determinó que no actúa durante la etapa de adsorción del virus a la membrana celular (pre-infección), ni durante la infección (ingreso a la célula), produciendo inhibición viral en la etapa post-infección, es decir, luego de que el virus ingreso a la célula (Fig. 4.38). Los ensayos realizados indican que **Im** actúa durante estadios tempranos post-adsorción, entre 2 y 4 h luego de su ingreso (Fig. 4.40), inactivando 99 % de las partículas de HSV-1 (Fig. 4.42). Dado que los estadios tempranos post-adsorción están asociados a la síntesis y transporte de ADN, ARN o proteínas virales (Tomé *et al.*, 2007), **Im** podría estar interfiriendo en alguno de estos procesos.

Por otro lado, **Im** consiguió reducir la viabilidad de las células tumorales de cáncer cervical humano (HeLa) a concentraciones sub-tóxicas sobre células no tumorales de mamífero (Vero) (Fig. 4.43). De esta manera, se profundizó en el estudio de los efectos biológicos de esta AQ, proyectando su posible uso en el tratamiento de tumores.

II- Antraquinonas

de

Heterophyllaea pustulata

Hook. f.

En el grupo de Farmacognosia del Dpto. de Ciencias Farmacéuticas (Facultad de Ciencias Químicas de la UNC) se logró el aislamiento, purificación e identificación de numerosos derivados antraquinónicos a partir de la especie vegetal *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas) (Núñez Montoya et al., 2003; Núñez Montoya et al., 2006). Asimismo, se ha demostrado que la mayoría de las AQs aisladas poseen propiedades fotosensibilizantes; es decir que en presencia de luz y oxígeno molecular (O_2), poseen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ERO), ya sea radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a través de un mecanismo fotosensibilizante Tipo I y/u oxígeno singlete (1O_2) mediante un mecanismo fotosensibilizante Tipo II (Núñez Montoya et al., 2005; Comini et al., 2007).

El estudio de sustancias fotosensibilizantes implica el desarrollo de una promisorio línea de investigación, debido a la posible aplicación de estos compuestos en la Terapia Fotodinámica (TFD) para tratar células cancerígenas o para inactivar microorganismos en la variante conocida como Terapia Fotodinámica Antimicrobiana (TFDA) (Hamblin et al., 2016; Oniszczuk et al., 2016). Estos sistemas terapéuticos implican la participación de tres factores indispensables: una sustancia química no tóxica, denominada fotosensibilizador (FS), la cual es activada por luz inocua a su longitud de onda (λ) de absorción, y en presencia de O_2 produce un incremento en los niveles de las ERO. Estas especies así generadas, reaccionan con moléculas biológicas de su entorno directo (proteínas, lípidos, ADN), conduciendo eventualmente a la muerte de las células cancerígenas o microorganismos, que se traduce en la regresión tumoral o de la infección (Agostinis et al., 2011; Baltazar et al., 2015; Hamblin et al., 2016; Oniszczuk et al., 2016).

Teniendo en cuenta el potencial uso que poseen las sustancias fotosensibilizantes en la TFD y TFDA, se decidió estudiar dos AQs purificadas de esta especie vegetal que resultaron fotoactivas: soranjidiol (**Sor**) y bisoranjidiol (**Bisor**) (Núñez Montoya et al., 2005) a fin de profundizar el estudio de sus efectos biológicos y establecer si pueden actuar como agentes antivirales a través de un mecanismo de fotosensibilización.

II-1- Aislamiento, purificación e identificación de antraquinonas fotosensibilizantes

II-1.1- Soranjidiol

Soranjidiol (**Sor**) (Fig. 4.52), se aisló a partir de partes aéreas de *H. pustulata*, siguiendo el protocolo de purificación descrito por Núñez-Montoya *et al.* (2003), con una pureza de $94,2 \pm 0,2$ %, según su análisis por HPLC-UV-Vis (Fig. 4.53), bajo condición 2 de elusión (I-6-Materiales y Métodos).

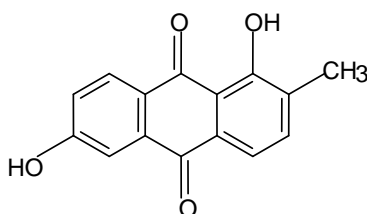


Figura 4.52. Estructura molecular de soranjidiol.

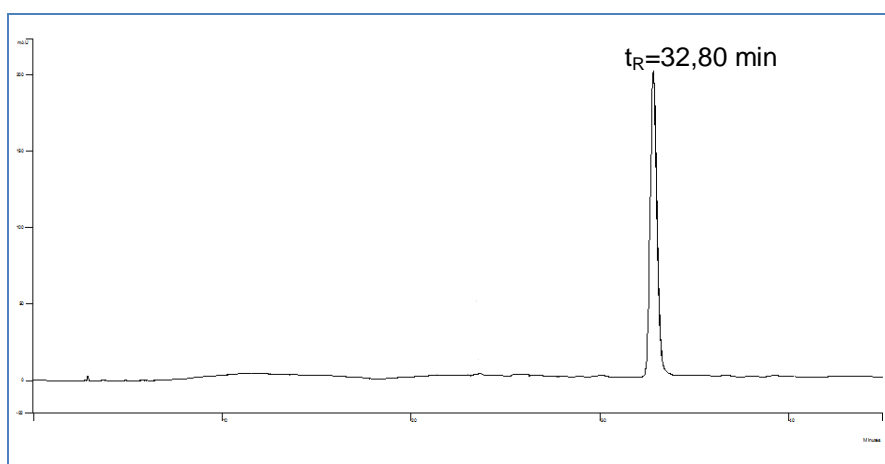


Figura 4.53. Cromatograma de soranjidiol en HPLC-UV-Vis.

La identificación de **Sor** se realizó a través de co-cromatografía contra testigo en TLC y en varias FM. En la Tabla 4.14 se muestra los R_f de este compuesto en tres FM distintas. Además se utilizó espectrofotometría UV-Vis y RMN monodimensional (Tabla 4.15). Los datos obtenidos para la muestra aislada fueron coincidentes con soranjidiol (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Dimmer *et al.* 2017; Banthorpe y White, 1995).

Tabla 4.14. Valores de R_f para soranjidiol.

FM	R _f
<i>n</i> -hex-AcOEt-HFo (75-25-1)	0,37 ± 0,1
Ben-AcOEt (8-2)	0,55 ± 0,1
Ben-MeOH (95-5)	0,27 ± 0,1

Tabla 4.15. Datos espectroscópicos de soranjidiol.

Soranjidiol				
Peso Molecular	254,2 g/mol.			
Fórmula Molecular	C ₁₅ H ₁₀ O ₄ .			
UV-Vis (MeOH) λ _{max} (nm), [log ε]	270,0 [1,4]; 295,0 [1,0]; 389,9 (sh) [0,3]; 409,9 [0,4]; 435,0 (sh) [0,3]; 494,9 (sh) [0,1] [1]			
RMN-¹H δ (ppm) (DMSO-d ₆)	2,32	[3H; s; CH ₃ -2];		
	7,27	[1H; dd; J = 8,55 y 2,56; H-7];		
	7,52	[1H; d; J = 2,56; H-5];		
	7,60	[1H; d; J = 7,68; H-3];		
	7,70	[1H; d; J = 7,68; H-4];		
	8,16	[1H; d; J = 8,54; H-8] y		
	13,12	[1H; s; OH-1] [2]		
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)	C-1	159,9	C-6	163,8
	C-1a	114,7	C-7	124,4
	C-2	134,2	C-8	129,8
	C-3	136,8	C-8a	121,9
	C-4	118,6	C-9	187,0
	C-4a	131,1	C-10	181,5
	C-5	112,4	<u>C</u> H ₃ -2	15,4
	C-5a	135,6	[2]	

[1] Datos UV-Vis coincidentes con bibliografía: Wijnsma y Verpoorte, 1986.

[2] Datos espectroscopia de RMN-¹H y ¹³C coincidentes con bibliografía: Núñez Montoya, Tesis Doctoral, 2002.

Los datos de RMN-¹H indican la presencia de 5 protones aromáticos correspondientes a: H-5 (7,52 ppm; d; J = 2,56), H-7 (7,27 ppm, dd; J = 8,55 y 2,56) y H-8 (8,16 ppm; d; J = 8,54) y los otros dos protones con J_o corresponden a los ubicados en posición 3 y 4 del núcleo antraquinona. La

señal a 13,12 ppm es característica de un grupo –OH en posición peri al grupo C=O; lo cual es corroborado por el corrimiento de la señal de C-9 a 187,0 ppm (Winjsma y Verpoorte, 1986). El segundo sustituyente es un grupo –CH₃ que por su corrimiento no estaría adyacente al grupo C=O (posición β). Se infiere que el tercer sustituyente es un grupo –OH también en posición β, los cuales en general no se observan en el espectro de RMN-1H porque son –OH libres (Winjsma y Verpoorte, 1986).

II-1.2- Bisoranjidiol

Bisoranjidiol (**Bisor**) (Fig. 4.54), es una biantraquinona compuesta por dos moléculas de soranjidiol, unidas a través de sus C en posición 5: 5-5'-bis-(1,6-dihidroxi-2-metil antraquinona). Se purificó a partir de partes aéreas de *H. pustulata*, siguiendo el procedimiento descrito por Núñez-Montoya *et al.* 2006, obteniéndose con una pureza de 90,2 ± 0,2 %, según su análisis por HPLC-UV-Vis (Fig. 4.55), bajo condición 2 de elusión (I-6-Materiales y Métodos).

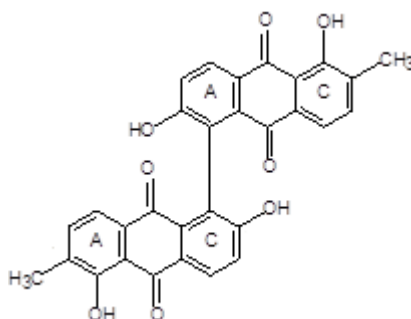


Figura 4.54. Estructura molecular de bisoranjidiol.

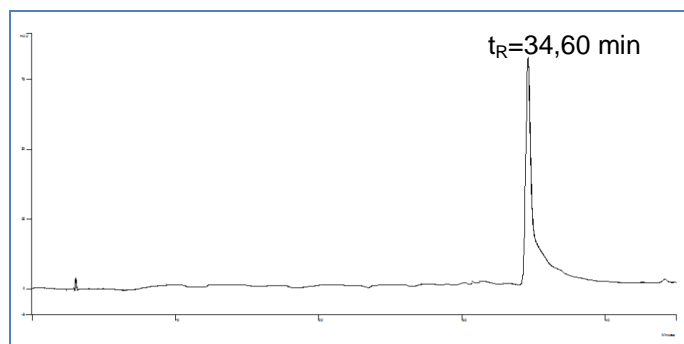


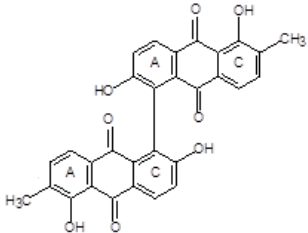
Figura 4.55. Cromatograma de bisoranjidiol en HPLC-UV-Vis.

Dado que se trata de un compuesto conocido, se analizó de la misma manera que **Sor**. En la Tabla 4.16 se muestran los valores de R_f y en la Tabla 4.17 se resumen los datos espectroscópicos obtenidos para esta biantraquinina, los cuales fueron coincidentes con bibliografía (Núñez Montoya *et al.*, 2006).

Tabla 4.16. Valores de R_f para bisoranjidiol.

FM	R _f
<i>n</i> -hex-AcOEt-HFo (75-25-1)	0,22 ± 0,1
Ben-AcOEt (8-2)	0,25 ± 0,1
Ben-MeOH (95-5)	0,05 ± 0,1

Tabla 4.17. Datos espectroscópicos de bisoranjidiol.

Bisoranjidiol			
			
Peso Molecular	506,5 g/mol		
Fórmula Molecular	C ₃₀ H ₁₈ O ₈		
UV-Vis (MeOH) λ _{max} (nm), [log ε]	255,0 [0,4]; 270,0 [0,3]; 285,0 (sh) [0,3]; 295,0 (sh) [0,3]; 390,0 (sh) [0,1]; 415,0 [0,1]; 435,0 (sh) [0,1] [1]		
RMN-¹H δ (ppm) (DMSO-d ₆)	2,29 7,34 7,36 7,57 8,27 13,18	[6H; s; CH ₃ -2] [2H; d; J = 7,56; H-3] [2H; d; J = 8,54; H-7] [2H; d; J = 7,82; H-4] [2H; d; J = 8,54; H-8) y [2H; s; OH-1] [2]	
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)	C-1 C-1' C-2 C-3 C-4 C-4a C-5 C-5'	159,8 114,6 133,9 136,7 118,0 131,6 127,5 132,6	C-6, 6' C-7 C-8 C-8a C-9 C-10 CH ₃ -2 [2]

[1] Datos UV-Vis coincidentes con bibliografía: Dimmer, Tesis Doctoral, 2017.

[2] Datos espectroscopia de RMN-¹H y ¹³C coincidentes con bibliografía: Núñez Montoya, Tesis Doctoral, 2002.

El espectro de RMN-¹H muestra la presencia de cuatro señales de dobletes atribuibles a protones aromáticos en posición *orto* en ambas estructuras monoméricas: H-3; H-4; H-7 y H-8. Los sustituyentes se observan como una singlete a δ H 2,29 correspondiente a dos grupos -CH₃ y un singlete que corresponde a los -OH en posición α al C=O a δ H 13,18. No se observa la señal correspondiente al -OH en posición 6 y 6' debido a que son -OH libres (Winjsma y Verpoorte, 1986).

II-2- Estudios de actividad biológica de soranjidiol y bisoranjidiol

II-2.1- Evaluación de la citotoxicidad *in vitro*

Se determinó la toxicidad sobre la línea celular Vero, según metodología descrita en el punto II-2.1-B-Materiales y Métodos, permitiendo obtener las curvas de viabilidad celular vs concentraciones de cada AQ por el ensayo de captación de RN (Fig. 4.56). Tal como se observa, **Bisor** es más citotóxico que **Sor**.

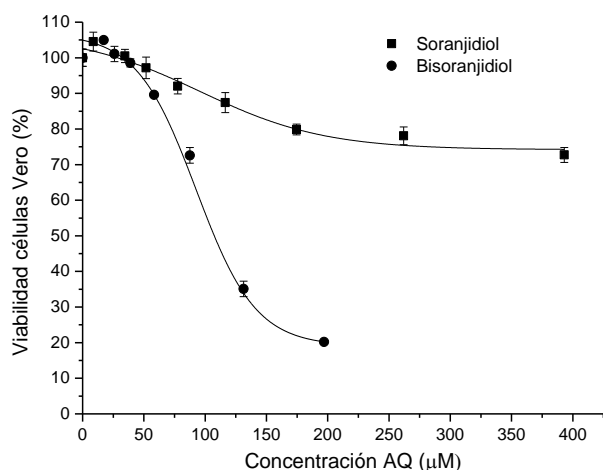


Figura 4.56. Curva de citotoxicidad *in vitro* de soranjidiol y bisoranjidiol sobre células Vero.

En la Tabla 4.18, se exponen los valores de las concentraciones citotóxicas y no citotóxicas para estas dos AQs.

Tabla 4.18. Valores de CC₅₀, CSubT y MCNC para soranjidiol y bisoranjidiol.

AQ	Línea celular Vero		
	CC ₅₀ (μ M)	CSubT (μ M)	MCNC (μ M)
Soranjidiol	> 393	176,3 \pm 25,0	98,0 \pm 18,3
Bisoranjidiol	112,2 \pm 3,3	75,5 \pm 1,8	59,2 \pm 2,1

CC₅₀: Concentración citotóxica al 50 %, CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

II-2.2 Evaluación de la actividad antiviral *in vitro*

A fin de establecer si estas AQs presentan actividad antiviral *per se* frente al HSV-1, se evaluaron a dos concentraciones: CSubT y MCNC, aplicando la misma metodología utilizada para las otras AQs (II-2.3-A-Materiales y Métodos).

En la Tabla 4.19, se indican los valores de porcentaje de inhibición (% I) obtenidos para cada AQ a las concentraciones ensayadas.

Tabla 4.19. Porcentaje de inhibición viral (% I) de soranjidiol y bisoranjidiol sobre HSV-1.

AQ	Actividad antihéptica (% I) a distintas concentraciones	
	CSubT	MCNC
Soranjidiol	19,1 \pm 6,4	19,1 \pm 4,5
Bisoranjidiol	37,9 \pm 3,0	32,1 \pm 4,0
Aciclovir	100	100

CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

Se puede concluir que ambas AQs evidenciaron una baja actividad sobre la inhibición del HSV-1 (< 50 %). Por lo tanto, fue interesante estudiar si este efecto podía ser incrementado por acción de la luz, mediante un mecanismo de fotosensibilización. Así, estas AQs fotosensibilizantes, resultaron ser buenas candidatas para evaluar la inactivación viral fotoestimulada.

II-2.3- Inactivación herpética fotoestimulada *in vitro* por soranjidiol y bisoranjidiol

En función de los resultados anteriores, se procedió a evaluar si la inactivación del virus HSV-1 producida por **Sor** y **Bisor** puede ser fotoestimulada. Se utilizó la metodología descrita en el punto II-2.4-Materiales y Métodos. Es necesario recordar que en este ensayo, se evalúa el efecto sobre las partículas virales una vez realizado el tratamiento con luz y en comparación con la condición experimental mantenida en oscuridad. Como ya se explicó, la inactivación de las partículas virales se determinó mediante el efecto de los virus que permanecieron activos, actuando sobre la VC de nuevas monocapas celulares.

II-2.3-A- Evaluación de soranjidiol

El efecto sobre las células infectadas con HSV-1 y tratadas con **Sor** (MCNC), se evaluó post-tratamiento con luz o sin luz.

En la Fig. 4.57, se observa la viabilidad de las células hospedadoras sometida a diferentes condiciones:

- *Control celular*: células no infectadas y no tratadas.
- *Control de toxicidad*: células no infectadas y tratadas con **Sor** (MCNC).
- *Control de virus extracelular*: efecto de la carga viral extracelular luego que las células infectadas fueron sometidas a irradiación/oscuridad.
- *Control de virus intracelular*: efecto de la carga viral intracelular de las células infectadas y sometidas a irradiación/oscuridad.
- *Virus extracelular post-tratamiento*: efecto de la carga viral extracelular luego que las células infectadas fueron tratadas con **Sor** y sometidas a irradiación/oscuridad.
- *Virus intracelular post-tratamiento*: efecto de la carga viral intracelular de las células infectadas tratadas con **Sor** y sometidas a irradiación/oscuridad.

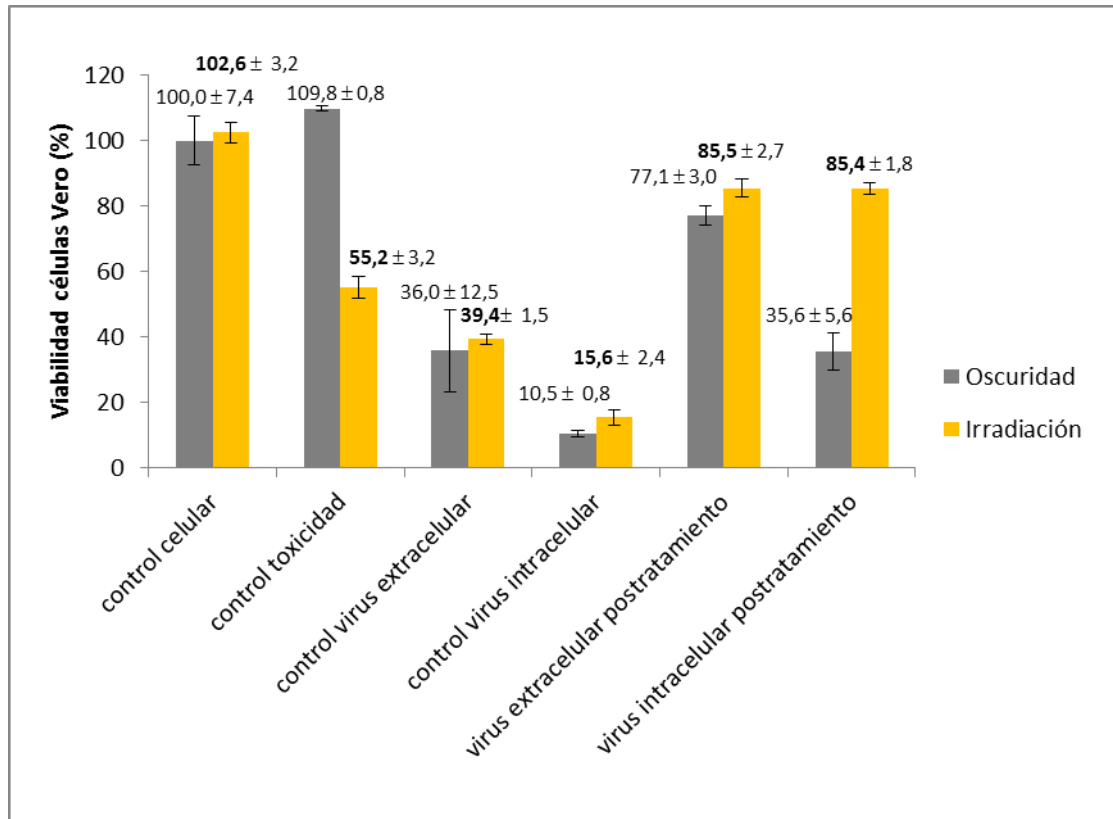


Figura 4.57. Inactivación fotoestimulada del HSV-1 por soranjidiol a su MCNC (98,0 μ M), expresada como porcentaje de viabilidad de las células hospedadoras. Comparación de dos condiciones experimentales: oscuridad e irradiación.

Con este ensayo se pudo establecer que la irradiación no modifica la viabilidad de las células hospedadoras ni el efecto del virus. Los valores de los controles celulares bajo las dos condiciones experimentales son similares (100,0 \pm 74 y 102,6 \pm 3,2; $p > 0,05$). Tampoco se observan diferencias significativas en los controles virales extracelulares en oscuridad y con luz (36,0 \pm 12,5 y 39,4 \pm 1,5; $p > 0,05$), teniendo también un comportamiento similar los controles virales intracelulares (10,5 \pm 0,8 y 15,6 \pm 2,4; $p > 0,05$).

Las células que fueron tratadas con **Sor** a su MCNC (*control de toxicidad*) mostraron reducción de la viabilidad cuando fueron irradiadas, es decir que hubo fotoestimulación de la citotoxicidad de **Sor** (109,8 \pm 0,8 y 55,2 \pm 3,2).

Se observó que **Sor** tuvo efecto sobre el virus extracelular tanto en oscuridad como con irradiación (*virus extracelular postratamiento*), debido a que la viabilidad de las células hospedadoras tratadas ($77,1 \pm 3,0$ y $85,5 \pm 2,7$) fue mayor a su respectivo control viral ($36,0 \pm 12,5$ y $39,4 \pm 1,5$). De la misma manera, se examinó el virus intracelular (*virus intracelular postratamiento*), el cual fue inactivado en oscuridad ($35,6 \pm 5,6$ vs $10,5 \pm 0,8$) y esta actividad se incrementó por acción de la irradiación ($85,4 \pm 1,8$ vs $35,6 \pm 5,6$); es decir, hubo fotoestimulación de la inactivación de virus intracelular.

En la Fig. 4.58, se realiza otro análisis del mismo ensayo comparando la viabilidad de las células hospedadoras tratadas con **Sor** (MCNC), con el porcentaje inactivación viral logrado por esta AQ a la misma concentración sobre las partículas virales extracelulares e intracelulares.

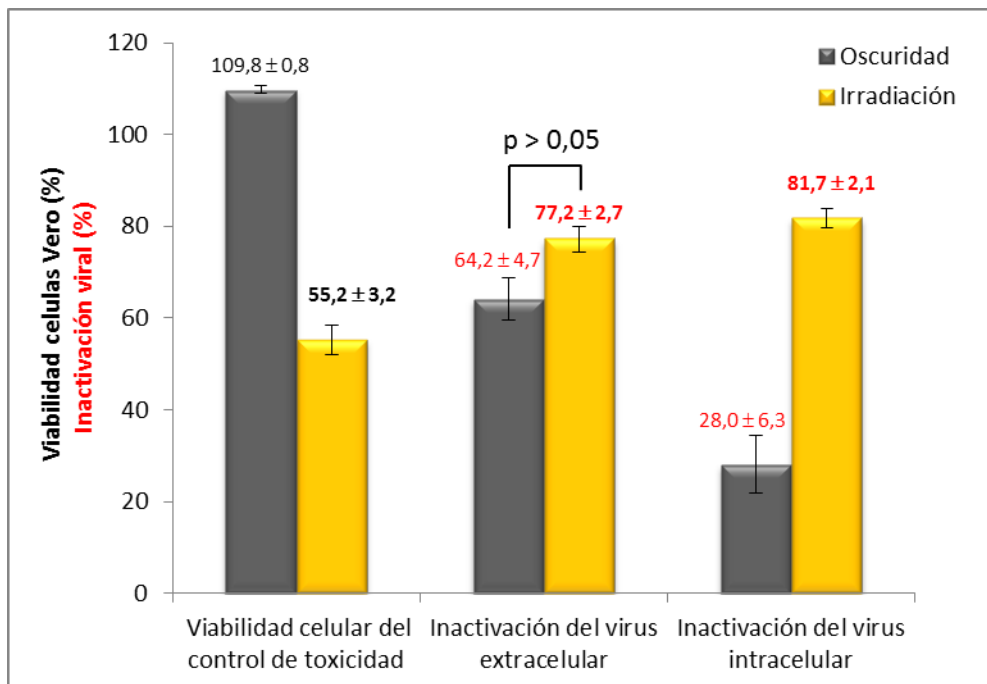


Figura 4.58. Viabilidad de la célula hospedadora tratada con soranjidiol a su MCNC ($98,0 \mu\text{M}$) y % de inactivación del HSV-1 extra e intracelular por acción de soranjidiol (MCNC) en oscuridad y bajo irradiación.

Mediante estos resultados se demostró que **Sor** a su MCNC es fotoactiva, ya que reduce viabilidad de las células hospedadoras al

55,2 ± 3,2 % bajo acción de la luz, lo cual también puede corroborarse mediante su ECP (Fig. 4.59).



Figura 4.59. Efecto citopático de soranjidiol a su MCNC (98,0 μM) sobre células Vero en condiciones de oscuridad e irradiación.

A su vez, **Sor** a esta misma concentración y con irradiación, logró aumentar la inactivación de las partículas virales intracelulares al 81,7 ± 2,1 % (Fig. 4.58). Se observó una importante inactivación del virus extracelular (alrededor del 70 %), pero sin diferencia estadística significativa entre oscuridad e irradiación ($p > 0,05$); por lo tanto, se deduce que la actividad observada se debe a un efecto virucida o antiviral de **Sor** por sí misma que no es afectada por la acción de la luz.

II-2.3-B- Evaluación de bisoranjidiol

En el Fig. 4.60, se muestran los resultados obtenidos para **Bisor**, realizando el mismo análisis previamente expuesto para **Sor**.

Las células tratadas con **Bisor** a su MCNC (*control de toxicidad*), mostraron reducción de la viabilidad cuando fueron irradiadas (86,6 ± 3,1 vs 21,0 ± 1,6); es decir, que hubo fotoestimulación de la citotoxicidad. El efecto sobre las células infectadas con HSV-1 y tratadas con Bisor (MCNC), mostró que hubo inactivación sobre el virus extracelular tanto en oscuridad como con irradiación (virus extracelular postratamiento) debido a que la viabilidad de la célula hospedadora (84,6 ± 2,5 y 84,2 ± 5,9) fue mayor a su respectivo control viral (36,0 ± 12,5 y 39,4 ± 1,5). De la misma manera, se examinó el virus intracelular (virus intracelular postratamiento), el cual fue moderadamente inactivado en oscuridad (24,4 ± 0,3 vs 10,5 ± 0,8) y esta actividad aumentó en

condición de irradiación ($92,3 \pm 1,4$ vs $24,4 \pm 0,3$); es decir, hubo fotoestimulación de la inactivación de las partículas virales intracelulares.

