

20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

Avances en el estudio químico de raíces de *Heterophyllaea lycioides*

Autor: Franco Maximiliano Escatena Perez, e-mail: francomaximiliano95@gmail.com

Co-autor(es): Dimmer, Jesica A.; e-mail: jdimmer@fcq.unc.edu.ar; Cabrera, José Luis; e-mail: jcabrera@fcq.unc.edu.ar; Núñez Montoya, Susana C.; e-mail: sununez@fcq.unc.edu.ar.

Orientador: Núñez Montoya, Susana C.; e-mail: sununez@fcq.unc.edu.ar

Departamento/ Instituto/ Faculdade: Dpto de Ciencias Farmacéuticas – Facultad de Ciencias Químicas, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) – CONICET.
Universidade de origem: Universidad Nacional de Córdoba

Resumen

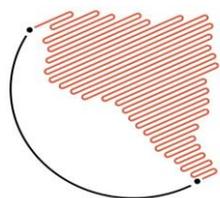
Se inició el estudio químico de *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith (Rubiaceae), extrayendo los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto de Acetato de Etilo (AcOEt) obtenido de las raíces. Mediante particiones líquido-líquido se realizó una primera purificación del extracto de AcOEt, obteniéndose una fracción enriquecida en antraquinonas (AQs). Posteriormente, esta fracción se sometió a cromatografía en columna (CC), lo cual permitió separar siete derivados antraquinónicos, purificados por cromatografía en capa delgada preparativa (TLCp) y caracterizados por co-cromatografía en TLC y espectrofotometría UV-Visible. Entre ellos, dos resultaron ser AQs aisladas previamente del género *Heterophyllaea*, Damnacanthol y Bisoranjidiol. Las restantes se encuentran en proceso de dilucidación de su estructura. Hasta el momento los datos de espectrofotometría permiten deducir que se trataría de derivados que no han sido obtenidos previamente de *H. lycioides* y *H. pustulata*; por tanto, serían estructuras aisladas por primera vez en el género *Heterophyllaea* y particularmente, en la especie *H. lycioides*.

Palabras clave: *Heterophyllaea lycioides*, bisoranjidiol, damnacanthol

Introducción:

Heterophyllaea J.D. Hook. es un género sudamericano, perteneciente a la familia de las Rubiáceas, representado por dos especies: *Heterophyllaea pustulata* Hook f.,

autóctona de Bolivia y del noroeste argentino, especialmente de la región montañosa de Salta y Jujuy; y *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith, autóctona de la región andina boliviana y



peruana^{1,2}. Ambas especies fueron registradas como plantas tóxicas que producen ceguera progresiva en animales³.

H. pustulata ha sido intensamente estudiada por nuestro grupo de trabajo, demostrándose que los compuestos responsables del efecto tóxico son derivados antraquinónicos (AQs)⁴. Los mismos presentan propiedades fotosensibilizantes, por lo cual, en presencia de luz, tienen la capacidad de generar especies reactivas del oxígeno (ERO) a través de dos mecanismos: tipo I (generación de anión superóxido, $O_2^{\bullet-}$) y/o Tipo II (generación de oxígeno singulete, 1O_2)^{5,6}. Estas ERO generan un estrés oxidativo en la célula, produciendo finalmente la muerte de éstas. Numerosos estudios realizados en nuestro grupo demostraron que estas estructuras presentan diversas actividades biológicas a través de un proceso foto-estimulado (antifúngico, antibacteriano, antitumoral, entre otras). Por esta razón, continúan siendo estudiadas como potenciales agentes anticancerígenos y antimicrobianos (bacterias, virus y hongos)⁷⁻¹².

Estos hallazgos, motivaron el estudio de la otra especie que conforma este género: *H. lycioides*. Se trata de un arbusto de aproximadamente 1 m de altura que crece en elevaciones que van desde los 1500 a 35000 metros sobre el nivel del mar. Se conoce vulgarmente con el nombre de ceguera o Q`api.¹³

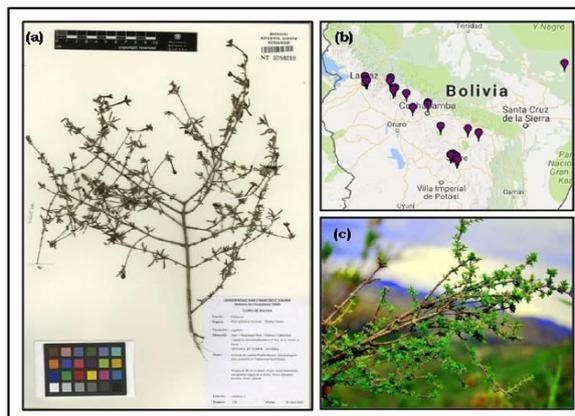
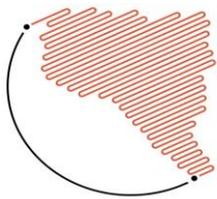


Figura 1: a) Herbario de la especie. b) Distribución de *H. lycioides* en Bolivia. c) Fotografía de la especie *H. lycioides*.

El estudio químico de las partes aéreas permitió aislar siete AQs, tres de las cuales resultaron ser estructuras nuevas, dos de ellas cloradas: 5-clorosoranjidiol (5-clsor), 7-clorobisoranjidiol y lycionina¹⁴. Se demostró que las nuevas estructuras, a través de la foto-estimulación pueden producir ERO¹⁴ y particularmente, 5-clsor junto a Bisoranjidiol (Bisor) y Soranjidiol (Sor), antraquinonas previamente aisladas de ambas especies, producen la inactivación fotodinámica de *Leishmania amazonensis*.¹⁵

El estudio biológico de las raíces de esta especie se inició con un screening antibacteriano *in vitro* de extractos de polaridad creciente: Hexánico (Hex), Bencénico (Ben), Acetato de etilo (AcOEt) y Etanólico (EtOH). Los extractos Hex y AcOEt resultaron ser los más activos sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*, meticilino sensible y resistente, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli*¹⁵. Estos resultados estarían indicando la



presencia de compuestos bioactivos en las raíces de *H. lycioides*.

Objetivos:

Se plantea como objetivo hacer un estudio fitoquímico del extracto de AcOEt de las raíces de *Heterophyllaea lycioides* (Rusby) Sandwith (Rubiaceae); esto implica la extracción, purificación y caracterización de los principales compuestos presentes en las raíces, empleando diferentes técnicas.

Materiales y métodos:

a) Obtención de extracto enriquecido en Aqs.

A partir del extracto de AcOEt seco, obtenido de las raíces de *H. lycioides*, se realizaron distintas particiones liquido-liquido empleando una ampolla de decantación. Se utilizaron diferentes solventes para extraer determinados compuestos a distintos pH de las soluciones acuosas, como se indica en la figura 2. Finalmente, se obtuvo el extracto etéreo II, que contiene en su mayor proporción Aqs.

b) Purificación y caracterización de las Aqs

El extracto Etéreo II se sometió a una cromatografía en columna (CC), utilizando Silica gel 60 (0,063-0,200 mm) como fase estacionaria (FE) y dos fases móviles (FM) constituidas por diclorometano (DCM) - AcOEt (98:2) y (95:5).

Las alícuotas obtenidas de la elusión de la columna (195) se analizaron mediante cromatografía en capa delgada (TLC), utilizando Hexano (Hex) - AcOEt (7:3) como FM. Las alícuotas con iguales perfiles cromatográficos, es decir, que presentaban iguales o similares compuestos, caracterizados por la relación de frentes (Rf), aspecto con la luz visible y aspecto con luz UV de longitud de onda $\lambda=254\text{nm}$ y $\lambda=365\text{nm}$, se juntaron en fracciones según se muestra en la figura 3 que contenían 2 o 3 compuestos mayoritarios (A).

c) Aislamiento e identificación de las Aqs

Para obtener cada compuesto en forma pura, se procedió a realizar una cromatografía en capa delgada preparativa (TLCp), empleando como FE cromatofolios de silica gel 60 en fase normal (0,20 mm layer, Marcherey Nagel, Nuren, Germany) y diferentes FM de acuerdo con la polaridad