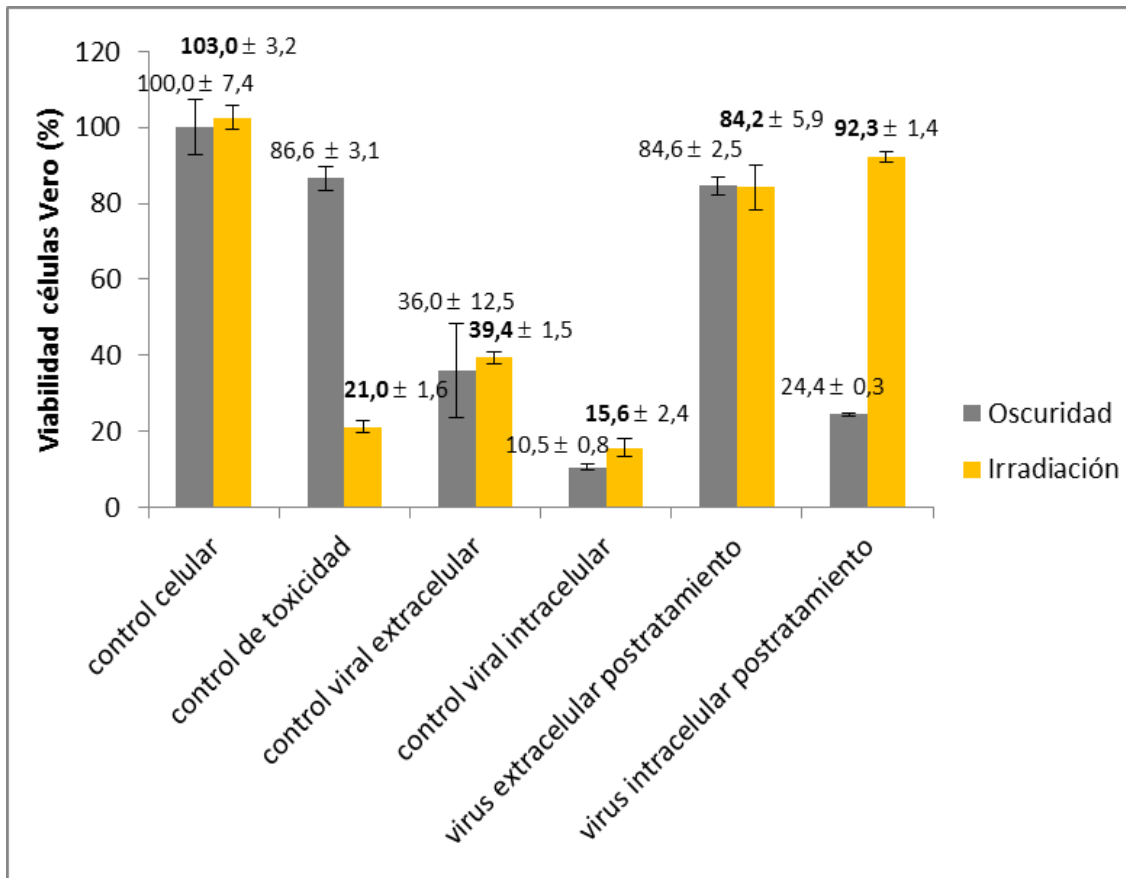


Figura 4.60. Inactivación fotoestimulada del HSV-1 por bisoranjidiol a su MCNC ($59,2 \mu\text{M}$), expresada como porcentaje de viabilidad de las células hospedadoras. Comparación de dos condiciones experimentales: oscuridad e irradiación.

Control celular (células no infectadas sin tratar), control de toxicidad (células tratadas con **Bisor** a su MCNC), control virus extracelular (células infectadas con partículas virales extracelulares), control virus intracelular (células infectadas con partículas virales intracelulares), virus extracelular post-tratamiento (células infectadas con partículas virales extracelular post-tratamiento con **Bisor**) y virus intracelular post-tratamiento (células infectadas con partículas virales post-tratamiento con **Bisor**).

En la Fig. 4.61, se compara la viabilidad de las células hospedadoras tratadas con **Bisor** (MCNC), con el porcentaje inactivación viral logrado por esta AQ a la misma concentración sobre las partículas virales extracelulares e intracelulares.

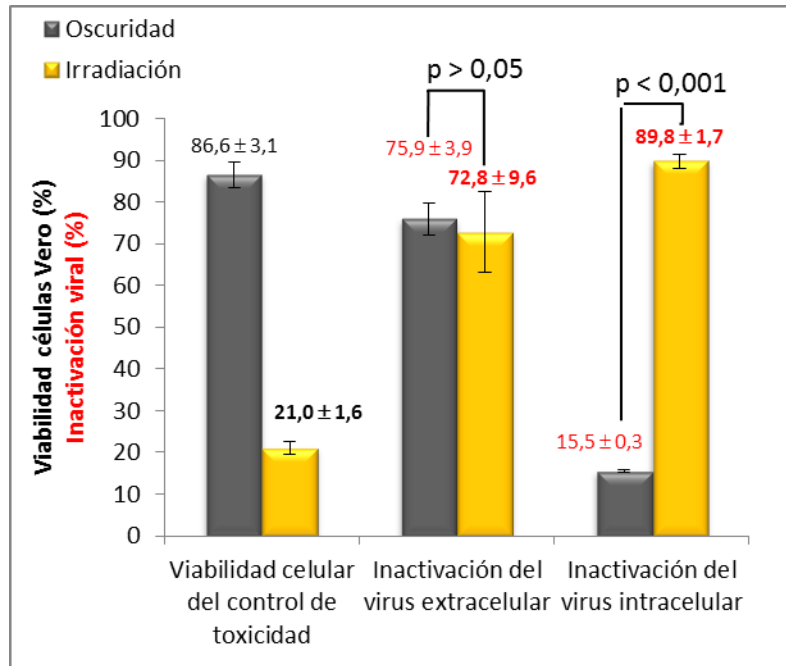


Figura 4.61. Viabilidad de la célula hospedadora tratada con bisoranjidiol a su MCNC (59,2 μ M) y % de inactivación del HSV-1 extra e intracelular por acción de bisoranjidiol (MCNC) en oscuridad y bajo irradiación.

Mediante la realización de esta metodología, se demostró el efecto fotoestimulado de **Bisor** a su MCNC sobre las células hospedadoras y la inactivación del virus intracelular. La viabilidad de las células hospedadoras se redujo al 21,0 \pm 1,6 % con irradiación, acción que también se corroboró mediante su ECP (Fig. 4.62).



Figura 4.62. Efecto citopático de bisoranjidiol a su MCNC (59,2 μ M) sobre células Vero en condiciones de oscuridad e irradiación.

En la Fig. 4.61 también se observa que **Bisor** a su MCNC y con luz, logró incrementar la inactivación de las partículas virales intracelulares al $89,8 \pm 1,7 \%$ ($p < 0,001$). A pesar que se observó inactivación sobre el virus extracelular (alrededor del 70 %), este efecto no presentó diferencia estadística significativa entre el tratamiento en oscuridad y con irradiación ($p > 0,05$); por tanto, la actividad observada se debe a un efecto virucida o antiviral de **Bisor** y no a la combinación de esta AQ con la irradiación.

Evaluando el proceso de fotoestimulación de ambas AQs sobre la inactivación del HSV-1, se puede concluir que el efecto de **Bisor** fue levemente mayor que el de **Sor**, puesto que el efecto inhibitorio del dímero sobre las partículas virales intracelulares fue de $89,79 \pm 1,67 \%$ (Fig. 4.61) y el de **Sor** fue de $81,75 \pm 2,07 \%$ (Fig. 4.58), ($p = 0,05$).

II-3- Discusión de resultados obtenidos para *H. pustulata*

Se estudiaron dos AQs purificadas a partir de *H. pustulata*: soranjidiol y su dímero 5,5'-bisoranjidiol (Figs. 4.52 y 4.54), en cuanto a su efecto sobre el HSV-1. Ambas AQs mostraron una baja actividad antiherpética *in vitro*, que fue independiente de su CSubT y MCNC, siendo la estructura dimérica más activa (Tabla 4.19). Aprovechando sus propiedades fotosensibilizantes, se evaluó si el efecto observado podría ser incrementado por acción de la luz.

Efectivamente, la irradiación incrementó la citotoxicidad sobre la célula hospedadora; por lo que fue necesario discernir si el efecto tóxico también afectaba a las partículas virales. Este punto fue crucial de investigar porque más allá que la fotosensibilización de las AQs genera un efecto nocivo sobre las células infectadas, tal como si fuera una célula tumoral, era necesario demostrar que las partículas virales eran afectadas, y con ello su capacidad para proseguir con la infección.

Durante la realización de esta tesis, se logró desarrollar una metodología que permitió estudiar el efecto de compuestos fotosensibilizantes sobre las partículas virales que infectan a las células hospedadoras. Se estableció que ambas AQs inhiben la replicación del virus extracelular sin necesidad de irradiación (Figs. 4.58 y 4.61). Cabe destacar que ambas AQs

tuvieron un efecto inhibitorio sobre las partículas virales en el interior de la célula, mediante un mecanismo de fotosensibilización. Así, se demostró que **Bisor** produce una mayor fotoinactivación viral que **Sor**. Este es un importante hallazgo porque ambas AQs evitarían que el virus cumpla con su ciclo de replicación para salir de las células y continuar propagando la infección. El efecto final es una reducción en la carga viral, que en definitiva se traduce en la regresión de la infección.

La metodología empleada pone en evidencia que el virus (HSV-1) fue más sensible al proceso de fotoestimulación que la célula hospedadora. La inactivación de las partículas virales se produjo instantáneamente post-irradiación, ya que el virus se colectó e inoculó inmediatamente después de la irradiación ($t = 0$). Mientras que la viabilidad de las células hospedadoras se cuantificó 48 h post-irradiación; lo que permite deducir que seguidamente a la irradiación, las células continuaban viables. Esto fue confirmado por la observación del ECP a $t = 0$, en donde las células tratadas mostraron una morfología similar a las células del control celular. Este resultado es promisorio frente a la posibilidad del uso de estas AQs en TFD para el tratamiento de lesiones de etiología viral. Además, la TFD ha demostrado ser efectiva contra cepas del HSV-1 tanto sensibles como resistentes a aciclovir (Latief *et al.*, 2015), debido a que el mecanismo de acción está relacionado a la producción de estrés oxidativo, el cual es generalizado e inespecífico (Oniszczyk *et al.*, 2016).

III- Otros derivados

Antraquinónicos

En el marco de una pasantía realizada en el Laboratorio de Química Medicinal del Departamento de Farmacia de la Universidad de Patras en Grecia, dirigida por el Prof. Dr. Manolis Fousteris, se planteó como objetivo obtener derivados antraquinónicos relacionados a los presentes en *Galium latoramosum* Clos, con la finalidad de evaluar su actividad antiviral *in vitro*. Así, se plantearon diferentes estrategias que incluyen desde la semisíntesis usando algunas de las AQs aisladas de esta especie vegetal, hasta la síntesis total de AQs previamente aisladas de especies vegetales pertenecientes al género *Galium*.

III-1- Obtención, purificación e identificación de lucidina

A partir del estudio químico de los extractos bioactivos de *G. latoramosum*, mediante HPLC-MS-QTOF, se demostró que **Lp** es la AQ mayoritaria de esta especie vegetal (Fig. 4.5). Sin embargo, no presentó actividad antiviral *in vitro* sobre ninguno de los virus ensayados (Fig. 4.14). Haciendo uso de este metabolito secundario brindado en gran cantidad por esta especie vegetal, se utilizó **Lp** como precursor para la obtención de derivados a fin de evaluar su posible actividad antiviral.

Lucidina, una AQ aglicón, se obtuvo mediante la hidrólisis ácida de **Lp** (Fig. 4.63), siguiendo la metodología descrita en el punto I-5.1-Materiales y Métodos. El rendimiento de esta hidrólisis fue de 85,6 %.

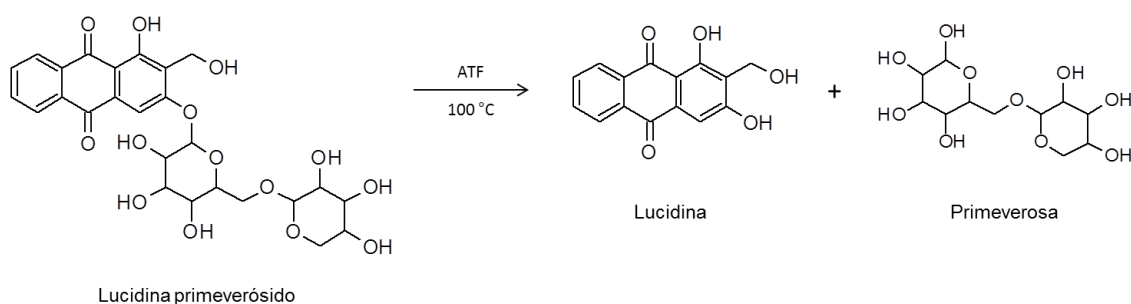


Figura 4.63. Obtención de lucidina.

La identidad se confirmó por espectroscopía de RMN-¹H (Fig. 4.64) al ser comparada con datos bibliográficos (Kamiya *et al.*, 2010).

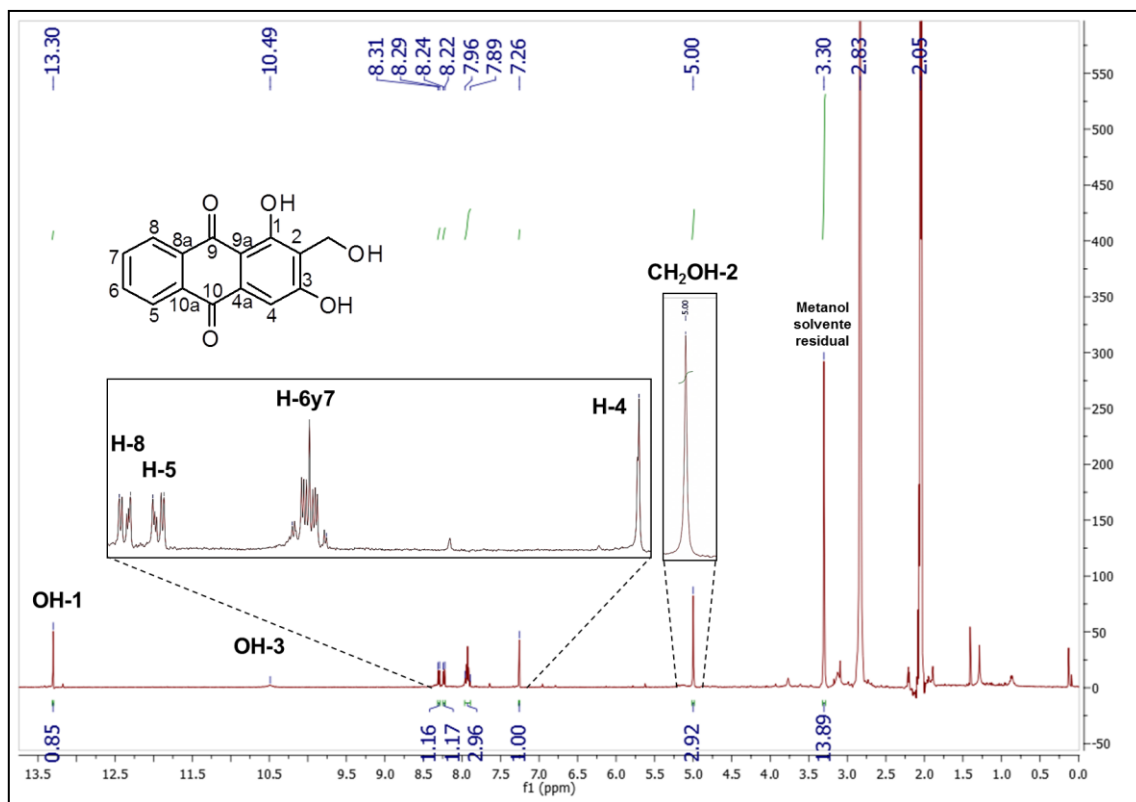


Figura 4.64. Espectro de RMN-¹H de lucidina (400 MHz, acetona-d₆).

NMR-¹H: 13,30 (s, 1H, OH-1); 10,49 (s, 1H, OH-3); 8,30 (dd, 1H, H-8); 8,23 (dd, 1H, H-5); 7,93 (m, 2H, H-6y7); 7,26 (s, 1H, H-4); 5,00 (s, 2H, CH₂OH).

III-2- Obtención, purificación e identificación de nordamnacantal

Nordamnacantal (**Nor**) (Fig. 4.65), se obtuvo a través de la oxidación del grupo alcohol primario de lucidina con clorocromato de piridinio, tal como se describe en el punto I-5.2-Materiales y Métodos. El rendimiento de reacción fue de 14,0 %.

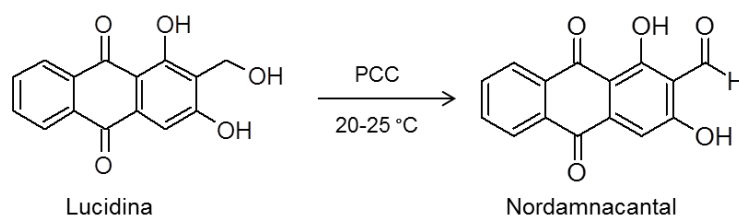


Figura 4.65. Obtención de nordamnacantal.

La identidad de **Nor** (Tabla 4.20) se confirmó por HPLC-DAD-ESI-QTOF, espectrofotometría UV-Vis (Fig. 4.66), espectroscopía de RMN- ^1H y ^{13}C (Fig. 4.67 y 4.68) al ser comparado con datos bibliográficos (Wijnsma y Verpoorte, 1986; Zhou *et al.*, 1994; Kamiya *et al.*, 2010; Saha *et al.*, 2012).

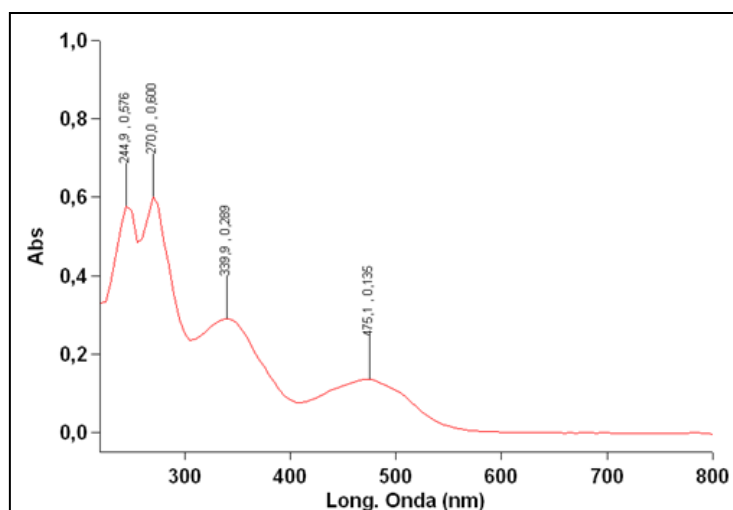


Figura 4.66. Espectro UV-Vis nordamnacantal en metanol.

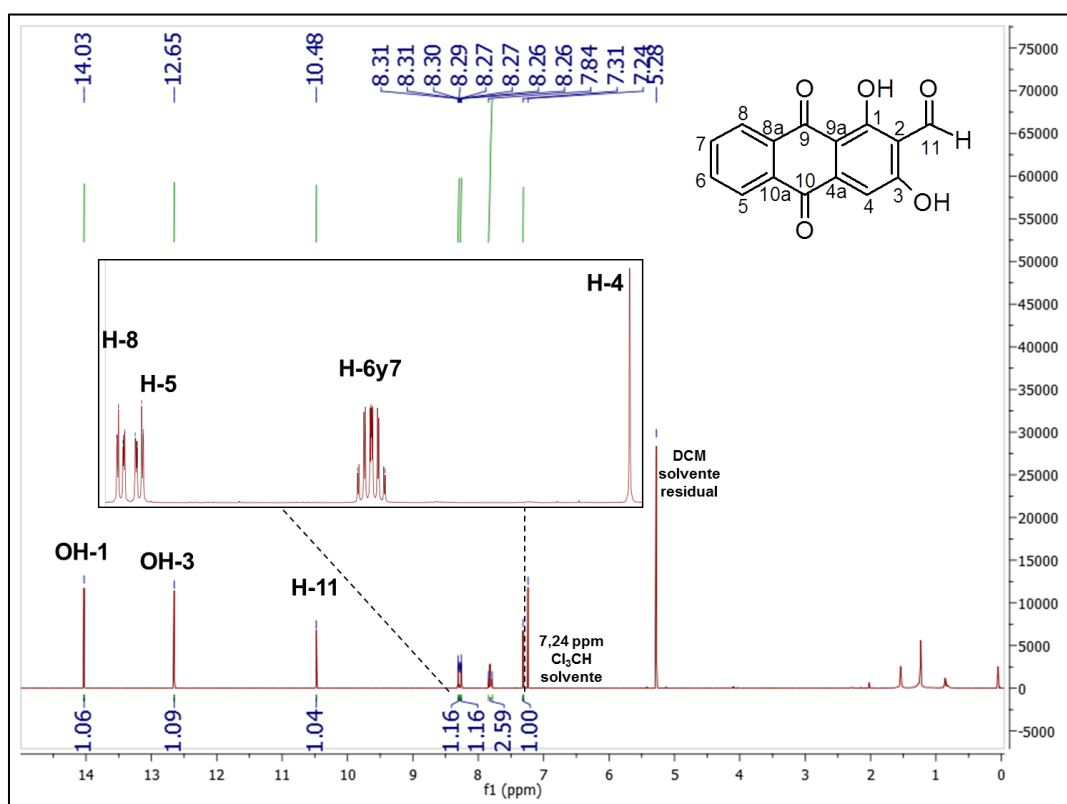


Figura 4.67. Espectro de RMN- ^1H de nordamnacantal (600 MHz, $\text{Cl}_3\text{CD-d}_6$).

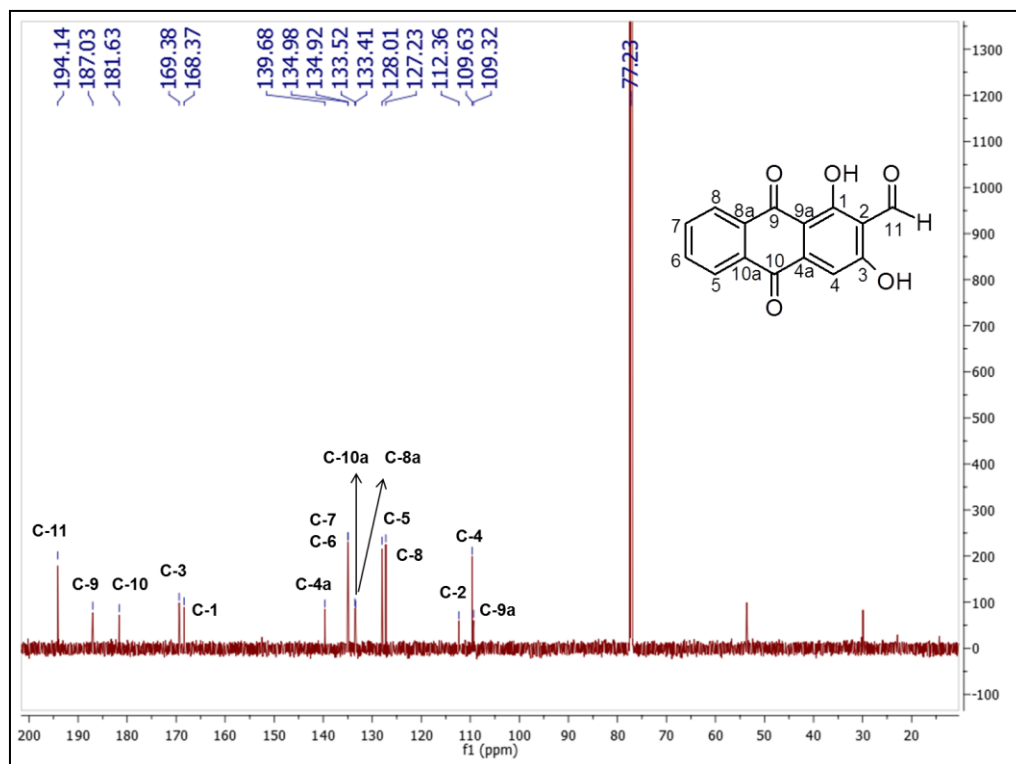


Figura 4.68. Espectro de RMN-¹³C de nordamnacantal (150 MHz, Cl₃CD-d₆).

El análisis de HPLC-DAD-ESI-QTOF (Fig. 4.69) muestra la presencia del ión m/z [M-H] de 267,0289 (calculado 267,0288), lo que le atribuye el peso molecular 268,2210 g/mol correspondiente a C₁₅H₈O₅. El principal rompimiento fue el ión m/z [M-CHO] de 239,0341 (Fig. 4.70) que confirmó la presencia del grupo aldehído.

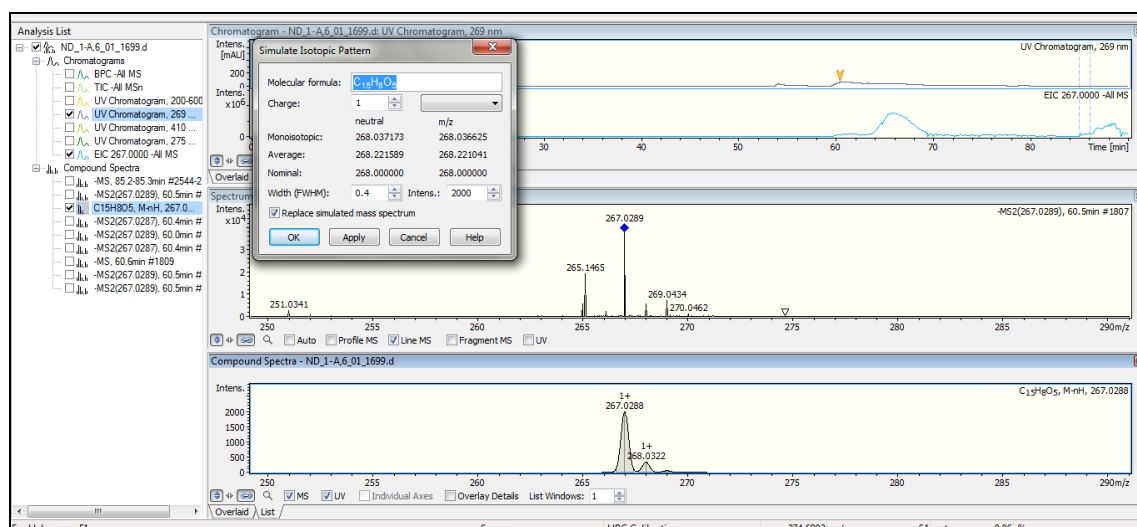


Figura 4.69. Espectro de masa obtenido por HPLC-DAD-ESI-QTOF de nordamnacantal.

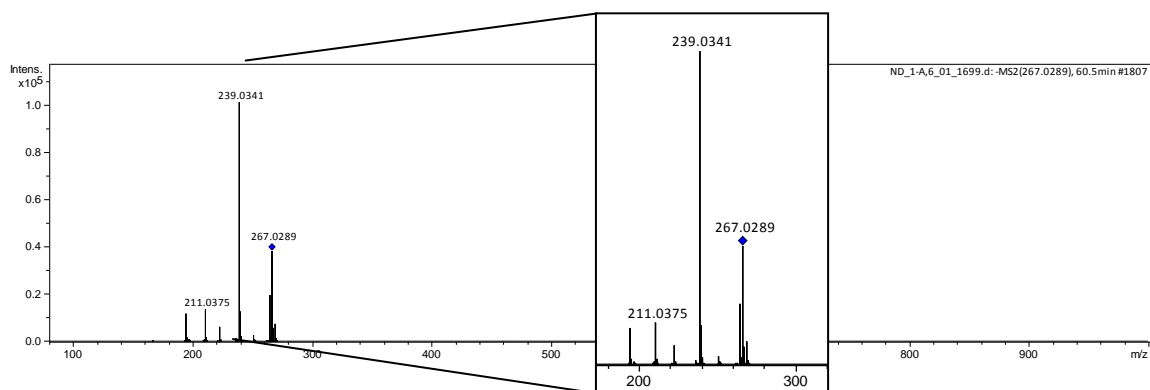


Figura 4.70. Principales rompimientos MSⁿ de nordamnacantal.

Tabla 4.20. Datos espectroscópicos de nordamnacantal.

Nordamnacantal				
HRMS	Peso Molecular = 268,03 g/mol Fórmula Molecular = C ₁₅ H ₈ O ₅			
UV-Vis (MeOH) λ_{\max} (nm) [log ϵ]	244,9 [0,6]; 270,0 [0,6]; 339,9 [0,3]; 475,1 [0,1] [1]			
RMN-¹H (Cl ₃ CD) δ (ppm) J (Hz)	7,31 7,81 8,27 8,30 10,48 12,65 14,03	[1H; s; H-4] [2H; m; H-6 y H-7] [1H; dd ($J_o = 7,29$; $J_m = 1,92$); H-5] [1H; dd ($J_o = 7,29$; $J_m = 1,92$); H-8] [1H, s, COH-2] [1H, s, OH-3] [1H; s; OH-1] [2]		
RMN-¹³C (DMSO-d ₆) δ (ppm)	C-1 C-2 C-3 C-4 C-4a C-5 C-6 C-7	168,4 112,4 169,4 109,6 139,7 128,0 134,9 135,0	C-8 C-8a C-9 C-9a C-10 C-10a C-11	127,2 133,4 187,0 109,3 181,6 133,5 194,1
				[3]

[1] Datos UV-Vis coincidentes con bibliografía (Akhtar *et al.*, 2013).

[2] Datos espectroscopia de RMN-¹H coincidentes con bibliografía (Zhou *et al.*, 1994; Saha *et al.*, 2012).

[3] Datos espectroscopia de RMN-¹³C coincidentes con bibliografía (Kamiya *et al.*, 2010).

aproximadamente 10 % (Zhang *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2007) y que la purificación es una de las etapas más laboriosas (Qiao *et al.*, 2007).