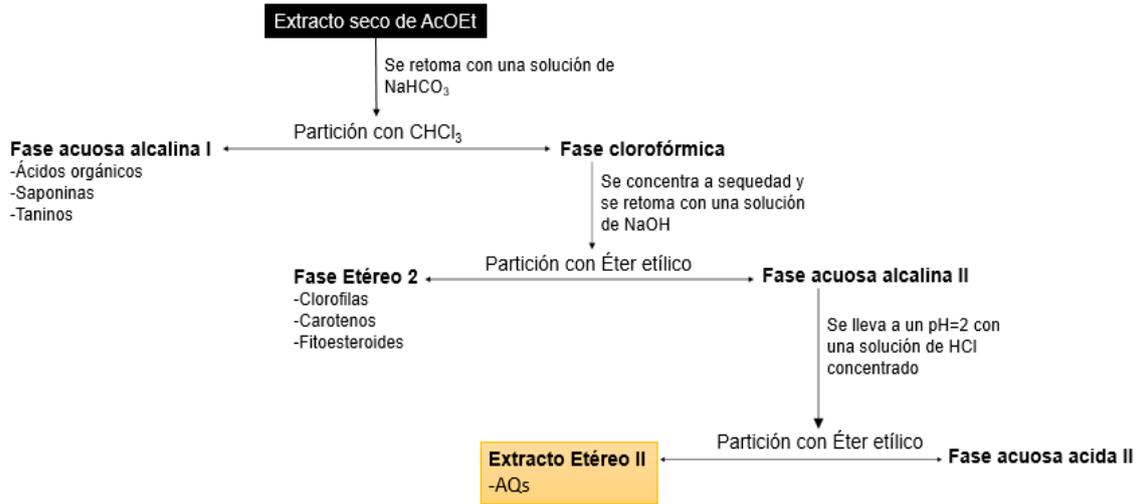
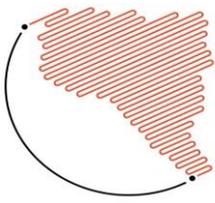


Figura 2. Esquema de purificación del extracto de AcOEt.

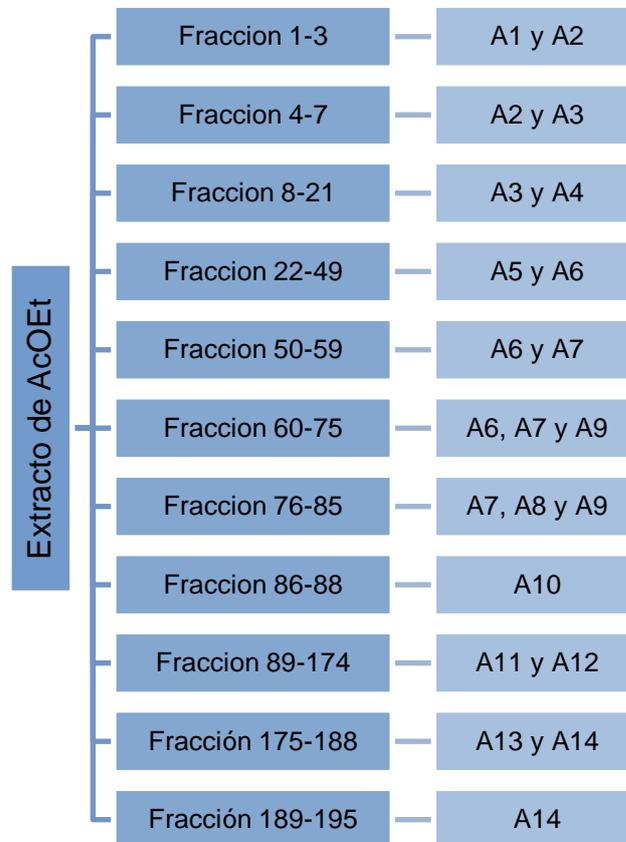
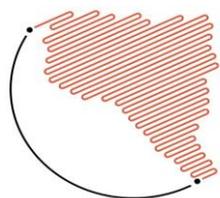


Figura 3. Fracciones obtenidas a partir de la Cromatografía en Columna.



del compuesto a aislar. Así, para el aislamiento de los compuestos presentes en la fracción 22-49 se empleó primero Hex y luego Hex-AcOEt (9:1), obteniéndose A5 (13,8 mg). Con las fracciones 50-59, 60-75 y 76-85 se utilizó Hex-AcOEt (9:1) para obtener A7 (1,1 mg), A8 (0.5 mg) y A9 (0.8 mg). Finalmente, para la fracción 89-174 se empleó Hex-AcOEt (7:3) y se obtuvo A11 (1.8 mg) y A12 (0.4 mg); y para la fracción 189-195 se empleó Cloroformo (CHCl₃)-AcOEt (8:2) y se obtuvo el compuesto A14 (20 mg).

Los compuestos obtenidos se sometieron a espectrofotometría UV-Vis para obtener sus perfiles espectrales en CHCl₃ y Metanol (MeOH), empleando el espectrofotómetro Cary Win UV 50. Se analizó la similitud de estos con los perfiles espectrales de las AQs obtenidas de *H. lycioides* y *H. pustulata*.

Aquellos que presentaron similitud con compuestos obtenidos previamente de *H. lycioides* y *H. pustulata*, fueron sometidos a una co-cromatografía con testigos, empleando como FM CHCl₃-AcOEt (8:2), Benceno (Ben)-AcOEt (1:1) y Hex-AcOEt (1:1) y como FE, placas de silica gel 60 en fase normal.

Resultados y discusión:

A partir de las distintas particiones líquido-líquido aplicadas al extracto de AcOEt, se obtuvo una fracción enriquecida en AQs,

que luego se sometió a una CC. La elusión cromatográfica y seguimiento por TLC permitió obtener 11 fracciones a partir de las cuales se caracterizaron 14 compuestos por sus datos cromatográficos en TLC, como se muestra en la Tabla 1.

Se seleccionaron los compuestos A5, A7, A8, A9, A11, A12 y A14 debido a que se encontraban en mayor proporción para ser purificados por TLCp. Y se caracterizaron mediante su espectro UV-Visible, a fin de realizar su identificación por comparación con las curvas espectrales de AQs testigos. Los datos de los espectros se resumen en la Tabla 2.

Comparando los espectros UV-Visible en CHCl₃ y MeOH con los espectros de AQs testigos, se determinó que el compuesto A7 presenta una similitud de las curvas espectrales con Damnacanthol (Dmnlol) como se muestra en la figura 4. Este espectro presenta un máximo a 276,1 nm que corresponde al sistema bencenoide, característico de una antraquinona, y dos bandas a 337,1 y 368,0, que se observan debido a la presencia de un sustituyente OH en posición 2 y 3 (figura 5).^{17,18}

Los compuestos A5, A8, A9, A11 y A12 no presentaron similitud con los perfiles espectrales de las AQs aisladas de *H. lycioides* y *H. pustulata* y utilizadas como testigos en este trabajo.

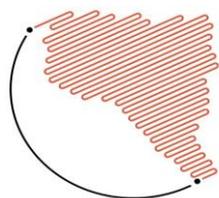


Tabla 1. Características cromatográficas en TLC de los compuestos eluidos de la columna cromatográfica

Compuesto	Color en estado seco	Color observado a $\lambda=254\text{nm}$.	Color observado a $\lambda=365\text{nm}$.	Rf en Hex/AcOEt (7:3)
A1	Amarillo	Opaco	Opaco	0,98
A2	Amarillo	Amarillo claro	Amarillo claro	0,21
A3	Amarillo	Naranja	Naranja	0,86
A4	Amarillo	Naranja claro	Naranja	0,69
A5	Naranja-Rosa	Naranja flúor	Naranja	0,90
A6	Naranja-Rosa	Naranja flúor	Naranja	0,86
A7	Amarillo	Naranja opaco	Naranja opaco	0,49
A8	Amarillo	Naranja claro	Naranja claro	0,42
A9	Amarillo	Naranja claro	Naranja claro	0,68
A11	Amarillo	Amarillo	Amarillo	0,34
A12	Amarillo	Naranja	Naranja	0,45
A14	Amarillo	Opaco	Opaco	0,11