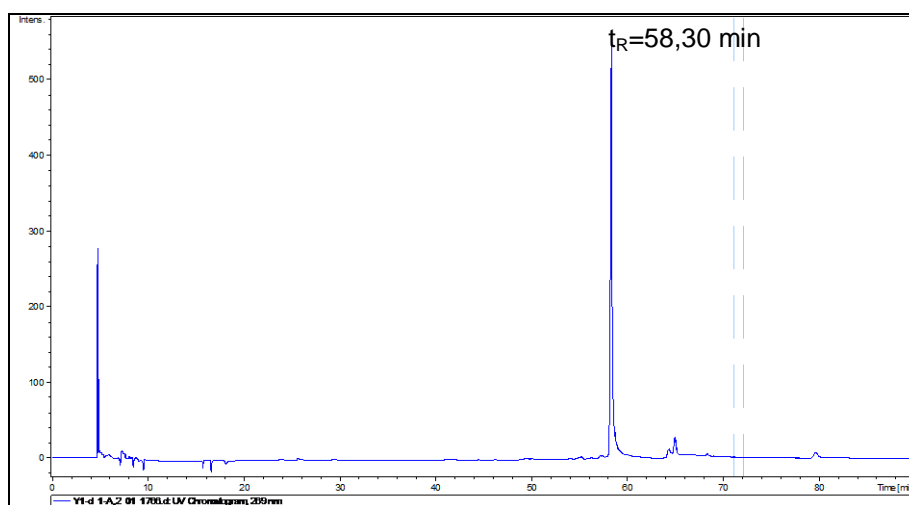


Figura 4.72. Espectro de HPLC-DAD-ESI-QTOF de 6-bromo-xantopurpurina.

La identidad se confirmó por el análisis de sus datos espectrales. El análisis de HPLC-DAD-ESI-QTOF (Fig. 4.73) muestra la presencia del ión m/z [M-H] de 318,9461 (calculado 318,9425), lo que confirma el peso molecular 319,1070 g/mol correspondiente a $C_{14}H_7BrO_4$.

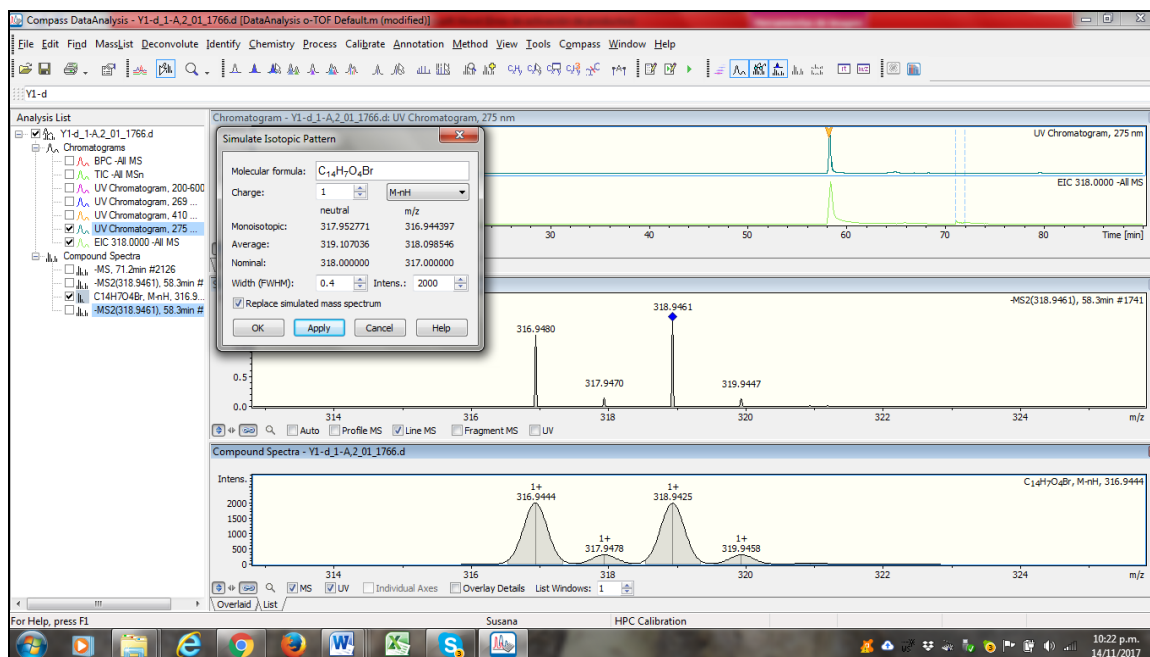


Figura 4.73. Espectro de masa obtenido por HPLC-DAD-ESI-QTOF de 6-bromo-xantopurpurina.

En la Fig. 4.74, se muestra el espectro UV-Vis de **BrX**, el perfil concuerda con lo descrito para AQs (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

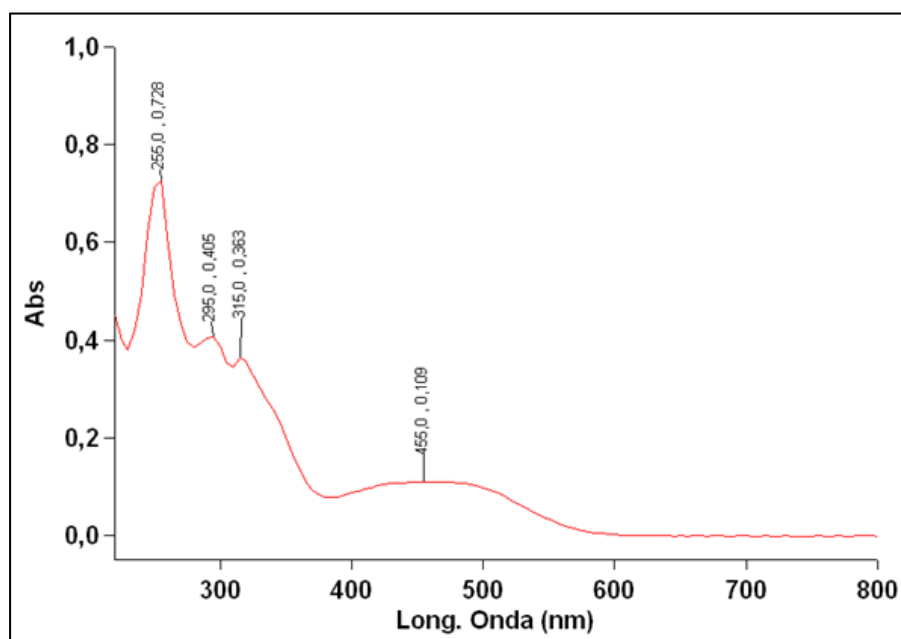


Figura 4.74. Espectro UV-Vis 6-bromo-xantopurpurina en metanol.

La espectroscopia de RMN monodimensional (RMN- ^1H) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC) permitieron su dilucidación estructural (Fig. 4.75 a Fig. 4.79).

A partir del espectro de RMN- ^1H (Fig. 4.75) se corroboró la presencia de tres sustituyentes, en función de las señales de los 5 protones aromáticos. Además, se visualiza la señal de dos de estos sustituyentes que se tratarían de dos OH fenólicos, uno de ellos en posición *peri* al grupo C=O ($\delta_{\text{H}} = 12,71$) ubicado en posición 1 del núcleo AQ. Dado los reactivos utilizados en la reacción, se deduce que el OH- β , proveniente del resorcinol, se encuentra en posición 3. El tercer sustituyente es un átomo de bromo, proveniente del reactivo de reacción anhídrido bromo ftálico, el cual podría estar en posición 6 ó 7.

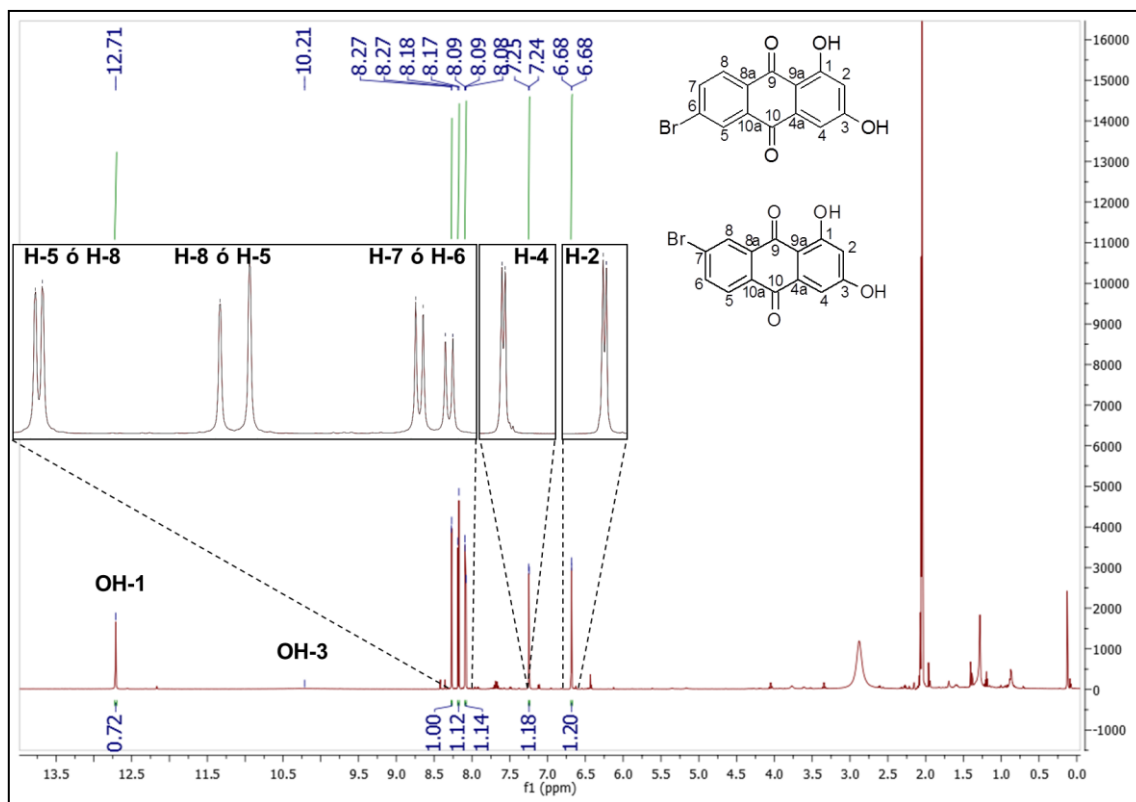


Figura 4.75. Espectro de RMN-¹H de 6-bromo-xantopurpurina (600 MHz, acetona-d₆).

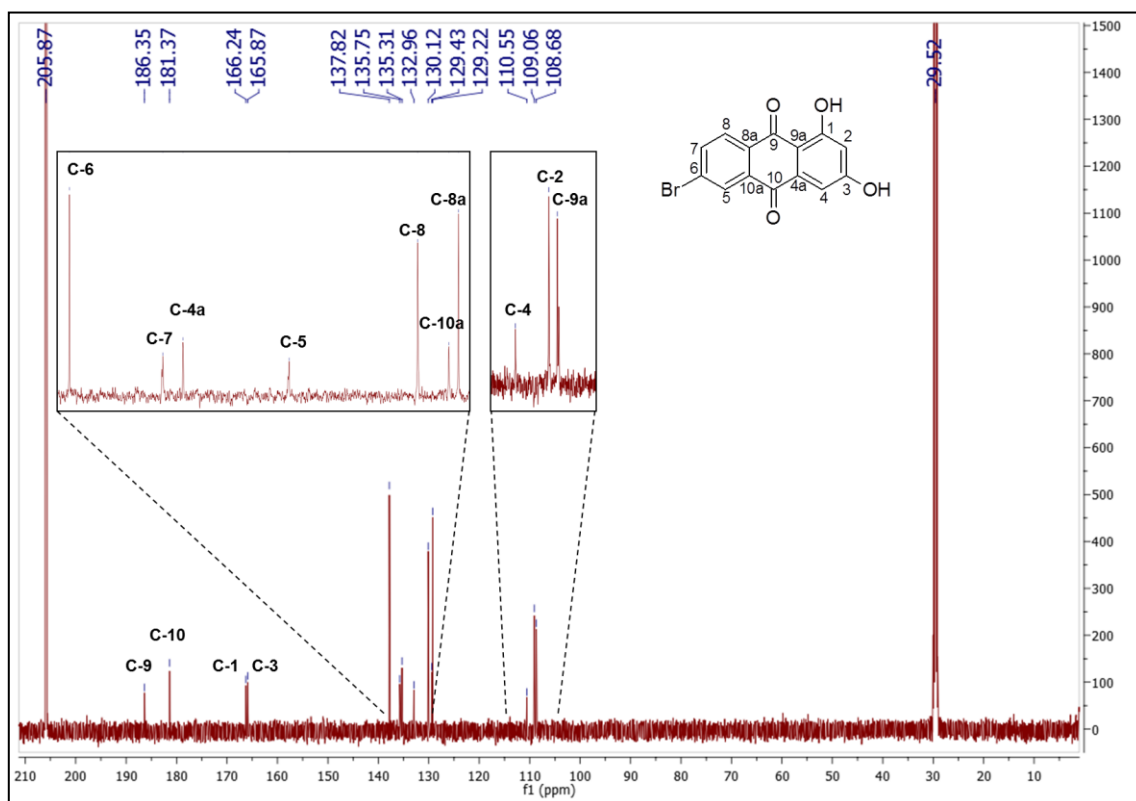


Figura 4.76. Espectro de RMN-¹³C de 6-bromo-xantopurpurina (150 MHz, acetona-d₆).

Las señales del espectro de RMN- ^{13}C , confirmó el núcleo antraquinónico debido a la presencia de dos grupos $\text{C}=\text{O}$, uno de ellos con un δ_c a 186,3 que indica la formación de un puente hidrógeno con un grupo $\text{OH}-1$ (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

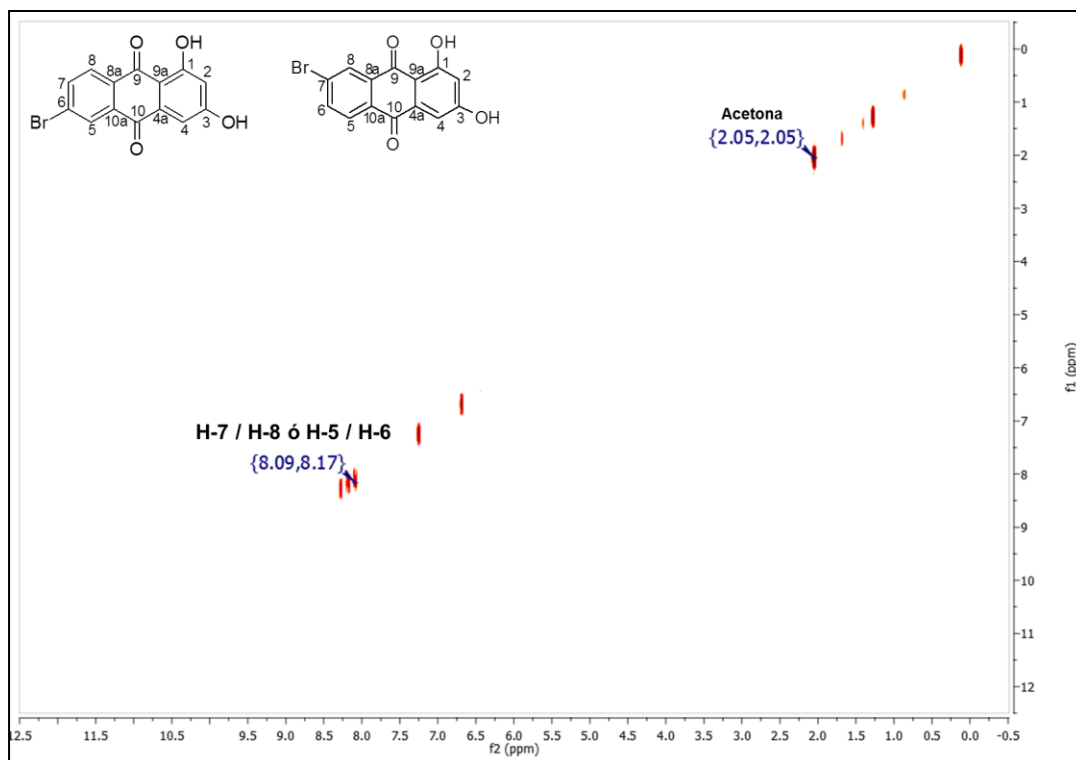


Figura 4.77. Espectro de COSY de 6-bromo-xantopurpurina (600 MHz, acetona- d_6).

En el espectro COSY sólo se visualiza la correlación de los protones aromáticos adyacentes que se ubican en el anillo A del núcleo antraquinónico.

El espectro HSCQ (Fig. 4.78) muestra la correlación C-H del núcleo antraquinona.

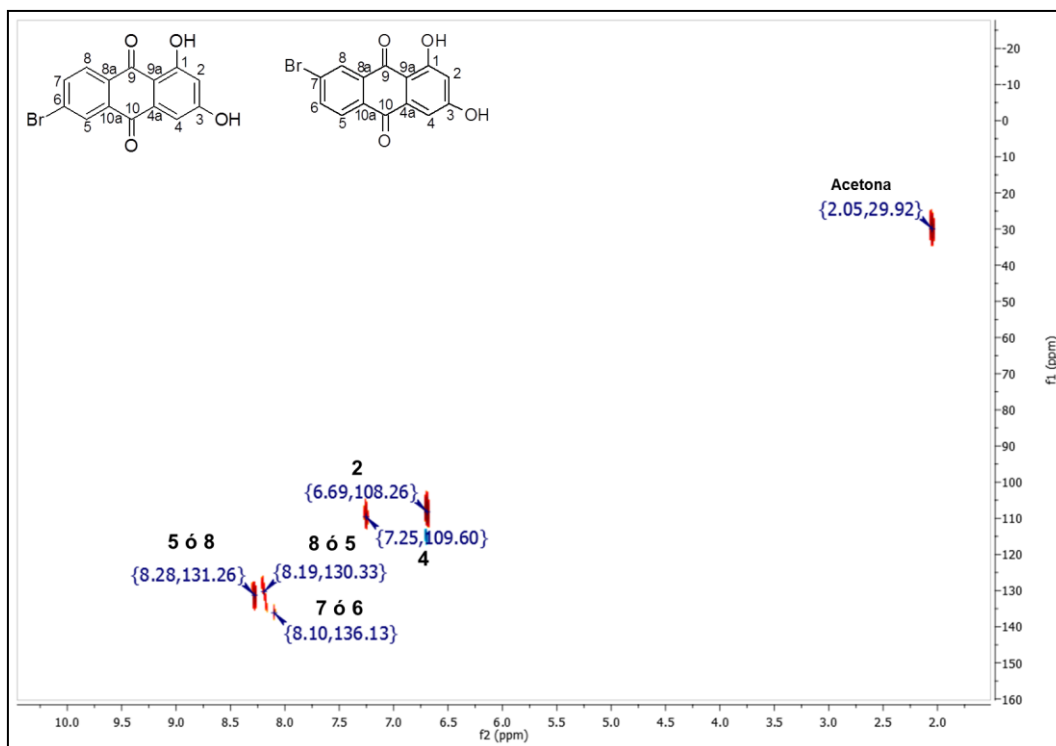


Figura 4.78. Espectro de HSQC de 6-bromo-xantopurpurina (600 MHz y 150 MHz, acetona-d6).

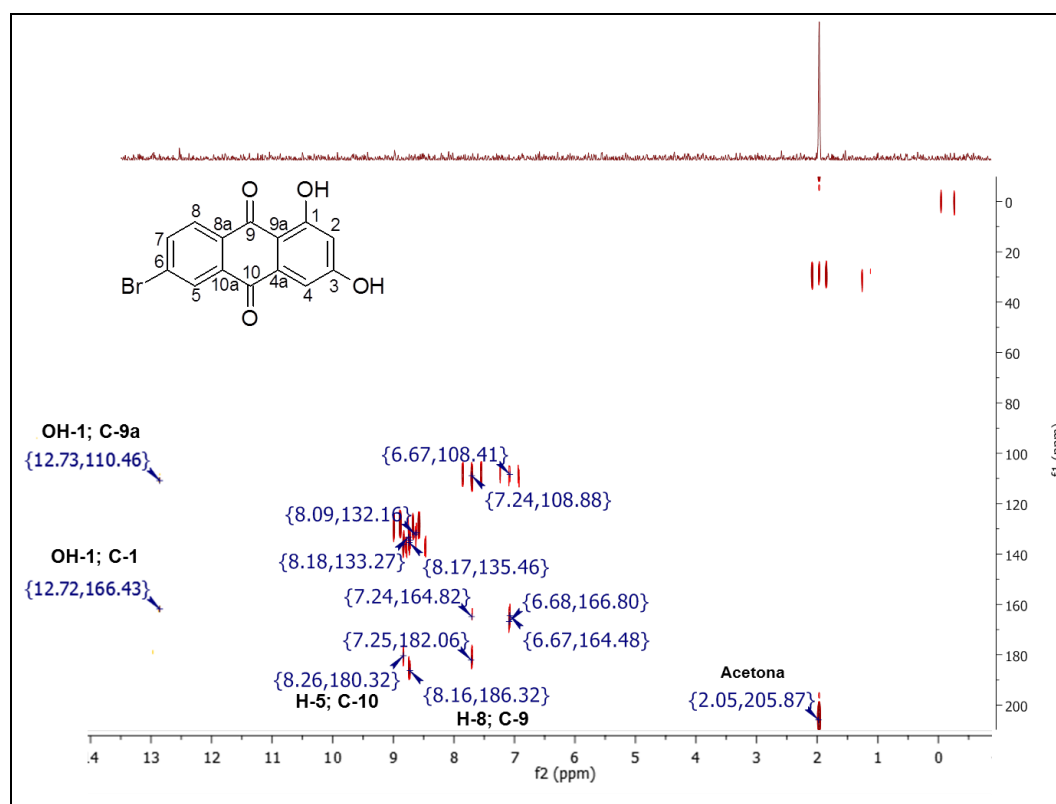


Figura 4.79. Espectro de HMBC de 6-bromo-xantopurpurina (600 MHz y 150 MHz, acetona-d6).

La ubicación del átomo de bromo en posición -6 se confirmó a través de HMBC, ya que el H-5, que se encuentra a campos más bajos debido a la cercanía del átomo de Br, correlaciona con el C-10 y el H-8 lo hace con el C-9 (Fig. 4.80).

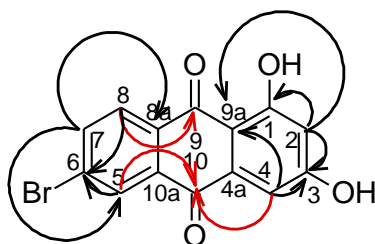


Figura 4.80. Principales correlaciones entre H y C obtenidas del espectro HMBC de 6-bromo-xantopurpurina.

En la Tabla 4.21 se muestra la asignación de cada uno de los átomos pertenecientes a 6-bromo-xantopurpurina, mediante el análisis de RMN.

Tabla 4.21. Datos de RMN-¹H y correlaciones COSY y HMBC para 6-bromo-xantopurpurina.

Posición	δ_c , tipo	δ_H , mult., (J en Hz)	COSY ^a	HMBC ^b
1	166,2; C	-		-
2	109,1; C	6,68; d ($J_m = 2,40$)		1, 3, 9a
3	165,9; C	-		-
4	110,6; CH	7,25; d ($J_m = 2,40$)		3, 9a, 10
4a	135,3; C	-		-
5	133,0; CH	8,25; d ($J_m = 1,92$)		6, 10
6	137,8; C	-		-
7	135,8; CH	8,09; dd ($J_o = 8,16; J_m = 1,08$)	8	5, 8a
8	130,1; CH	8,18; d ($J_m = 8,22$)	7	5, 6, 9
8a	129,2; C	-		-
9	186,4; C	-		-
9a	108,7; C	-		-
10	181,4; C	-		-
10a	129,4; C	-		-
1-OH	-	12,71; s		1, 9a
3-OH	-	10,21; s		-

Espectros realizados en Acetona-*d*₆.

^aCOSY corresponde a las correlaciones de protones con los protones indicados.

^bHMBC corresponde a la correlación del protón asignado a los carbonos indicados.

III-3.2- Obtención, purificación y elucidación estructural de 6-fenil-xantopurpurina

6-fenil-xantopurpurina (**PhX**) se obtuvo a través de la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura (Fig. 4.81), tal como se describe en el punto I-5.3-B-Materiales y Métodos.

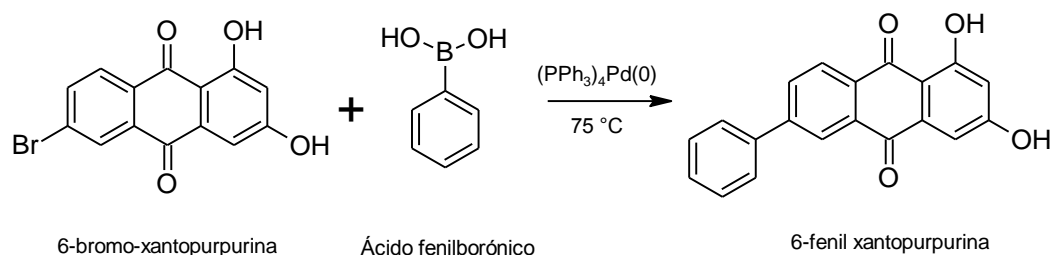


Figura 4.81. Obtención de 6-fenil-xantopurpurina (**PhX**).

El rendimiento de reacción fue de 98 % y el producto se obtuvo con una pureza de $89,8 \pm 0,3$ %, según HPLC-DAD-ESI-QTOF (Fig. 4.82), bajo condición 1 de elusión (I-6-Materiales y Métodos).

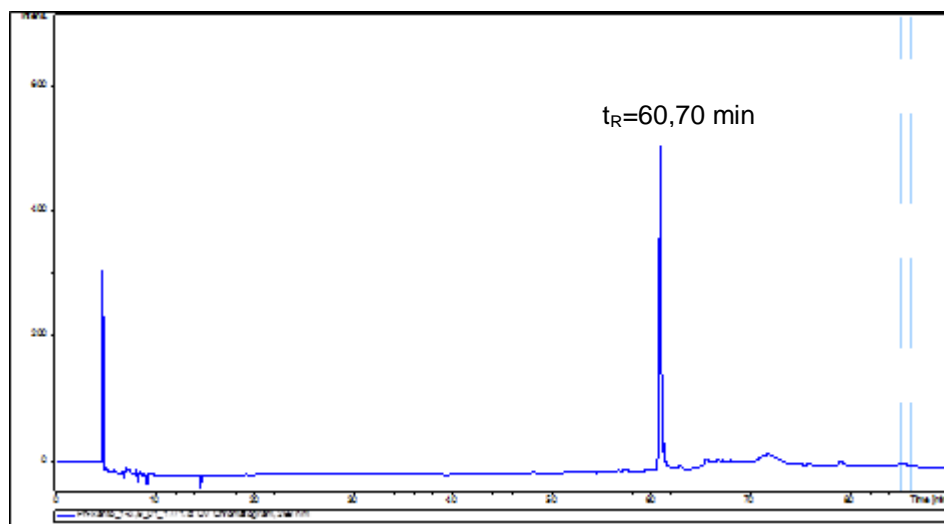


Figura 4.82. Espectro de HPLC-DAD-ESI-QTOF de 6-fenil-xantopurpurina.

La identidad se realizó mediante el análisis de sus datos espectrales. El análisis de HPLC-DAD-ESI-QTOF (Fig. 4.83) muestra la presencia del ión m/z [M-H] de 315,0675 (calculado 315,0652), confirmando el peso molecular 316,3076 g/mol correspondiente a $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_4$.

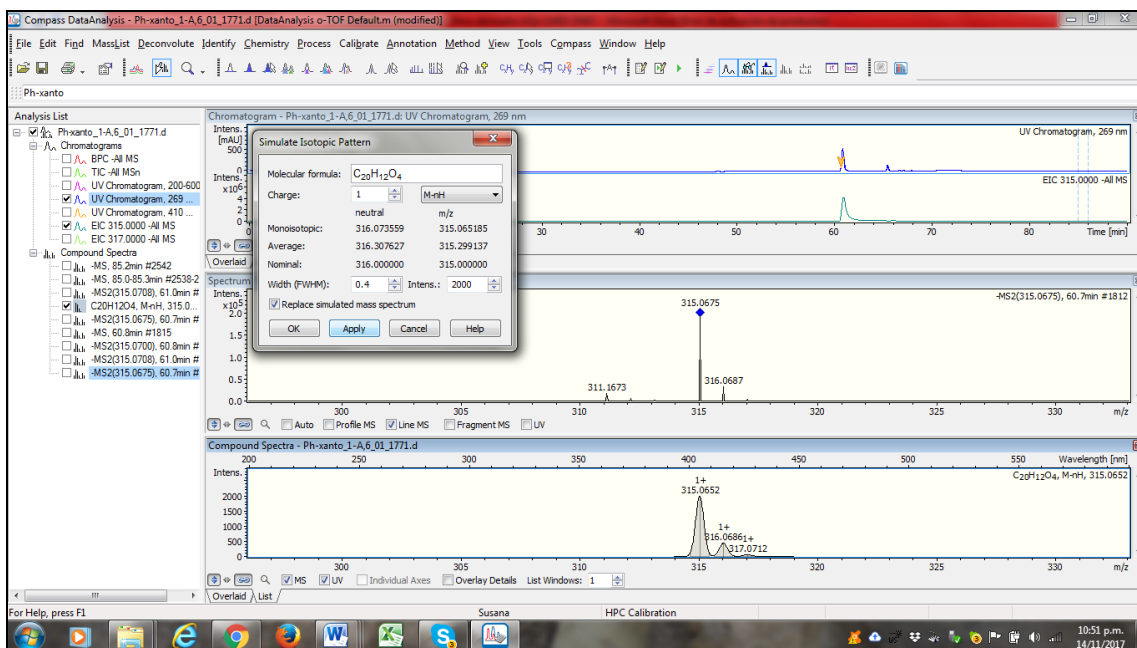


Figura 4.83. Espectro de masa obtenido por HPLC-DAD-ESI-QTOF de 6-fenil-xantopurpurina.