Tabla 2. Espectros UV-Visible de los compuestos purificados

Compuesto	UV- Vis en CHCl_3	UV- Vis en MeOH
	λ , nm (abs)	λ , nm (abs)
A5	275,0 (0,776); 494,0 (0,022)	274,0 (0,702); 500,8 (0,018)
A7	276,1 (0,727); 337,1 (0,087); 368,0 (0,075)	273,1 (0,664); 309,1 sh (0,149); 374,1 sh (0,070)
A8	277,0 (0,709); 337,1 (0,089); 366,1 sh (0,074)	277,0 (0,613); 374,6 sh (0,066)
A9	276,1 (0,862); 335,5 sh (0,127)	273,1 (0,691); 282,2 sh (0,604)
A11	277,9 (1,242); 312,8 (0,248); 361,4 (0,129)	277,9 (0,683); 315,0 (0,214); 380,9 sh (0,063)
A12	269,0 (0,575); 328,2 sh (0,088); 412,1 sh (0,054)	271,0 (0,814); 308,1 sh (0,256); 404,2 sh (0,081)
A14	273,1 (0,425); 420,0 (0,116)	274,0 (0,469); 295,4 sh (0,269); 416,0 (0,149)

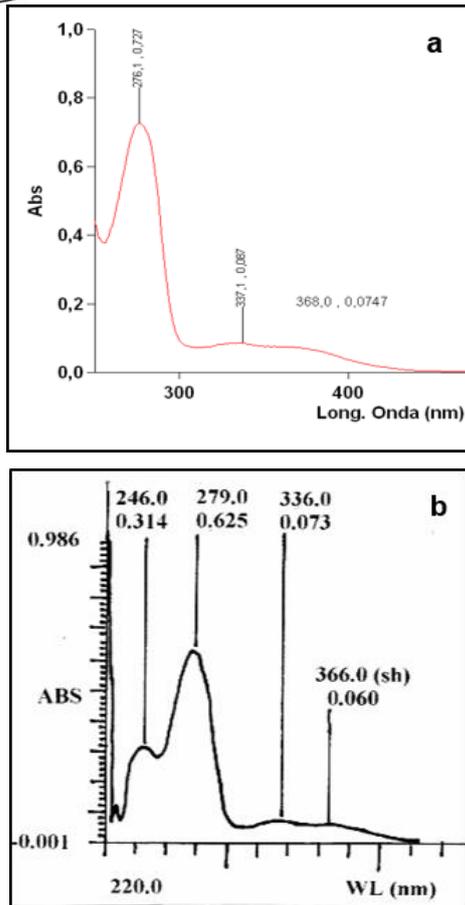
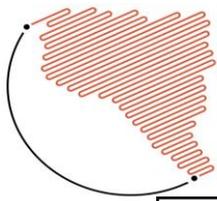


Figura 4. Comparación de las curvas espectrales de A7 (a) con Damnacanthol (b) en CHCl₃.

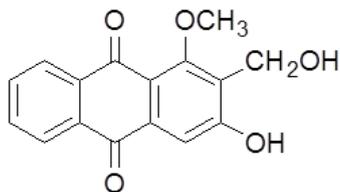


Figura 5. Estructura química de Dmnl.

Teniendo en cuenta los máximos de absorción que presentan dichas AQs, se puede estimar que A5 sería una antraquinona con dos o más sustituyentes OH. La curva espectral de esta AQ muestra una banda a 494 nm, la cual presenta un corrimiento batocrómico respecto a las AQs que poseen un solo OH en posición uno.^{17,18}

Por otro lado, los compuestos A8, A9, A11 y A12 presentan la banda característica del sistema bencenoide alrededor de 277 nm y perfil similar a Dmnl. Por lo cual, se estima que estas estructuras serían similares a Dmnl con pequeñas variaciones en el patrón de sustitución.

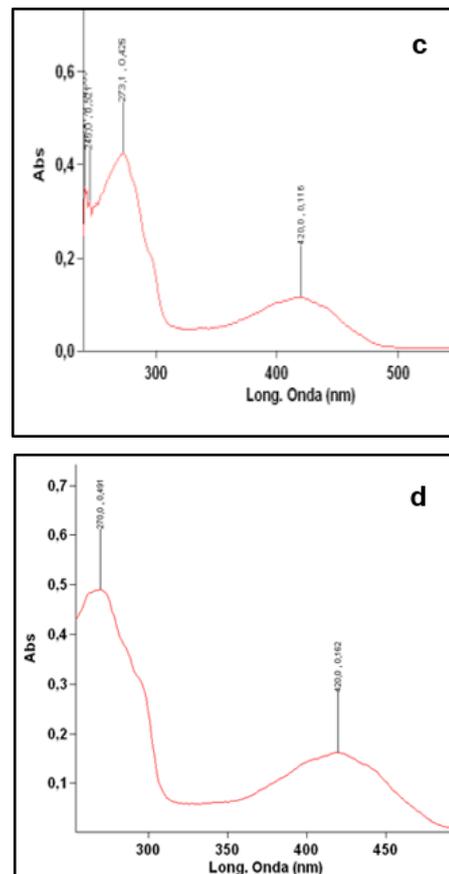


Figura 6. Comparación de las curvas espectrales de A14 (c) con Bisor (d) en CHCl₃.

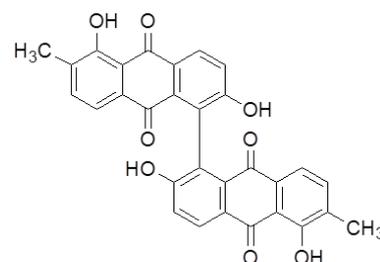
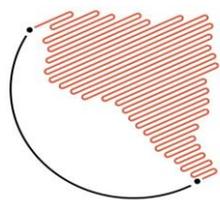


Figura 7. Estructura química de Bisor.



Para arribar a resultados más concluyentes, es necesaria la recolección de mayor cantidad de cada AQ para poder realizar estudios complementarios como Resonancia Magnética Nuclear en una y dos dimensiones (1D-RMN y 2D-RMN), espectrometría de masa de alta resolución (HRMS) y espectroscopia infrarroja (IR).

Se ha demostrado que Bisor presenta actividad antibacteriana en cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que DmnoI no produce inhibición de la misma.⁷ Teniendo en cuenta que Bisor es la AQ que se encuentra en mayor proporción en el extracto AcOEt, la misma podría ser la responsable de la actividad que presenta este extracto.

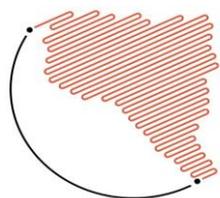
Conclusión:

El estudio químico del extracto de AcOEt, obtenido de raíces de *H. lycioides*, permitió la obtención de 7 AQs, dos de ellas resultaron ser conocidas, Damnacanthol y Bisoranjidiol. Las restantes se encuentran en proceso de dilucidación de su estructura. Hasta el momento los datos de espectrofotometría permiten deducir que se trataría de derivados que no han sido obtenidos previamente de *H. lycioides* y *H. pustulata*; por tanto, serían estructuras aisladas por primera vez en el género *Heterophyllaea* y particularmente, en la especie *H. lycioides*. Estos nuevos derivados antraquinónicos presentarían similitud estructural, dado que sus espectros

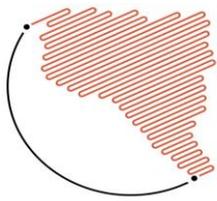
UV-Visible muestran pequeñas variaciones que indicarían diferencias menores en el patrón de sustitución.

Referencias bibliográficas:

1. Bacigalupo, N. M. (1993). Rubiaceae. In: Flora de la Provincia de Jujuy. Cabrera A. L., Tomo XIII, parte IX, (pp. 375-380). Bs. As: Colección Científica INTA.
2. Sandwith, N. Y. Kew Bull. (1949). Contributions to the Flora of Tropical America: XLIX. Notes on Rubiaceae. Volumen 4 (2), (pp. 253-264).
3. Hansen, E. W.; Martiarena, C. A. (1967). Contribución al estudio de la toxicidad de *Heterophyllaea pustulata* Hook "cegadera" en el ganado. Patol. Animal, Rev. Inv. Agropec. (INTA). Serie 4: Patol. Animal, 4 (7), (pp. 81-113).
4. Nuñez Montoya SC, Comini LR, Rumie Vittar B, Fernandez I, Rivarola VA and Cabrera J.L. (2008). Phototoxic effects by *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). Toxicon; (51), (pp. 1409-1415).
5. Núñez Montoya SC, Comini L, Sarmiento M, Becerra C, Albesa I, Argüello GA and Cabrera J.L. (2005). Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: Singlet oxygen and superoxide anion production. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*; 78 (1), (pp. 77-83).
6. Comini L, Núñez Montoya S.C., Sarmiento M, Cabrera J.C. and Argüello G. (2007). Characterizing some photophysical, photochemical and photobiological