En la Fig. 4.84, se muestra el espectro UV-Vis de PhX en MeOH, el perfil concuerda con lo descrito para AQs (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

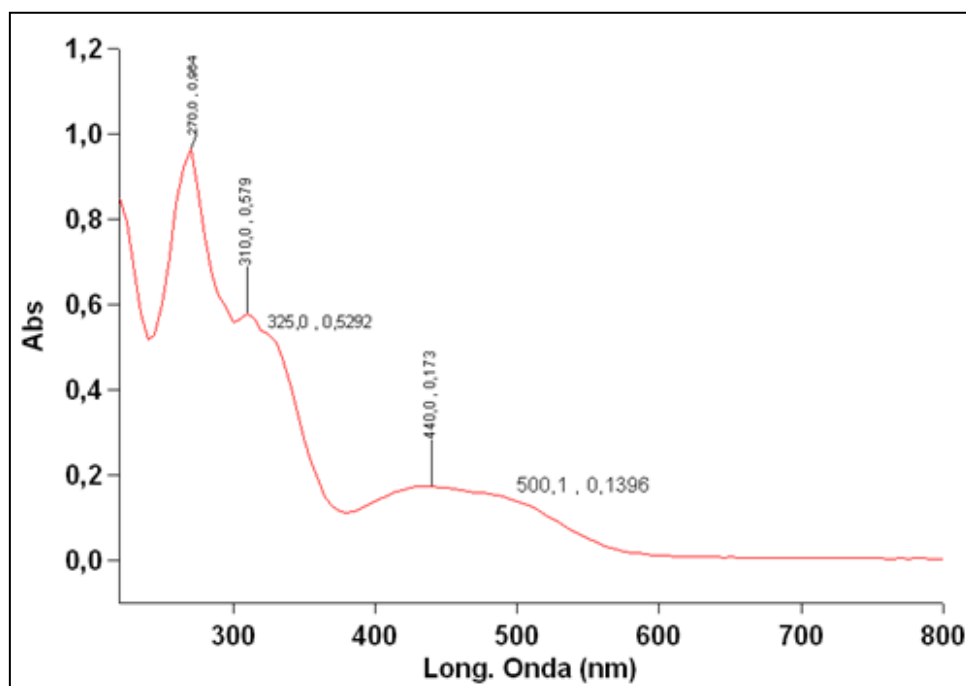


Figura 4.84. Espectro UV-Vis de 6-fenil-xantopurpurina en metanol.

La espectroscopia de RMN monodimensional (RMN- ^1H) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC) permitieron su dilucidación estructural (Fig. 4.85 a Fig. 4.88).

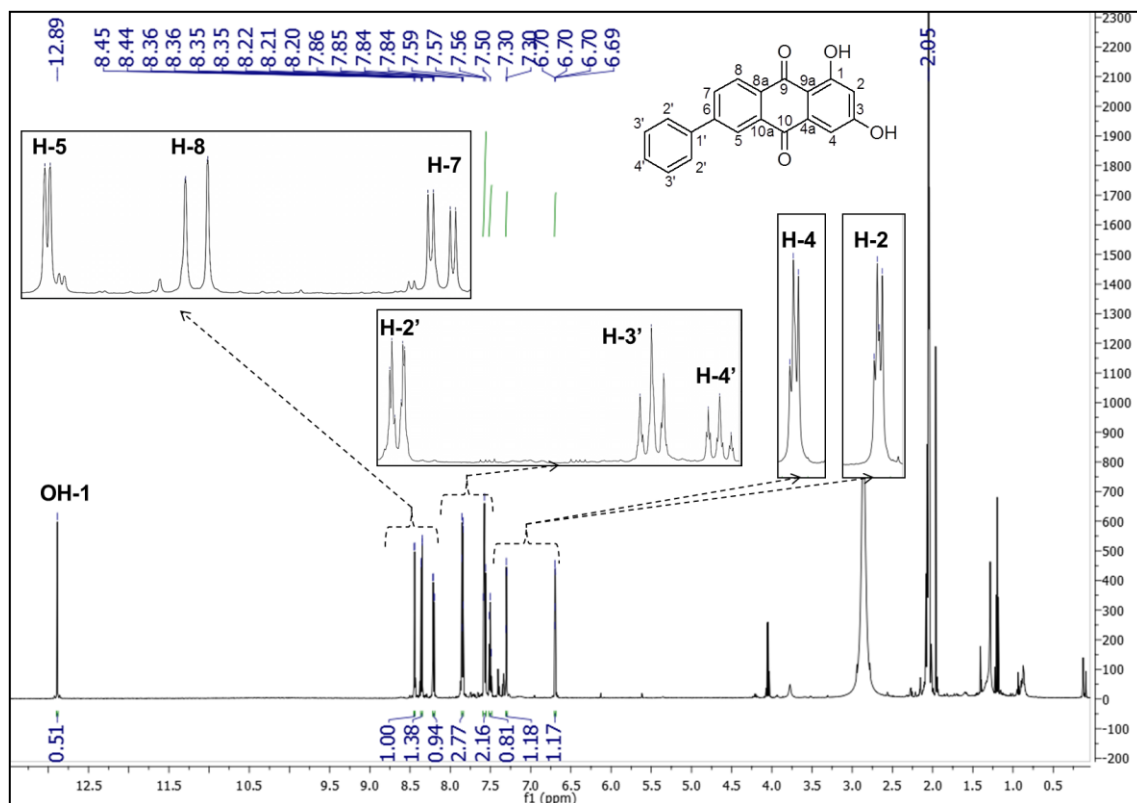


Figura 4.85. Espectro de RMN- ^1H de 6-fenil-xantopurpurina (600 MHz, acetona- d_6).

Dado que **PhX** se obtuvo de **BrX** (Fig. 4.71), en el espectro de RMN- ^1H (Fig. 4.85), se observan las señales de los cinco protones aromáticos en posición 2, 4, 5, 7 y 8. Además, se visualizan los protones aromáticos correspondientes al sustituyente fenilo, identificados como H'.

En el espectro COSY (Fig. 4.86) se observaron sólo dos correlaciones: H-7/H-8 del núcleo antraquinónico y H-2'/H-3' del sustituyente fenilo.

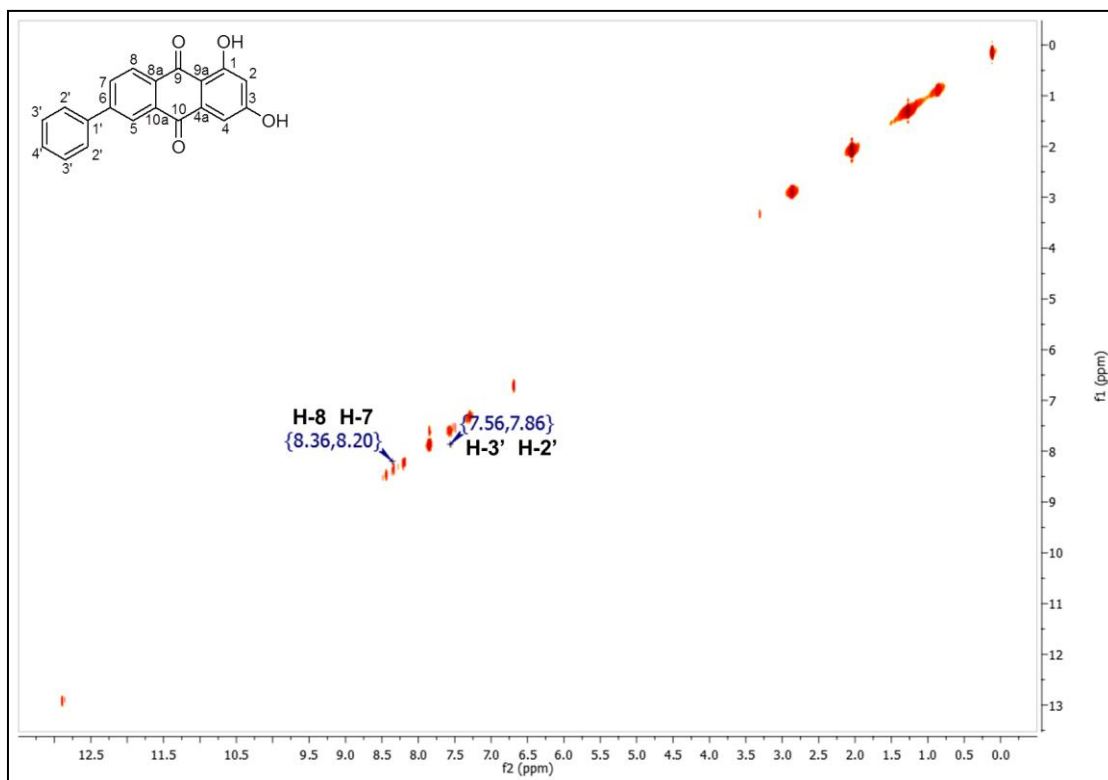


Figura 4.86. Espectro de COSY de 6-fenil-xantopurpurina (600 MHz, acetona-d6).

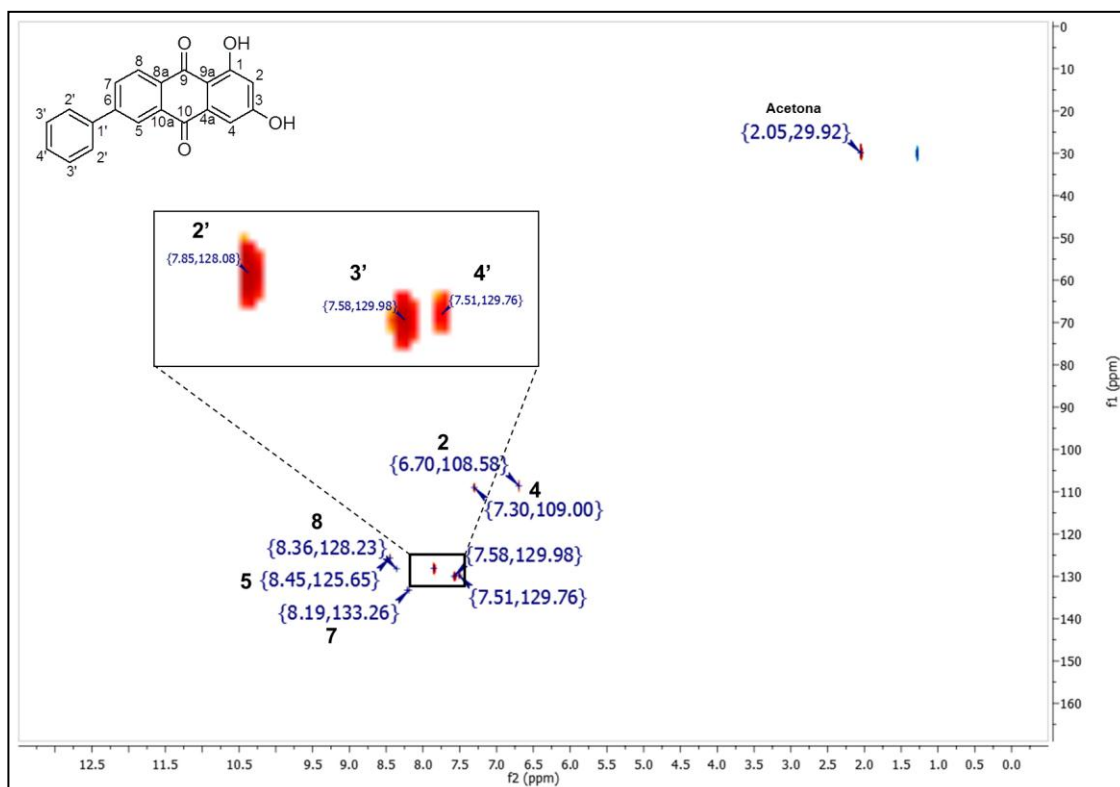


Figura 4.87. Espectro de HSQC de 6-fenil-xantopurpurina (600 MHz y 150 MHz, acetona-d6).

En el espectro HSQC (Fig. 4.87) se destacan las correlaciones C-H correspondientes al grupo fenilo, las cuales se suman a las correlaciones del núcleo antraquinona.

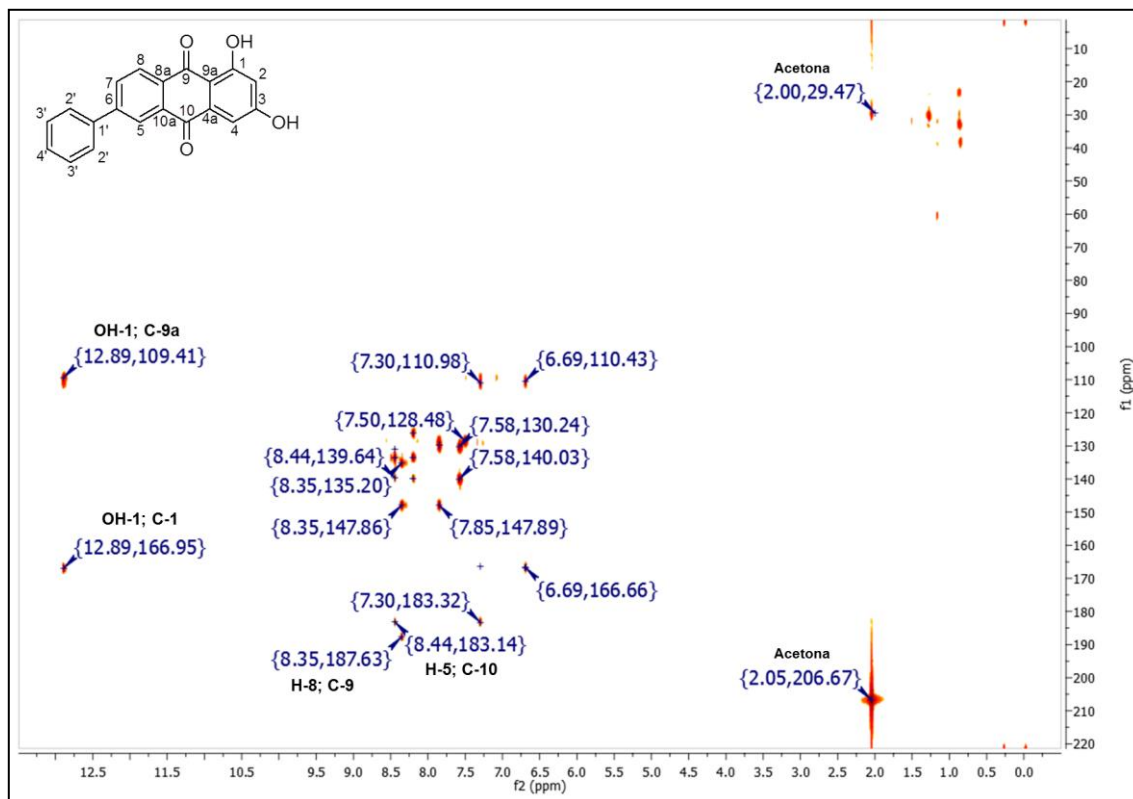


Figura 4.88. Espectro de HMBC de 6-fenil-xantopurpurina (600 MHz y 150 MHz, acetona-d6).

Con el espectro de HMBC (Fig. 4.88) se vuelve a confirmar la ubicación del grupo fenilo en posición 6; y además, se termina de asignar los corrimientos de los restantes átomos de carbono.

En la Tabla 4.22 se muestra la asignación de cada uno de los átomos pertenecientes a 6-fenil-xantopurpurina, mediante el análisis de RMN.

Tabla 4.22. Datos de RMN- H^1 y $-C^{13}$ y correlaciones COSY y HMBC para 6-fenil-xantopurpurina.

6-fenil-xantopurpurina				
Posición	δ_c , tipo	δ_H , mult., (J en Hz)	COSY ^a	HMBC ^b
1	167,0; C	-	-	-
2	108,6; CH	6,69; d ($J_m = 2,28$)	-	1, 3, 4
3	166,7; C	-	-	-
4	109,0; C	7,30; d ($J_m = 2,36$)	-	3, 4a, 10
4a	111,0; C	-	-	-
5	125,7; CH	8,44; d ($J_o = 1,68$)	-	10, 10a, 1'
6	147,9; C	-	-	-
7	133,3; CH	8,20; dd ($J_o = 8,12$; $J_m = 1,88$)	8	8a, 1'
8	128,2; CH	8,35; d ($J_m = 8,08$)	7	5, 7, 9
8a	133,6; C	-	-	-
9	187,6; C	-	-	-
9a	109,4; C	-	-	-
10	183,3; C	-	-	-
10a	134,0; C	-	-	-
1-OH	-	12,88; s	-	1, 9a
3-OH	-	10,09; s	-	-
1'	140,0; C	-	-	-
2'	128,1; CH	7,85; d ($J_m = 7,8$)	3'	6, 3'
3'	130,0; CH	7,58; t ($J_m = 7,38$)	2'	1', 4'
4'	129,8; CH	7,51; t ($J_m = 7,32$)	-	2'

Espectros realizados en acetona- d_6 .

^aCOSY corresponde a las correlaciones de protones con los protones indicados.

^bHMBC corresponde a la correlación del protón asignado a los carbonos indicados.

III-3.3- Obtención, purificación y elucidación estructural de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina

6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (**MeOPhX**) se obtuvo a través de la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura (Fig 4.89), tal como se describe en el punto I-5.3-B-Materiales y Métodos.

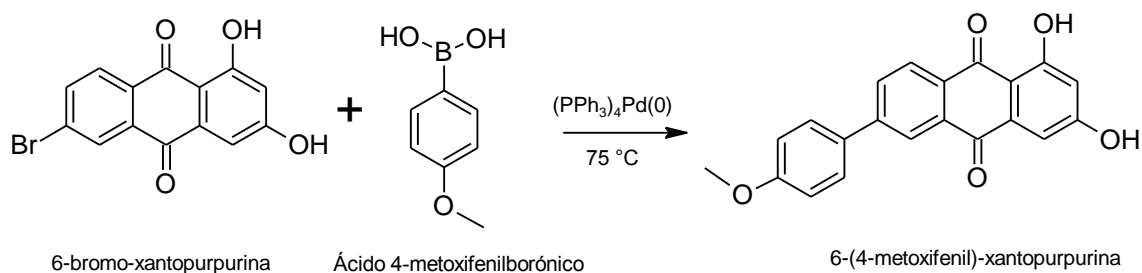


Figura 4.89. Obtención de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

El rendimiento de reacción fue de 95 % y el producto se obtuvo con una pureza de $92,3 \pm 0,2$ %, según HPLC-UV-Vis (Fig. 4.90) bajo condición 1 de elusión (punto I-6-Materiales y Métodos).

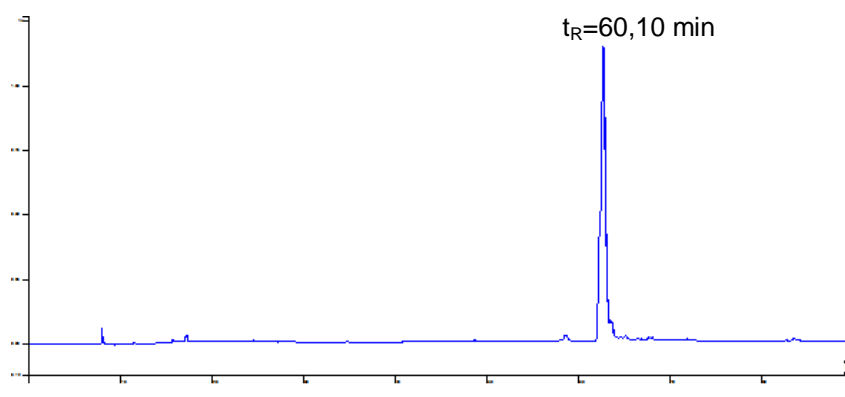


Figura 4.90. Espectro de HPLC-UV-Vis de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

La identidad se confirmó por el análisis de sus datos espectroscópicos: HPLC-DAD-ESI-QTOF, UV-Vis, RMN monodimensional (RMN- ^1H) y bidimensional (COSY, HSQC y HMBC).

El análisis de HPLC-DAD-ESI-QTOF (Fig. 4.91) muestra la presencia del ión m/z [M-H] de 345,0750 (calculado 345,0757), lo cual confirma el peso molecular 346,3329 g/mol correspondiente a $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{O}_5$.

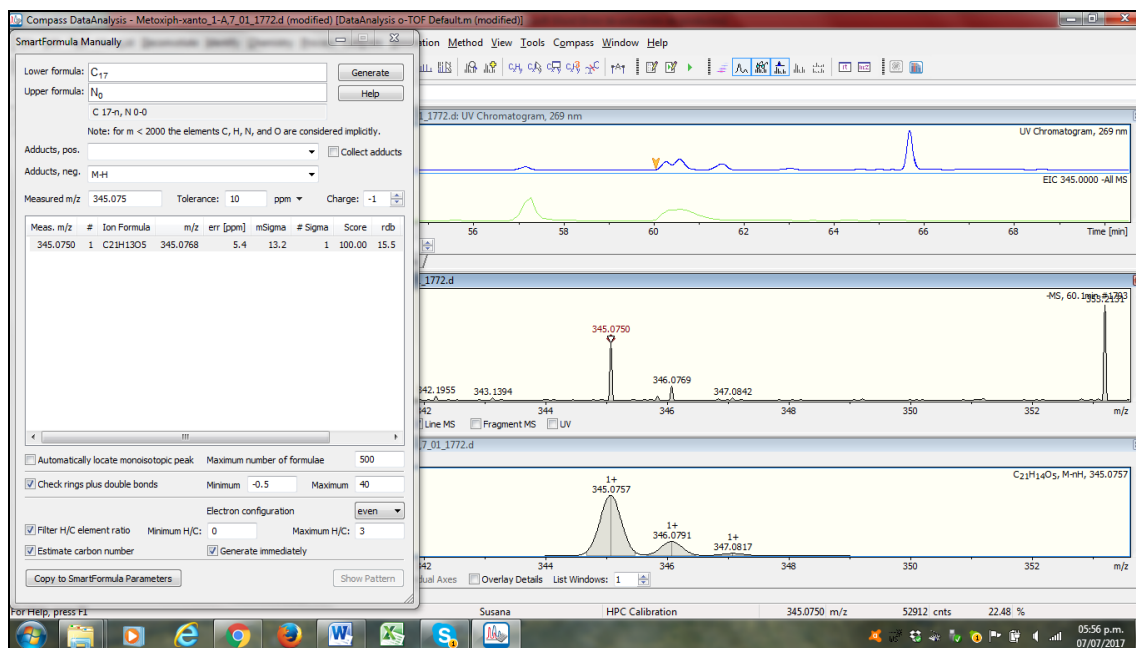


Figura 4.91. Espectro de HPLC-DAD-ESI-QTOF de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

El espectro UV-Vis (Fig. 4.92) muestra el perfil correspondiente a la estructura de una AQ (Wijnsma y Verpoorte, 1986).

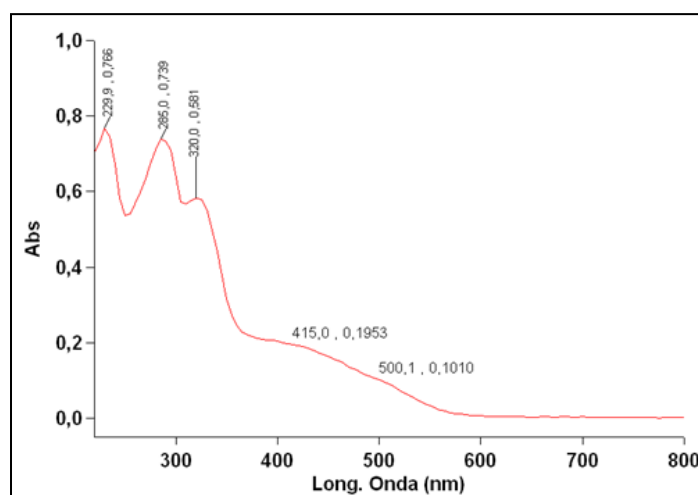


Figura 4.93. Espectro UV-Vis de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

El espectro de RMN-¹H junto a los espectros bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC) permitieron su elucidación estructural (Fig. 4.94 a Fig. 4.97).

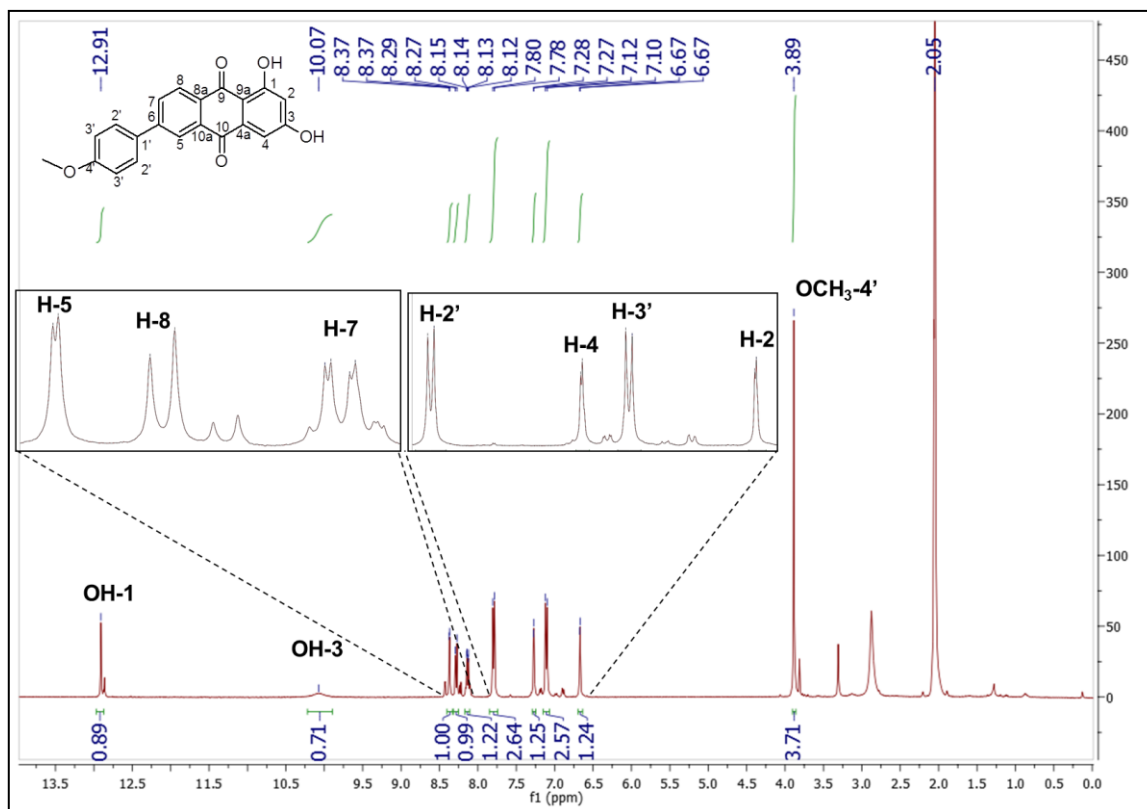


Figura 4.94. Espectro de RMN- ^1H de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (400 MHz, acetona- d_6).

Dado que **MeOPhX** se obtiene de **BrX** (Fig. 4.71), en el espectro de RMN- ^1H (Fig. 4.94) se observan los mismos protones aromáticos que para **BrX** (H-2, H-4, H-5, H-7 y H-8). A estos, se suman las señales de los protones aromáticos del sustituyente metoxifenilo (H-2' y H-3'). En este caso no se observa la señal de H-4' debido a la presencia de un metoxilo ($\text{OCH}_3\text{-4}'$) en esta posición.

En la Fig. 4.95 se muestra el espectro COSY de **MeOPhX**, donde se visualizan las correlaciones H-7/H-8 y H-2'/H-3'.

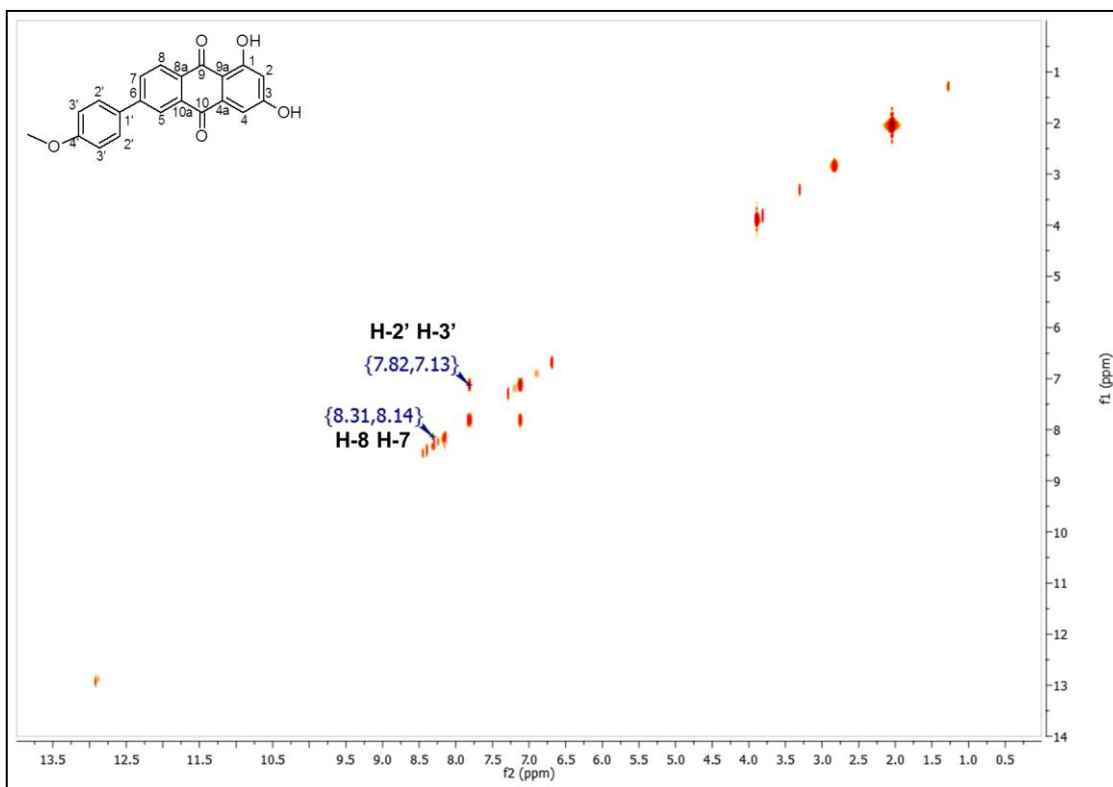


Figura 4.95. Espectro de COSY de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (400 MHz, acetona-d6).

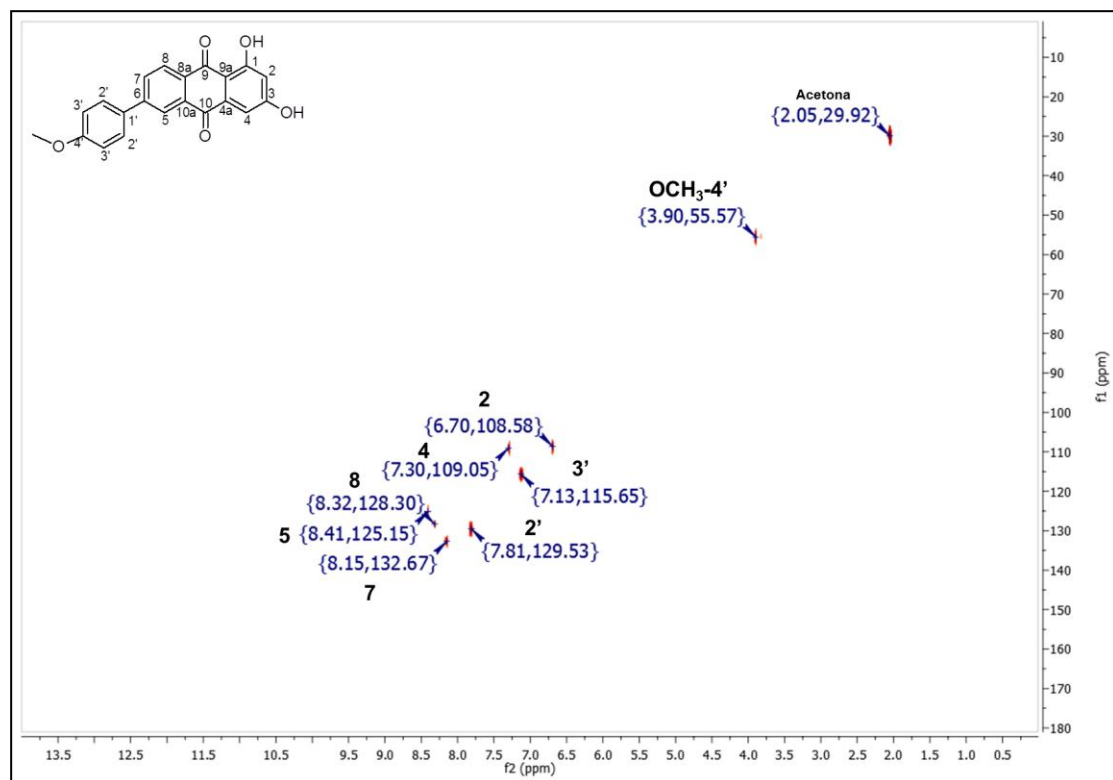


Figura 4.96. Espectro de HSQC de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (400 MHz y 100 MHz, acetona-d6).

El espectro HSQC de **MeOPhX** (Fig. 4.96) es muy similar al espectro de **PhX** (Fig. 4.87) en cuanto a las correlaciones C-H del núcleo AQ, destacándose la presencia de OCH₃-4'.

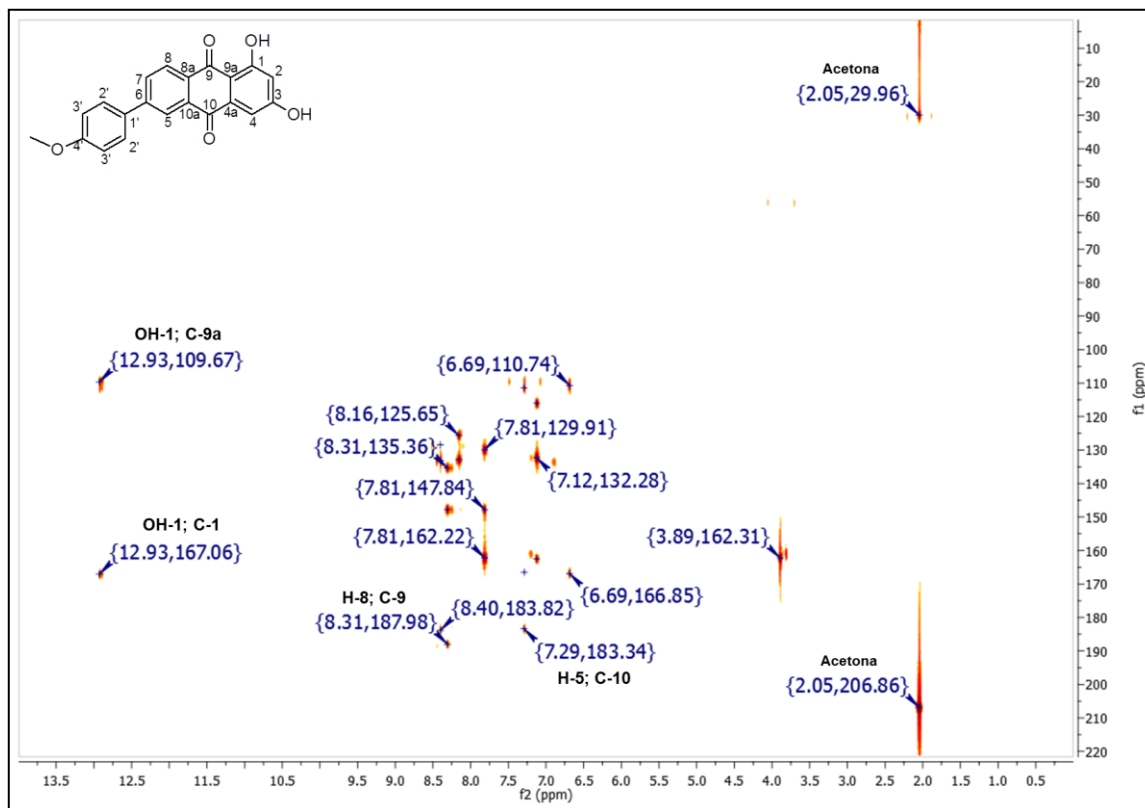


Figura 4.97. Espectro de HMBC de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (400 MHz y 100 MHz, acetona-d₆).

El espectro HMBC de **MeOPhX** (Fig. 4.97) confirma que el 4-metoxifenilo se ubica en posición 6 del núcleo AQ.

En la Tabla 4.23 se muestra la asignación de cada uno de los átomos pertenecientes a 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (Fig. 4.89), mediante el análisis de RMN.

Tabla 4.23. Datos de RMN- H^1 y $-C^{13}$ y correlaciones COSY y HMBC para 6-(4-metoxifenil)-xantopurina.

6-(4-metoxifenil)-xantopurina				
Posición	δ_c , tipo	δ_H , mult., (J en Hz)	COSY ^a	HMBC ^b
1	167,1; C	-	-	-
2	108,6; CH	6,67; d ($J_m = 2,36$)	-	1, 4
3	166,5; C	-	-	-
4	109,1; CH	7,28; d ($J_m = 2,24$)	-	3, 4a, 10
4a	111,5; C	-	-	-
5	125,2; CH	8,37; d ($J_m = 1,76$)	-	10, 10a
6	147,8; C	-	-	-
7	132,7; CH	8,14; dd ($J_o = 8,16$; $J_m = 1,92$)	8	5, 1'
8	128,3; CH	8,28; d ($J_o = 8,12$)	7	6, 8a, 9
8a	135,4; C	-	-	-
9	188,0; C	-	-	-
9a	109,7; C	-	-	-
10	183,3; C	-	-	-
10a	128,4; C	-	-	-
1-OH	-	12,91; s	-	1, 9a
3-OH	-	10,07; s	-	-
1'	132,3; C	-	-	-
2'	129,5; CH	7,79; d ($J_o = 8,80$)	3'	6, 1', 4'
3'	115,7; CH	7,11; d ($J_o = 8,76$)	2'	1', 3', 4'
4'	162,3; C	-	-	-
OCH ₃	55,6; CH ₃	3,89; s	-	4'

Espectros realizados en acetona- d_6 .^aCOSY corresponde a las correlaciones de protones con los protones indicados.^bHMBC corresponde a la correlación del protón asignado a los carbonos indicados.

III-4- Evaluación de la citotoxicidad y actividad antiviral *in vitro* de derivados antraquinónicos obtenidos por síntesis

Lucidina fue el primer derivado obtenido mediante hidrólisis de lucidina primeverósido, una AQ natural aislada de *Galium latoramosum* Clos. Lucidina es un agente mutagénico conocido, ya que ha demostrado que puede ser metabolizada a un compuesto exometilénico reactivo formando aductos covalentes con el ADN. Kawasaki *et al.*, (1994) evidenció la formación de aductos con los ácidos nucleicos adenina y guanina en condiciones fisiológicas. Estos se identificaron como productos de reacción entre la posición -2 del intermediario electrofílico antraquinónico y el átomo de nitrógeno de la base del ADN (Fig. 4.98).

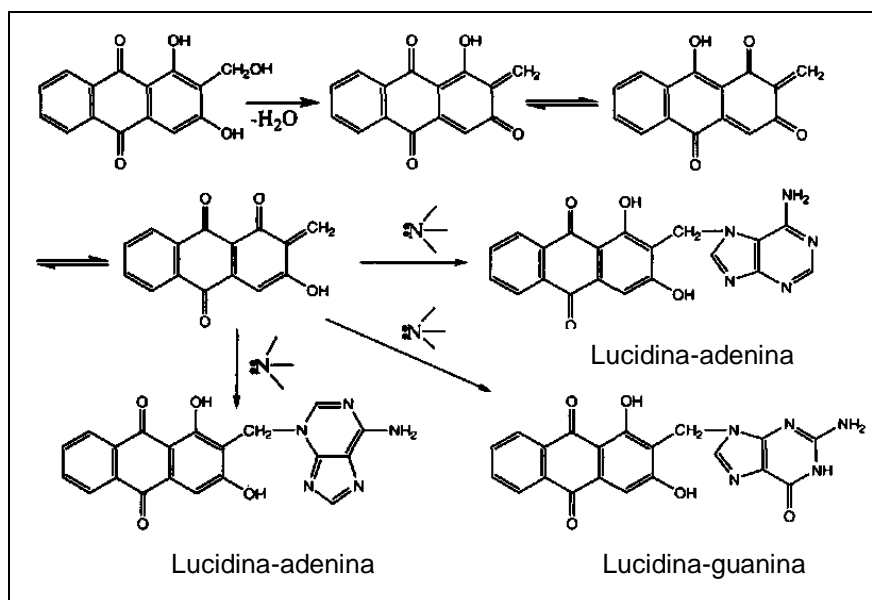


Figura 4.98. Formación de aductos entre lucidina y bases del ADN (Poginsky *et al.*, 1991; Kawasaki *et al.*, 1994) (Imagen adaptada).

Compuestos como nordamnacantal (2-formil-1,3-dihidroxi antraquinona), que no posee un grupo oximetileno en el carbono 2 del núcleo antraquinónico, no es mutagénico. Una deshidratación para generar el grupo metileno exocíclico no es posible en esta AQ (Kawasaki *et al.*, 1994). Por esta razón es que se procedió a obtener nordamnacantal a partir de lucidina con el fin de evaluar la actividad biológica de una AQ no mutagénica.

Cabe destacar que **Nor** es una AQ que se ha aislado de otras especies vegetales (Caro *et al.*, 2012; Kamiya *et al.*, 2010; Morimoto *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 1993), pero en esta tesis se obtuvo mediante hidrólisis oxidativa a partir de **Lp**. Las otras tres AQs, son derivados de xantopurpurina, que no han sido aislados de la naturaleza, aunque xantopurpurina está presente en especies vegetales del género *Galium* (El-Gamal *et al.*, 1995; Morimoto *et al.*, 2002).

III-4.1- Evaluación biológica de nordamnacantal

Se determinaron las concentraciones citotóxicas y no citotóxicas de **Nor** sobre células Vero (Tabla 4.24), utilizando la metodología descrita en el punto II-2.1-B-Materiales y Métodos. Los datos se extrajeron de la curva dosis respuesta elaborada para tal fin (Fig. 4.99).

Tabla 4.24. Valores de CC_{50} , CSubT y MCNC para nordamnacantal.

AQ	Línea celular Vero		
	CC_{50} (μ M)	CSubT (μ M)	MCNC (μ M)
Nordamnacantal	$169,6 \pm 4,5$	$81,9 \pm 9,9$	$66,0 \pm 11,8$

CC_{50} : Concentración citotóxica al 50 %, CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

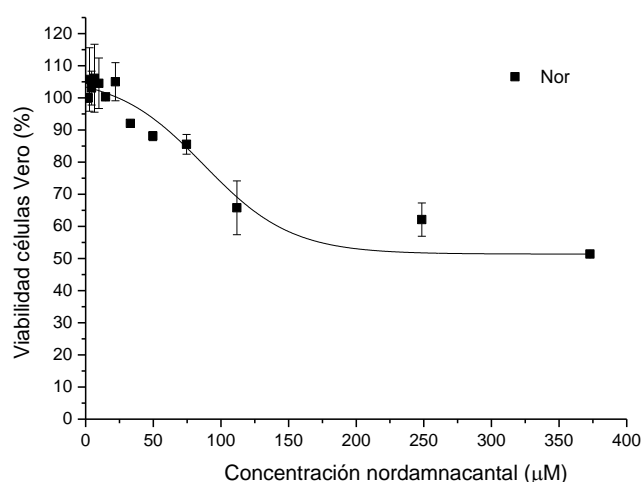
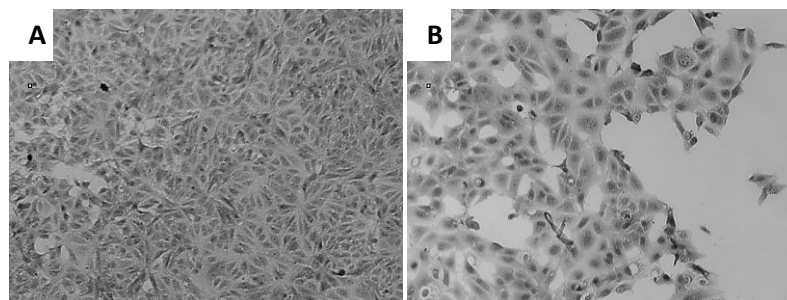


Figura 4.99. Curvas de porcentaje de viabilidad de células Vero vs concentración de nordamancatal.

En la Fig. 4.100 se observa el ECP (II-2.1-A-Materiales y Métodos) causado por **Nor** a su CC_{50} (**B**), en comparación con el control celular (**A**).



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.100. Efecto citopático de nordamnacantal sobre células Vero. **(A)** Monocapa celular sin tratar (CC). **(B)** Monocapa celular tratada con CC_{50} (169,6 μ M) de nordamnacantal.

Se ensayó la actividad antiviral *in vitro* de **Nor** frente a los tres modelos virales, mediante la metodología descrita en el punto II-2.3-A-Materiales y Métodos. Tal como se observa en la Fig. 4.101, **Nor** sólo exhibió actividad frente a HSV-1, puesto que logró mantener la viabilidad de la célula hospedadora por encima de la viabilidad de las células infectadas sin tratamiento (CV).

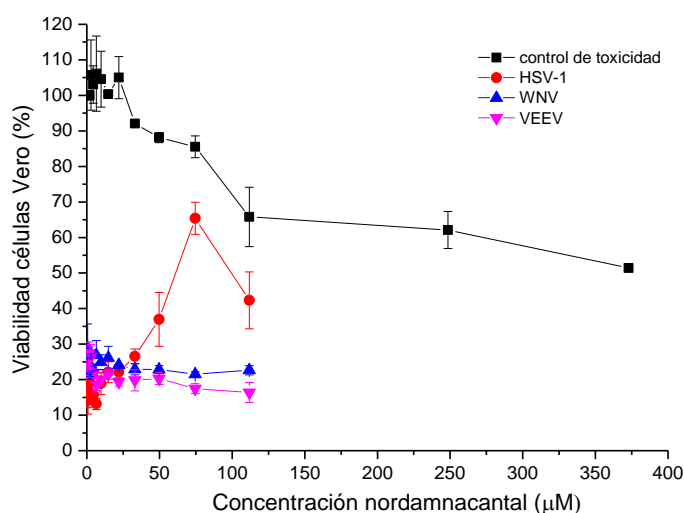


Figura 4.101. Actividad antiviral *in vitro* de nordamnacantal sobre tres virus infectando células Vero, expresada como porcentaje de viabilidad celular.

HSV-1: (virus Herpes Simple Tipo 1), WNV (virus West Nile), VEEV (virus Encephalitis Equino Venezolana). Control citotoxicidad (células Vero tratadas con Nor). Control viral (células Vero infectadas y sin tratar, **Nor** = 0 μ M).

A través de la elaboración de una curva de inhibición de HSV-1 a distintas concentraciones de **Nor** (Fig. 4.102), se determinaron los % I a las concentraciones no citotóxicas de la AQ y el IS. **Nor** fue capaz de inhibir aproximadamente en un $72,3 \pm 4,2$ % al HSV-1 a una concentración subtóxica y con un IS de 6,0.

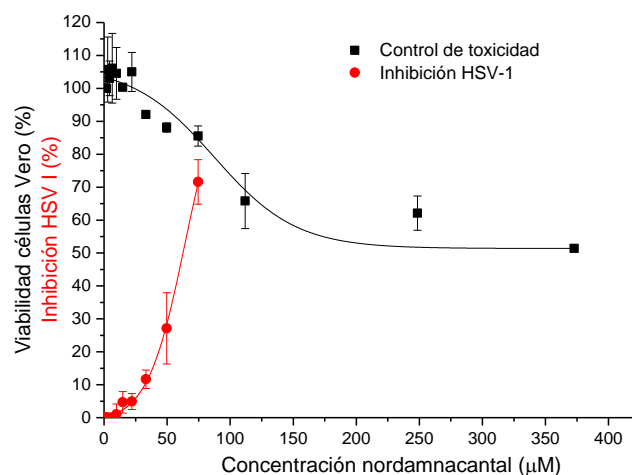


Figura 4.102. Curva de inhibición del HSV-1 y curva de citotoxicidad sobre células Vero por acción de nordamnacantal.

Nor es una AQ natural que suele encontrarse en algunas especies del género *Galium* (Morimoto *et al.*, 2002). Sin embargo, por medio del análisis químico de los extractos de raíces de *G. latoramosum*, se confirmó que esta AQ no se encuentra presente en las raíces de esta especie vegetal (Tabla 4.3). De esta manera, la semisíntesis de AQ, resultó ser una importante herramienta para la obtención de derivados con actividad antiviral *in vitro*.

III-4.2- Evaluación biológica de 6-bromo-xantopurpurina

Se estimaron las concentraciones citotóxicas y no citotóxicas de **BrX** sobre células Vero (Tabla 4.25) a partir de las curvas de % de VC vs concentraciones (Fig. 4.103), aplicando la metodología descrita en el punto II-2.1-B-Materiales y Métodos.

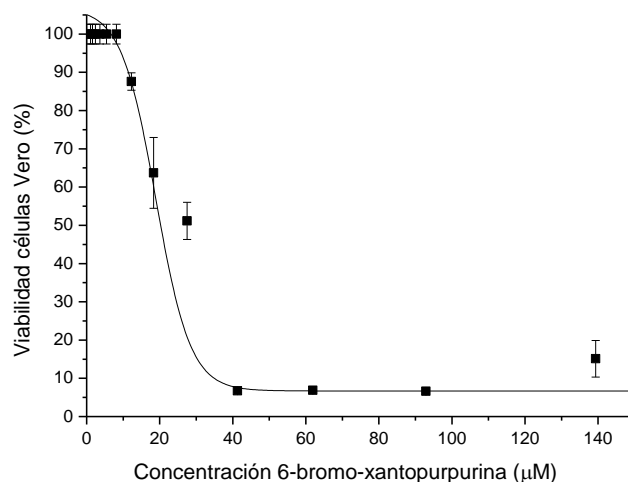


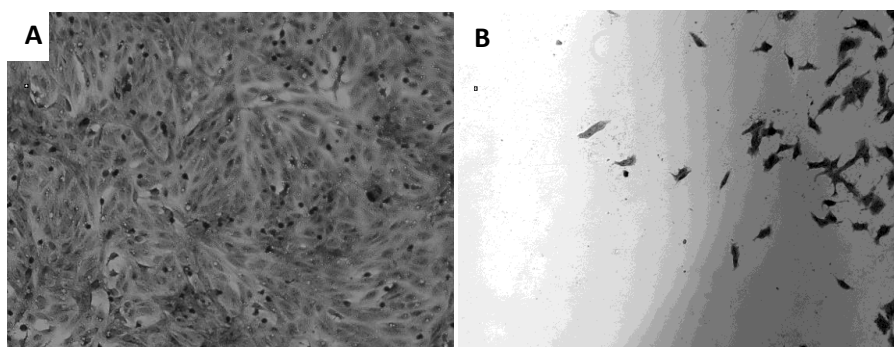
Figura 4.103. Curvas de porcentaje de viabilidad de células Vero vs concentración de 6-bromo-xantopurpurina.

Tabla 4.25. Valores de CC₅₀, CSubT y MCNC para 6-bromo-xantopurpurina.

AQ	Línea celular Vero		
	CC ₅₀ (µM)	CSubT (µM)	MCNC (µM)
6-bromo-xantopurpurina	26,3 ± 3,4	15,7 ± 2,9	10,0 ± 1,7

CC₅₀: Concentración citotóxica al 50 %, CSubT: Concentración subtóxica, MCNC: máxima concentración no citotóxica.

En la Fig 4.104 se observa el ECP (II-2.1-A-Materiales y Métodos) causado por **BrX** a su CC₅₀ sobre las células Vero y en comparación al CC.



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.104. Efecto citopático de 6-bromo-xantopurpurina sobre células Vero. **(A)** Monocapa celular sin tratar (CC). **(B)** Monocapa celular tratada con CC₅₀ (26,3 µM) de 6-bromo-xantopurpurina.

Se evaluó la actividad antiviral de **BrX** frente a los tres modelos virales, mediante la metodología descrita en el punto II-2.3-A-Materiales y Métodos. Tal como se observa en la Fig. 4.105, **BrX** no inhibió a ninguno de los virus ensayados a concentraciones no citotóxicas para la célula hospedadora.

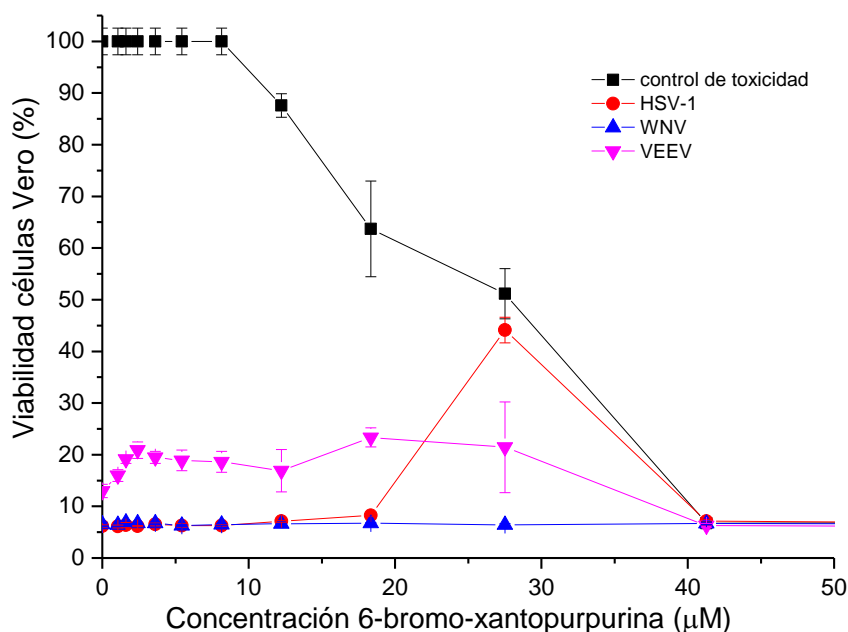


Figura 4.105. Porcentaje de viabilidad de las células Vero infectadas con distintos virus y tratadas con diferentes concentraciones de 6-bromo-xantopurpurina.

HSV-1: (virus Herpes Simple Tipo 1), WNV (virus West Nile), VEEV (virus Encefalitis Equino Venezolana).
Control citotoxicidad (células Vero tratadas con BrX). Control viral (células Vero infectadas y sin tratar, **BrX** = 0 µM)

III-4.3- Evaluación biológica de 6-fenil-xantopurpurina

Se determinaron las concentraciones citotóxicas y no citotóxicas de **PhX** sobre células Vero (Tabla 4.26) a partir de las curvas de % de VC vs concentraciones (Fig. 4.106), utilizando la metodología descrita en el punto II-2.1-B-Materiales y Métodos.

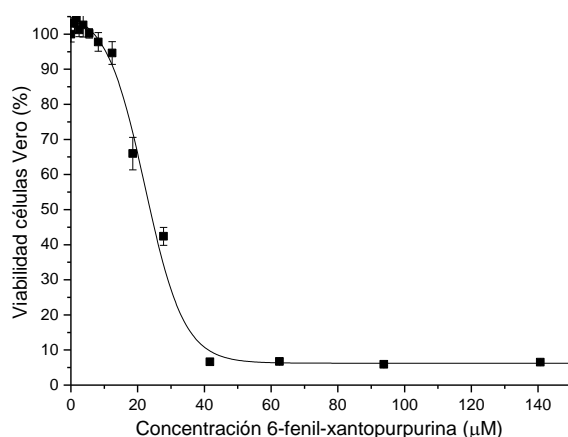


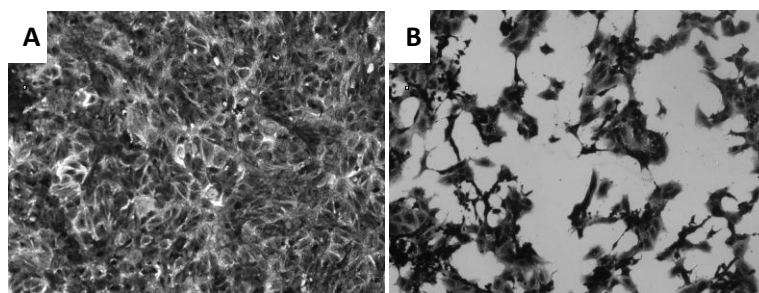
Figura 4.106. Curvas de porcentaje de viabilidad de células Vero vs concentración de 6-fenil-xantopurpurina.

Tabla 4.26. Valores de CC_{50} , C_{SubT} y $MCNC$ para 6-fenil-xantopurpurina.

AQ	Línea celular Vero		
	CC_{50} (µM)	C_{SubT} (µM)	$MCNC$ (µM)
6-fenil-xantopurpurina	$24,2 \pm 1,1$	$15,1 \pm 1,1$	$11,2 \pm 1,1$

CC_{50} : Concentración citotóxica al 50 %, C_{SubT} : Concentración subtóxica, $MCNC$: máxima concentración no citotóxica.

En la Fig 4.107 se observa el ECP (II-2.1-A-Materiales y Métodos) causado por **PhX** a su CC_{50} sobre células Vero y en comparación con el CC.



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.107. Efecto citopático de 6-fenil-xantopurpurina sobre células Vero. **(A)** Monocapa celular sin tratar (CC). **(B)** Monocapa celular tratada con CC_{50} ($24,2 \mu\text{M}$) de 6-fenil-xantopurpurina.

Se estudió la actividad antiviral *in vitro* de **PhX** frente a los tres modelos virales, mediante la metodología descrita en el punto II-2.3-A-Materiales y Métodos. Tal como se observa en la Fig. 4.108, **PhX** exhibió una leve inhibición sobre el HSV-1 ($34,9 \pm 4,2$ % I) y WNV ($23,4 \pm 2,1$ % I) a concentraciones no citotóxicas para la célula hospedadora, consideradas poco significativas (< 50 % I).

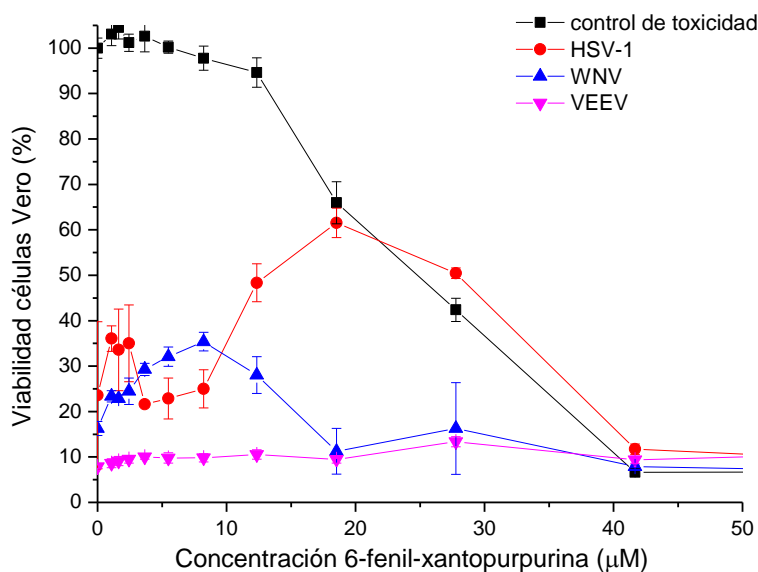


Figura 4.108. Porcentaje de viabilidad de las células Vero infectadas con distintos virus y tratadas con diferentes concentraciones de 6-fenil-xantopurpurina.

HSV-1: (virus Herpes Simple Tipo 1), WNV (virus West Nile), VEEV (virus Encephalitis Equino Venezolana).
Control citotoxicidad (células Vero tratadas con BrX). Control viral (células Vero infectadas y sin tratar, **Ph-X** = 0 µM)

III-4.4- Evaluación biológica de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina

A partir de las curvas de % de VC vs concentraciones (Fig. 4.109), se determinaron las concentraciones citotóxicas y no citotóxicas de **MeOPhX** sobre células Vero (Tabla 4.27), utilizando la metodología descrita en el punto II-2.1-B-Materiales y Métodos.

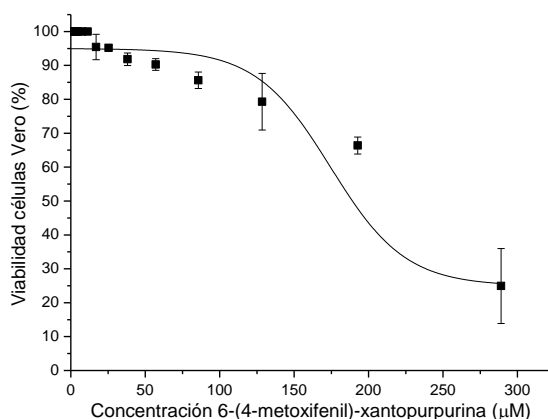


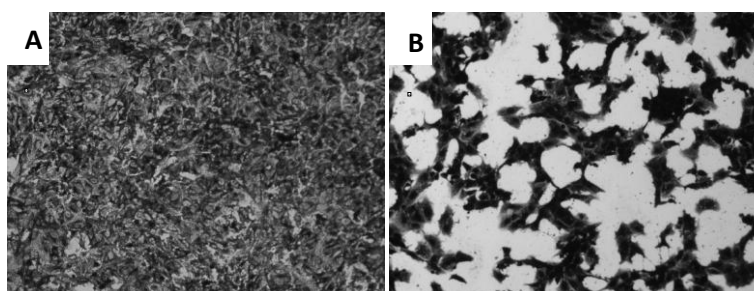
Figura 4.109. Curvas de porcentaje de viabilidad de células Vero vs concentración de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

Tabla 4.27. Valores de CC_{50} , $CSubT$ y $MCNC$ para 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

AQ	Línea celular Vero		
	CC_{50} (µM)	$CSubT$ (µM)	$MCNC$ (µM)
6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina	$213,7 \pm 44,0$	$121,5 \pm 28,4$	$74,4 \pm 17,9$

CC_{50} : Concentración citotóxica al 50 %, $CSubT$: Concentración subtóxica, $MCNC$: máxima concentración no citotóxica.

En la Fig 4.110 se observa el ECP (II-2.1-A-Materiales y Métodos) causado por **MeOPhX** a su CC_{50} sobre células Vero y en comparación con el CC.



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.110. Efecto citopático de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina sobre células Vero. **(A)** Monocapa celular sin tratar (CC). **(B)** Monocapa celular tratada con CC_{50} ($213,7 \mu M$) de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

Se evaluó la actividad antiviral *in vitro* de **MeOPhX** frente a los tres modelos virales, mediante la metodología descrita en el punto II-2.3-A-Materiales y Métodos. En la Fig. 4.111 se puede observar que **MeOPhX** exhibió buena actividad frente al WNV y moderada actividad contra el HSV-I, puesto que logró mantener la viabilidad de la célula hospedadora por encima de la viabilidad de las células infectadas sin tratamiento (CV).

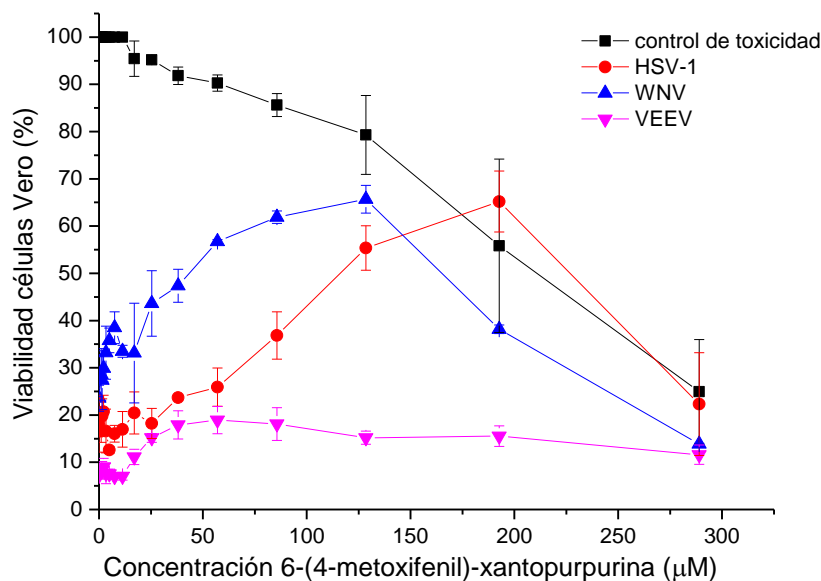


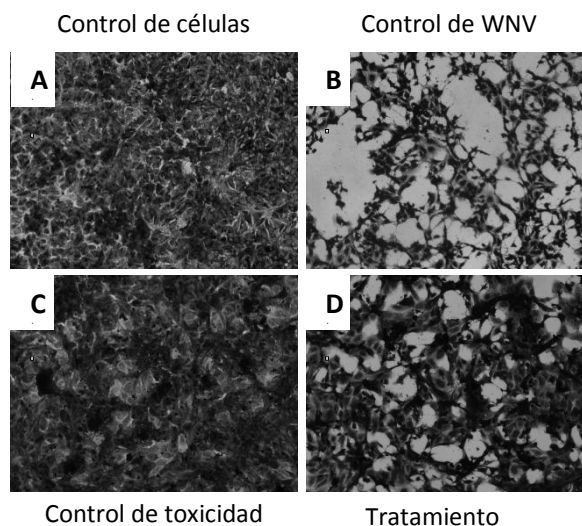
Figura 4.111. Porcentaje de viabilidad de las células Vero infectadas con distintos virus y tratadas con diferentes concentraciones de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

HSV-1: (virus Herpes Simple Tipo 1), WNV (virus West Nile), VEEV (virus Encephalitis Equino Venezolana).

Control citotoxicidad (células Vero tratadas con BrX).

Control viral (células Vero infectadas y sin tratar, **MeOPh-X** = 0 µM)

La inhibición del WNV también puede ser observada en la Fig. 4.112, donde el ECP viral del tratamiento (Fig. 4.112.D) se encuentra reducido comparado a su respectivo CV (células afectadas por el WNV y no tratadas, Fig. 4.112.B).



Magnificación 200x con microscopía óptica de fase invertida.

Figura 4.112. Efecto citopático causado por WNV en células Vero. **(A)** Control celular: no infectadas y sin tratar. **(B)** Control viral: células infectadas y sin tratar. **(C)** Control de toxicidad: células no infectadas y tratadas con 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (**MeOPhX**) a la CSubT (121,5 μ M) y **(D)** Tratamiento: células infectadas y tratadas con **MeoPhX** a la CSubT.

A través de la elaboración de una curva de inhibición del WNV y HSV-1 a distintas concentraciones de **MeOPhX** (Fig. 4.113), se estimaron los % I a las concentraciones no citotóxicas de esta AQ y el IS. **MeOPhX** fue capaz de inhibir aproximadamente en un $77,3 \pm 1,5$ % al WNV, presentando un IS de 3,4; mientras que inhibió al HSV-1 en un $55,8 \pm 6,7$ % y mostrando un IS de 1,9 a una CSubT.

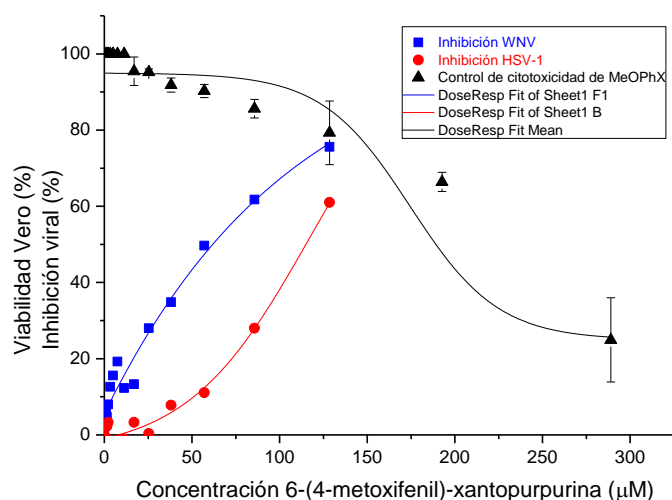


Figura 4.113. Curvas de inhibición sobre los virus WNV y HSV-1 y curva de citotoxicidad sobre células Vero por acción de 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina.

Mediante la síntesis total del núcleo antraquinónico, se logró obtener tres derivados de xantopurpurina, de los cuales sólo 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina fue bioactivo. Este derivado presentó un moderado efecto antiviral sobre el HSV-1 e inhibió significativamente al WNV, actividad que no había sido observada para ninguna de las AQ evaluadas en esta tesis.

III-5- Inactivación viral fotoestimulada *in vitro*

En virtud de los resultados previamente obtenidos para **Sor** y **Bisor**, se decidió evaluar si algunas de las AQs aisladas de *G. latoramosum* y obtenidas por síntesis, poseían capacidad de inactivar partículas virales en presencia de irradiación.

En general, se busca que el fotosensibilizador no exhiba efecto en oscuridad, pero que si lo haga bajo la acción de la luz. Por ello, se eligió estudiar **Lp**, una AQ aislada de *G. latoramosum* que no presentó actividad antiviral bajo condiciones normales de irradiación (Fig. 4.14). Entre las AQs obtenidas por síntesis, se decidió ensayar 6-bromo-xantopurpurina (**BrX**) que tampoco fue activa (Fig. 4.105), y sobre la base que la presencia del átomo

halogenado puede ayudar al efecto fotosensibilizante (Valeur, 2001; Skoog *et al.*, 2001).

Se aplicó la metodología descrita en el punto II-2.4-Materiales y Métodos, evaluando solamente la acción sobre el HSV-1.

III-5.1- Evaluación de lucidina primeverósido

En la Fig. 4.114, se compara la viabilidad de las células hospedadoras tratadas con **Lp** a su MCNC, con el porcentaje inactivación viral logrado por esta AQ a la misma concentración sobre las partículas virales extracelulares e intracelulares, bajo dos condiciones experimentales: oscuridad e irradiación.

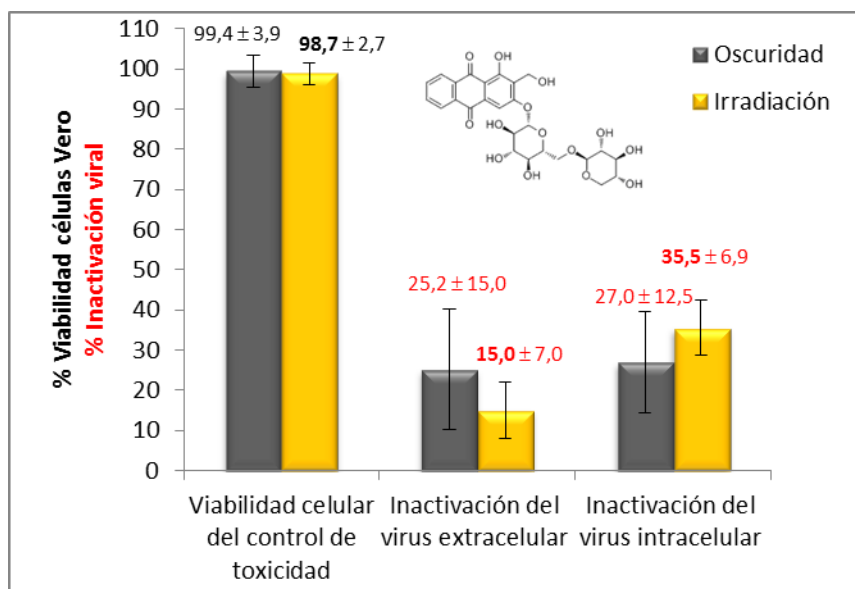


Figura 4.114. Viabilidad de la célula hospedadora tratada con lucidina primeverósido a su MCNC (566,3 μM) y % de inactivación del HSV-1 extra e intracelular por acción de lucidina primeverósido (MCNC) en oscuridad y bajo irradiación.

Se observa que **Lp** bajo la acción de la luz, no redujo la viabilidad de las células hospedadoras y tampoco logró fotoestimular la inactivación viral, ya que los porcentajes de inactivación viral con irradiación son similares a sus respectivos valores en oscuridad y menores al 40 %. Por lo tanto, **Lp** no es fotoactiva en las condiciones ensayas.

III-5.2- Evaluación de 6-bromo-xantopurpurina

En la Fig. 4.115, la combinación de **BrX** a su MCNC con irradiación no redujo la viabilidad de las células hospedadoras. Sin embargo, bajo irradiación logró inactivar las partículas virales extracelulares en un $72,6 \pm 2,9$ % y en un $83,3 \pm 4,4$ % las partículas virales intracelulares. En base a la inactivación viral fotoestimulada por **BrX**, podemos concluir que esta AQ es fotoactiva y presenta la ventaja sobre todas las AQs ensayadas en esta tesis que no produce efectos sobre la célula hospedadora, aún bajo irradiación.

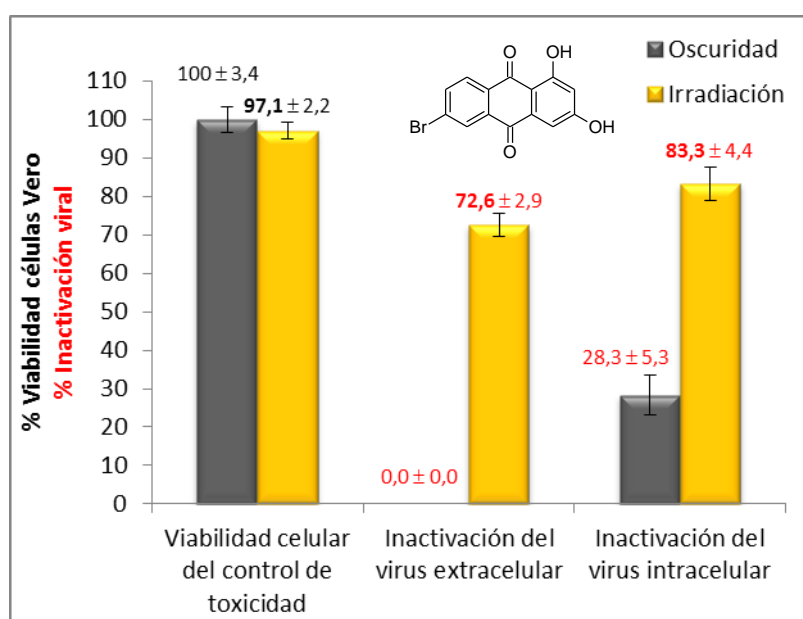


Figura 4.115. Viabilidad de la célula hospedadora tratada con 6-bromo-xantopurpurina a su MCNC ($10,0 \mu\text{M}$) y % de inactivación del HSV-1 extra e intracelular por acción de 6-bromo-xantopurpurina (MCNC) en oscuridad y bajo irradiación.

III-6- Discusión de resultados sobre otros derivados antraquinónicos

A partir del análisis de los valores de la CC_{50} de los derivados de xantopurpurina (obtenidos por síntesis), se determinó que 6-bromo-xantopurpurina y 6-fenil-xantopurpurina son las AQs más citotóxicas sobre células Vero (Tablas 4.25 y 4.26), bajo las condiciones ensayadas. La

incorporación de un grupo metoxi (-OCH₃) al sustituyente fenilo en la posición 6 del núcleo antraquinona, disminuyó la citotoxicidad para 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (Tabla 4.27). Los dos primeros derivados no resultaron de interés porque además de ser citotóxicos, no presentaron una considerable actividad sobre los virus ensayados en este trabajo: HSV-1, WNV y VEEV (Figs. 4.105 y 4.108). Mientras la adición de un átomo de Br en la posición 6 del núcleo de xantopurpurina no le confirió efecto antiviral al derivado, la sustitución por un grupo fenilo en esta posición le otorgó una leve inhibición sobre el HSV-1 y WNV a concentraciones no citotóxicas para la célula hospedadora. Esta actividad antiviral considerada poco significativa fue incrementada por la adición de un grupo metoxilo en posición 4 del sustituyente fenilo (Fig. 4.111). Así, se destaca 6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina por ser la única AQ estudiada que posee una importante actividad antiviral contra WNV. Además, exhibió un moderado efecto antiherpético.

Nordamnacantal sólo presentó efecto sobre el HSV-1, con un buen IS y logrando aproximadamente un 72 % I a su CSubT (Fig. 4.102). Se destaca haber obtenida esta AQ a partir de un metabolito secundario inactivo y que es predominante en *G. latomorosum*, como es lucidina primeverósido. De esta manera, se le ha dado una utilidad a este metabolito secundario, de fácil obtención en alta cantidad a partir del material vegetal, a través de una metodología simple como es la recristalización.

Adicionalmente, se demostró que lucidina primeverósido no logró la fotoinactivación viral bajo las condiciones ensayadas; por tanto, se estableció en forma indirecta que esta AQ glicosilada no sería fotoactiva.

Por otra parte, 6-bromo-xantopurpurina que no mostró poseer actividad antiviral (Fig. 4.105), logró inactivar las partículas del HSV-1 bajo irradiación (Fig. 4.115), demostrando ser una AQ fotoactiva. Lo destacable de esta AQ es que cuando se utiliza a su MCNC, actúa tanto sobre el virus extracelular como intracelular mediante un mecanismo de fotosensibilización, sin afectar la viabilidad de las células hospedadoras, incluso bajo irradiación. Por esta razón, se la podría considerar un agente antiviral con posible aplicación en terapia fotodinámica.

IV- Discusión general

El desarrollo de esta tesis permitió obtener y evaluar 8 AQs, que presentaron diversas actividades frente a los virus estudiados: HSV-1 (genoma ADN), WNV y VEEV, estos dos últimos con genoma ARN. Cuatro de ellas se obtuvieron de especies vegetales autóctonas, pertenecientes a la familia de las Rubiáceas: **lucidina primeverósido (Lp)** y **2-isobutil éster de munjistina (Im)** de ***Galium latoramosum* Clos**, esta última una AQ nueva para esta familia de compuestos; y por otra parte, **soranjidiol (Sor)** y **bisoranjidiol (Bisor)** de ***Heterophyllaea pustulata* Hook. f.**

Aprovechando el recurso brindado por *G. latoramosum*, respecto al alto rendimiento de **Lp**, se utilizó esta AQ glicosilada como precursor para la obtención de **nordamnacantal (Nor)**; una AQ aglicón de origen natural, previamente informada para otras especies vegetales, que en esta tesis se obtuvo por semisíntesis.

Paralelamente, considerando el análisis químico realizado a *G. latoramosum* donde se observó la presencia de xantopurpurina, cuyos derivados han mostrado ser bioactivos (Wei *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001), se desarrolló una estrategia de síntesis que permitió obtener 3 derivados sintéticos de esta AQ: **6-bromo-xantopurpurina (BrX)**, **6-fenil-xantopurpurina (PhX)**, y **6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (MeOPhX)**.

Mediante el análisis de los valores de CC_{50} , se determinó que **BrX** y **PhX** son las AQs más citotóxicas sobre células Vero, usadas como células hospedadoras de los virus ensayados; y la menos citotóxica fue la antraquinona glicosilada **Lp**.

Respecto a la actividad antiviral *in vitro*, **Lp** fue la única AQ que no mostró actividad sobre ninguno de los virus estudiados. Las restantes AQs exhibieron diferentes grados de efecto antiherpético *in vitro*, destacándose **Im** y **Nor**. El derivado de munjistina (**Im**) produjo aproximadamente un 100 % I a la concentración que asegura el 80 % de viabilidad celular (CSubT), con un índice de selectividad promisorio para un compuesto de origen natural (IS = 8,7). Por su parte, **Nor** logró cerca de un 72 % I del HSV-1 a su CSubT. Este último resultado, demuestra que la semisíntesis resultó ser una importante herramienta para la obtención de derivados con actividad antiviral *in vitro*, partiendo de un metabolito secundario mayoritario e inactivo (**Lp**) para lograr un compuesto bioactivo (**Nor**).

Tabla 4.28. Derivados antraquinónicos estudiados: Citotoxicidad, actividad antiviral e inactivación viral fotoestimulada.

Derivados antraquinónicos		Citotoxicidad en Vero CC ₅₀ (μM)	Actividad antiviral (% I) ¹			Inactivación viral fotoestimulada (% I) ¹	
Nombre	Estructura		HSV-1	WNV	VEEV	HSV-1	
						Extracelular	Intracelular
Lucidina primeverosido (Lp)		> 1771,5	SI ²	SI	SI	SI	SI
Isobutil éster de munjistina (Im)		529,5 ± 23,6	98,9 ± 2,8	SI	SI	ND ³	
Soranjidiol (Sor)		> 393,0	19,1 ± 6,4	ND	ND	SI	81,7 ± 2,1
Bisoranjidiol (Bisor)		112,2 ± 3,3	37,9 ± 3,0	ND	ND	SI	89,8 ± 1,7
Nordamnacantal (Nor)		169,6 ± 4,5	72,3 ± 4,2	SI	SI	ND	
6-bromo-xantopurpurina (BrX)		26,3 ± 3,4	SI	SI	SI	72,6 ± 2,9	83,3 ± 4,4
6-fenil-xantopurpurina (PhX)		24,2 ± 1,1	34,9 ± 4,2	23,4 ± 2,1	SI	ND	
6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (MeOPhX)		213,7 ± 44,0	55,8 ± 6,7	77,3 ± 1,5	SI	ND	

1. Determinado a la CSubT de cada AQ y expresado como % de Inhibición

2. SI: Sin inhibición/ Sin inactivación fotoestimulada.

3. ND: No determinado.

Estudios más específicos realizados sobre la actividad antiherpética de **Im**, señalaron que este nuevo compuesto actúa luego de que el virus ingresa a la célula, durante estadios tempranos post-adsorción viral. Esto indicaría que **Im** podría estar interviniendo en la síntesis de las proteínas virales inmediatamente tempranas (Tomé *et al.*, 2007). De esta manera, esta AQ estaría impidiendo finalizar el ciclo de replicación del virus, necesario para generar nuevas partículas virales que salen de la célula para continuar con la infección.

En general, las AQs ensayadas no tuvieron efecto sobre los ARN-virus, con excepción de dos derivados sintéticos: **PhX** y **MeOPhX**. De éstas,

MeOPhX sobresale como la única AQ analizada que exhibió una significativa actividad antiviral *in vitro* sobre WNV ($\approx 77\%$ I).

Mediante un protocolo desarrollado en esta tesis, que permite analizar la fotoinactivación viral *in vitro*, se demostró que **Sor** y **Bisor**, AQs fotosensibilizantes que no mostraron efecto antiherpético de relevancia, logran un elevado porcentaje de fotoinactivación ($> 80\%$) sólo de los virus que consiguen ingresar a la célula hospedadora. Este hallazgo es muy importante porque al hacerlo en el interior de la célula, estarían afectando al ciclo de replicación del virus, reduciendo la carga viral y por consiguiente, producirían la regresión de la infección.

Este protocolo de fotoinactivación viral también se aplicó a otras dos AQs sin actividad antiherpética: una de origen natural (**Lp**) y otra sintética (**BrX**). **Lp** fue inactiva sobre el HSV-1 bajo la acción de la irradiación, en contraposición a **BrX**. Así, se demostró indirectamente que **BrX** posee propiedades fotosensibilizantes, debido a que en presencia de luz generó un importante aumento en la inactivación del HSV-1. Esta AQ presentó dos ventajas sobre **Sor** y **Bisor**. Por un lado, **BrX** fotoinactivó significativamente tanto las partículas virales extracelulares ($\approx 72\%$) como intracelulares ($\approx 83\%$). Por lo tanto, esta AQ no sólo afectaría el ciclo de replicación del virus, sino que también actuaría directamente sobre las partículas virales mediante un mecanismo fotosensibilizante. Asimismo, **BrX** produjo esta fotoinactivación viral a una concentración que no generó efectos nocivos en la célula hospedadora bajo irradiación; hallazgo que no se observó para las AQ de *H. pustulata* (**Sor** y **Bisor**), que manifestaron ser fototóxicas para las células en las condiciones ensayadas.

Además, con el fin de profundizar el estudio de los posibles efectos biológicos de **Im**, se ensayó sobre la línea celular epitelial de adenocarcinoma de cérvix humano, infectada persistentemente con el virus del papiloma humano tipo 18 (HPV18), denominada HeLa. Esta AQ disminuyó la viabilidad de las células tumorales HeLa (50%) a su CSubT sobre células Vero. Estos resultados motivan a profundizar los estudios de **Im** como un posible agente antitumoral, y ampliar el estudio a tumores causados por otros HPV e incluso evaluar su acción antiviral sobre el HPV.

Por otra parte, la purificación bioguiada del extracto que presentó mayor % I sobre HSV-1, permitió la identificación de procianidina A1. Esto abre una nueva perspectiva sobre el estudio de este tipo de metabolitos secundarios porque este compuesto demostró exhibir un 100 % I sobre HSV-1 a la MCNC. De esta manera, se estableció que este derivado sería uno de los responsables del efecto observado por el extracto.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

Y

PROYECCIONES

I- CONCLUSIONES

A partir de la especie *Galium latoramosum* Clos (Rubiaceae) se logró aislar, purificar e identificar dos AQs:

- **Lucidina primeverósido**, una AQ glicosilada que resultó ser mayoritaria para esta especie vegetal, según el análisis por HPLC-UV-Vis de los extractos obtenidos. En cuanto a su actividad biológica, evidenció ser la menos citotóxica sobre células Vero de todas las AQs estudiadas. Además, no presentó actividad antiviral ni inactivación viral fotoestimulada sobre los virus estudiados (HSV-1, VEEV y WNV).
- **2-isobutil éster de munjistina**, una AQ aglicón informada por primera vez para esta familia de compuestos naturales. Resultó ser la más activa contra el HSV-1 (virus ADN) de todas las AQ analizadas, logrando una inhibición del 100 % a su CSubT con un IS de 8. Esta nueva AQ actúa durante estadios tempranos del ciclo de replicación viral. Por otro lado, este metabolito secundario mostró actividad citotóxica sobre la línea celular HeLa (células tumorales de cáncer cervical humano causados por el HPV-18) a su CSubT, estimada sobre células Vero.

A partir de lucidina primeverósido se obtuvo **nordamnacantal** una AQ aglicón que a diferencia de su precursor resultó activa contra HSV-1 (% I ≈ 70).

Se obtuvieron tres derivados sintéticos de xantopurpurina (AQ presente en *G. latoramosum*, según análisis HPLC-DAD-ESI-QTOF): **6-bromo-xantopurpurina (BrX)**, **6-fenil-xantopurpurina (PhX)**, y **6-(4-metoxifenil)-xantopurpurina (MeOPhX)**. BrX y PhX presentaron la mayor actividad citotóxica sobre células Vero de todas las AQ estudiadas. Todas exhibieron baja actividad antiherpética. Sin embargo, BrX generó un importante aumento en la inactivación del HSV-1 mediante un proceso de fotoestimulación, a una concentración que no resultó citotóxica bajo irradiación. La evaluación de la fotoinactivación con PhX y MeOPhX se plantea como proyección de esta tesis.

Se destaca que MeOPhX demostró ser la única AQ de todas las analizadas en esta tesis, con una importante actividad antiviral sobre WNV (virus ARN).

Por otra parte, cabe destacar, que mediante un estudio bioguiado se logró aislar e identificar procianidina A1, una proantocianidina con muy buena actividad antiherpética (% I = 100) a su MCNC.

De la especie *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae), se purificaron dos AQs fotosensibilizantes, siguiendo la metodología desarrollada por nuestro grupo de trabajo: **soranjidiol** y su dimero **bisoranjidiol**. La AQ dimérica evidenció ser más citotóxica sobre las células hospedadoras Vero que su monómero y esta toxicidad incremento en condiciones de irradiación. Ambas AQ exhibieron leve actividad antiviral sobre HSV-1 y demostraron que a través de un proceso de fotoestimulación logran una gran inactivación del HSV-1 que se encuentran infectando la célula hospedadora (> 80 %). La fotoinactivación fue levemente mayor con bisoranjidiol.

Es así que los resultados derivados de esta tesis, aportan al conocimiento fitoquímico de nuestra flora autóctona y a su importancia en el descubrimiento de metabolitos secundarios bioactivos con potencial uso como agentes antivirales y antitumorales (**Im**) o en la obtención y detección de compuestos (**Lp**, **xantopurpurina**) que sirvan como punto de partida para la elaboración de sustancias semisintéticas (**Nor**) o sintéticas (**MeOPhX**) con efecto antiviral. Incluso, se destaca que la prospección de la flora autóctona en la búsqueda de compuestos fotosensibilizantes, impulsa al desarrollo de farmacoterapias más eficientes para el tratamiento de infecciones virales, como es la Terapia Fotodinámica Antimicrobiana.

II- PROYECCIONES

Fitoquímica y semisíntesis

Continuar con el estudio fitoquímico de *G. latoramosum* para aislar otros metabolitos secundarios, ya sea derivados antraquinónicos o procianidinas, que serán evaluados en cuanto a su actividad biológica.

Obtener nuevos derivados de semisíntesis a partir de lucidina primeverósido, con el fin de ampliar la quimioteca de derivados antraquinónicos a estudiar como compuestos bioactivos y fotosensibilizadores.

Mejorar el rendimiento de obtención de la procianidina A1, a los fines de confirmar la elucidación de su estructura y profundizar sus estudios de actividad antiherpética.

Actividad antiviral

Profundizar los estudios de actividad antiherpética de 2-isobutil éster de munjistina (**Im**) a fin de conocer su mecanismo de acción antiviral y además evaluar su actividad frente a cepas de HSV-1 resistentes a la terapia convencional (aciclovir).

Completar el estudio de los derivados antraquinónicos obtenidos sobre los virus estudiados en esta tesis, ensayando **Sor** y **Bisor** sobre WNV y VEEV.

Profundizar los estudios de actividad antiviral de las AQs que resulten activas, estableciendo en que momento del ciclo de replicación actúan y mediante cuál mecanismo de acción ejercen el efecto observado.

Ampliar el estudio de los derivados antraquinónicos obtenidos hacia otros virus de importancia para la salud humana.

Inactivación viral fotoestimulada

Establecer si las AQs con escaso (**PhX** y **MeOPhX**) o moderado efecto antiherpético (**Nor**), pueden incrementar la inactivación de las partículas virales mediante un proceso de fotoestimulación.

Estudiar las propiedades fotosensibilizantes Tipo 1 (generación de anión superóxido) y Tipo II (producción de oxígeno singulete) de las AQs que

lograron (**BrX**) o demuestren fotoinactivar virus o inhibir el crecimiento de células tumorales bajo la acción de irradiación.

Profundizar los estudios de fotoinactivación evaluando concentraciones menores a la MCNC a fin de poder establecer si es posible inactivar al virus empleando menor cantidad de AQ o lograr una inactivación del 100 % modificando la dosis de irradiación o sistema de irradiación.

Otras actividades biológicas

Ensayar la actividad de las AQs obtenidas (con excepción de **Im**) sobre la línea de células tumorales HeLa.

Determinar si las AQs obtenidas, especialmente **Im**, pueden incrementar su efecto citotóxico sobre la línea tumoral HeLa a través de un mecanismo de fotosensibilización.

Ampliar el estudio de los derivados antraquinónicos obtenidos hacia otras líneas celulares tumorales de importancia para la salud humana.

Capítulo 6

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeyssekera A., Gunaherath K., Ranasinghe C. 2014. A study of some anthraquinones of *Rubia cordifolia* L. incorporated into pinda oil: An ayurvedic medicinal oil used for topical application in dermatological and inflammatory conditions. *Int. J. of Res. in Ayurveda and Pharmacy*, 5 (3): 334-338.
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT. 2004. Farmacopea Argentina Codex Medicamentarius Argentino. 7°ed, Ministerio de la Salud, Buenos Aires, Argentina.
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, ANMAT. 2015. Disposición ANMAT N° 5418/2015. Drogas Vegetales, Preparados de Drogas Vegetales y Medicamentos Herbarios. Registro, rótulos, etiquetas y prospectos. Ministerio de la Salud, Buenos Aires, Argentina.
- Afshar B., Bibby D.F., Piorkowska R., Ohemeng-Kumi N., Snoeck R., Andrei G., Gillemot S., Morfin F., Frobert E., Burrell S., Boutolleau D., Crowley B., Mbisa J.L. 2017. A European multicentre External Quality Assessment (EQA) study on phenotypic and genotypic methods used for Herpes Simplex Virus (HSV) drug resistance testing. *J. Clin. Virol.*, 96: 89-93.
- Agostinis P., Berg K., Cengel K.A, Foster T.H., Girotti A.W, Gollnick S.O, Hahn S.M, Hamblin M.R, Juzeniene A., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Mroz P., Nowis D., Piette J., Wilson B.C, Golab J. 2011. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. *CA Cancer J. Clin.*, 61 (4): 250-281.
- Aguirre D. H., Neumann R. A. 2001. Intoxicación por "cegada" (*Heterophyllaea pustulata*) en caprinos del noroeste argentino. *Med. Vet.*, 18, 487-490.
- Akhtar M.N., Zareen S., Yeap S.K., Ho W.Y., Lo K.M., Hasan A., Alitheen N.B. 2013. Total synthesis, cytotoxic effects of damnacanthal, nordamnacanthal and related anthraquinone analogues. *Molecules*, 18 (8): 10042-10055.
- Akram M., Tahir I.M., Shah S.M.A., Mahmood Z., Altaf A., Ahmad K., Munir N., Daniyal M., Nasir S., Mehboob H. 2018. Antiviral potential of medicinal plants against HIV, HSV, influenza, hepatitis, and coxsackievirus: A systematic review. *Phytother Res.*
- Akrawia O., Khan A., Villingera A., Langer P. 2013. Synthesis of arylated anthraquinones by site-selective Suzuki Miyaura reactions of the bis (triflates) of 1,3-di(hydroxy) Anthraquinones. *Tetrahedron*, 69 (43): 9013-9024.
- Alves D.S., Pérez-Fons L., Estepa A., Micol V. 2004. Membrane-related effects underlying the biological activity of the anthraquinones emodin and barbaloin. *Biochem. Pharmacol.*, 68: 549-561.
- Amouroux P., Jean D., Lamaison J.L. 1998. Antiviral activity in vitro of *Cupressus sempervirens* on two human retroviruses HIV and HTLV. *Phytother. Res.* 12: 367-368.
- Andrei G., & De Clerq E. 1996. Quimioterapia de las infecciones virales. En: *Microbiología biomédica*, 1a ed, Basualdo J.A., Coto C.E. & de Torres R.A. (eds). Bs. As: Editorial Atlante S.R.L, pp., 616-625.

- Andrei G., Snoeck R., 2013. Herpes simplex virus drug-resistance: new mutations and insights. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 26 (6):551-60.
- Anouar el H., Osman C.P., Weber J.F., Ismail N.H. 2014. UV/Visible spectra of a series of natural and synthesised anthraquinones: experimental and quantum chemical approaches. *Springerplus*, 3: 233.
- Appeldoorn M.M., Vincken J.P., Gruppen H., Hollman P.C. 2009. Procyanidin dimers A1, A2, and B2 are absorbed without conjugation or methylation from the small intestine of rats. *J. Nutr.*, 139 (8): 1469-1473.
- Atahuachi Burgos M. 2005. La Guía "Darwin" de las flores de los valles bolivianos. Darwin Initiative, La Paz.
- Bacigalupo N. M. 1993. Rubiaceae. En: *Flora de la Provincia de Jujuy*. A. L. Cabrera. (Ed.), Buenos Aires, Argentina: Colección Científica INTA, pp., 375-380.
- Bag P., Ojha D., Mukherjee H., Halder U.C., Mondal S., Biswas A., Sharon A., Van Kaer L., Chakrabarty S., Das G., Mitra D., Chattopadhyay D. 2014. A dihydro-pyrido-indole potently inhibits HSV-1 infection by interfering the viral immediate early transcriptional events. *Antiviral Res.*, 105: 126-34.
- Balas L., Vercauteren J., Laguerre M. 1995. 2D NMR structure elucidation of proanthocyanidins: The special case of the catechin-(4 α -8)-catechin-(4 α -8)-catechin trimer. *Magn. Reson. in Chem.*, 33: 85-94.
- Baltazar L.M., Ray A., Santos D.A., Cisalpino P.S., Friedman A.J., Nosanchuk J.D. 2015. Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiol.*, 13 (6): 202.
- Banthorpe D.V. & White J.J. 1995. Novel anthraquinones from undifferentiated cell cultures of *Galium verum*. *Phytochem.*, 38 (1): 107-111.
- Baqi Y., Atzler K., Köse M., Glänzel M., Müller C.E. 2009. High-affinity, non-nucleotide-derived competitive antagonists of platelet P2Y₁₂ receptors. *J. Med. Chem.*, 52 (12): 3784-3793.
- Barboza G., Cantero J., Núñez C., Pacciaroni A., Espinar L. 2009. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34 (1-2): 7-365.
- Barnard D.L., Fairbairn D.W., O'Neill K.L., Gage T.L., Sidwell R.W. 1995. Anti-human cytomegalovirus activity and toxicity of sulfonated anthraquinones and anthraquinone derivatives. *Antiviral Res.*, 28 (4): 317-329.
- Barnard D.L., Huffman J.H., Morris J.L., Wood S.G., Hughes B.G., Sidwell R.W. 1992. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.*, 17 (1): 63-77.
- Barreto Penié J., González-Piñera J., Rodríguez M., Pino Alfonso P. 1998. Medicamentos antivirales. *Acta Médica*, 8 (1): 86-100.
- Barron D. & Ibrahim R. 1996. Isoprenylated flavonoids—a survey. *Phytochemistry*, 43 (5): 921-982.

- Behrendt P., Perin P., Menzel N., Banda D., Pfaender S., Alves M.P., Thiel V., Meulemann P., Colpitts C.C., Schang L.M., Vondran F.W., Anggakusuma R., Manns M.P., Steinmann E., Pietschmann T. 2017. Pentagalloylglucose, a highly bioavailable polyphenolic compound present in Cortex moutan, efficiently blocks hepatitis C virus entry. *Antiviral Res.*, 147:19-28.
- Bekhit A.E. & Bekhit A.A. 2014. Natural Antiviral Compounds. Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 42. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63281-4.00007-0>.
- Berge T., Banks I., Tigertt W. 1961. Attenuation of venezuelan equine encephalomyelitis virus by in vitro cultivation in guinea pig-heart cells. *Amer. J. Hyg.*, 73: 209-218.
- Bladt S. y Zgainski E. 1984. Plant Drugs Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas. Wagner H. (Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Alemania.
- Boldizsár I., Szucs Z., Füzfai Z., Molnár-Perl I. 2006. Identification and quantification of the constituents of madder root by gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr. A*, 1133 (1-2): 259-274.
- Bolivar P., Cruz-Paredes C., Hernández L.R., Juárez Z.N., Sánchez-Arreola E., Av-Gay Y., Bach H. 2011. Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of Galium mexicanum. *J Ethnopharmacol.*, 137 (1): 141-147.
- Borenfreund E., Puerner J.A. 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.*, 24 (2-3): 119-124.
- Brako L., Zarucchi J.L. 1993. Catalogue of the flowering plants and Gymnosperms of Peru. Missouri Botanical Garden, 45. 1029.
- Braslau R., Schaffner F., Earla A. 2013. Polymeric Phthalates: Potential Nonmigratory Macromolecular Plasticizers. *J. of Pol. Sci., part A: polymer chemistry*, 51: 1175–1184.
- Breitbart M, Rohwer F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* 13 (6): 278-284.
- Brigette C., Brassard P. 1933. An integrated approach to the synthesis of contiguously substituted xanthopurpurins, pachybasins and purpurins. *Tetrahedron*, 49 (4): 771-784.
- Briskin D. 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiol.*, 124: 507-514.
- Broks G., Butel J., Ornston L., 1996. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Ed. El Manual Moderno, México.
- Carballal G., Oubiña J., 1996. Virología Médica, 2da ed. El Ateneo, Buenos Aires.
- Caro Y., Anamale L., Fouillaud M., Laurent P., Petit T., Dufosse L. 2012. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. *Nat. Prod. Bioprospect.*, 2 (5): 174–193.
- Castilla V., Ramírez J., Coto C. 2009. Prospectiva del uso de esteroides de plantas como antivirales. *Química Viva*, 8 (1): 8-24.

- Chattopadhyay D & Naik TN. 2007. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini Rev. Med. Chem.*, 7 (3): 275–301.
- Cheng H.Y., Lin L.T, Huang H.H., Yang C.M., Lin C.C . 2008. Yin Chen Hao Tang, a Chinese prescription, inhibits both herpes simplex virus type-1 and type-2 infections *in vitro*. *Antiviral Res.*, 77 (1): 14–19.
- Cholewa M, Legge G.J., Weigold H., Holan G., Birch C.J. 1994. The use of a scanning proton microprobe to observe anti-HIV drugs within cells. *Life Sci.*, 54 (21): 1607-1612.
- Clauser K.R., Baker P., Burlingame A.L. 1999. Role of Accurate Mass Measurement (10 ppm) in Protein Identification Strategies Employing MS or MS/MS and Database Searching. *Analytical Chemistry*, 71 (14): 2871-2882.
- Comini L.R., Fernandez I.M., Rumie Vittar N.B., Núñez Montoya S.C., Cabrera J.L., Rivarola V.A. 2011b. Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine*, 18 (12): 1093-1095.
- Comini L.R., Núñez Montoya S.C., Páez P.L., Argüello G.A., Albesa I., Cabrera J.L. 2011a. Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 102 (2):108-114.
- Comini L.R., Núñez Montoya S.C., Sarmiento M., Cabrera J.L., Argüello G.A. 2007. Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological properties of photosensitizing anthraquinones. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 188 (2-3): 185-191.
- Condit R. 2013. Principles of Virology. En: Fields virology 6ta ed. Knipe D. y Howley P. (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Boston, EEUU, pp.31.
- Contigiani M., 2005. Togaviridae. En: Microbiología Biomédica, Basualdo J., Coto C., de Torres R. (Eds.), Atlante, Buenos Aires, Argentina, pp.896-904.
- Contigiani M.S., Diaz L.A., Spinsanti L.I. 2017. General Aspects on Arboviruses. En: Arthropod Borne Diseases. Marcondes C. (Ed), Springer International Publishing Switzerland. ISBN 978-3-319-13884-8 (eBook).
- Corey L. 2002. Challenges in genital herpes simplex virus management. *J. Infect. Dis.*, 186: 29-33.
- Coudret C., Mazenc V. 1997. Heteroarylation of anthraquinone-triflate by suzuki cross-coupling. *Tetrahedron Lett.*, 38 (30): 5293-5296.
- Cunningham A.A., Daszak P., Wood J.L.N. 2017. One Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 372 (1725).
- Cuoco G., Mathe C., Archier P., Vieillescazes C. 2011. Characterization of madder and garancine in historic French red materials by liquid chromatography-photodiode array detection. *Journal of Cultural Heritage*, 12 (1): 98-104.
- Dai T., Huang Y.Y., Hamblin M.R. 2009. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 6 (3-4): 170-188.

- Davis R.H., Agnew P.S., Shapiro E. Antiarthritic activity of anthraquinones found in aloe for podiatric medicine. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.*, 76 (2): 61–66.
- Dávola M.E., Mazaira G.I., Galigniana M.D., Alché L.E., Ramírez J.A., Barquero A.A. 2015. Synthetic pregnenolone derivatives as antiviral agents against acyclovir-resistant isolates of Herpes Simplex Virus Type 1. *Antiviral Res*, 122: 55-63.
- De Clercq E. 1993. Antivirals for the treatment of herpes virus infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 32 (Suppl. A): 121-32.
- De Clercq. E. 2004. Antiviral drugs in current clinical use. *E. J. Clin. Virol.*, 30 (2): 115-33.
- De Salazar P.M., Mireia J., Maresma M., Plasencia A. 2018. Evaluación del riesgo de transmisión autóctona del virus Zika y otras enfermedades virales emergentes transmitidas por mosquitos en Cataluña. *Gaceta Sanitaria*, 32 (1): 101-105.
- del Barrio Alonso G., Álvarez Á., Valdés S., Fernández F. 2008. Metodología de pesquisa preclínica de actividad anti-herpesvirus a partir de productos naturales. *Rev Cubana. Farm.*, 42: 2.
- del Barrio G. & Parra F. 2000. Evaluation of the antiviral activity of an aqueous extract from *Phyllanthus orbicularis*. *J. Ethnopharmacol.*, 72 (1-2): 317-322.
- Demagos G., Wolfgang B., Höfle G. 1981. New Anthraquinone and Anthraquinone Glycosides from *Morinda lucida*. *Naturforsch.*, 86b: 1180-1184.
- Deng J., Sanchez T., Neamati N., Briggs J.M. 2006. *J. Med. Chem.*, 49 (5): 1684-1692.
- Diaz A.L., Komar N., Visintin A., Dantur Juri M.J., Stein M., Lobo Allende R., Spinsanti L., Konigheim B., Aguilar J., Laurito M., Almirón W., Contigiani M. 2008. West Nile Virus in Birds, Argentine. *Emerg. Infec. Dis.*, 14 (4): 689-91.
- Diaz L., Vezanni D. 2016. Eco-epidemiología de enfermedades transmitidas por mosquitos. En: Investigaciones sobre mosquitos de Argentina. Berón C., Campos R., Gleiser R., Diaz-Nieto L., Salomón O., Scheweigmann N. (Eds). Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Dimmer J.A. Fotosensibilizadores fotodinámicos naturales y potenciales aplicaciones terapéuticas. Tesis Doctoral, 2017. Dpto. Farmacia, Universidad Nacional Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Dimmer J.A., Núñez Montoya S.C., Mendoza C.S., Cabrera J.L. 2017. Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae). *Phytochem.*, 137: 94-100.
- Dixon R.A., Xie D.Y., Sharma S.B. 2005. Proanthocyanidins—a final frontier in flavonoid research? *New Phytol.*, 165 (1): 9-28.
- Duval J., Pecher V., Poujol M., Lesellier E. 2016. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. *Ind. Crops Prod.*, 94: 812-833.

- Edwards R.A., Rohwer F. 2005. Viral metagenomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (6): 504-510.
- Egan K.P., Wu S., Wigdahl B. 2013. Immunological control of herpes simplex virus infections. *J Neurovirol.* 19 (4) 328–345.
- El-Emary N., Backheet E. 1998. Three hydroxymethylantraquinone glycosides from *Rubia tinctorum*. *Phytochem.*, 38 (0): 166-168.
- el-Gamal A.A., Takeya K., Itokawa H., Halim A.F., Amer M.M., Saad H.E., Awad S.A. 1995. Anthraquinones from *Galium sinaicum*. *Phytochem.*, 40: 245–251.
- Fabricant D.S., Farnsworth N.R. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.*, 109 (1): 69-75.
- Fairbairn J.W. 1976. The anthraquinone laxatives. *Pharmacol. Int. J. Exp. Clin. Pharmacol.*, 14: 1–105.
- Farnet C.M., Wang B., Lipford J.R., Bushman F.D. 1996. Differential inhibition of HIV-1 preintegration complexes and purified integrase protein by small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 93 (18): 9742-9747.
- Farnsworth N.R., Akerele O., Bingel A.S., Soejarto D.D., Guo Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bull. World Health Organ.*, 63 (6): 965-981.
- Fatahzadeh M., Schwartz R.A. 2007. Human herpes simplex virus infections: Epidemiology, pathogenesis, symptomatology, diagnosis, and management. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 57 (5): 737-763.
- Foot C.S. 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidations. *Photochem. Photobiol.*, 54 (5): 659–671.
- Fosso M.Y., Chan K.Y., Gregory R., Chang C-W.T. 2012. Library synthesis and antibacterial investigation of cationic anthraquinone analogs. *ACS Comb. Sci.*, 14 (3): 231–235.
- Friedel C., Crafts J., 1877. Sur une methode generale nouvelle de synthese d'hydrocarbures, d'acetones, etc. *Compt. rend.*, 84: 1450.
- Gan K.H., Teng C.H., Lin H.C., Chen K.T., Chen Y.C., Hsu M.F., Wang J.P., Teng C.M., Lin C.N. 2008. Antiplatelet effect and selective binding to cyclooxygenase by molecular docking analysis of 3-alkylaminopropoxy-9,10-anthraquinone derivatives. *Biol Pharm Bull*, 31: 1547–1551.
- Gescher K., Kühn J., Hafezi W., Louis A., Derksen A., Deters A., Lorentzen E., Hensel A., 2011. Inhibition of viral adsorption and penetration by an aqueous extract from *Rhododendron ferrugineum* L. as antiviral principle against herpes simplex virus type-1. *Fitoterapia.*, 82 (3): 408–413.
- Giuntoli B. 2005. I coloranti vegetali nella tintura delle stoffe. Facoltà di Agraria. Università di Pisa. Publicado en Internet Disponible online en [http:// www.percorsidiorientamento.it](http://www.percorsidiorientamento.it). Activo Julio 2011.
- Griffin D., 2013. Alphaviruses. En: Fields Virology 6ta Ed., Fields B. y Knipe D. (Eds.), Boston, EEUU: Lippincott Williams & Wilkins, pp., 651-682.

- Habeeb F., Shakir E., Bradbury .F, Cameron P., Taravati M.R., Drummond A.J., Gray A.I., Ferro V.A. 2007. Screening methods used to determine the anti-microbial properties of *Aloe vera* inner gel. *Methods*, 42 (4): 315–320.
- Hamblin M.R. 2016. Antimicrobial photodynamic inactivation: A bright new technique to kill resistant microbes. *Curr. Opin. Microbiol.*, 33: 67–73.
- Hansen E., Martiarena C. 1967. Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook “cegadera” en el ganado. *Patol. Animal, Rev. Inv. Agropec. (INTA)*, 4: 81-113.
- Harbone J.B. 1967. Comparative Biochemistry of the Flavonoids. first ed. New York, London. Ed. Academic press.
- Harborne J., Baxter H. (eds.), Moss, G. (Associate ed.), 1996. *Dictionary of Plant Toxins*, Jhon Wiley & Sons Ltd. New York.
- Henderson R.L., Rayner C.M., Blackburn R.S. 2013. Isolation and extraction of lucidin primeveroside from *Rubia tinctorum* L. and crystal structure elucidation. *Phytochem.*, 95: 105–108.
- Hernández G. y Peña M. 2002. Actualización sobre antivirales. *Sintefarma* 8: 1.
- Hieronymus J., 1882. *Plantae Diaphoricae. Florae Argentinae*, Buenos Aires 1882. Pp: 1-528. Disponible online en: <http://www.who.int/ihr/es/>.
- Higuchi H., Mori K., Kato A., Ohkuma T., Endo T., Kaji H., Kaji A. 1991. Antiretroviral activities of anthraquinones and their inhibitory effects on reverse transcriptase. *Antiviral Res.*, 15 (3): 205-216.
- Hinde N., Hall D. 1998. Kinetics and mechanism of the formation of mono- and di-phthalate esters catalysed by titanium and tin alkoxides. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 2: 1249-1256.
- Hjalmarsson A., Blomqvist P., Skoldenberg B. 2007. Herpes simplex encephalitis in Sweden, 1990–2001: incidence, morbidity, and mortality. *Clin. Infect. Dis.*, 45 (7): 875-880.
- Hodge Vere R.A., Field H.J. 2013. Antiviral agents for herpes simplex virus. *Adv. Pharmacol.* 67: 1-38.
- Huang Q., Lu G., Shen H.M., Chung M.C.M., Choon N.O. 2007. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb. *Med. Res. Rev.*, 27 (5): 609–630.
- Hudson J.B. 1990. *Antiviral Compounds from Plants*. CRC Press, Boca Raton, Boston, pp., 72–98.
- Hudson J.B., Harris L., Towers G.H. 1993. The importance of light in the anti-HIV effect of hypericin. *Antiviral Res.*, 20 (2):173-78.
- Huneck S., Yoshimura I. 1996. *Identification of Lichen Substances*. Springer-Verlag, Germany, Berlin, pp.179.
- Inoue K., Nayeshiro H., Inouye H., Zenk M. 1981. Anthraquinones in cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Phytochem.*, 20: 1693-1700.

- Instituto de botánica Darwinion. 2017b.
http://www.darwin.edu.ar/ImagenesIris/Heterophyllaea%20pustulata_F%20ARG.jpg
- Instituto de botánica Darwinion. 2017a.
<http://www2.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/DetalleEspecie.asp?forma=&variedad=&subespecie=&especie=latoramosum&genero=Galium&espcod=5476>
- Jackson T.C., Verrier J.D., Kochanek P.M. 2013. Anthraquinone-2-sulfonic acid (AQ2S) is a novel neurotherapeutic agent. *Cell. Death Dis.* 4 (1): 451.
- Jacques D., Haslam, E., Bedford G.R.; Greatbanks, D. 1974. Plant proanthocyanidins. Part 2. Proanthocyanidin A-2 and its derivatives. *J. Chem.Soc. Perkin Trans.*, 1: 2663–2671.
- Jassim S.A., Naji M.A. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.*, 95 (3): 412-27.
- Kamei H., Koide T., Kojima T., Hashimoto Y., Hasegawa M. 2009. Inhibition of Cell Growth in Culture by Quinones. *Cancer Biother. and Radiopharm.*, 13 (3): 185-188.
- Kamiya K., Hamabe W., Tokuyama S., Hirano K., Satake T., Kumamoto-Yonezawa Y., Yoshida H., Mizushina Y. 2010. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chemistry*, 118 (3) 725–730.
- Kanai R., Kar K., Anthony K., Gould L.H., Ledizet M., Fikrig E., Marasco W.A., Koski R.A., Modis Y. 2006. Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. *J. Virol.* 80 (22): 11000-11008.
- Kawasaki Y., Goda Y., Noguchi H., Yamada T. 1994. Identification of adducts formed by reaction of purine bases with a mutagenic anthraquinone, lucidin: mechanism of mutagenicity by anthraquinones occurring in rubiaceae plants. *Chem. Pharm. Bull.* 42 (9): 1971-1973.
- Khan N., Karodi R., Siddiqui A., Thube S., Rub R. 2011. Development of anti-acne gel formulation of anthraquinones rich fraction from *Rubiocordifolia* (Rubiaceae). *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, 4 (4): 28–36.
- Kharlamova T. 2009. Synthesis and HIV-1 RNase H-activity of new alizarin acetonil derivatives. *Chem. Nat. Comp.*, 45: 629.
- Knipe D. y Howley P., 2007. Herpes Simplex viruses. En: Fields virology 5ta ed. Knipe D. y Howley P. (Eds.). Lippincott Williams y Wilkins Boston, EEUU, pp., 2515.
- Konigheim B.S. Prospección de productos naturales con potencial actividad antiviral obtenidos a partir de especies nativas del género *Larrea*. Tesis Doctoral, 2012. Universidad Nacional Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Konigheim B.S., Beranek M., Comini L.R., Aguilar J.J., Marioni J., Cabrera J.L., Contigiani M.S., Núñez Montoya S.C. 2012. *In Vitro* antiviral activity of *Heterophyllaea pustulata* extracts. *Nat. Prod. Commun.*, 7 (8): 1025-1028.

- Koyama J., Okatani T., Tagahara K., Kouno I., Irie H. 1991. Anthraquinones of *Damnacanthus indicus*. *Phytochem.*, 31: 709-710.
- Kraus G.A., Pratt D., Tossberg J., Carpenter S. 1990. Antiretroviral activity of synthetic hypericin and related analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172 (1): 149-153.
- Krohn K., Vitz J., 2004. Total Synthesis of Premithramycinone H and Related Anthrapyran Antibiotics. *Eur. J. Org. Chem.*, 209-219.
- Kuhn R. 2013. Togaviridae. En: Fields virology 6ta ed. Knipe D. & Howley P. (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins Boston, EEUU., pp., 629-646.
- Kukhanova M.K., Korovina A.N., Kochetkov S.N. 2014. Human Herpes Simplex Virus: Life Cycle and Development of Inhibitors. *Biochemi. (Mosc)*, 79 (13): 1635-1652.
- LaBeaud A.D. 2008. Why arboviruses can be neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2 (6): e247.
- Ladeau S., Marra P., Kilpatrick A., Calder C. 2008. West Nile Virus Revisited: Consequences for North American Ecology. *BioScience*, 58: 937-946.
- Latief M.A., Chikama T., Ko J.A., Kiuchi Y., Sakaguchi T., Obana A. 2015. Inactivation of acyclovir-sensitive and -resistant strains of herpes simplex virus type 1 *in vitro* by photodynamic antimicrobial chemotherapy. *Mol. Vis.*, 21: 532-537.
- Lazcano Araujo A. 2010. Origen y evolución de los virus: ¿genes errantes o parásitos primitivos? En: Mensaje Bioquímico. Álvarez Fernández G., Bustos Jaimes I., Castañeda Patlán C., Guevara Fonseca J., Romero Álvarez I., Vázquez Meza H. (Eds), Dpto de Bioquímica, Fac. de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, DF, México, pp.,73-84.
- Liu A., Shu S., Qin H., Lee S., Wang Y., Du G. 2009. *In vitro* Anti-Influenza Viral Activities of Constituents from *Caesalpinia sappan*. *Planta Med.* 75: 137-143.
- Lv Q., Luo F., Zhao X., Liu Y., Hu G., Sun C., Li X., Chen K. 2015. Identification of proanthocyanidins from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and their antioxidant activity. *PLoS One*, 10 (3).
- Mal D., Ray S., Sharma I. 2007. Direct access to 1,4-dihydroxyanthraquinones: the Hauser annulation reexamined with p-quinones. *J. Org. Chem.*, 72 (13): 4981-4984.
- Malik E.M., Müller C.E. 2016. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. *Med Res Rev.*, 36 (4): 705-748.
- Marcondes C.B., Contigiani M., Gleiser R.M. 2017. Emergent and Reemergent Arboviruses in South America and the Caribbean: Why so many and why now? *J. Med. Entomol.*, 54 (3): 509-532.
- Marioni J., Arce J.E., Cabrera J.L., Paraje M.G., Núñez Montoya S.C. 2016a. Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharm. Biol.*, 3: 1-11.
- Marioni J., Da Silva M.A., Cabrera J.L., Núñez Montoya S.C., Paraje M.G., 2016b. The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea*

- pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23: 1321–1328.
- Marković Z.S., Manojlović N.T., Jeremić S.R., Živić M. 2013. HPLC, UV–vis and NMR spectroscopic and DFT characterization of purpurin isolated from *Rubia tinctorum* L. *Hem. Ind.*, 67 (1): 77–88.
- Martínez G. 2005. Recolección y Comercialización de Plantas Medicinales en el Departamento Santa María, Provincia de Córdoba, Argentina. *Acta Farm. Bonaerense*, 24 (4): 575-584.
- Max. P. 1929. The Chemistry of Anthraquinone. *Chem. Rev.*, 6 (1): 157–174.
- Mesa D., Fabio A., Cárdenas Z., Jaime A., Villamil C. 2005. Las Encefalitis Equinas en la Salud Pública. 1era ed., Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia (Ed.). Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Departamento de Salud Animal. ISBN: 958-701-598-3.
- Missouri Botanical Garden. 2016a. *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith, Tropicos.org: <http://tropicos.org/Name/27909507>.
- Mitchell C., Monath T., Sabattini M., Cropp C., Daffner J., Calisher C., Jakob W., Christensen H. 1985. Arbovirus investigations in Argentina, 1977-1980 - II. Arthropod collections and virus isolations from argentine mosquitoes. *Am. J. Trop. Med.*, 34 (5): 945-55.
- Morales M.A., Barrandeguy M., Fabbri C., Garcia J.B., Vissani A., Trono K., Gutierrez G., Pigretti S., Menchaca H., Garrido N., Taylor N., Fernandez F., Levis S., Enría D. 2006. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*, 12 (10): 1559-1561.
- Morimoto M., Tanimoto K., Sakatani A., Komai K. 2002. Antifeedant activity of an anthraquinone aldehyde in *Galium aparine* L. against *Spodoptera litura* F. *Phytochem.*, 60 (2): 163–6.
- Mukhopadhyay S., Kim B.S., Chipman P.R., Rossmann M.G., Kuhn R.J. 2003. Structure of West Nile Virus. *Science*, 302 (5643): 248.
- Murdock K.C., Child R.G., Fabio P.F., Angier R.B., Wallace R.E., Durr F.E., Citarella R.V. 1979. Antitumor Agents. 1.1,4-Bis[(aminoalkyl)amino]-9,10-anthracenediones. *J. Med. Chem.*, 22 (9): 1024–1030.
- Newman D.J., Cragg G.M. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, 75: 311–335.
- Núñez Montoya S.C, Agnese A., Cabral Pérez M., IN Tiraboschi, Cabrera J.L. 2003. Pharmacological and toxicological activity of *Heterophyllaea pustulata* anthraquinone extracts. *Phytomed.*, 10: 569-574.
- Núñez Montoya S.C. Metabolitos secundarios en *Heterophyllaea pustulata* Hook.f. (Rubiáceas). Tesis doctoral, 2002. Dpto. Farmacia, Universidad Nacional Córdoba, Córdoba, Argentina.
- Núñez Montoya S.C., Agnese A., Cabrera J.L. 2006. Anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata*. *J. Nat. Prod.*, 69: 801-803.

- Núñez Montoya S.C., Comini L.R., Sarmiento M., Becerra C., Albesa I., Argüello G., Cabrera J.L. 2005. Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 78 (1): 77-83.
- OMS, 1998a. The World Health Report 1998. Global life expectancy reaches new heights but 21 million face premature death this year, warns WHO. A vision for all. Press Release WHA, 4, 241. Disponible online en: <http://www.who.int/inf-pr-1998/en/pr98-WHA4.html>.
- OMS, 1998b. World Health Organization regional publications. Guidelines for the Appropriate Use of Herbal Medicines. Western Pacific Serie n° 23. WHO, Manila.
- OMS. 1989. Forty-second World Health Assembly. Geneva, 8-19 MAY 1989. WHA42.43 Traditional medicine and modern health care. Disponible online en WHO/EMC Web site: <http://search.who.int>. July 29th, 2011.
- OMS. 2000. A framework for global outbreak alert and response. World Health Organization. Department of Communicable Disease, Surveillance and Response. Disponible online en WHO/EMC: <http://www.who.int/emc>.
- OMS. 2010. Enfermedades tropicales desatendidas: preguntas más frecuentes. Disponible online en: http://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq/es/
- OMS. 2011. Infección por el virus del Nilo Occidental. Disponible online en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs354/es/>
- Oniszczyk A., Wojtunik-Kulesza K.A., Oniszczyk T., Kasprzak K. 2016. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 83: 912–929.
- Ooi L.S., Wang H., Luk C.W., Ooi V.E. 2004. Anticancer and antiviral activities of *Youngia japonica* (L.) DC (Asteraceae, Compositae). *J. Ethnopharmacol.* 94 (1): 117-122.
- OPS. 1995. Brote de Encefalitis Equina Venezolana 1995. *Epidemiol Bull.*, 16 (4).
- OPS. 2011. Módulos de principios de epidemiología para el control de enfermedades (MOPECE). Disponible on line en: http://www.paho.org/col/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-ops-oms-colombia&alias=854-mopece2&Itemid=688.
- OPS. 2016. Encefalitis Equina Venezolana. Disponible online en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=8300%3A2013-encefalitis-equina-venezolana&catid=908%3Aviral-diseases-home&Itemid=39851&lang=es
- O'Riordan K., Akilov O.E., Hasan T. 2005. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2 (4): 247-262.
- Özgen U., Kazaz C., Seçen H., Coskun M. 2006. Phytochemical Studies on the Underground Parts of *Asperula taurina* subsp. *caucásica*. *Turk J. Chem.*, 30: 15-20.

- Park K.J. 2003. Evaluation of in vitro antiviral activity in methanol extracts against influenza virus type A from Korean medicinal plants. *Phytother. Res.*, 17 (9): 1509- 1563.
- Perussi J. 2007. Photodynamic inactivation of microorganisms. *Quim. Nova*, 30: 988-994.
- Pierson T. y Diamond M., 2013. Flaviviruses. En: Fields virology 6ta ed. D Knipe y P Howley (Eds.), Lippincott Williams y Wilkins, Boston, EEUU, pp. 760.
- Pisano M.B., Contigiani M.S., Ré V. 2016. Venezuelan equine encephalitis virus. En: Molecular detection of animal viral pathogens. Dongyou L. (Ed.), CRC Press, Boca Ratón, New York, London, pp., 269 -276.
- Pisano M.B., Dantur M.J., Ré V.E., Díaz L.A., Farías A., Sánchez Seco M.P., Tenorio A., Almirón W.R., Contigiani M.S. 2010b. "Co-circulation of Rio Negro Virus (RNV) and Pixuna Virus (PIXV) in Tucumán Province, Argentina". *Trop. Med. In.t Health.*, 15 (7): 865-868.
- Pisano M.B., Ré V.E., Díaz L.A., Farías A., Stein M., Sanchez-Seco M.P., Tenorio A., Almirón W.R., Contigiani M.S. 2010a. Enzootic activity of Pixuna and Rio Negro Viruses (Venezuelan Equine Encephalitis complex) in a neotropical region of Argentina. *Vec. B. Zoon. Dis.*, 10 (2): 199-201.
- Poginsky B., Westendorf J., Blomeke B., Marquardt H., Hewer A., Grover P.L., Phillips D.H. 1991. Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L. *Carcinogenesis*. 12 (7): 1265-1271.
- Powers A.M., Oberste M.S., Brault A.C., Rico-Hesse R., Schmura S.M., Smith J.F., Kang W., Sweeney W.P., Weaver S.C. 1997. Repeted emergence of epidemic/epizootic Venezuelan Equine Encephalitis from a single genotype of enzootic subtype ID virus. *J. Virol.*, 71 (9): 6697-705.
- Pretsch E., Bühlmann P., Affolter C., Herrera A., Martinez R. 2005. Determinación estructural de compuestos orgánicos, Masson, Barcelona, pp., 139.
- Qiao W., Zheng J., Wang Y., Zheng Y., Song N., Wan X., Wang Z.Y., 2008. Efficient synthesis and properties of novel infrared electrochromicanthraquinone imides. *Org. lett.* 10 (4) 641-644.
- Repetto M. 2002. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group Tercera edición, pp., 303-305.
- Riva M. y López D. 1993. Utilización de las pruebas de citotoxicidad *in vitro* en la valoración de los efectos de los contaminantes ambientales. *Boletín Intexter.*, 104: 59-64.
- Roizman B., Knipe D., Whitley R., 2013. Herpes Simplex viruses. En: Fields virology 6ta ed. D Knipe y P Howley (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Boston, EEUU, pp. 1825.
- Rowe J, Greenblatt R.J., Liu D, Moffat J.F. 2010. Compounds that target host cell proteins prevent varicella-zoster virus replication in culture, ex vivo, and in SCID-Hu mice. *Antiviral Res.*, 86 (3) 276-285.

- Rumie Vittar N.B., Comini L.R., Fernandez I.M., Agostini E., Núñez-Montoya S.C., Cabrera J.L., Rivarola V.A. 2014. Photochemotherapy using natural anthraquinones: Rubiadin and Soranjidiol sensitize human cancer cell to die by apoptosis. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 11 (2) 182-192.
- Saha K., Lam S.K., Abas F., Hamzah A.S., Stanslas J., Lim S.H., Lajis N.H. 2012. Synthesis of damnacanthal, a naturally occurring 9,10-anthraquinone and its analogues, and its biological evaluation against five cancer cell lines. *Med. Chem. Res.*, 22 (5): 2093-2104.
- Sandwith N. 1949. Contributions to the Flora of Tropical America: XLIX. Notes on Rubiaceae. *Kew Bulletin*, 253-264.
- Santos-Buelga C., Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 80: 1094-1117.
- Semple S.J., Pyke S.M., Reynolds G.D., Flower R.L. 2001. *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral Res.*, 49 (3): 169-178.
- Semple S.J., Reynolds G.D., O'Leary M.C., Flower R.L. 1998. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *J. Ethnopharmacol.* 60 (2): 163-172.
- Seo E.J., Ngoc T.M., Lee S.M., Kim Y.S., Jung Y.S. 2012. Chrysophanol-8-O-glucoside, an anthraquinone derivative in rhubarb, has antiplatelet and anticoagulant activities. *J. Pharmacol. Sci.* 118: 245–254.
- Shrestha J.P., Fosso M.Y., Bearss J., Chang C.W. 2014. Synthesis and anticancer structure activity relationship investigation of cationic anthraquinone analogs. *Eur. J. Med. Chem.* 77: 96–102.
- Shrestha J.P., Subedi Y.P., Chen L., Chang C.W. 2015. A mode of action study of cationic anthraquinone analogs: A new class of highly potent anticancer agents. *Med. Chem. Comm.* 6 (11): 2012–2022.
- Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A. 2001. Principios de análisis instrumental. 5ta ed., Fernández C. (Ed.), McGraw-Hill, Madrid, España.
- Smetana Z., Ben-Hur E., Mendelson E., Salzberg S., Wagner P., Malik Z. 1998. Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 44 (1): 77-83.
- Song J.M., Lee K.H., Seong B.L., 2005. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antiviral Res.*, 68 (2): 66–74.
- Spinsanti L., Diaz L., Glatstein N., Arselam S., Morales M., Farias A., Fabbri C., Aguilar J., Ré V., Frías M., Almiron W., Hunsperger E., Siirin M., Travassos Da Rosa A., Tesh R., Enría D., Contigiani M. 2008. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J. Clin. Virol.*, 42: 27-33.
- Stepanov A.A., Gornostaev L.M., Vasilevsky S.F., Arnold E.V., Mamatyuk V.I., Fadeev D.S., Gold B., Alabugin I.V. 2011. Chameleonic Reactivity of Vicinal Diazonium Salt of Acetylenyl-9,10-anthraquinones: Synthetic Application toward Two Heterocyclic Targets. *J. Org. Chem.*, 76 (21): 8737–8748.

- Stevens W.C. Jr, Hill D.C. 2009. General methods for flash chromatography using disposable columns. *Mol. Divers.* 13 (2): 247–52.
- Swaminathan S., Khanna N., Herring B, Mahalingam S. 2013. Dengue vaccine efficacy trial: does interference cause failure? *Lancet Infect. Dis.*, 13 (3): 191-192.
- Sydiskis R.J., Owen D.G., Lohr J.L., Rosler K.H., Blomster R.N. 1991. Inactivation of Enveloped Viruses by Anthraquinones Extracted from Plants. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 35 (12): 2463-2466.
- Tamayo N., Echavarren A.M., Paredes M.C., Farifia F., Noheda P. 1990. Synthesis of anthraquinone derivatives by palladium-catalyzed coupling of triflates with stannanes. *Tetrahedron Lett.*, 31 (36): 5189-5192.
- Tardivo J.P., Del Giglio A., de Oliveira C.S., Gabrielli D.S., Junqueira H.C., Tada D.B., Severino D., de Fátima Turchiello R., Baptista M.S. 2005. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, 2 (3): 175-191
- Terlizzi M.E., Occhipinti A., Luganini A., Maffei M.E., Gribaudo G. 2016. Inhibition of herpes simplex type 1 and type 2 infections by Oximacro®, a cranberry extract with a high content of A-type proanthocyanidins (PACs-A). *Antiviral Res.*, 132: 154-164.
- Tomé J.P., Silva E.M., Pereira A.M., Alonso C.M., Faustino M.A., Neves M.G., Tomé A.C., Cavaleiro J.A., Tavares S.A., Duarte R.R., Caeiro M.F., Valdeira M.L. 2007. Synthesis of neutral and cationic tripyridylporphyrin-D-galactose conjugates and the photoinactivation of HSV-1. *Bioorg. Med. Chem.*, 15 (14): 4705-4713.
- Towers G.H., Hudson J.B. 1987. Potentially useful antimicrobial and antiviral phototoxins from plants. *Photochem. Photobiol.*, 46 (1): 61-66.
- Trillo C., Demaio P. 2007. Tintes naturales: guía para el reconocimiento y uso de plantas tintóreas del centro de Argentina. Ed. Sezo. Arg.
- Tsuchiya Y., Shimizu M., Hiyama Y., Itoh K., Hashimoto Y., Nakayama M., Horie T., Morita N. 1985. Antiviral activity of natural occurring flavonoids *in vitro*. *Chem. Pharm. Bull.*, 33 (9) 3881–3886.
- Valeur B. 2001. Molecular fluorescence, Methods and Applications. Wiley-VCH Verlag.
- Van Gorkom B.A., de Vries E.G., Karrenbeld A., Kleibeuker J.H. 1999. Anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 13 (4): 443-452.
- Vázquez-Calvo Á., Jiménez de Oya N., Martín-Acebes M.A., Garcia-Moruno E., Saiz J.C. 2017. Antiviral Properties of the Natural Polyphenols Delphinidin and Epigallocatechin Gallate against the Flaviviruses West Nile Virus, Zika Virus, and Dengue Virus. *Front. Microbiol.*, 8: 1314.
- Vickery M., Vickery B. 1981. Secondary Plant Metabolism. University Park Press. Baltimore.

- Vilhelmova-Ilieva N., Jacquet R., Quideau S., Galabov A.S. 2014. Ellagitannins as synergists of ACV on the replication of ACV-resistant strains of HSV 1 and 2. *Antiviral Res.*, 110: 104-114.
- Villar del Fresno A.M. (ed.) 1999. Quinonas y naftoquinonas. Antraquinonas. Principios flouroglucínicos. En: Farmacognosia General. Síntesis, Madrid, España..
- Wagner E., Hewlett M. 1999. Basic virology. Malden Mass Blackwell Science, USA.
- Wainwright M. 2003. Local treatment of viral disease using photodynamic therapy. *Inte. J. of Antimicrob. Agents*, 21 (6): 510-520.
- Wang C.M., Hsu Y.M., Jhan Y.L., Tsai S.J., Lin S.X., Su C.H., Chou C.H. 2015. Structure Elucidation of Procyanidins Isolated from *Rhododendron formosanum* and Their Anti-Oxidative and Anti-Bacterial Activities. *Molecules*, 20 (7): 12787-12803.
- Wei B.L., Wu S.H., Chung M.I., Won S.J., Lin C.N. 2000. Synthesis and cytotoxic effect of 1,3-dihydroxy-9,10-anthraquinone derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, 35 (12): 1089-98.
- Whitley R.J., Kimberlin D.W., Roizman B. 1998. Herpes Simplex Viruses. *Clin. Infect. Dis.*, 26 (3): 541–555.
- Whitley R.J., Roizman B. 2001. Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357 (9267): 1513-1518.
- Whitley R.J. 2006. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res.* 71 (2-3) 141-148.
- Wijnsma R. y Verpoorte R.,1986. Anthraquinones in the Rubiaceae. En: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Grisebach H., Kirby G., Tamm Ch. (Eds.), Springer-Verlag, Wien, Suiza, pp., 79-149.
- Wu Y.W., Ouyang J., Xiao X.H., Gao W.Y., Liu Y. 2006. Antimicrobial Properties and Toxicity of Anthraquinones by Microcalorimetric Bioassay. *Chinese J. Chem.*, 24 (1): 45-50.
- Wuthi-udomlert M., Kupittayanant P., Gritsanapan W. 2010. *In vitro* evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivatives of *Senna alata*. *J. Health Res.*, 24(3): 117–122.
- Xu J., Xu Z., Zheng W. 2017. A Review of the Antiviral Role of Green Tea Catechins. *Molecules*, 22 (8).
- Xu X., Xie H., Wang Y., Wei X. 2010. A-type proanthocyanidins from lychee seeds and their antioxidant and antiviral activities. *J. Agric. Food Chem.*, 58 (22):11667-11672.
- Yanagida A., Kanda T., Shoji T., Ohnishi Kameyama M., Nagata T.1999. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 855 (1): 181-190.
- Yao G., Ye M., Dai W., Pan Yingming, Xilin Ouyang, and Hengshan Wang. 2014. Synthesis, Cytotoxicity, DNA Binding, and Apoptosis of Alizarin 2-O-Side-Chain Derivatives. *Chem. Nat. Comp.*, 50 (2) 242-246.

- Zhang Z., Li X., Song T., Zhao Y., Feng Y. 2012. An Anthraquinone Scaffold for Putative, Two-Face Bim BH3 α -Helix Mimic. *J. Med. Chem.*, 55 (23): 10735–10741.
- Zhao C.C., Shao J.H., Li X., Kang X.D., Zhang Y.W., Meng D.L., Li N. 2008. Flavonoids from *Galium verum* L. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 10 (7-8): 613-617.
- Zhao F., Wang S.J., Lin S., Zhu C.G., Yuan S.P., Ding X.Y., Yue Z.G., Yu Y., Liu B., Wu X.L., Hou Q., Shi J.G. 2011. Anthraquinones from the roots of *Knoxia valerianoides*. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 13 (11): 1023–1029.
- Zhou Z., Jiang S. H., Zhu D., Lin L., Cordell G., 1994. Anthraquinones from *Knoxia valerianoides*. *Phytochem.* 36, 765–68.
- Zhuravlev N.S., Borisov M.I. 1969. Anthraquinones of *Galium dasypodum*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii.* 5 (2): 118.
- Zuloaga F.O. & Morrone O. 1999. En: Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden (ed. V.C. Hollowell); Missouri Botanical Garden Press, St. Luis, USA; 74, 1005-1006.

TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS

➤ Proceedings:

- ML Mugas, BS Konigheim, L Rojas, JJ Aguilar, MJ Joseau, MS Contigiani, SC Núñez Montoya. **Estudio sobre actividad antiviral *in vitro* de extractos de Galium latoramosum Clos (Rubiaceae).** Dominguezia (2013), 29: 109-110. ISSN: 1669-6859. [XI Simposio Arg. y XIV Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica y I Congreso Latinoamericano de Plantas Medicinales, Fac. Farmacia y Bioquímica, UNR. Rosario, 20-22/11/2013, Santa Fé, Arg.].
- Mugas ML, Konigheim BS, Aguilar JJ, Marioni J. Comini LR, Contigiani MS, Cabrera JL, Núñez Montoya SC. **Searching for a methodology to assess *in vitro* antiviral activity photosensitized.** J. Pharm. Care Health Sys. (2015), 2 (4): 65. ISSN: 2376-0419. [318th OMICS International Conference, OMICS. Philadelphia, 10-12/08/2015, USA]. <http://www.omicsgroup.org/journals/ArchiveJPCHS/global-pharma-summit-2015-posters-and-accepted-abstracts.php>.
- Mugas ML, Rojas L, Joseau J, Núñez Montoya SC. **Elucidación estructural de dos nuevas antraquinonas obtenidas de Galium latoramosum Clos.** The Journal of the Argentine Chemical Society (2016), 103 (1-2): 03-045. ISSN: 1852-1207. Anales de la Asociación Química Argentina (AAQAE 095-196). [XXXI Congreso Arg. de Química, AQA. Ciudad de Bs. As, 25-28/10/2016, Arg.].
- María L. Mugas, Brenda S. Konigheim, Juan J. Aguilar, Marta S. Contigiani, Susana C. Núñez Montoya. **Fotosensibilización de compuestos naturales: Antraquinonas antiherpéticas como posibles agentes para la terapia fotodinámica antimicrobiana.** XXIV JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES, Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM) "Desafíos Contemporáneos de los Jóvenes Investigadores en el Desarrollo de la Ciencia en América Latina". Universidad Estadual Paulista, San Pedro, San Pablo, 24-26/10/2016. Brasil. ISBN: 978-9974-8553-2-8.

➤ Nacionales:

- TERCERA REUNIÓN DE FOTOBIOLOGOS MOLECULARES ARGENTINOS (III GRAFOB). Tucumán, 29-31/08/2016. Argentina. **Fotosensibilización de nueva antraquinona natural inactiva al virus Herpes Simple Tipo-1.** Laura Mugas, Brenda Konigheim, Javier Aguilar, Laura Rojas, Jaqueline Joseau, Marta Contigiani, Susana C. Núñez Montoya; en el **Simposio de Fotomedicina, PDT y efectos de**

- luz sobre la salud.** Este trabajo fue seleccionado para su presentación oral por el Comité Científico de III GRAFOB.
- XXXVI REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE VIROLOGÍA (SAV). Buenos Aires, 5-6/12/2016. **Actividad anti herpética de nueva antraquinona natural: efecto sobre el ciclo de replicación viral.** Mugas,ML; Konigheim,BS; Aguilar,JJ, Contigiani, MS; Núñez Montoya, SC.
 - XII CONGRESO ARGENTINO DE VIROLOGÍA. Buenos Aires, 26-28/09/2017. Argentina. **Actividad antiviral de una antraquinona natural de la flora autóctona y de su derivado semi-sintético.** María L. Mugas, Brenda S. Konigheim, Laura Rojas, Juan J. Aguilar, M. Jacqueline Joseau, Marta S. Contigiani, Fousteris M., Susana C. Núñez Montoya.
- **Internacionales:**
- XI CONGRESO ARGENTINO DE VIROLOGÍA, II CONGRESO LATINOAMERICANO DE VIROLOGÍA. Buenos Aires, 23-26/06/15. Argentina. **Especie vegetal autóctona demuestra actividad antiviral *in vitro*.** María L. Mugas, Brenda S. Konigheim, Laura Rojas, Juan J. Aguilar, M. Jacqueline Joseau, Marta S. Contigiani, Susana C. Núñez Montoya.
 - XVIII REUNIÓN DE LA COMISIÓN PERMANENTE Y XII ASAMBLEA GENERAL DE LA CONFERENCIA IBEROAMERICANA DE FACULTADES DE FARMACIA (COIFFA). Córdoba, 02-06/11/2015. Argentina. **Estudio de citotoxicidad *in vitro* de un pigmento natural.** María L. Mugas, Brenda S. Konigheim, Laura Rojas, Martinez Florencia Juan J. Aguilar, M. Jacqueline Joseau, Marta S. Contigiani, Susana C. Núñez Montoya.
 - 25ST I-APS CONFERENCE. Santiago, 24-27/05/2016. Chile. ***In vitro* viral inactivation photosensitized by a vegetal extract.** Laura Mugas, Juliana Marioni, Brenda Konigheim, Javier Aguilar, José L. Cabrera, Marta Contigiani, Susana C. Núñez Montoya.
 - XIII ENCUENTRO LATINOAMERICANO DE FOTOQUÍMICA Y FOTOBIOLOGÍA (ELAFOT). Villa Carlos Paz. Córdoba, 23-27/10/2017. Argentina. ***In vitro* viral inactivation photosensitized by a natural anthraquinones.** Laura Mugas, Brenda Konigheim, Javier Aguilar, José L. Cabrera, Marta Contigiani, Susana C. Núñez Montoya.

ANEXO

PREPARACION DE MEM**Componentes:**

Medio Mínimo Esencial (MEM).....	9,36 g
L- glutamina.....	0,30 g
Bicarbonato sódico.....	2,20 g
H ₂ O bidestilada estéril.....	.c.s.p 1000 mL

Preparación: Disolver las cantidades indicadas en 900 mL de H₂O bidestilada estéril bajo agitación constante. Completar a volumen final de 1000 mL con H₂O bidestilada estéril. Ajustar el pH a 7,4 utilizando HCl. Filtrar en condiciones de esterilidad. Mantener en lugar fresco (2- 8 C).

FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO**Componentes:**

MEM estéril.....	500 mL
SFB.....	10 %
Gentamicina.....	50 g/mL

Preparación: Añadir al MEM estéril el SFB y la gentamicina, homogeneizar y mantener en lugar fresco (2- 8 C).

FORMULACIÓN DEL MEDIO DE MANTENIMIENTO**Componentes:**

MEM estéril.....	500 mL
SFB.....	2 %
Gentamicina.....	50 g/mL

Preparación: Añadir al MEM estéril el SFB y la gentamicina, homogeneizar y mantener en lugar fresco (2- 8 C).

BUFFER FOSFATO SALINO (PBS)**Componentes:**

NaCl	8,0 g
KCl.....	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,15 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O-bidestilada estéril.....	c.s.p 1000 mL
pH: 7,2 ± 0,2	

Preparación: Se pesan las sales y se disuelven. Por último la solución obtenida se esteriliza por autoclave. Mantener a TA

SOLUCION DE ROJO NEUTRO (RN)**Componentes:**

Rojo neutro	500 mg
H ₂ O-bidestilada estéril.....	c.s.p100 mL
pH: 7,2 ± 0,2	

Preparación: Se pesa el rojo neutro y se disuelve. Por último la solución obtenida, 5mg/mL, se esteriliza por autoclave. Mantener a 4°C.

SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA**Componentes:**

Cristal violeta.....	1 g
H ₂ O-destilada.....	c.s.p 100 mL
pH: 7,2 ± 0,2	

Preparación: Se pesa el cristal violeta y se disuelve. Mantener a TA

SOLUCIÓN PARA LA EXTRACCIÓN DEL RN

Agua destilada.....50 mL

Etanol.....49 mL

Ácido acético.....1 mL

Preparación: Se mezcla el agua con el etanol y por último se añade el ácido.
Mantener a TA.