- properties of photosensitizing anthraquinones. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 188, (pp. 185-191).
7. Comini L.R., Núñez Montoya S.C., Páez P.L., Argüello G.A., Albesa I. and Cabrera J.L. (2011). Antibacterial activity of anthraquinone derivatives from *Heterophyllaea pustulata* (Rubiaceae). *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 102, (pp. 108-114).
8. Comini L.R., Fernandez I.M., Rumie Vittar N.B., Núñez Montoya S.C., Cabrera J.L. and Rivarola V.A. (2011). Photodynamic activity of anthraquinones isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook f. (Rubiaceae) on MCF-7c3 breast cancer cells. *Phytomedicine*, 18 (12), (pp. 1093-1095).
9. Rumie Vittar, N.B.; Comini, L.R.; Fernandez, I.M.; Agostini, E.; Nuñez 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. *Photodiag. Photodyn. Ther.*, 11 (2), (pp. 182-192).
10. Marioni, J., Arce, J. E., Cabrera, J. L., Paraje, M. G., Núñez Montoya, S. C., (2016). Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract. *Pharm. Biol.*, 3, (pp. 1-11).
11. Marioni, J., Da Silva, M. A., Cabrera, J. L., Núñez Montoya, S. C., Paraje, M. G., (2016). The anthraquinones rubiadin and its 1-methyl ether isolated from *Heterophyllaea pustulata* reduces *Candida tropicalis* biofilms formation. *Phytomedicine*, 23, (pp. 1321 – 1328).
12. 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, (pp. 1025-1028).
13. Atahuachi Burgos, M., (2005). La Guía “Darwin” de las flores de los valles bolivianos. La Paz. Darwin Initiative.
14. Dimmer, J.A., Núñez Montoya, S.C., Mendoza, C.S., Cabrera, J.L., (2017). Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, 137, (pp. 94-100).
15. Dimmer, J. A., Cabral, F. V., Sabino, C. P., Silva, C. R., Núñez Montoya, S. C., Cabrera, J. L., Ribeiro, M. S., (2019). Natural anthraquinones as novel photosensitizers for antiparasitic photodynamic inactivation. *Phytomedicine*, 61, (pp. e152894).
16. Dimmer, J.A., Páez, P. L., Nuñez Montoya, S. C., Comini, L. R., Mendoza, C. S., Cabrera, J. L., (2015). VI Congreso Iberoamericano de ciencias farmacéuticas. Determinación de la actividad antibacteriana en extractos de raíces de *Heterophyllaea lycioides*. Córdoba, Argentina.
17. Thomson, R. H., (1971). Naturally occurring quinones. London y Nueva York, Academic Press.
18. Anouar, E.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), (pp. 1-12).

Agradecimientos:

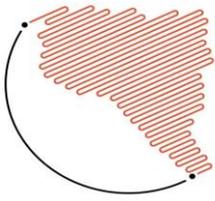
A la Dra. Jesica Dimmer, por su gran predisposición en todo momento para realizar el estudio, por confiar en mí, y sobre todo, la paciencia que tuvo al momento de enseñarme a investigar.

A la Dra. Susana Montoya, por brindarme este espacio de investigación en su área y por sus sabios consejos.

A todos los integrantes del laboratorio 206-207 del departamento de Ciencias Farmacéuticas, por su buena onda de todas las mañanas y así hacer que todo sea más fácil.

Financiamiento:

Al financiamiento otorgado por FONCYT (Plan Argentina Innovadora 2020) - PICT 2014 n° 2204 (Res. ANPCyT n° 270/25); FONCYT – PICT 2016 N° 1697 (Res. ANPCyT n° 285/17); SeCyT-UNC – Proyecto Consolidar (res. N° 411/18 y 99/19) y PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO 2018-2020 - SeCyT-UNC (Res. n° 472/18 y 99/19).



XXVII JORNADAS DE JOVENS
PESQUISADORES
23 A 25 DE OUTUBRO DE 2019
A ciência e a tecnologia na produção
de inovação e transformação social



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO