



Facultad de Ciencias
Bioquímicas y Farmacéuticas
UNR

FARMACOGNOSIA

Dpto. de Química Orgánica

***Estudio fitoquímico bioguiado de plantas de la
flora argentina***

Andrea Marta Escalante

Rosario

Argentina

2005

Estudio fitoquímico bioguiado de plantas de la flora argentina

Andrea M. Escalante

Farmacéutica

Profesora de Enseñanza Media y Superior en Química

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la cátedra de Farmacognosia, Dpto. Química Orgánica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 17 de mayo de 2001 y el 28 de febrero de 2005.

Directora: Dra. Susana A. Zacchino

Co Directora: Dra. Martha A. Gattuso

2005

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a la Doctora Susana Zacchino, quien depositó su confianza en mí, me dirigió en la realización del presente trabajo y con quien he compartido muchos momentos y etapas importantes de mi vida.

Agradezco a la Doctora Martha Gattuso, quien también me ha dirigido en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas, por su apoyo y por sus consejos oportunos.

Al Doctor Manuel González Sierra le quedo profundamente agradecida por su dedicación en la realización de los espectros desarrollados durante mi trabajo de tesis, su excelente humor y su ayuda infatigable en los momentos de análisis.

Al Dr. Guillermo Picó, por guiarme en los ensayos de espectroscopía UV y por el tiempo dedicado al análisis de mis dudas y de mis resultados.

A la Dra. Susana Gattuso, por ayudarme dedicadamente con las técnicas micrográficas.

A la Dra. Alicia Bardón de la Universidad de Tucumán, por recibirme tan generosamente en su laboratorio para mi entrenamiento en técnicas de HPLC.

A los Dres. Pilar Pérez, Juan Carlos Ribas y Angel Durán de la Universidad de Salamanca, por haberme recibido e instruido en su laboratorio y por su incesante apoyo durante toda mi estadía.

Al Dr. Joao Ernesto Carvalho de la Universidad de Campinas le agradezco su valiosa ayuda al realizar los ensayos de actividad citotóxica.

A la Profesora Elisa Petenatti agradezco el material de herbario y bibliográfico facilitados.

A Osvaldo Di Sapio por su ayuda incondicional y buena disposición.

A mis amigos y compañeros de trabajo, en especial a Ma. Victoria, Silvia, Maximiliano y Marcos, quienes me han enseñado mucho y con quienes he compartido las dudas surgidas dándome su valioso apoyo en mis momentos de indecisión, como así también su incondicional ayuda frente a mis apuros. Sinceramente, ¡¡ muchas gracias !!.

A mi amiga Carina Santecchia, con quien más allá de la distancia tengo la suerte de compartir una hermosa amistad, la carrera profesional y también mi iniciación en el trabajo de investigación, todo mi agradecimiento.

A Nancy Vera, a quien conocí en la Universidad de Tucumán, me guió en mis trabajos de HPLC y GC-MS y con quien hemos cultivado una muy linda amistad.

A mis padres quiero agradecerles antes que nada el ejemplo de vida, el enorme esfuerzo que realizaron para que me iniciara en la actividad profesional, sus consejos oportunos, su presencia constante, su confianza y apoyo incondicionales.... en especial, cada una de esas palabras que sólo pueden venir de ellos dos y que siempre me van a acompañar.

A mis hermanos, por escucharme cada vez que necesité un consejo y por dármelo con tanta sinceridad, realismo y amor.

A mi amado esposo Luis, le doy gracias por su paciencia, por acompañarme incondicionalmente, por soportar mis ausencias y silencios y por cuidar y anidar junto a mí lo más hermoso que Dios nos ha dado : nuestro hijo.

Finalmente, agradezco a todos y cada uno de los que de una u otra forma me ayudaron durante de este largo tiempo de trabajo.

*A mis queridos y añorados abuelos:
Rafael Córdoba y Manuel Alberto Escalante*

Este trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones, manuscritos, conferencias y comunicaciones a congresos:

* **PUBLICACIONES**

Escalante, A.M.; Santecchia, C.B.; López, S.N.; Gattuso, M.A.; Gutierrez Ravelo, A.; Delle Monache, F.; Gonzalez Sierra, M.; Zacchino, S.A. (2002), Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an argentinean species in critic risk". *Journal of Ethnopharmacology* **82**, 29-34.

Santecchia, C.; **Escalante, A.**; Gattuso, M.; Zacchino, S.; Gutiérrez Ravello, A.; Delle Monache, F.; González Sierra, M. (2000), *Phytolacca tetramera*, una fuente de saponinas triterpenoides; *Revista Latinoamericana de Química* **28**, 246-247.

Escalante, A.; Gattuso, S.; Zacchino, S.; Gattuso, M. (2005), Anatomic, ultra-structural and histochemical studies on *Phytolacca* species from Argentina with emphasis in *Phytolacca tetramera*; *Plant Biology*. (Enviado).

Escalante, A.; Zacchino, S. (2005), Estudios espectroscópicos completos de Fitolacósido B, Fitolacósido E y Fitolacósido F, aislados de frutos de *Phytolacca tetramera*; en: *Manual de Técnicas Espectroscópicas*, A. San Feliciano (Ed.), CAB-CYTED, Salamanca (España) (En prensa).

Escalante, A.; Pérez, P.; Gattuso, S.; Gattuso, M.; Zacchino, S. (2005), Effect of Phytolaccoside B on morphology of fungal cells and chitin synthesis (Manuscrito en preparación).

* **CONFERENCIA**

Escalante, A. (2004), Estudios para determinar el mecanismo de acción de una saponina antifúngica aislada de *Phytolacca tetramera*; VIII Simposio Argentino y XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Buenos Aires, Argentina, 2-6/08.

* **TRABAJOS A CONGRESO**

Sortino, M.; López, S.; Castelli, M.V.; **Escalante, A.**; Zacchino, S. Malformaciones de las hifas en el test de *Neurospora crassa* como indicador de compuestos inhibidores de la síntesis de pared celular fúngica. II Workshop de Biocatálise (BioCat II), 16-18/02/04, Campinas, Brasil.

Escalante, A.; Santecchia, C.; González Sierra, M.; Gattuso, M.; Zacchino, S. Estudio morfo-anatómico de *Phytolacca tetramera* y localización histoquímica de sus saponinas antifúngicas. XII Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina Nuno Alvares Pereira. 8-12/09/03, Río de Janeiro, Brasil.

Carvalho, J.E.; Kohn, L.K.; Antonio, M.A.; **Escalante, A.**; López, S.; Castelli, M.V.; Gattuso, S.; Petenatti, E.; Zacchino, S. Evaluación de la citotoxicidad de plantas de la flora argentina; IV Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica. 8-10/05/2002, Bs. As., Argentina.

Escalante, A.M.; Santecchia, C.B.; López, S.N.; Gattuso, M.A.; Zacchino, S.A. Aislamiento de saponinas triterpenoides antifúngicas de *Phytolacca tetramera*. XIII SINAQO, 11-14/11/2001. Huerta Grande, Córdoba.

Escalante, A.; Sortino, M.; Castelli, M.V.; López, S.N. Estrategias para detectar antifúngicos selectivos, en extractos vegetales y en productos de síntesis. IX Jornadas de Jóvenes Investigadores de la A.U.G.M., 12-14/09/2001. Rosario, Argentina.

Escalante, A.; Sortino, M.; López, S.N.; Vivot, E.; Muñoz, J.de D. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de catorce especies de la flora de la provincia de Entre Ríos, Argentina. IV Congreso Internacional de Química, 16-20/04/2001. La Habana, Cuba.

INDICE

Presentación	i
Agradecimientos	iii
Publicaciones	vi
Abreviaturas	xiv
I. Introducción	1
I.1-Búsqueda de compuestos bioactivos	2
I.1.A-Importancia de la búsqueda de compuestos antifúngicos	3
I.1.A.1-Características de los hongos causantes de infecciones fúngicas en humanos	3
I.1.A.2-Clasificación de las infecciones fúngicas	5
I.1.A.3-Tratamiento de las infecciones fúngicas	7
I.1.A.4-Estructuras y mecanismos de acción de los principales antifúngicos en uso clínico	8
I.1.A.4.1-Antifúngicos que actúan sobre el núcleo	9
I.1.A.4.2-Antifúngicos que actúan sobre la membrana citoplasmática	9
I.1.A.4.3-Antifúngicos que actúan sobre la pared celular	14
I.1.B-Productos Naturales como fuentes de compuestos bioactivos	17
I.1.B.1-Estado actual del estudio de plantas en el mundo	18
I.1.B.2-Importancia del estudio de la flora argentina	19
I.1.C-Estrategias para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos	21
I.1.C.1-Bioensayos para determinar actividad antifúngica	29
II. Objetivos	35
II.1-Objetivo General	36
II.1.1-Objetivos Específicos	36

III. Resultados y discusión	37
III.1-Selección de especies vegetales argentinas a estudiar	38
III.1.1-Selección del material vegetal	39
III.2-Determinación de la actividad antifúngica de las especies seleccionadas	46
III.2.1-Evaluación de la actividad antifúngica de las especies seleccionadas	47
III.3-Antecedentes químicos y de actividad biológica de <i>Phytolacca tetramera</i>	51
III.3.1-Descripción y localización de <i>P. tetramera</i>	52
III.3.1.1-Antecedentes químicos del género <i>Phytolacca</i>	53
III.3.1.1.1-Estructuras de los compuestos encontradas en especies del género <i>Phytolacca</i>	54
III.3.1.1.2-Saponinas	60
III.3.1.1.2.1-Saponinas aisladas del género <i>Phytolacca</i>	63
III.3.1.2-Estudios previos de actividad biológica en especies del género <i>Phytolacca</i>	68
III.4-Estudio fitoquímico de <i>P. tetramera</i> guiado por actividad antifúngica y elucidación estructural de los compuestos puros aislados	70
III.4.1-Estudio de la actividad antifúngica de los extractos crudos de rizomas, partes aéreas y frutos con semilla de <i>P. tetramera</i>	71
III.4.2-Fraccionamiento y purificación del extracto crudo de frutos de <i>P. tetramera</i>	73
III.4.3-Estrategias para la elucidación estructural de saponinas	84
III.4.3.1-Elucidación estructural de la saponina de tres azúcares	85
III.4.4-Determinación de la CIM de las saponinas aisladas e identificadas	104
III.4.5-Determinación de la CFM de Fitolacósido B	106
III.5-Derivados químicos de Fitolacósido B	107
III.5.1-Preparación de derivados de Fitolacósido B y evaluación de actividad antifúngica	108
III.5.1.1-Preparación de derivados de Fitolacósido B	108

III.5.1.1.1-Hidrólisis	108
III.5.1.1.2-Metilación	109
III.5.1.1.3-Permetilacion	109
III.5.1.2-Determinación de la actividad antifúngica de los derivados de Fitolacósido B	110
III.6-Estudios de Mecanismo de acción de Fitolacósido B	112
III.6.1-Estudios de mecanismo de acción	113
III.6.1.1-Estudios de las malformaciones de las hifas producidas por Fitolacósido B	114
III.6.1.2-Estudios que tienen como blanco la pared celular fúngica	116
III.6.1.2.1-Bioensayo de <i>Neurospora crassa</i>	116
III.6.1.2.2-Bioensayo de Sorbitol	117
III.6.1.2.3-Ensayos de inhibición de (1,3) β -D-glucan y quitin sintasas	118
III.6.1.2.3.1-Estructura de la pared celular fúngica	118
III.6.1.2.3.2-Ensayo de inhibición de (1,3) β -D-glucan-sintasa	119
III.6.1.2.3.3- Ensayo de inhibición de quitin-sintasa	120
III.6.1.2.4-Tinción con Calcofluor	122
III.6.1.2.5-Valoración de Quitina	124
III.6.1.2.6-Observación por MET de la pared de <i>Neurospora crassa</i> tratada con Fitolacósido B	124
III.6.1.3-Estudios que tienen como blanco la membrana celular fúngica	127
III.6.1.3.1-Ensayo del efecto del ergosterol	127
III.6.1.3.2-Ensayo de la unión al ergosterol medido por espectroscopía UV	129
III.6.1.3.3-Ensayo de pérdida de componentes celulares	131
III.7-Estudios de Toxicidad de Fitolacósido B	135
III.7.1-Estudios de toxicidad de Fitolacósido B en células humanas	136
III.7.1.1-Determinación de la actividad hemolítica	136
III.7.1.1.1-Actividad hemolítica de Fitolacósido B	136

III.7.1.2-Actividad citotóxica	137
III.7.1.2.1-Determinación de la actividad citotóxica de Fitolacósido B	139
III.8-Estudios Morfo-anatómico e Histoquímico de <i>Phytolacca tetramera</i>	141
III.8.1-Estudio morfo-anatómico	142
III.8.1.1-Morfología externa	142
III.8.1.1.1-Estudio morfológico comparativo de <i>P.tetramera</i> con otras especies del género <i>Phytolacca</i>	146
III.8.1.2-Anatomía de los distintos órganos de <i>P. tetramera</i>	148
III.8.1.2.1-Estudio anatómico comparativo de <i>P. tetramera</i> con el resto de las especies del género <i>Phytolacca</i> que crecen en Argentina	155
III.8.1.3-Localización histoquímica de las saponinas	157
III.8.1.3.1-Histoquímica de <i>P. tetramera</i> comparada con la del resto de las especies del género <i>Phytolacca</i> que crecen en Argentina	157
IV. Resumen y conclusiones	160
V. Parte experimental	166
V.1-General	167
V.2-Material Vegetal	167
V.2.1-Preparación de extractos crudos de las partes aéreas de las plantas seleccionadas	170
V.2.2-Preparación de extractos crudos de frutos y rizomas de <i>P. tetramera</i>	171
V.2.3-Purificación del extracto crudo de frutos de <i>P. tetramera</i>	171
V.3-Reacciones de derivatización	173
V.3.1-Hidrólisis de Fitolacósido B	173
V.3.2-Metilación de Fitolacósido B	173
V.3.3-Permetilación de Fitolacósido B	174
V.4-Evaluación biológica	174

V.4.1-Microorganismos y Medios	174
V.4.2-Ensayos antifúngicos	176
V.5-Ensayos de Mecanismo de acción	180
V.5.1-Estudio de malformaciones de las hifas	180
V.5.1.1- Preparación de las muestras para la observación con MEB	180
V.5.2-Ensayos que tienen como blanco la pared celular fúngica	181
V.5.2.1-Metodología del bioensayo de <i>Neurospora crassa</i>	181
V.5.2.2-Metodología del bioensayo de Sorbitol	182
V.5.2.3-Metodología del ensayo de (1,3) β -glucan-sintasa	182
V.5.2.4-Metodología del ensayo de quitin-sintasa	184
V.5.2.5-Metodología para la tinción con Calcofluor	185
V.5.2.6-Metodología para la valoración de Quitina	186
V.5.2.7-Preparación de las muestras para la observación con MET	188
V.5.3- Ensayos que tienen como blanco la membrana celular fúngica	190
V.5.3.1-Metodología del efecto del ergosterol en la CIM de Fitolacósido B	190
V.5.3.2-Metodología del ensayo de interacción de ergosterol y Fitolacósido B por espectroscopía UV	190
V.5.3.3-Metodología del ensayo de liberación o pérdida de componentes celulares	191
V.6-Ensayos de Toxicidad	191
V.6.1-Metodología del ensayo de hemólisis de Fitolacósido B	191
V.6.2-Metodología del ensayo de citotoxicidad	192
V.7-Metodología para el estudio morfo-anatómico e histoquímico de <i>P. tetramera</i>	193
V.7.1-Metodología para el estudio morfo-anatómico de <i>P. tetramera</i>	193
V.7.2-Reacciones histoquímicas	194
VI. Bibliografía	195

Abreviaturas

1 D: espectro de una dimensión

2 D: espectro de dos dimensiones

AcOH: Acetona

AE: Acetato de Etilo

ATC: Ácido tricloroacético

CC: Cromatografía en columna

CCD: Cromatografía en capa delgada

CLAE: Cromatografía líquida de alta presión

CLMP: Cromatografía líquida de mediana presión

CH₂N₂: Diazometano

CH₂Cl₂: Diclorometano

CH₃OH: Metanol

CHCl₃: Cloroformo

DCM: Diclorometano

DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer; brinda información sobre la multiplicidad de carbonos, permite diferenciar señales de **CH** y **CH₃** de las de **CH₂**, separándolas en distintas fases.

FAB-MS: Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry

GC-EM: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

Glc: Glucosa

h: hora/s

Hex: Hexano

HMBC: Heteronuclear Multiple Binding Correlation; correlación heteronuclear que permite detectar pares de C-H separados por dos o más enlaces (²J_{C-H}, ³J_{C-H}).

HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation; correlación heteronuclear que permite detectar pares de C-H directamente unidos ($^1J_{C-H}$).

IR: espectroscopía Infra-Roja

KOH: Hidróxido de potasio

min.: minuto/s

NAcGA: N-Acetil-glucosamina

n-BuOH: Butanol

OMS: Organización Mundial de la Salud

Peb: Punto de ebullición

Pf: Punto de fusión

PM: Peso Molecular

Rhm: Ramnosa

RMN de ^{13}C : Resonancia Magnética Nuclear de Carbono; brinda información sobre los desplazamientos químicos de los mismos (δ_C).

RMN de 1H : Resonancia Magnética Nuclear de Protones; brinda información sobre los desplazamientos químicos de los mismos (δ_H), sus multiplicidades y acoplamiento entre protones (J_{H-H}).

ROESY: Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy; permite correlacionar pares de 1H que interactúan espacialmente.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SRM: Suldorrodamina B

TOCSY: Total Correlation Spectroscopy; correlación homonuclear que permite correlacionar todos los 1H conectados por acoplamiento de espín en una cadena.

T^a: Temperatura

UDP-Glc: Uridina di fosfato unida a glucosa

UDP-NAcGA: Uridina di fosfato unida a N-Acetilglucosamina

UV: espectroscopía Ultra Violeta

UV-V: espectroscopía Ultra Violeta-Visible

WHO: World Health Organization

Xyl: xilosa

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. Introducción

I.1- Búsqueda de compuestos bioactivos

La búsqueda de compuestos bioactivos es el punto de partida para el proceso de descubrimiento de drogas potencialmente útiles y se ha convertido en una necesidad insoslayable y urgente en respuesta a las enfermedades para las cuales la terapéutica existente no resulta eficiente (Cordell, 2000; Cragg y col. 2001).

Para encarar la búsqueda de compuestos bioactivos se requiere:

- una actividad biológica blanco,

y una vez seleccionada, se necesita de la participación de dos componentes imprescindibles (Ghilsaberti, 1993):

- sustancias a ser ensayadas
- bioensayos apropiados a ser utilizados

Para realizar el trabajo que presentamos aquí, hemos seleccionado a las infecciones fúngicas en humanos como blanco terapéutico para nuestra investigación, hemos realizado la búsqueda de compuestos antifúngicos a partir de plantas nativas o endémicas de Argentina y hemos utilizado ensayos con y sin blanco específico de modo de detectar su mecanismo de acción.

I.1.A- Importancia de la búsqueda de compuestos antifúngicos

Durante las dos últimas décadas ha habido un aumento dramático de las infecciones fúngicas en humanos como resultado de las deficiencias en el sistema inmunológico asociadas con la quimioterapia anticancerígena, trasplantes, nutrición parenteral y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), entre otras.

Los hongos implicados en estas infecciones pueden ser patógenos verdaderos o patógenos oportunistas. Estos últimos son hongos con baja virulencia que manifiestan su patogenicidad en pacientes inmunodeprimidos y que, en algunos casos, los llevan a la muerte (San Blas y col., 2004).

A pesar de que la medicina ha conseguido aumentar la supervivencia de pacientes inmunocomprometidos, paradójicamente un gran número de estos individuos sufren infecciones fúngicas que los llevan a la muerte.

I.1.A.1- Características de los hongos causantes de infecciones fúngicas en humanos

Los hongos son organismos eucariotes, heterótrofos, cuyas células, a diferencia de las células de mamíferos, presentan paredes celulares. Constituyen un grupo muy heterogéneo, ampliamente distribuido en todos los ecosistemas ya que pueden utilizar casi cualquier superficie para crecer (San Blas y col., 2004).

Desde el punto de vista estructural, los hongos se pueden dividir en dos tipos morfológicos básicos: levaduras y hongos filamentosos. Esta división no es estática, ya que algunos hongos son dimórficos, es decir pueden cambiar su morfología entre filamentosos y levaduriformes, dependiendo de las condiciones ambientales (Kurtzman y col., 1998).

-Hongos levaduriformes

Las levaduras son células sencillas, ovales o redondas, de 2 a 10 μm de diámetro (fig. 1-a) que están ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se las encuentra tanto en frutas, granos, miel y otros alimentos como en el suelo, aire, piel y mucosas de mamíferos (San Blas y col., 2004).

Existen más de 600 especies conocidas de levaduras, distribuidas en 60 géneros taxonómicos, de las cuales sólo aproximadamente 20 son capaces de producir enfermedades en humanos y animales. Dentro de ellas, las más aisladas como agentes causales de infecciones fúngicas en el hombre son *Candida albicans*, otras especies del género *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, etc) y *Cryptococcus neoformans* (Kurtzman y col., 1998).

-Hongos filamentosos

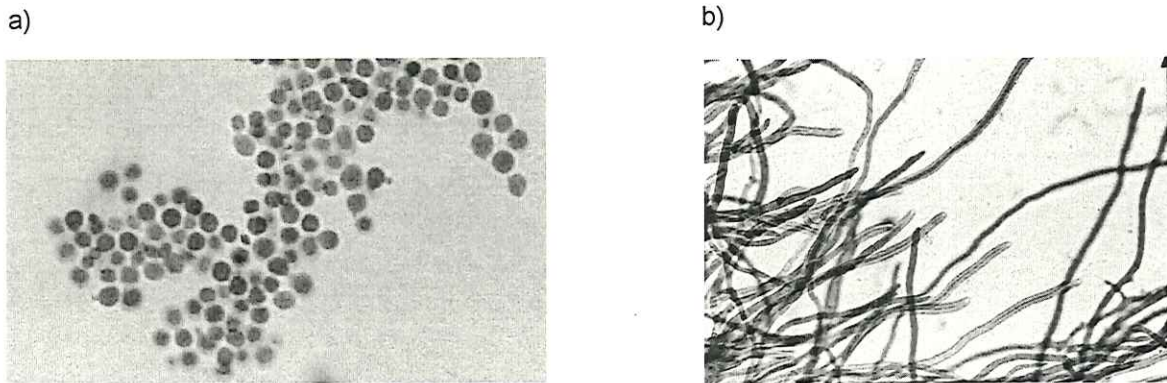
Las unidades fundamentales de estos hongos son estructuras filiformes llamadas hifas, que en conjunto forman un micelio. Generalmente las hifas son multinucleadas de 2 a 30 μm de diámetro pudiendo llegar a tener varios cientos de micrómetros de longitud (Saral, 1991) (fig. 1-b).

Entre los hongos filamentosos, los más importantes como productores de infecciones en humanos pertenecen al género *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus* y *A. fumigatus*) y a un grupo definido de hongos pertenecientes a los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* y *Microsporum*, que se conocen en conjunto como dermatofitos (San Blas y col., 2004).

Del género *Trichophyton*, las especies más comúnmente aisladas en humanos son *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, mientras que del género *Microsporum* son dos las especies que afectan al hombre: *M. canis*, que se

hospeda principalmente en animales (gatos y perros) y *M. gypseum*, que se encuentra en el suelo. Del género *Epidermophyton*, *E. floccosum* es el dermatofito más aislado de infecciones fúngicas en humanos (Weitzmann y col., 1995).

Figura 1: Distintos tipos de hongos observados con microscopio óptico (400x), (a) levaduras, (b) hongos filamentosos



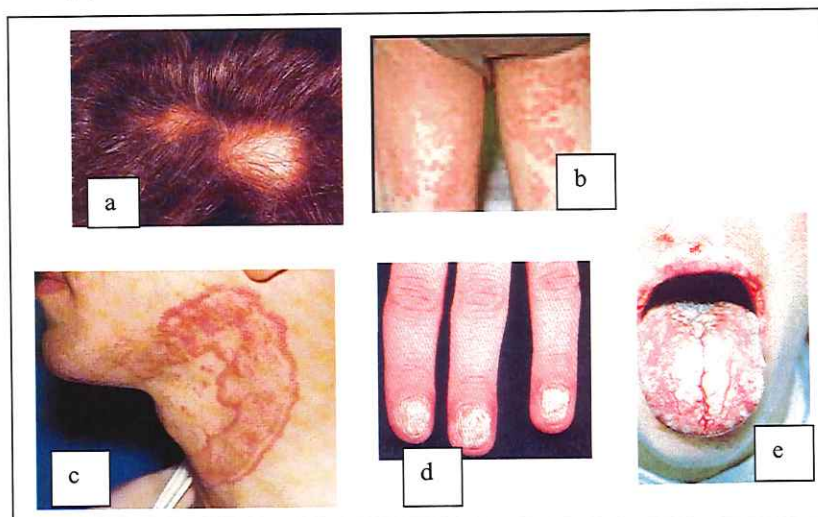
I.1.A.2- Clasificación de las infecciones fúngicas

Las infecciones fúngicas pueden ser clasificadas de acuerdo con su localización en tres grandes grupos: superficiales, subcutáneas y sistémicas (San Blas y col., 2004).

Las micosis superficiales se producen en las capas más externas de la piel, uñas, cabello y mucosas y afectan a millones de personas en todo el mundo (Weitzmann y col., 1995). La mayoría de ellas son producidas por dermatofitos, especialmente *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. y *Epidermophyton* spp. aunque algunas infecciones, especialmente aquellas que afectan las mucosas, son producidas por especies del género *Candida*. Las producidas por dermatofitos se llaman tiñas y su nombre en latín muchas veces da idea de la localización de la infección: *tinea pedis* (pies), *tinea unguium* (uñas), *tinea capitis* (cuero cabelludo). Las manifestaciones clínicas son leves y no comprometen la vida del paciente pero afectan su calidad de vida, pudiendo llegar a ser invasivas o expandirse a

otros individuos (fig. 2).

Figura 2: Algunas infecciones fúngicas superficiales: (a) *tinea capitis*; (b y c) infecciones de piel; (d) *tinea unguium*; (e) infección de la mucosa de la boca.



Las micosis subcutáneas están restringidas a regiones tropicales y subtropicales del mundo y están causadas preferentemente por *Sporothrix schenckii* y por *Fonsecae pedrosoi* (San Blas y col., 2004; Alvarado González y col., 2003).

Las infecciones fúngicas sistémicas son principalmente producidas por *C. albicans* aunque recientemente se ha observado una emergencia de infecciones producidas por otras especies del género *Candida* tales como *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*. También el género *Aspergillus* es causal de infecciones sistémicas. Las aspergilosis invasivas son usualmente causadas por *A. fumigatus* y en menor medida por *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* y son muchas veces la causa de muerte de pacientes con SIDA. A su vez, *C. neoformans* es el agente causal de la meningitis criptocócica que es una de las infecciones fúngicas que produce más mortalidad dentro de los pacientes con SIDA (Murphy y col., 1997; Marco y col., 1998; Ablordeppey, 1999; Aliff y col.,

2003).

Otras micosis de importancia incluyen a las infecciones fúngicas producidas por los hongos patógenos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*, que pueden infectar tanto a pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos (San Blas y col., 1991; Ablordeppey, 1999).

I.1.A.3- Tratamiento de las infecciones fúngicas

Aunque parece haber muchas drogas para el tratamiento de las infecciones fúngicas, hay realmente un número limitado de drogas antifúngicas eficaces (Denning, 2004). Ellas pertenecen a sólo cinco clases de compuestos: pirimidinas (5-Fluocitosina), polienos (por ej. Anfotericina B), azoles (por ej. Fluconazol é Itraconazol), alilaminas (ej. Terbinafina); y lipopéptidos de los cuales Caspofungina (2002, Merck, USA) ha sido recientemente introducida en el mercado (Vicente y col., 2003).

De las drogas antifúngicas en uso clínico, muchas de ellas no son de amplio espectro de acción ó tienen efectos secundarios no deseables. Ésto puede explicarse por la gran similitud existente entre las células fúngicas y las de mamíferos. Todas ellas son eucariotas y comparten una gran cantidad de maquinaria enzimática y bioquímica, resultando difícil desarrollar agentes antifúngicos que tengan especificidad por estructuras del hongo, como es el caso de los más exitosos agentes antibacterianos (Kontoyiannis y col., 2003).

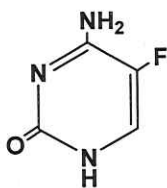
Otro inconveniente de los antifúngicos de uso actual es que algunos son fungistáticos y no fungicidas produciendo recurrencia (azoles).

Además, dado que es difícil y generalmente lleva tiempo diagnosticar una

I.1.A.4.1- Antifúngicos que actúan sobre el núcleo

5-Fluocitosina (fig. 4) es el antifúngico más usado de los que actúan a este nivel (Ablordeppey, 1999). Es una pirimidina fluorada que altera el metabolismo normal de las células fúngicas induciendo la síntesis defectuosa del ARN/ADN.

Figura 4: 5-Fluocitosina



Es muy activa contra *Candida* y *Cryptococcus* spp. con emergencia temprana de resistencia por lo que se utiliza mucho en combinación con anfotericina B (Polak, 1995). Sin embargo, es común la toxicidad habiendo mostrado hepatotoxicidad y problemas cerebrales (Barrett-Bee y col., 1992; Selitrennikoff, 1995).

I.1.A.4.2- Antifúngicos que actúan sobre la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática fúngica actúa como barrera de permeabilidad, conducto para el transporte de pequeñas moléculas y la transmisión de señales involucradas en la regulación del ciclo celular (Selitrennikoff, 1995). Está formada por una bicapa semejante a la de mamíferos constituida por fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides, siendo el ergosterol el principal esteroide de las membranas celulares de los hongos (Barrett-Bee y col., 1992).

El sitio de acción de la mayoría de los antifúngicos en uso actual, es el ergosterol de la membrana fúngica (Onishi y col., 2000) con quien interactúan de

dos formas diferentes:

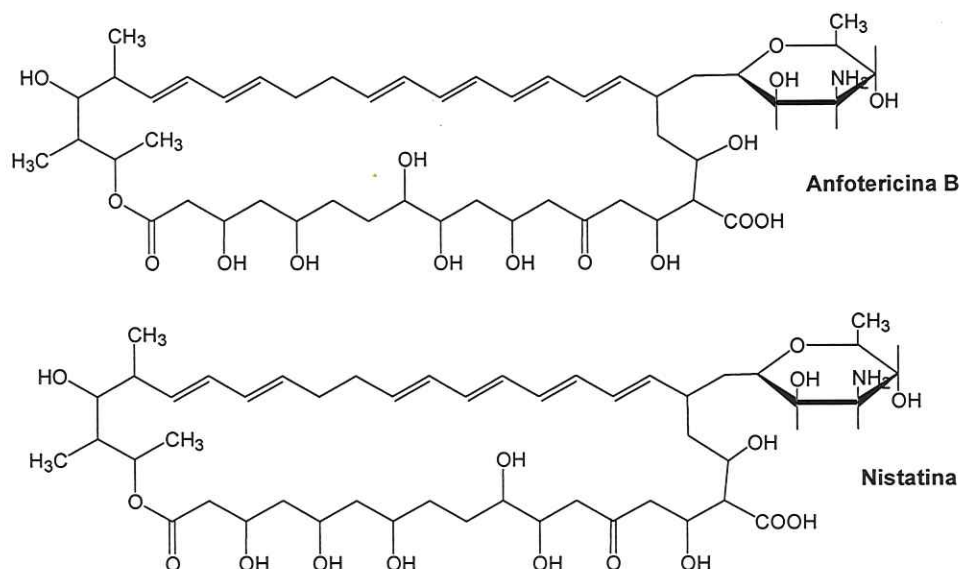
- a) Por unión al mismo.
- b) Inhibiendo su biosíntesis.

a) *Drogas que se unen al ergosterol*

Estas drogas forman complejos con los esteroides de la membrana fúngica, provocando una modificación de la arquitectura de la membrana y por lo tanto una alteración de su función biológica, llevando a la pérdida de componentes intracelulares y a la lisis celular (Selitrennikoff, 1992).

Ejemplos de antifúngicos que actúan por este mecanismo son los polienos Anfotericina B y Nistatina (fig. 5) (Selitrennikoff, 1995). Ambos compuestos han mostrado toxicidad, pero ésta es particularmente importante en Anfotericina B. Este polieno, que es después de 30 años de uso la droga de elección para muchas micosis sistémicas, es extremadamente tóxico para humanos, produciendo nefrotoxicidad (Barrett-Bee y col., 1992).

Figura 5: Estructuras químicas de polienos.



micosis especialmente si es invasiva, muchas veces se utilizan antifúngicos en forma preventiva por tiempos prolongados. Como consecuencia de esto, la resistencia a las drogas antifúngicas ha ido creciendo en forma alarmante constituyendo un serio problema para un futuro muy próximo. (Marr y Borden, 1998).

I.1.A.4- Estructuras y mecanismos de acción de los principales antifúngicos en uso clínico.

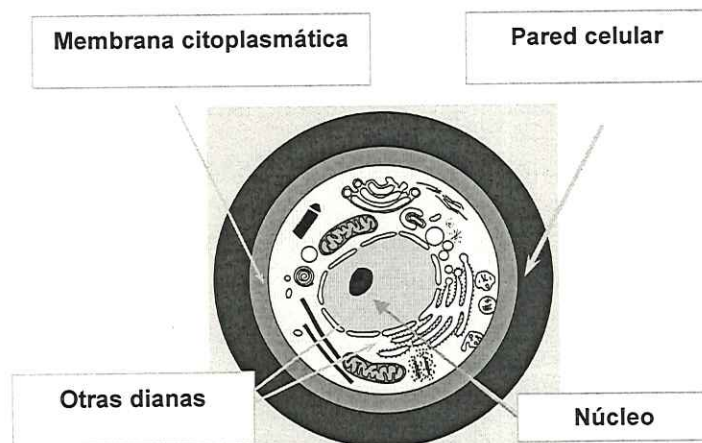
En la figura 1 se presenta un esquema simplificado de la célula fúngica adonde se indican los principales blancos de acción de antifúngicos.

Las drogas que están actualmente en uso clínico pueden agruparse, de acuerdo con su blanco de acción, en tres categorías principales (fig. 3).

Antifúngicos que actúan sobre:

1. el núcleo
2. la membrana citoplasmática
3. la pared celular.

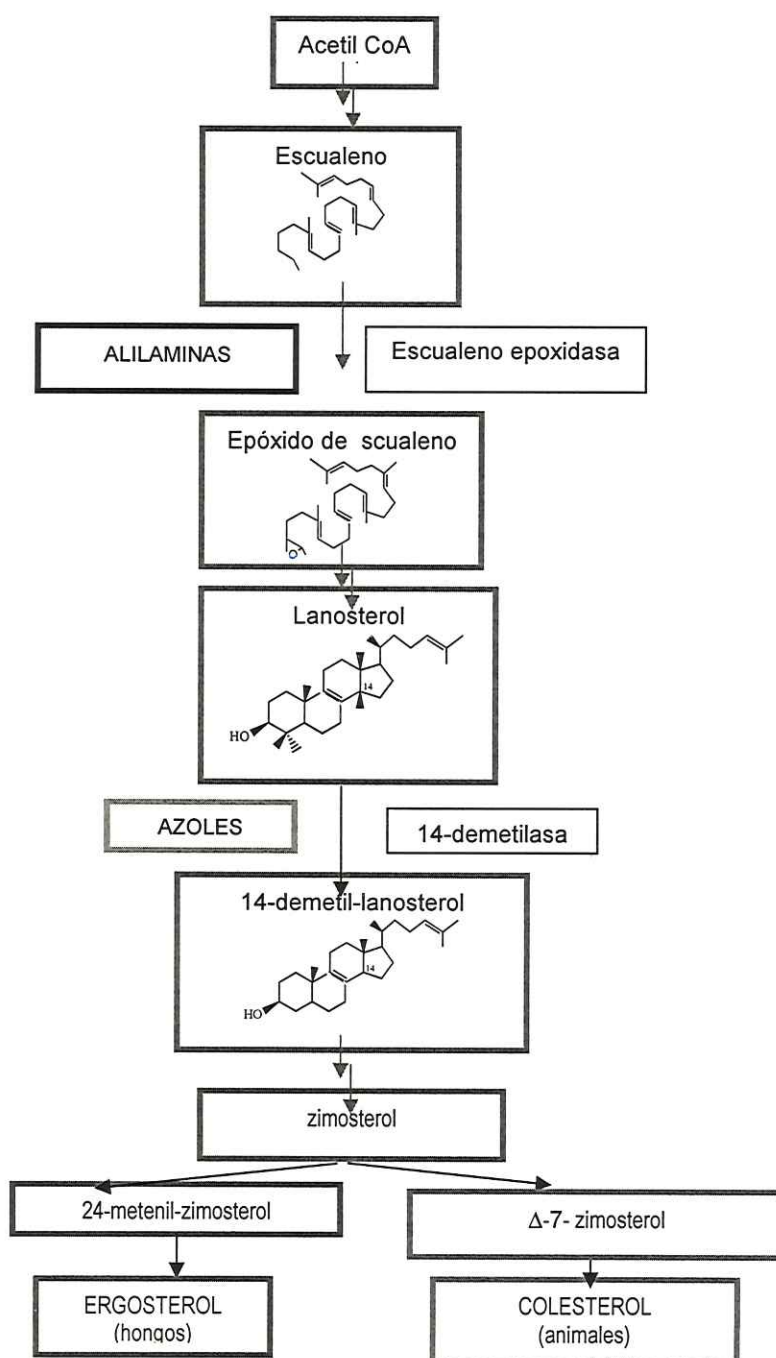
Figura 3: Esquema de la célula fúngica con los principales blancos de ataque de agentes antifúngicos.



b)- Antifúngicos que actúan sobre la biosíntesis de ergosterol

Muchos de los más exitosos agentes de uso en clínica interfieren con la biosíntesis del ergosterol (fig. 6) en alguna de sus etapas, produciendo acumulación de sus precursores biosintéticos (Barrett-Bee y col., 1992, Groll, 1998).

Figura 6: Esquema simplificado de la biosíntesis del ergosterol y del colesterol. A la derecha de las flechas algunas enzimas involucradas y a la izquierda, conocidos inhibidores de las mismas.



Sin embargo, es bien conocido que los antifúngicos que actúan por este mecanismo no son selectivos ya que inhiben etapas de la biosíntesis que son comunes a la síntesis del colesterol (fig. 6), por lo que los efectos secundarios producidos en el huésped son importantes.

Dentro de este grupo de drogas existen dos subgrupos:

- los inhibidores de escualeno epoxidasa
- Los que interfieren con la 14- α -demetilasa del lanosterol

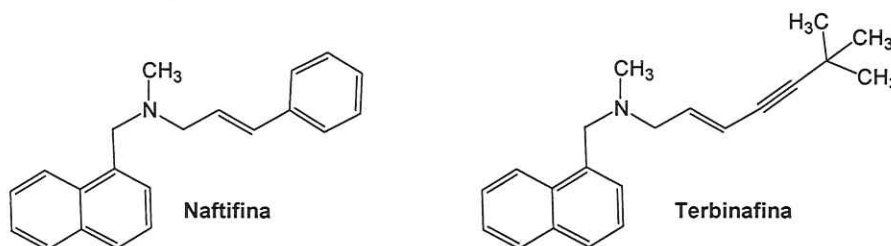
-Inhibidores de escualeno epoxidasa

La epoxidación en la posición 2,3 es la primera etapa en la conversión del escualeno al esqueleto tetracíclico de los esteroides y es catalizado por la enzima escualeno-epoxidasa. Los inhibidores conocidos de esta enzima son las alilaminas (Nussbaumer y col., 1991).

Naftifina (fig. 7) fue la primera alilamina con este mecanismo de acción. Es útil para tratar a los dermatofitos y es usada en forma tópica (Nussbaumer y col., 1991). Terbinafina (fig. 7), un análogo de la anterior, es un antifúngico de elección contra dermatofitos, y se usa en forma oral y tópica (Rashid y col., 1995)

A pesar de que estas drogas son selectivas ya que la enzima fúngica es varios órdenes de magnitud menos sensible que la de hongos a la inhibición por alilaminas, se han manifestado problemas gastrointestinales (3-4%) y alergias (1%) como efectos secundarios (Oehlschlager y col., 1992; Barrett-Bee y col., 1992).

Figura 7: Estructuras químicas de alilaminas.



-Inhibidores de la 14- α -demetilasa del lanosterol

Una vez que se forma el lanosterol por ciclización del epóxido de escualeno, se produce la eliminación del metilo de posición 14 α , para dar 14-demetil lanosterol. La demetilación es catalizada por la 14 α -demetilasa, la cual es inhibida por los principales antifúngicos de uso en clínica, los azoles. Como consecuencia de esta inhibición, se produce acumulación de lanosterol el cual es incapaz de reemplazar al ergosterol de la membrana citoplasmática, produciendo cambios en la permeabilidad celular, en la estructura de la membrana y en la actividad de sus enzimas resultando en la inhibición del crecimiento celular (San Blas, 1991).

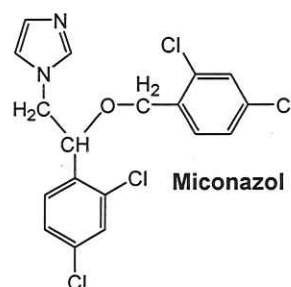
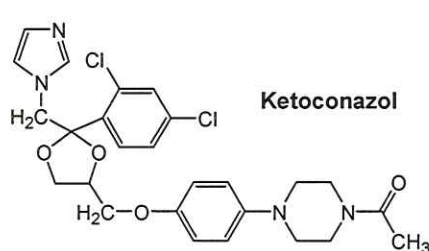
Los primeros azoles que fueron desarrollados son los imidazoles (ketoconazol, Miconazol y Clotrimazol) (fig. 8), los cuales mostraron serios efectos secundarios tales como inhibición de la biosíntesis de hormonas sexuales y toxicidad hepática (Barret-Bee y col., 1992).

Luego se desarrollaron los triazoles (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol) (fig. 8) (Di Domenico, 1999), los cuales ganaron mucha notoriedad entre todos los agentes antifúngicos, debido a su reducida toxicidad respecto de los imidazoles y la posibilidad de múltiples formas de administración. Sin embargo, la resistencia a triazoles tales como Fluconazol é Itraconazol está

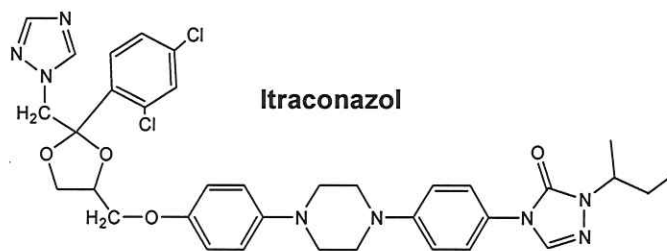
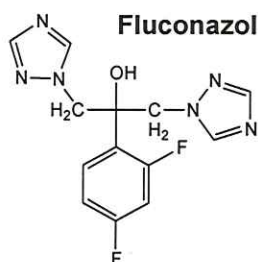
informada cada vez con más frecuencia especialmente contra especies de *Candida*. Otro problema de los azoles es que son fungistáticos y no fungicidas produciendo recurrencia (Kelly y col. 1995; Li y col., 2004).

Figura 8: Estructuras de algunos azoles.

IMIDAZOLES



TRIAZOLES



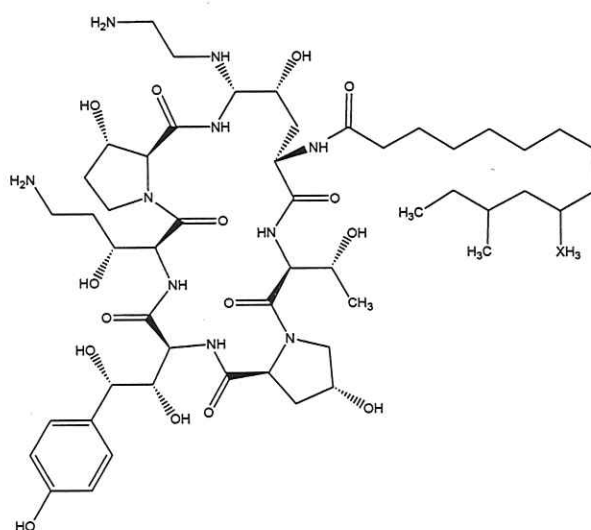
I.1.A.4.3- Antifúngicos que actúan sobre la pared celular

La pared celular fúngica actúa como barrera protectora, evita la ruptura osmótica y confiere forma; es esencial para el crecimiento y viabilidad del hongo (Selitrennikoff, 1995).

Dado que la pared está completamente ausente en las células de mamíferos, los antifúngicos que actúan por este mecanismo son selectivos ya que no modifican ningún sistema bioquímico del huésped, resultando muy atractivos para su uso en clínica (Pérez y col., 2004).

Han sido descriptos varios inhibidores de la síntesis de pared pero sólo uno, Caspofungina (fig. 9), fue recientemente incorporado al mercado como antifúngico (Kartsonis y col., 2003). Su mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de uno de los principales polímeros de la pared, (1,3) β -D-glucano.

Figura 9: Estructura de Caspofungina



En la tabla 1 se presentan a los antifúngicos en uso clínico ordenados por su blanco de acción (San Blas, 1991; Selitrennikoff, 1992 y 1995; Kartsonis y col., 2003).

Tabla 1: Diferentes drogas antifúngicas en uso clínico agrupadas de acuerdo con su blanco de acción

1- Núcleo

Síntesis defectuosa del ARN/ADN (5-Fluocitosina)

2- Membrana celular

2.1- Unión al ergosterol (Polienos: Anfotericina B y Nistatina)

2.2- Inhibición de la biosíntesis de ergosterol:

2.2.1- inhibición de escualeno epoxidasa (Alilaminas: Naftifina y Terbinafina)

2.2.2- inhibición de 14- α -demetilasa del lanosterol

a) Imidazoles (Ketoconazol, Miconazol)

b) Triazoles (Fluconazol, Itraconazol)

3- Pared celular

Inhibición de la síntesis de (1,3) β -D-glucano (Caspofungina)

De todo lo expresado anteriormente se desprende que, a pesar del progreso considerable en la terapia de antifúngicos, subsisten todavía muchos problemas sin resolver.

Todas las drogas en uso clínico presentan alguna de las siguientes desventajas:

- i) no poseen amplio espectro de acción,
- ii) no son selectivas para el hongo sino que producen bloqueos metabólicos al propio huésped produciendo toxicidad,
- iii) inhiben el crecimiento (fungistáticas) pero no matan al hongo (fungicidas) produciendo recurrencia,
- iv) llevan al desarrollo de resistencia.

Por todas estas razones existe un consenso general de que son necesarios nuevos compuestos antifúngicos que en lo posible actúen por un mecanismo de acción selectivo, los cuales puedan ser alternativas para el desarrollo de nuevas drogas antifúngicas más efectivas y en lo posible más seguras para el tratamiento de las infecciones fúngicas tan difíciles de erradicar (Onishi y col., 2000; San Blas y col. 2004).

I.1.B- Productos Naturales como fuentes de compuestos bioactivos

El uso de plantas con propiedades medicinales es tan antiguo como la civilización humana y por largo tiempo, preparaciones con plantas fueron una de las principales opciones para el tratamiento de las enfermedades (Jevan Ram y col., 2004).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas, generalmente con el propósito de su propia defensa, tienen una gran variedad estructural y han demostrado ser de mucha utilidad para el descubrimiento de drogas, muchas de las cuales han llegado a ser esenciales para la humanidad (Nisbet y col., 1997).

Una evidencia de la importancia de los productos naturales (PN), reside en el hecho de que de las 252 drogas consideradas básicas y esenciales por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 1998), un 11% son exclusivamente de origen vegetal y un número significativo son derivados semisintéticos de PN (Rates, 2001).

En un todo de acuerdo con estos datos, un reciente trabajo de Newman y col. (2003) informó que el 61 % de las 877 entidades químicas de bajo peso molecular (PM) introducidas como drogas durante el período 1981-2002, habían sido obtenidas a partir de, o fueron inspiradas en, PN. Éstas incluyen PN (6%), derivados de PN (27%), compuestos de síntesis con farmacóforos de PN o productos de síntesis diseñados en base a PN (28%).

A pesar de la evidente importancia de los PN, ese mismo período 1981-2002 fue testigo de una disminución del interés de las compañías farmacéuticas por continuar con programas de descubrimiento de drogas en base a la exploración de la naturaleza, debido al gran desarrollo de la química de síntesis y

sobre todo a la aparición de la química combinatoria (Newman y col., 2003).

Actualmente, a pesar de todas las vicisitudes y tendencias a lo largo de los años, hay un renovado interés por los PN como fuente de moléculas con actividad biológica (Rouhi, 2003), ya que representan un reservorio extraordinario de moléculas novedosas. En promedio, los productos naturales tienen mayores PM, incorporan menos nitrógeno, halógeno ó azufre pero más oxígeno y son estéricamente más complejos con más carbonos tetraédricos cabezas de puente, más anillos y más centros quirales que los compuestos de síntesis y los obtenidos por química combinatoria (Yue-Zhong, 1998).

Por todas las ventajas que presentan los productos naturales, Newman y sus col. (2003) son partidarios de que la exploración de la naturaleza debe expandirse cada vez más con el fin de encontrar nuevos agentes activos que puedan servir como tales ó como modelos para la elaboración de drogas eficaces para el tratamiento de enfermedades particularmente aquellas difíciles de erradicar.

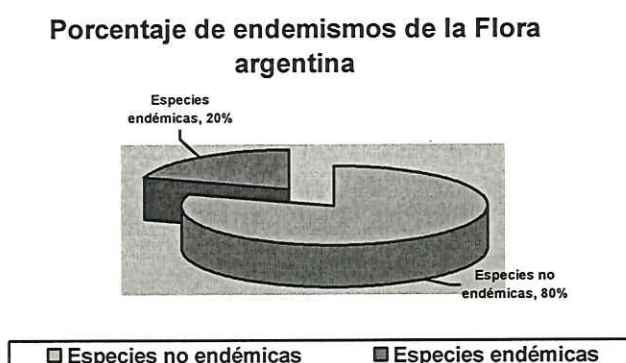
I.1.B.1- Estado actual del estudio de plantas en el mundo

De las 250.000 especies de plantas conocidas en todo el mundo (de un total aproximado de 700.000 existentes), sólo un pequeño porcentaje ha sido investigado fitoquímicamente y mucho menor fue la fracción sometida a ensayos biológicos (Cragg y col., 2001). Sumado a esto, es preocupante saber que una de cada ocho especies de plantas conocidas están en la categoría de especies en riesgo de extinción, lo que constituye otro factor clave en el renovado interés por los PN (Newman y col., 2003).

I.1.B.2- Importancia del estudio de la flora argentina

En la República Argentina habitan 9.689 especies de plantas que se reparten en 1.927 géneros correspondientes a 248 familias (Zuloaga y col., 1996; 1999-a; 1999-b). Estas especies son nativas o endémicas. Las plantas nativas, autóctonas o indígenas, son aquellas propias del país en que se encuentran, es decir que no han sido introducidas. Las especies endémicas son aquellas que viven exclusivamente en un área geográfica restringida y única (Zuloaga y col., 1999-a).

El territorio argentino presenta un alto grado de endemismo con 1.914 especies endémicas, lo que representa aproximadamente el 20 % del total como se muestra en el siguiente gráfico:



Este alto grado de endemismo indica que la flora argentina representa un reservorio genético de incalculable valor, aún poco conocido en cuanto a su utilidad; de allí la importancia de abordar su estudio en forma interdisciplinaria.

En cuanto a su potencial utilidad como fuente de medicamentos, los escasos datos publicados hacen de la flora argentina una interesante e importante fuente de materia prima para estudios de bioactividad. Los mismos deben ser llevados a cabo en forma inmediata ya que, especialmente debido a las diversas

actividades antrópicas, se corre un inminente riesgo de extinción de las especies imposibilitando ello conocer su potencial e incalculable valor.

1.1.C- Estrategias para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos

El camino para obtener compuestos bioactivos a partir de plantas, comprende:

- la selección y recolección del material vegetal,
- la preparación de extractos crudos,
- la evaluación de los mismos con un bioensayo adecuado,
- el fraccionamiento del extracto activo y la evaluación de las distintas subfracciones con el mismo bioensayo, con el fin último de aislar y determinar la estructura de los compuestos puros responsables de la actividad (Hostettmann y col., 1997; Nisbet y col., 1997).

- *Selección y recolección del material vegetal*

Una cuestión central en la búsqueda de compuestos biológicamente activos a partir de plantas, es la selección de las especies vegetales a investigar.

Existen distintos criterios para elegir el material vegetal:

- a) En base a datos etnofarmacológicos
- b) Considerando el tipo de compuestos químicos que se encuentran en las distintas familias vegetales
- c) Datos ecológicos y observación de campo
- d) Al azar

a) La etnobotánica o etnofarmacología es una disciplina científica cuyo objetivo es utilizar los conocimientos recopilados a través de los años por diferentes etnias, sobre las plantas y animales que ellos utilizan para cuidar su salud (Scarpa, 2004).

La idea de descubrir y desarrollar compuestos biológicamente activos en base a información etnofarmacológica es atractiva por el hecho de que el empleo tradicional de una planta para fines curativos es una demostración de eficacia y más importante todavía, de seguridad. La información sobre cómo las plantas son usadas y los procedimientos de extracción, constituyen también datos muy importantes. (Soejarto y col., 1996; Rates, 2001). La experiencia acumulada en los distintos países del mundo, se ha ido transmitiendo de diferentes formas hasta nuestros días y es de un valor incalculable para orientar las investigaciones en procura de nuevas drogas (Soejarto y col., 1997). Se ha demostrado que, de las drogas derivadas de plantas en uso actualmente en países desarrollados, el 77% ha sido descubierto como resultado de estudios de plantas usadas previamente en la medicina popular (Cordell, 2000).

b) La selección basada en los compuestos activos o tóxicos descritos en ciertas familias y géneros vegetales (Gottlieb y col., 1993; Souza Brito, 1996) puede orientar sobre la posibilidad de encontrar una determinada actividad biológica.

También la Quimiotaxonomía, ciencia que clasifica a las plantas en función de las estructuras de sus constituyentes químicos, puede introducir elementos útiles. Si uno o varios compuestos naturales son marcadores quimiotaxonómicos para una dada familia y poseen además relevantes propiedades biológicas, podrían ser de utilidad para buscar sustancias análogas en especies relacionadas de la misma familia (Hostettmann y col., 2001).

c) La selección basada en datos ecológicos u observación de campo es también muy importante. Especies vegetales que crecen en entornos muy hostiles como los trópicos húmedos y zonas muy cálidas, y que no muestran signos de agresión,

pueden contener compuestos preformados que le sirven de defensa contra insectos o microorganismos (fitoanticipinas) ó pueden sintetizar compuestos como respuesta al ataque del patógeno (fitoalexinas) (Morrissey y col., 1999).

d) Al azar. Consiste en que el investigador realice una búsqueda probando todas las especies que tiene a su alcance, incluyendo aquellas que ha recolectado con otros fines. La búsqueda de drogas antitumorales por el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU es un buen ejemplo del uso de esta estrategia (Soejarto, 1997, Rates, 2001).

-Recolección y secado del material vegetal

Una vez que el material vegetal ha sido seleccionado, es importante considerar la época del año en que se realiza la recolección, ya que la composición de los metabolitos de las plantas varía considerablemente en las distintas estaciones. El material recolectado debe ser trasladado rápidamente hasta el laboratorio y sometido inmediatamente a secado. La eliminación de humedad previene el ataque por hongos y evita determinadas reacciones que puedan alterar la composición química inicial (Tyler, 1988).

-Identificación del material vegetal

Una vez que las plantas de interés han sido recolectadas, su identidad debe ser ratificada por un botánico quien deposita un ejemplar en un herbario acreditado internacionalmente donde se acompaña de una etiqueta en la que constan los nombres genérico, específico, la localidad en que fue colectada, la fecha, el nombre del colector, etc. La muestra guardada en herbario se conoce con el nombre de *voucher specimen*.

- *Preparación de los extractos crudos*

- Importancia del solvente a utilizar y de la temperatura de extracción.*

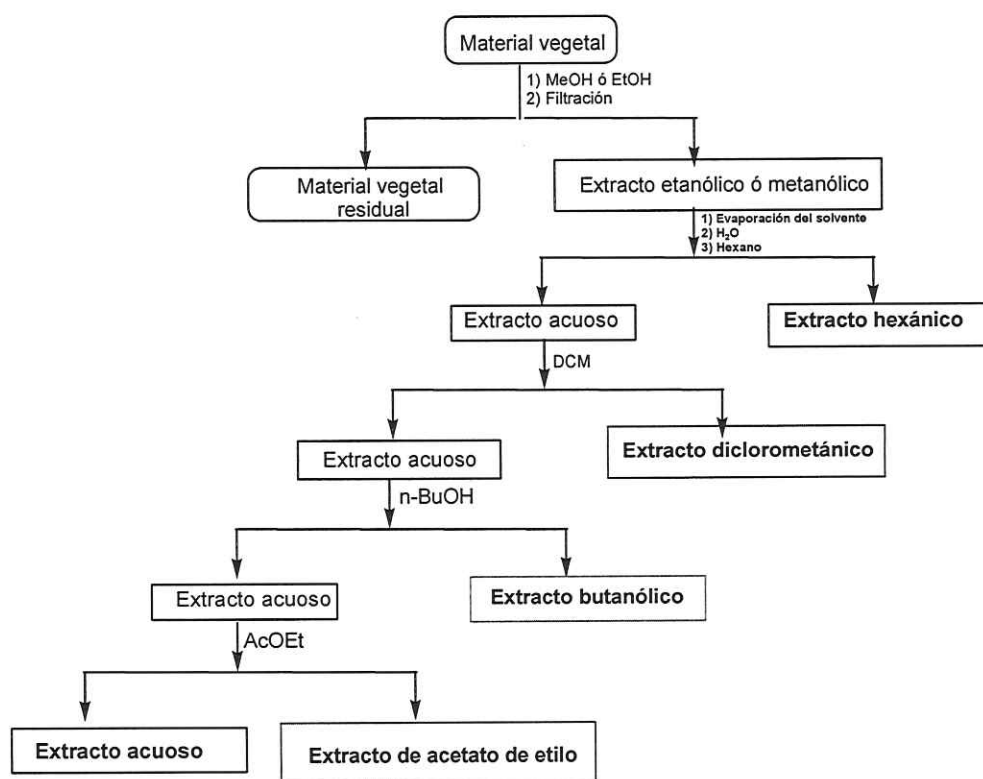
Para la realización de estudios biológicos los extractos de plantas se pueden preparar en frío (por maceración, lixiviación, etc.), o en caliente (utilizando un extractor de Soxhlet ó calentamiento a reflujo; entre otros procedimientos) (Vanden Berghe y col., 1991).

El solvente a utilizar reviste mucha importancia ya que un solvente no polar extraerá diferentes metabolitos que uno polar. Así los extractos pueden ser acuosos, hidroalcohólicos, etanólicos, metanólicos, de acetato de etilo, clorofórmicos, etéreos, hexánicos, etc. (Ghilsaberti, 1993).

Sin embargo, para la gran mayoría de los estudios de bioactividad se utiliza la extracción con etanol ó metanol (incluso mezclas hidroalcohólicas), solventes que permiten la extracción de compuestos de distintas polaridades y en frío, para evitar la descomposición de los metabolitos. A veces, es necesario preparar otro tipo de extractos utilizando metodologías diferentes y otros solventes (Rates, 2001).

- Fraccionamiento del extracto*

Para ésto, se puede realizar una partición líquido-líquido con solventes de polaridad creciente (Cechinel Filho y col.; 2001), tales como hexano, diclorometano, butanol y acetato de etilo lo cual permite la semipurificación del extracto inicial separando sub-extractos que contienen compuestos de distinta polaridad. La figura 10 ilustra un fraccionamiento con solventes de polaridad creciente, indicando las posibles clases de compuestos que pueden ser separados con cada uno de ellos.

Figura 10: Esquema de un procedimiento de partición por solventes del extracto crudo de plantas.

Hexano: extrae esteroides, ácidos grasos, terpenos, hidrocarburos, acetofenonas.

DCM (Diclorometano): extrae lignanos, flavonoides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos, cumarinas.

n-BuOH (Butanol normal): extrae flavonoides, taninos, saponinas, carbohidratos.

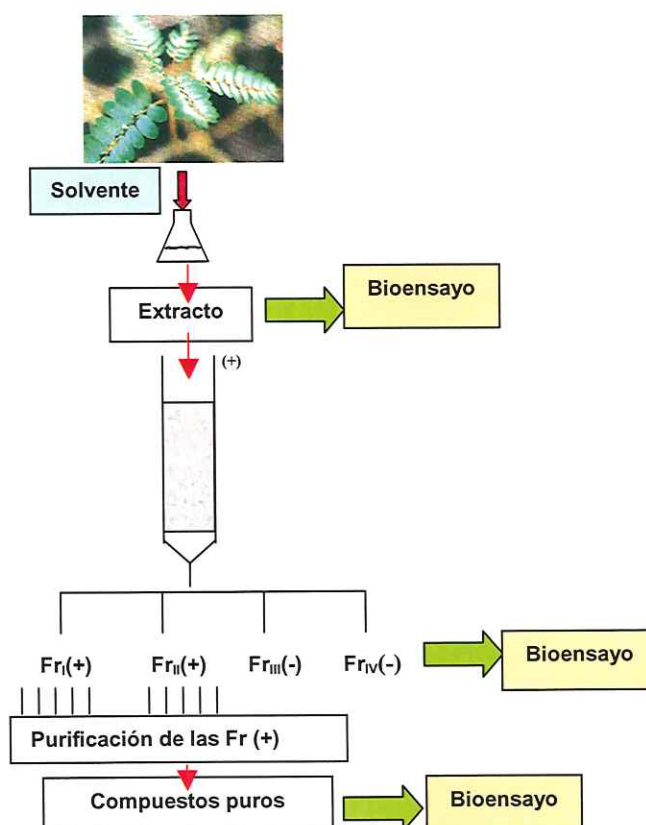
AcOEt (Acetato de Etilo), extrae flavonoides más polares, taninos, xantonas ácidos triterpénicos, saponinas, compuestos fenólicos en general.

En ciertos casos, cuando se buscan alcaloides, fenoles ó ácidos grasos por ejemplo, se utilizan metodologías específicas y solventes adecuados para cada uno de ellos (Hostettmann y col., 1997).

Otras metodologías sólo utilizan fraccionamientos cromatográficos del extracto crudo sin realizar fraccionamientos previos con solventes de polaridad creciente.

Para localizar los principios activos, el extracto crudo se somete a evaluación de la actividad biológica buscada, utilizando un bioensayo adecuado y si resulta activo, se evalúan todos los sub-extractos con el mismo bioensayo con el que se evaluó el extracto crudo. Los sub-extractos activos son fraccionados generalmente por procedimientos cromatográficos exhaustivos y las distintas fracciones obtenidas se someten al mismo bioensayo utilizado durante todo el proceso, lo que permite seleccionar las fracciones positivas para fraccionamientos subsecuentes. En la figura 11 se ilustra un ejemplo de fraccionamiento bio guiado.

Figura 11: Fraccionamiento bio guiado de extractos vegetales para aislar compuestos bioactivos.



El extensivo uso de cromatografías y otras técnicas de purificación permite llegar a compuestos puros bioactivos. Algunas de las técnicas separativas son cromatografías en columna (CC) o en placa (CP); cromatografías con presión normal, de media presión (CLMP) y de alta eficiencia (CLAE).

Entre las técnicas utilizadas para la identificación estructural de los compuestos activos principalmente se utilizan Punto de fusión (Pf), Punto de ebullición (Peb.), y métodos espectroscópicos tales como espectroscopia de masa (EM), Ultravioleta (UV), Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C) en una y dos dimensiones (1D y 2D). que son los más utilizados.

Actualmente existen cromatógrafos acoplados a espectrómetros de masa ó de RMN, que ayudan mucho en la determinación estructural de los compuestos a medida que eluyen de la columna (Hostettmann y col., 1997).

- *Bioensayos a ser utilizados*

-Elección de los bioensayos de acuerdo con distintas instancias de evaluación.

Los bioensayos son pruebas que deben ser creíbles, reproducibles, sensibles, tener significado y lo más importante, ser predictivas. Los mismos pueden ser divididos en dos grupos de acuerdo con la instancia en que ellos son utilizados.

a) *Ensayos de primer orden*: son pruebas sencillas que se aplican a un gran número de muestras iniciales para determinar si tienen o no una determinada actividad biológica. La función de estos ensayos es descartar materiales inactivos y proveer muestras activas para continuar con el proceso de fraccionamiento y

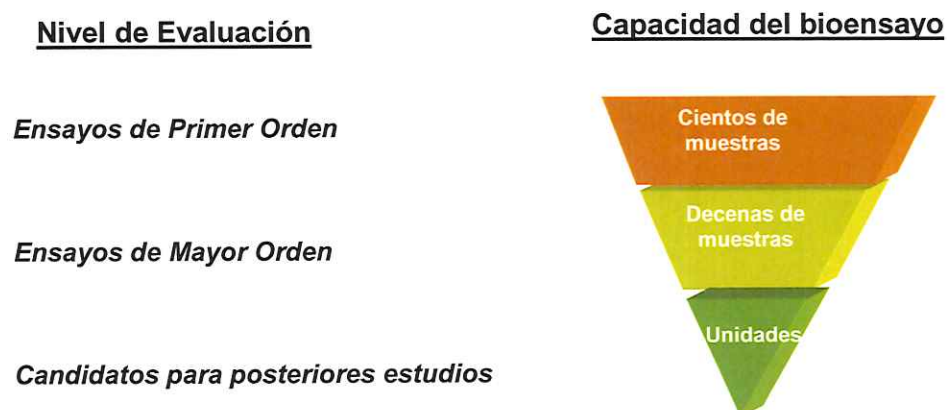
purificación. Los ensayos de primer orden sirven como guía para la detección y fraccionamiento de los extractos activos, la purificación y el aislamiento de los compuestos puros responsables de la actividad.

Estos ensayos deben tener alta capacidad, bajo costo, deben dar respuestas rápidas y sobre todo deben poder ser realizados en el mismo laboratorio donde se hace el trabajo fitoquímico ya que es importante tener en cuenta que en el fraccionamiento de extractos bioactivos se generan cientos de fracciones cuya actividad debe ser conocida por el químico lo antes posible para poder continuar su trabajo (Hostettmann y col., 2001).

b) *Ensayos de mayor orden*: Son pruebas más complejas que permiten profundizar en el estudio de la actividad de los compuestos activos. Incluyen, entre otros, ensayos con blanco específico orientados a determinar el mecanismo de acción. Son generalmente de baja capacidad, costosos y su realización requiere de un mayor equipamiento.

La figura 12 muestra el proceso de evaluación y cómo se va reduciendo el número de muestras a medida que se avanza en su estudio.

Figura 12: Distintos niveles de evaluación y comparación de la cantidad de muestras evaluadas a medida que se avanza en el proceso.



El proceso de evaluación inicial debe reducir el número de compuestos a una cantidad manejable pero no demasiado pequeña de modo de no perder la posibilidad de encontrar compuestos para un futuro desarrollo (Suffness y col., 1991).

I.1.C.1- Bioensayos para determinar actividad antifúngica

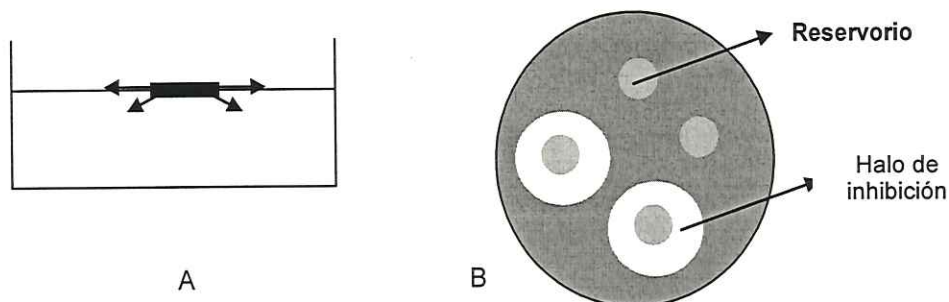
Entre los métodos útiles para evaluar actividad antifúngica, se encuentran los bioensayos a célula entera:

- de difusión
- bioautográficos
- de dilución

- *Métodos de difusión*

En estos métodos, el extracto de planta ó compuesto a probar contenido en un reservorio (discos de papel, agujeros en el medio de cultivo ó cilindros sobre su superficie) se pone en contacto con un medio sólido (por ej. agar) inoculado con un hongo determinado. Luego de un tiempo adecuado de incubación, se mide el diámetro ó el radio de la zona clara (donde no hubo crecimiento fúngico) alrededor del reservorio (fig 13).

Figura 13: Método de difusión en agar con discos de papel. A: Placa vista lateralmente mostrando la forma en que difunden los compuestos hacia el agar; B: Placa vista desde arriba. Los halos de inhibición se observan en blanco.



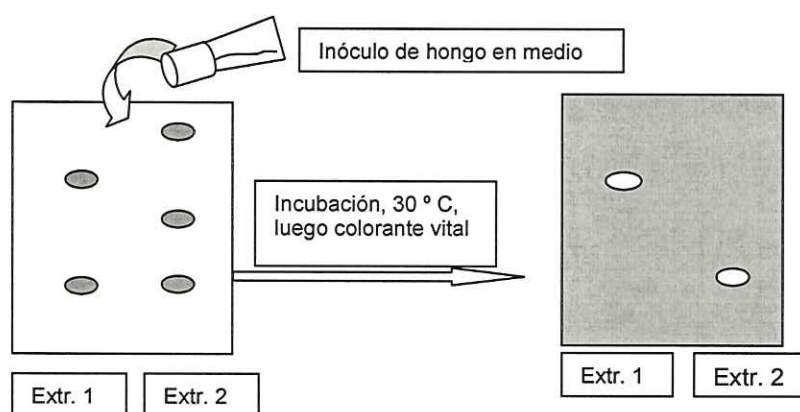
La información que brinda es cualitativa, útil para establecer la sensibilidad del microorganismo a un determinado compuesto, pero no para establecer comparaciones de la potencia antimicrobiana de distintos compuestos. El método presenta además inconvenientes con las sustancias que no difunden al medio.

- *Métodos bioautográficos*

La bioautografía es un método cualitativo útil para la localización de compuestos antifúngicos en un cromatograma de un extracto complejo.

En una de las técnicas bioautográficas denominada *bioautografía en capa de agar*, un medio de agar previamente inoculado con el hongo prueba es aplicado sobre la placa cromatográfica ya desarrollada. Los compuestos difunden al agar y las zonas de inhibición del crecimiento son visualizadas con un colorante vital (Rahalison y col., 1991) (fig. 14).

Figura 14: Método bioautográfico en capa de agar



Esta metodología es usada para hongos de crecimiento rápido entre los cuales se encuentran *Candida albicans* (San Blas y col., 2004), *Cryptococcus*

neoformans (Orabi y col., 2000; López y col., 2002), *Saccharomyces cerevisiae* (Majinda y col., 2001), *Aspergillus fumigatus* y *A. niger* (Magalhaes y col., 2001).

- *Métodos de dilución*

En este tipo de métodos, una cantidad fija de muestra a ser probada se mezcla homogéneamente con un medio sólido (método de dilución en agar) ó líquido (dilución en caldo) al cual se le agrega un inóculo con el hongo a probar. Usualmente se hacen diluciones de la muestra original y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM), que es la menor concentración a la cual se inhibe el crecimiento del microorganismo (fig. 15 A).

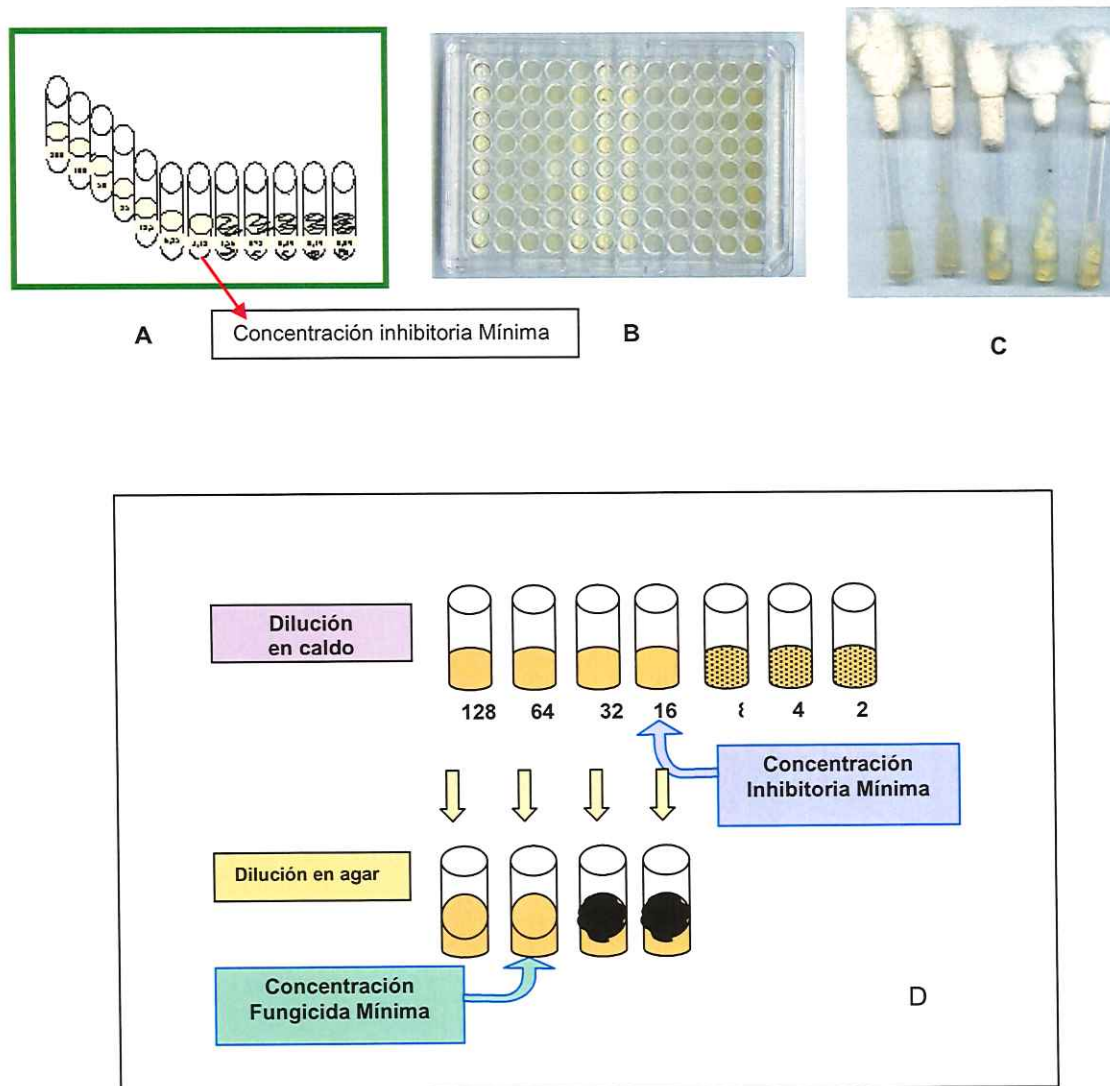
De acuerdo con los volúmenes finales de trabajo, el método se puede clasificar en macro ó microdilución (fig. 15 A-C). Tienen la ventaja de ser cuantitativos y de poder ser usados tanto con muestras solubles en agua como lipofílicas.

Las pruebas pueden ser extendidas para proveer información sobre la concentración fungicida mínima (CFM), que es la mínima concentración a la que se produce la muerte del hongo (Vanden Berghe y col., 1991) (fig. 15-D). Su determinación da una información adicional a la que proporciona la CIM.

La figura 15-D muestra un esquema general de la metodología para determinar la CFM (las concentraciones son valores supuestos sólo a los fines de ejemplificar el método). Para realizar este ensayo se determina la CIM con el método de dilución en caldo y de los tubos donde no hubo crecimiento fúngico (concentraciones inhibitorias), se toman alícuotas que se re-siembran en placas ó tubos de agar-sabouraud por triplicado. Después de un tiempo de incubación, se

determina la mínima concentración a la cual no hubo nuevo desarrollo fúngico (CFM).

Figura 15: Distintos tipos de métodos de dilución: A) macrodilución en caldo; B) microdilución en caldo; C) macrodilución en agar; D) esquema de la metodología para determinar la concentración fungicida mínima (CFM). Los números debajo de los tubos indican las concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ del compuesto prueba.



Dada la gran cantidad de variables que modifican los valores de CIM y de CFM, se deben fijar el mayor número posible de parámetros de modo de que los resultados sean reproducibles aún en diferentes laboratorios y con distinto operador.

Son numerosos los trabajos realizados con estos métodos que se han reportado y se reportan actualmente. Muchos de estos trabajos utilizan sólo el método de difusión (Soman y col., 1999; Pal Singh y col., 1999), otros lo complementan con el método de dilución (Hufford y col., 1988; Avato y col., 1997; Sata y col., 1999) ó sólo realizan método de dilución (Iwasa y col., 1998; Maoz y col., 1999). Otros usan método bioautográficos (Rath y col., 1995). Algunos realizan la evaluación sólo contra hongos patógenos para el humano (Lima y col., 1995), algunos sólo contra especies de *Candida* (Li y col., 1995). En algunos casos se usan varias cepas de una misma especie para determinar qué porcentaje de aislados clínicos son inhibidos por el extracto probado (Hufford y col., 1975).

En la tabla 2 se muestran distintos tipos de compuestos antifúngicos naturales aislados de plantas y de microorganismos descubiertos con los métodos detallados arriba.

Tabla 2: Diferentes tipos de compuestos antifúngicos descubiertos con métodos celulares sin blanco específico

Tipo de compuesto	Fuente natural	Método utilizado	Referencias
Alcaloides	<i>Liriodendrum tulipifera</i>	Difusión	Hufford, 1975
Alcaloides isoquinolínicos	<i>Mitracarpus scaber</i>	Difusión + Dilución	Okunade, 1999
cuaternarios	Derivados sintéticos de la berberina aislada de <i>Coptis japonica</i> y <i>Phellodendrum amurense</i>	Dilución	Iwasa, 1998 Iwasa, 1997
Biflavonas	<i>Cupressocyparis leylandii</i>	Dilución	Iwasa, 1998
Catequinas	<i>Agrimonia pilosa</i>	Dilución	Kasai, 1992
Sesquiterpenlactonas	<i>Inula viscosa</i>	Dilución	Maoz, 1999
	<i>Vernonia amygdalina</i>	Dilución	Al Magboul, 1997
Sesquiterpenfenoles	<i>Bidens cernua</i>	Dilución	Smirnov, 1998
Triterpenoides	<i>Terminalia bellerica</i>	Difusión + Dilución	Nandy, 1997
	<i>Lantana indica</i>	Dilución	Verma, 1998
Saponinas esteroidales	<i>Solanum nigrescens</i>	Dilución	He, 1994
	<i>Trillium grandiflorum</i>	Difusión + Dilución	Hufford, 1988
Poliacetilenos	<i>Bellis perennis</i>	Difusión + Dilución	Avato, 1997
Glicósidos de ácido tetrámico	Esponja marina: <i>Siliquariaspongia japonica</i>	Difusión + Dilución	Sata, 1999
Derivados de ác p-OH-benzoico	Hongo coprófilo <i>Sporormiella vexans</i>	Difusión	Soman, 1999
	Hongo coprófilo: <i>Ascodesmis sphaerospora</i>	Difusión	Hein, 1998
Derivados de antronas	<i>Morinda lucida</i>	Bioautografía	Rath, 1995
Antraquinonas	<i>Tabebuia avellaneda</i>	Dilución	Guiraud, 1994
Naftoquinonas	<i>Myristica fragrans</i>	Dilución	Miyazawa, 1996;
Lignanos y neolignanos	<i>Virola surinamensis</i>		Zacchino, 1997; Zacchino, 1999; Zemek, 1979
Fenilpropanoides	<i>Ampla distribución</i>	Dilución	Hattori, 1986; Marston, 1995
Derivados de acetofenonas	<i>Sebastiania schottiana</i> e <i>Phyllanthus sellowianus</i>	Difusión	Lima, 1995
	Análogos sintéticos	Dilución	Pinheiro, 1999
Resorcinoles	<i>Myristica fragrans</i>	Dilución	Orabi, 1991
Lactonas	Cianobacteria marina	Difusión	Pal Singh, 1999
	<i>Lyngbya majuscula</i>		
	Fungo <i>Coniothyrium sporulosum</i>	Dilución	Mukhopadhyay, 1999
Macrolactonas	<i>Pseudolaryx kaempferi</i>	Difusión + Dilución	Li, 1995
	Actinomiceto: HILY-8620959	Dilución	Guiraud, 1999
Fosfocolinas	<i>Irlbachia alata</i>	Dilución	Lu, 1999

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

II.1- OBJETIVO GENERAL

- Contribuir al conocimiento de la flora de nuestro país con un enfoque multidisciplinario que comprende estudios: morfo-anatómico, fitoquímico y de actividad biológica, modificación química por semisíntesis, incluyendo uso de bioensayos sin y con blanco específico y estudios de toxicidad.

II.1.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Hacer un relevamiento de las plantas utilizadas en la medicina popular argentina para dolencias relacionadas con infecciones fúngicas y de otras plantas elegidas al azar que no hayan sido previamente estudiadas.
- Seleccionar una serie de plantas para ser sometidas a la evaluación de su actividad antifúngica.
- Realizar el fraccionamiento guiado por actividad para obtener compuestos puros bioactivos.
- Utilizar todas las técnicas necesarias para elucidar las estructuras de los compuestos activos, tales como UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , EM.
- Modificar químicamente los compuestos activos, evaluarlos y conocer su relación estructura-actividad.
- Hacer estudios de mecanismo de acción con métodos celulares y enzimáticos.
- Estudiar la toxicidad de los compuestos activos.
- Establecer los parámetros morfológicos y micrográficos necesarios para dejar perfectamente establecida la identidad de la planta en estudio según los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1- Selección de las especies vegetales argentinas a estudiar

III.1.1- Selección del material vegetal

Para el estudio de actividad antifúngica nos propusimos probar plantas nativas y endémicas de la flora argentina con el fin de elegir la más activa para continuar su estudio.

Para el estudio fitoquímico guiado por actividad biológica, realizamos previamente una selección de especies vegetales argentinas utilizando los siguientes criterios:

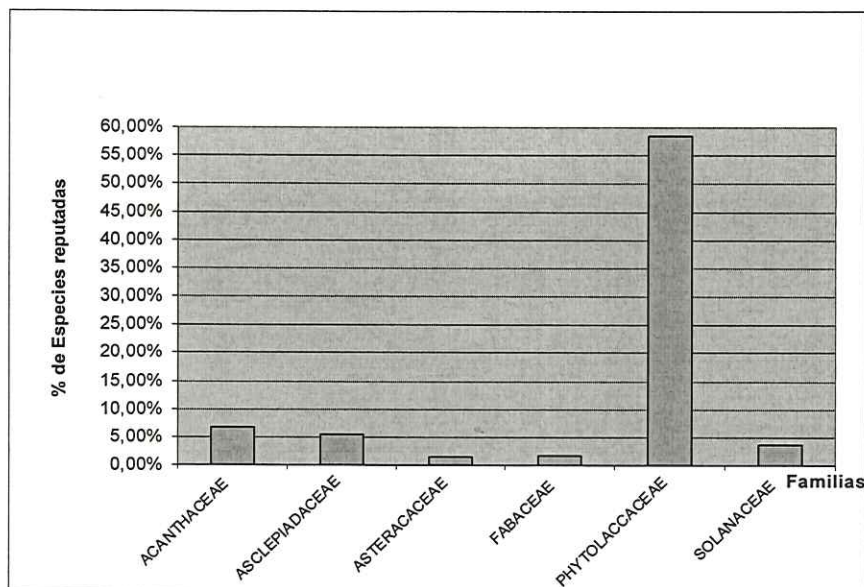
- a) etnofarmacológico
- b) al azar.

a) Selección en base a datos etnofarmacológicos

Realizamos búsquedas en libros y revistas especializadas sobre plantas argentinas usadas en la medicina popular (Filipov, 1997; Mereles y col., 1997; Pochettino y col., 1997) utilizando palabras clave relacionadas con actividad antifúngica tales como: antimicótico, antiséptico, lavado de heridas, aftas, caspa, vulnerario, lavado de llagas, afecciones cutáneas, afecciones urinarias, caída del cabello, cicatrizante. Las familias más citadas fueron consideradas prioritarias en los estudios de evaluación de actividad antifúngica.

En este relevamiento bibliográfico encontramos citas de 144 especies distribuidas en 50 familias, siendo las familias Asteraceae, Fabaceae y Solanaceae las más citadas (21, 12 y 13 citas respectivamente; fig. 16). Esta última es además una de las diez familias mas citadas en relevamientos etnobotánicos publicados en *J. Ethnopharmacology* (Gottlieb y col., 2002).

Figura 17 % de especies de cada familia vegetal argentina usadas para tratar dolencias relacionadas con infecciones fúngicas calculado como: (número de especies citadas/el número total de especies de esa familia existentes en Argentina) x 100.



De la comparación de estos porcentajes, surgen las familias Phytolaccaceae y Acanthaceae como las más promisorias para la búsqueda de compuestos antifúngicos: 58 % de las especies de la familia Phytolaccaceae y 6,8 % de la familia Acanthaceae son usadas en la medicina popular para dolencias relacionadas con infecciones fúngicas. Es por éso que hemos seleccionado especies de ambas familias para la evaluación de actividad antifúngica.

a.1) Elección de especies argentinas de la familia Phytolaccaceae

La familia Phytolaccaceae es una familia del Orden Centrospermae (Caryophyllales, Chenopodiales), que se divide en seis subfamilias, de las cuales tres se encuentran en la Argentina: Phytolacchoideae, Rivinoideae y Microteoideae en las zonas norte y centro-este del país.

En la revisión actual de las Phytolaccaceae de la Argentina (Guaglianone, 1999) aparecen citadas en cada subfamilia los siguientes géneros y especies:

-Subfamilia PHYTOLACCOIDEA:

Comprende únicamente al género *Phytolacca* y a las especies *P. americana* Linnaeus, *P. tetramera* Hauman, *P. bogotensis* Humboldt, Bonpland & Kunth, *P. rivinoides* Kunth & Bouche y *P. dioica* Linnaeus.

-Subfamilia RIVINOIDEAE

Comprende los géneros *Seguiera*, *Rivina*, *Trichostigma*, *Hillieria* y *Petiveria* y las especies *S. aculeata* Jacq., *S. paraguayensis* Morong, *R. humilis* Linnaeus, *T. octandrum* (Linnaeus) Walter, *H. latifolia* (Lamark) Walter y *P. alliacea* Linnaeus.

-Subfamilia MICROTEOIDEAE

Comprende al género *Microtea* y solamente a la especie *M. scabrida* Urban.

Para nuestros estudios de actividad antifúngica, hemos seleccionado una especie de cada sub-familia priorizando especies que no tengan estudios previos:

- *Phytolacca tetramera* Hauman de la sub-familia Phytolacchoideae
- *Seguiera aculeata* Jacq. de la sub-familia Rivinoideae
- *Microtea scabrida* Urban de la sub-familia Microteoideae.

-Phytolacca tetramera Hauman

Es una planta endémica de Argentina de la cual no se conocen estudios previos. Sin embargo, datos etnofarmacológicos proporcionados por la base de datos Napralert dan cuenta de que otras especies del género *Phytolacca* son utilizadas por la medicina popular: *P. dioica* (ombú), se usa como vulnerario para lavar heridas (Hieronymus, 1882; Lifchitz, 1985). La decocción de la raíz y las hojas se utiliza para preparar lociones y éstas junto con las tinturas se usan contra la sarna y otras afecciones de la piel (Dominguez, 1903; 1928). La ceniza de ramas y hojas es usada como cicatrizante (Martinez Crovetto, 1981). *P. dodecandra*, nativa de Norte América, tiene una larga historia de uso para distintas afecciones de la piel (www.wrc.net/phyto/Phytolacca.html), mientras que la infusión de las hojas de *P. rivinoides* es usada para desinfectar y reducir la inflamación de llagas (Schultes y col., 1992).

-Seguieria aculeata Jacq.

Es un árbol pequeño nativo de Argentina que se encuentra en Misiones, Jujuy y Salta. No hay de este género ni de esta especie información etnofarmacológica ni estudios de actividad biológica reportados.

Sólo un trabajo referido a este género está publicado en la literatura (Salt y col., 1991). En él se hace un análisis del contenido de esteroides en tres especies del género *Seguieria*: *S. aculeata*, *S. americana* y *S. langsdorfii*.

-Microtea scabrida Urban

Es una hierba nativa de Argentina, de la cual no existen estudios previos. Datos etnofarmacológicos de la base de datos Napralert informan que una especie

del mismo género, *M. debilis*, ha sido usada para tratar llagas y heridas infectadas (Duke, 1994).

No hay estudios previos de evaluación de actividad antifúngica de especies de *Microtea*.

a.2) Elección de especies argentinas de la familia Acanthaceae

En Argentina, esta familia está integrada por diecisiete géneros y setenta y tres especies, trece de las cuales son endémicas. De éstas, siete pertenecen al género *Justicia*: *J. gilliesi*, *J. hunzikeri*, *J. lilloana*, *J. mandonii*, *J. oranensis*, *J. riojana* y *J. tweediana* (Zuloaga y col., 1999-a), no existiendo para estas especies trabajos previos publicados en cuanto a usos.

Para nuestros estudios de actividad antifúngica seleccionamos tres especies, dos endémicas y una nativa, priorizando que esta última no tuviera estudios previos:

- *Justicia gilliesi* (Ness) Benth.
- *Justicia tweediana* (Ness) Griseb.
- *Justicia squarrosa* Griseb.

-*Justicia gilliesi* (Ness) Benth.

Es un subarbusto endémico que crece en el centro-oeste de Argentina (La Rioja, San Luis, San Juan y Mendoza) a una elevación de 500-1.500 m sobre el nivel del mar. De esta especie no existe ningún estudio previo.

- *Justicia tweediana* (Ness) Grises.

Es un subarbusto endémico que crece en el centro-oeste de Argentina (San Luis, San Juan y Tucumán) a una elevación de 0-2.500 m sobre el nivel del mar. De esta especie no existe ningún estudio previo.

- *Justicia squarrosa* Griseb.

Es una hierba nativa que crece a 500-1.500 m de altura en el centro-oeste de Argentina (La Rioja, Salta, San Luis y Tucumán). De esta especie no existe ningún estudio previo.

Estudios etnofarmacológicos de otras especies del género *Justicia* muestran que *J. gendarusa*, una especie que crece en Malasia e Indonesia y *J. peploides* de India, se utilizan para tratar forúnculos (Grosvenor y col., 1995) y para el tratamiento de la caída prematura del cabello (Gimlette y col., 1939). *J. procumbens* y *J. prostrata* de Nepal e India respectivamente, se usan para tratar heridas infectadas (Manhandar, 1995) y *J. spicigera* de Guatemala, es usada para erupciones de la piel, leucorrea y vaginitis (Cáceres y col., 1987).

b) Especies seleccionadas al azar

Además de las especies nombradas, se eligieron una serie de especies argentinas seleccionadas al azar, las cuales no tienen estudios previos: *Ehretia cuneifolia* (Boraginaceae), *Ayenia lingulata* (Sterculiaceae), *Boopis anthenoides* (Calyceraceae), *Schkuria pinnata* (Asteraceae), *Hysterionica jasionoides* (Asteraceae), *Thymophylla pentachaeta* (Asteraceae), *Xeroalloysia ovatifolia* (Verbenaceae). Todas ellas crecen en el norte y centro-oeste de Argentina.

III.2- Determinación de la actividad antifúngica de las especies vegetales seleccionadas

III.2.1- Evaluación de la actividad antifúngica de las especies seleccionadas

Las especies seleccionadas de acuerdo con lo explicado en el capítulo III.1, fueron sometidas a bioensayos para detectar actividad antifúngica.

- Preparación de las muestras para los ensayos antifúngicos

Los extractos de plantas se prepararon por maceración de partes aéreas secas con metanol. Luego, se evaporó el solvente a bajas temperaturas para no destruir sustancias termolábiles. El pH del extracto fue ajustado a siete, ya que los microorganismos no crecen en medios ácidos ni alcalinos.

- Elección de los microorganismos a utilizar

Usamos un panel de 12 hongos, entre los que están representados las levaduras (*Candida albicans*, *C. tropicalis* y *Cryptococcus neoformans*) hongos filamentosos oportunistas patógenos para el hombre (*Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*), incluyendo a los dermatofitos (*Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*). Se utilizaron hongos estandarizados obtenidos de colecciones de cepas fúngicas tales como Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Estados Unidos) ó de centros como el Centro de Referencia Micológica (CEREMIC, UNR, Rosario) con el objeto de garantizar al máximo la autenticidad de la cepa y que los resultados sean reproducibles.

- Biensayo antifúngico

Como ensayo antifúngico se utilizó en esta primera instancia, el método de dilución en agar. Éste método ha mostrado ser útil para extractos complejos dado que no requiere esterilización previa del extracto ya que la mayor parte del mismo

queda bajo la superficie del agar, impidiendo el desarrollo de organismos aeróbicos contaminantes. La esterilización de un extracto seguramente podría modificar la composición del extracto original. El cultivo contaminante ocasional que pueda desarrollar sobre la superficie del agar no resulta un problema serio y es fácilmente detectado (Mitscher y col., 1972).

Se probaron los extractos a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ y a diluciones sucesivas frente al panel hongos según lo descrito en Materiales y Métodos, hasta llegar a determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ó sea la mínima concentración a la cual el desarrollo fúngico fue inhibido. Se consideraron activos los extractos con valores de CIM menores a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Mitscher y col., 1972).

Los resultados mostraron (tabla 3) que los extractos metanólicos de partes aéreas de *S. aculeata*, *M. scabrida*, *J. gilliesii*, *J. tweediana*, *J. squarrosa*, *T. flagellaris*, *A. linguata*, *H. jasionoides*, *T. pentachaeta*, *V. ovatifolia*, *F. bidentis* y *G. gaudichaudianum* fueron inactivos frente a todas las especies fúngicas probadas ($\text{CIM} \geq 1000 \mu\text{g/ml}$) mientras que los de *B. anthemoides*, *E. cuneifolia* y *S. pinnata* mostraron una actividad baja ($750 \leq \text{CIM} \leq 900 \mu\text{g/ml}$) frente a sólo una ó dos especies fúngicas de las doce probadas.

Tabla 3: Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM en µg/ml) de especies seleccionadas de la flora argentina frente a hongos oportunistas patógenos para el humano.

Familia	Especie vegetal	# Voucher specimen	Tipo de extracto	C.a.	C.t.	C.n.	A.n.	A.fl.	A. fu	M.c	M.g.	T.m.	T.r	E.f.
Phytolaccaceae	<i>Phytolacca tetramera</i>	MG 134 (UNR)	MeOH	750	750	500	>1000	500	>1000	250	250	250	250	500
Phytolaccaceae	<i>Segueria aculeata</i>	MG 119 (UNR)	MeOH	>1000	>1000	750	>1000	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	1000
Phytolaccaceae	<i>Microtea scabrida</i>	MG 125 (UNR)	MeOH	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000	>1000
Acanthaceae	<i>Justicia gilliesii</i>	L.A. del Vitto 8988(UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Acanthaceae	<i>Justicia tweediana</i>	L.A. del Vitto 7231 (UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Acanthaceae	<i>Justicia squarrosa</i>	L.A. del Vitto 9011 (UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Loranthaceae	<i>Tripodanthus flagellaris</i>	Del Vitto Petenatti 9244 (UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Sterculiaceae	<i>Ayenia lingulata</i>	Del Vitto Petenatti 9251 (UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000
Calyceraceae	<i>Boopis anthemoides</i>	Del Vitto Petenatti 9253 (UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	750	750	>1000
Asteraceae	<i>Hysterionica jasionoides</i>	Del Vitto Petenatti 9255(UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	>1000
Asteraceae	<i>Thymophylla pentachaeta</i>	Del Vitto Petenatti 8999(UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Verbenaceae	<i>Veroaloyisia ovatifolia</i>	Del Vitto Petenatti 9252 (UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Boraginaceae	<i>Cortesia cuneifolia</i>	Del Vitto y Petenatti 9237	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	750	>1000	>1000	1000	750
Asteraceae	<i>Flaveria bidentis</i>	Del Vitto Petenatti 9238(UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Asteraceae	<i>Gnaphalium gaudichaudia num</i>	Del Vitto y Petenatti 9239(UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Asteraceae	<i>Schkuhria pinnata</i>	Del Vitto yPetenatti 9240(UNSL)	MeOH	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	900

C.a.: *Candida albicans* ATCC 10231; C.t.: *Candida tropicalis* C 131 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264; *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934; *Aspergillus flavus* ATCC 9170; *Aspergillus niger* ATCC 9029; *Microsporum canis* C112; *Microsporum gypseum* C115; *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972; *Trichophyton rubrum* C113; *Epidermophyton floccosum* C114. P.t.: *Phytolacca tetramera*; S.a.: *Segueria aculeata*; J.g.: *Justicia gilliesii*; J.t.: *Justicia tweediana*. f: frutos; r: rizomas; p.a: partes aéreas.

En contraste, el extracto metanólico de partes aéreas de *Phytolacca tetramera* mostró actividad contra diez de los doce hongos probados, con valores de CIM entre 250-750 µg/ml. Fue activo contra dos especies del género *Candida*: *C. albicans* y *C. tropicalis* que como ya expresáramos en la Introducción, es el género que causa la mayor cantidad de infecciones fúngicas sistémicas y superficiales en pacientes inmunodeprimidos. Sumado a ésto, el extracto metanólico de *P. tetramera* inhibió el crecimiento de *C. neoformans*, así como el

de todos los dermatofitos probados, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* y *E. floccosum*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, *P. tetramera* era la especie más activa y tenía un amplio espectro de acción por lo que decidimos continuar su estudio.

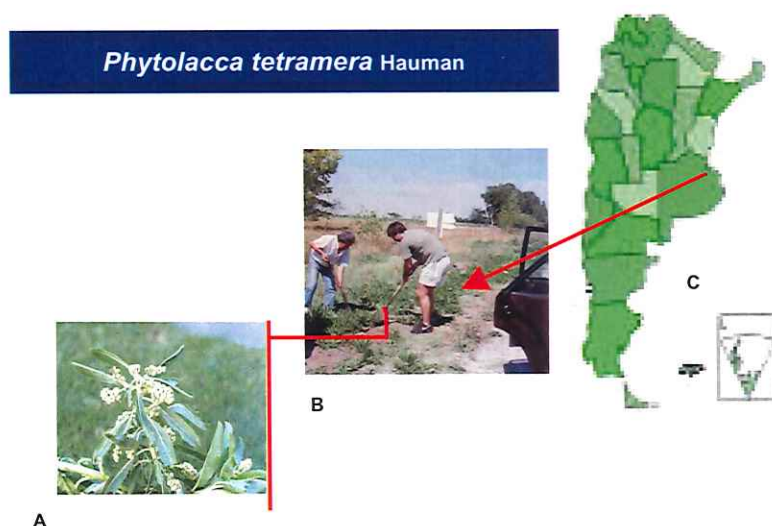
III.3- Antecedentes químicos y de actividad biológica de *Phytolacca tetramera*

III.3.1- Descripción y localización de *Phytolacca tetramera* Hauman (Phytolaccaceae)

P. tetramera es un arbusto sufrútice endémico (fig. 18-A y 18-B) que se encuentra exclusivamente en las praderas pampeanas de la Provincia de Buenos Aires (57,5° long. W. Greenwich, 35° lat. austr.), descrito por primera vez por Hauman en 1909 (Hauman-Merck, 1909). Se encuentra en terrenos arenosos del Partido de San José de Magdalena, a la vera de la ruta provincial 11 en cercanías de la ciudad de La Plata (fig. 18-C) y como consecuencia de su localización, está sujeta a la periódica mutilación por máquinas desmalezadoras utilizadas para el mantenimiento de la ruta. Está considerada en riesgo crítico (Critic risk, C.R.) (Hernández y col., 1998; Delucchi y col., 1992), integrando la Lista Roja del Tratado de Plantas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los recursos naturales (UICN, 1994).

De esta forma, además de ser importante su estudio por la actividad biológica mostrada, cobra una gran importancia la investigación de *P. tetramera* ya que estamos ante una especie vascular única en riesgo de extinción.

Figura 18: Foto de *Phytolacca tetramera* y su localización en Argentina



Antes de comenzar su estudio, realizamos la búsqueda bibliográfica de los componentes químicos y de la actividad biológica descritas en especies del género *Phytolacca*, los cuales se resumen a continuación.

III.3.1.1- Antecedentes químicos del género *Phytolacca*

Los compuestos químicos aislados de especies del género *Phytolacca* se muestran en la tabla 4.

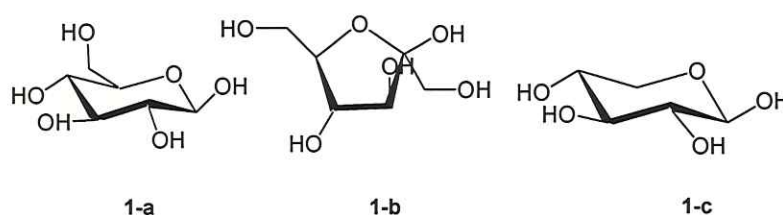
Tabla 4: Tipos de compuestos aislados de especies del género *Phytolacca*.

Familia de compuestos		Estructuras	Fuente	Referencias
Hidratos de Carbono	Monosacáridos	1 a-c	<i>P.americana</i>	www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm
	Polisacáridos	1 d		
Ácidos grasos	Ácidos grasos	2 a-b	<i>P.americana</i>	www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm
	Triglicéridos	3 a-b	<i>P. americana</i>	
Vitaminas	Vit. B ₁	4	<i>P. americana</i>	www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm
	Vit. B ₂	5	<i>P. americana</i>	
	Niacina	6	<i>P. americana</i>	
	Vitamina C	7	<i>P. americana</i>	
Terpenos	Sesquiterpenos	8	<i>P. americana</i>	www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm
			<i>P. esculenta</i>	
	Triterpenos	9	<i>P. americana</i>	Yi y col., 1991a-b
			<i>P. esculenta</i>	
	Tetraterpenos	10	<i>P. americana</i>	www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm
	Esteroles	11 a-b	<i>P. esculenta</i>	Chi y col., 1981
Alcaloides-pigmentos	Betacianinas	12 a-c	<i>P. bogotensis</i>	Seeligman y col., 1973
			<i>P. americana</i>	Duke, 1994
	Betaxantinas	13	<i>P. americana</i>	Duke, 1994
Fenilpropanoides y derivados	Fenilpropanoides	14 a-b	<i>P. americana</i>	Segelman y col., 1969
	Lignanós	15 a-c	<i>P. americana</i>	Woo y col., 1980
Saponinas	Se desarrollan en la tabla 5			

III.3.1.1.1- Estructuras de los compuestos encontrados en especies del género *Phytolacca*

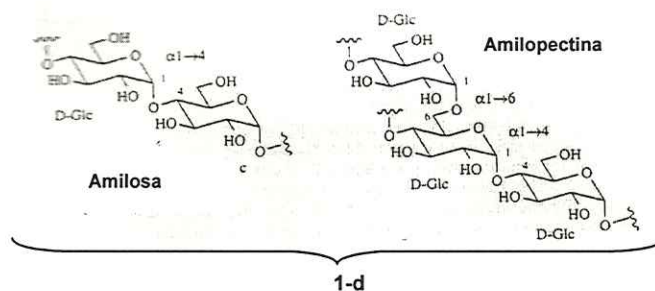
- **Monosacáridos**

En *P. americana* se encontró β -D-glucosa (**1-a**), β -D-fructosa (**1-b**) y β -D-xilosa (**1-c**) (www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm).



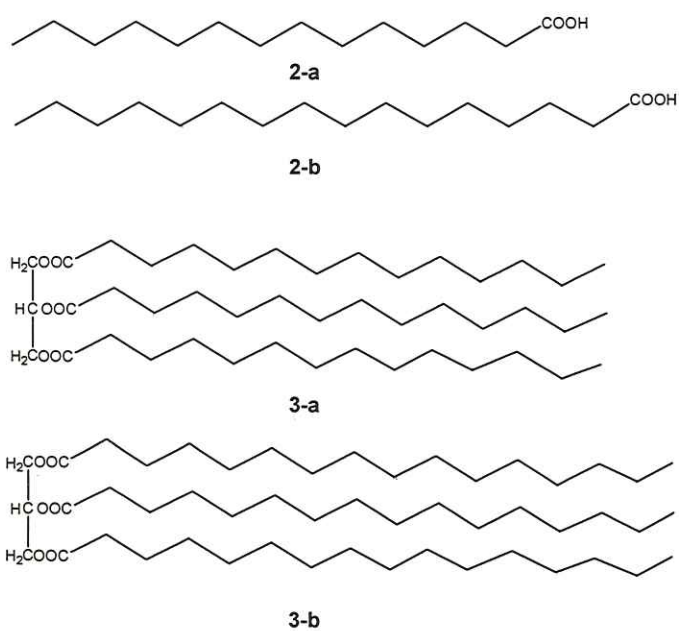
- **Polisacáridos**

Se ha encontrado almidón (**1-d**) y sus polisacáridos componentes (amilosa y amilopectina) en *P. americana* (www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm).



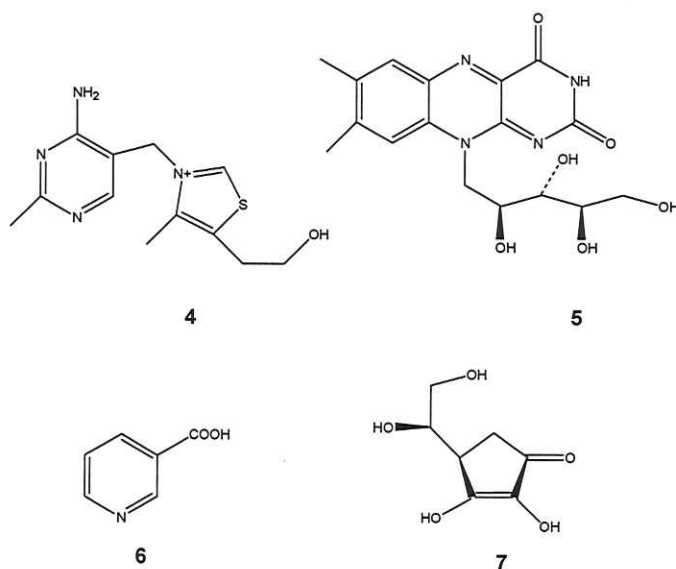
- **Ácidos grasos y triglicéridos**

Los ácidos grasos saturados de 14 átomos de C, ácido mirístico (**2-a**) y de 16 átomos de C, ácido palmítico (**2-b**) y los triglicéridos trimiristina (**3-a**) y tripalmitina (**3-b**), se describieron en *P. americana* (www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm).



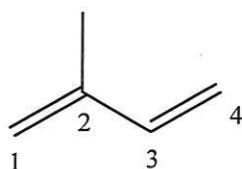
• Vitaminas

Las vitaminas B₁ Tiamina (4), B₂ Riboflavina (5), B₃ Niacina (6) y C Ácido ascórbico (7), fueron descritas en *P. americana* (www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm).



Terpenos

Con este nombre se agrupa a un gran número de compuestos cuyos esqueletos carbonados presentan como factor común unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) unidas entre sí.

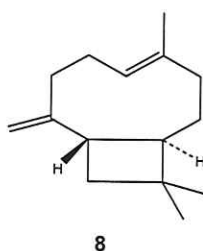


Unidad de isopreno

Dentro de los compuestos terpenoides aislados de especies del género *Phytolacca*, se encuentran sesquiterpenos (15 átomos de C, 3 unidades isopreno), triterpenos (30 átomos de C, 6 unidades isopreno) y tetraterpenos (cuarenta átomos de C, 8 unidades isopreno).

- **Sesquiterpenos**

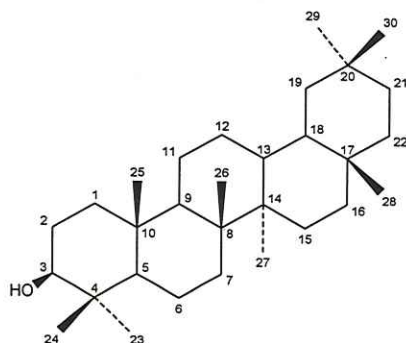
El sesquiterpeno β -cariofileno (8) fue descrito en *P. americana* y en *P. esculenta* (www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm).



- **Triterpenos**

Poseen una estructura general del tipo β -amirina (con 2 metilos en la posición 20) y un hidroxilo en C₃ (9). En general los triterpenos se encuentran

formando heterósidos denominados saponinas.



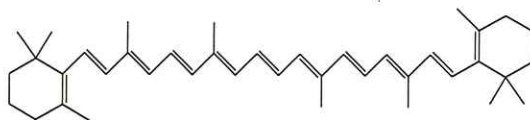
9

Las estructuras de los triterpenos y de sus saponinas serán desarrollados dentro del tema Saponinas que se trata más adelante en este capítulo.

- **Tetraterpenos**

Son compuestos formados por la unión de ocho unidades de isopreno y presentan cuarenta átomos de carbono.

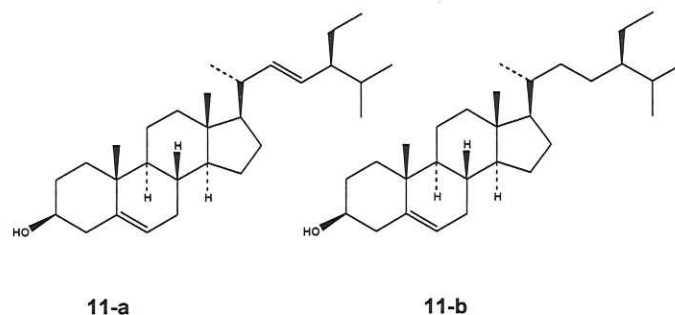
Sólo se ha informado la presencia de β -caroteno (**10**) en *P. americana* (www.chromadex.com/Phytosearch/poke.htm).



10

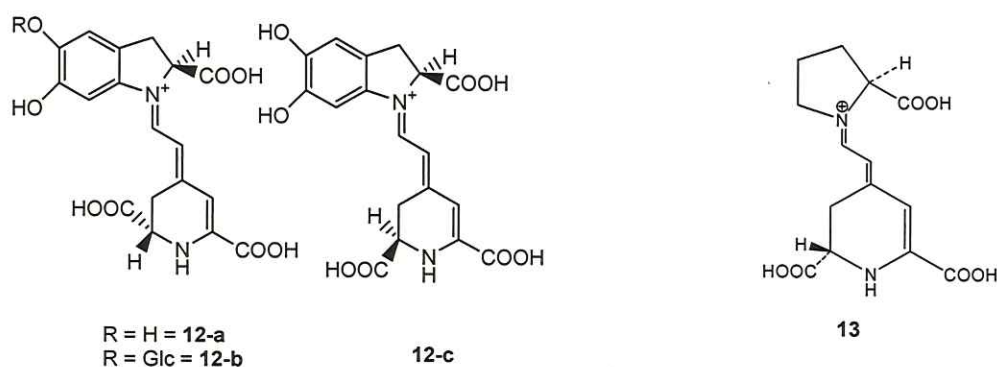
• Esteroles

Son alcoholes con estructura esteroideal conteniendo veintinueve átomos de carbono. De ellos, estigmasterol (**11-a**) y sitosterol (**11-b**) fueron aislados de *P. esculenta* (Chi y col., 1981).

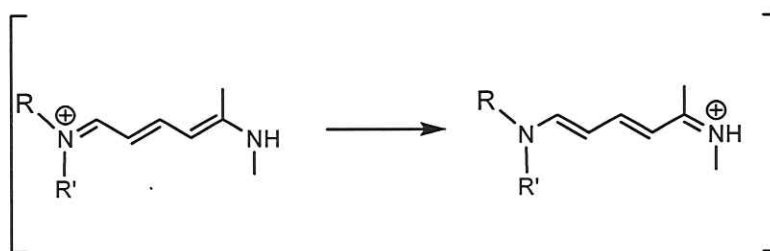


• Pigmentos

Los pigmentos betaláinas son un signo distintivo de la familia Phytolaccaceae y de todo el orden Centrospermae al cual pertenecen. Comprenden dos grupos de sustancias muy solubles en agua (Wyler y col., 1961; Piatelli y col., 1964): betacianinas (**12 a-c**) y betaxantinas (**13**). Particularmente en plantas del género *Phytolacca* están presentes las betacianinas betanidina (**12-a**), betanina (**12-b**) e isobetanidina (**12-c**) (Mabry y col., 1964; Seeligman y col., 1973).



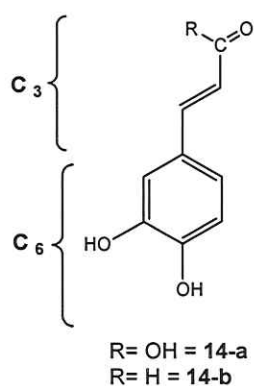
Las betacianinas y las betaxantinas están relacionadas química y biogenéticamente, pero se diferencian por sus respectivos colores: las betacianinas son rojo-violáceas ($\lambda = 530-554$ nm), mientras que las betaxantinas son amarillas ($\lambda = 440-480$ nm). El cromóforo de las betalainas es un sistema 1,7-diazaheptametino protonado (Jackman y col., 1992):



Todas las betacianinas extienden la conjugación del cromóforo con un anillo aromático sustituido; mientras que las betaxantinas se caracterizan por no tener extendida la conjugación.

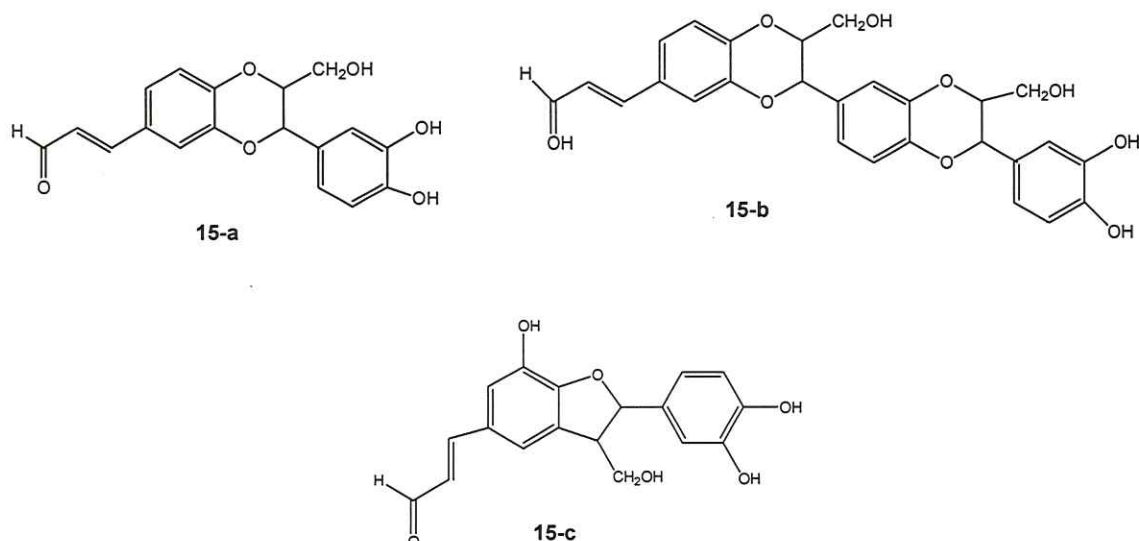
• Fenilpropanoides

Son compuestos del tipo C_6-C_3 , sintetizados a partir de la ruta biosintética del ácido shikímico. De *P. americana* se han aislado ácido cafeico (**14-a**) y aldehído cafeico (**14-b**) (Segelman y col., 1969).



- **Neolignan**

Son dímeros de fenilpropanoides de los cuales Americaninas A (**15-a**), B (**15-b**) y C (**15-c**) fueron descritas en *P. americana* (Woo y col., 1980).



III.3.1.1.2- Saponinas

Generalidades

Las saponinas constituyen un grupo de compuestos ampliamente distribuidos en las plantas superiores que se distinguen por formar soluciones acuosas coloidales que forman espuma persistente por agitación. Tienen sabor amargo, pueden poseer propiedades hemolíticas y son tóxicas para peces.

Desde el punto de vista químico, las saponinas son glicósidos de alto PM que consisten en una porción azúcar ó glicona unida a una aglicona ó genina denominada sapogenina:

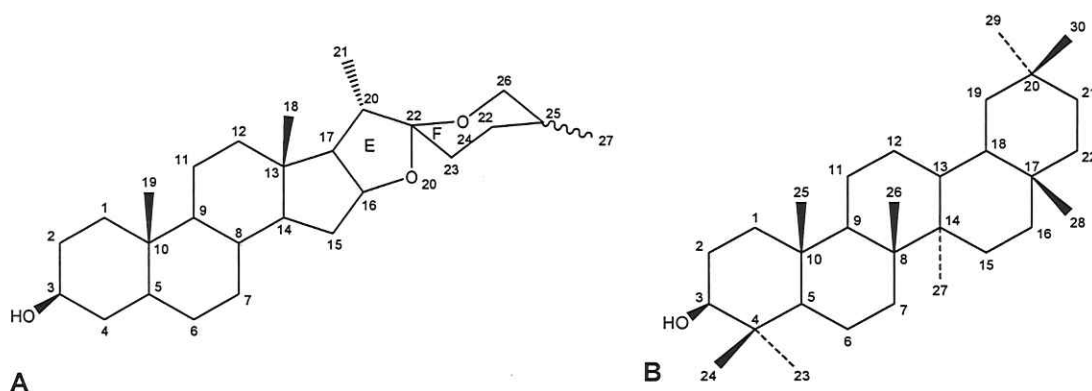


Según la naturaleza de su genina, las saponinas se clasifican en esteroideas (A) ó triterpenoideas (B) (fig. 19).

Las sapogeninas esteroideas se caracterizan por poseer un esqueleto de 27 átomos de C, con un espirocetal entre los anillos E y F, un -OH en C₃ y grupos -CH₃ en C₁₀ y C₁₃.

Las sapogeninas triterpenoides se caracterizan por tener 30 átomos de C, con estructura terpenoide y un -OH en C₃.

Figura 19: Sapogeninas esteroídica (A) y triterpenoide (B).



Las saponinas con genina esteroídica se encuentran casi exclusivamente en Angiospermas monocotiledóneas: familias Liliaceae (*Allium*, *Smilax*, *Asparagus*); Agaveaceae (*Agave*, *Yucca*); Dioscoreaceae (*Dioscorea*) y Scrophulariaceae (*Digitalis*) (Dewick, 2002.).

Las saponinas con genina triterpenoide son las más numerosas y se encuentran principalmente en Angiospermas dicotiledóneas: familias Araliaceae; Phytolaccaceae; Cucurbitaceae; Primulaceae y Sapindaceae, entre otras (Dewick, 2002.).

Características de la porción azúcar

La porción azúcar puede ser lineal ó ramificada, habiéndose encontrado hasta once monosacáridos en una misma saponina. En general se encuentran oligosacáridos de dos a cinco monosacáridos. Los monosacáridos más comunes son: D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), ác. D-glucurónico (GlcA), ác D-galacturónico (GalA), L-rhamnosa (Rha), L-arabinosa (Ara) y D-xilosa (Xyl) (las abreviaturas entre paréntesis son las recomendadas por IUPAC (International Union of Pure and Applied Chem., 1982). Los azúcares están unidos a la genina por un enlace tipo éter glicosídico o tipo éster glicosídico (Hostettmann y col., 1995).

Clasificación de las saponinas de acuerdo con el número de cadenas de azúcares

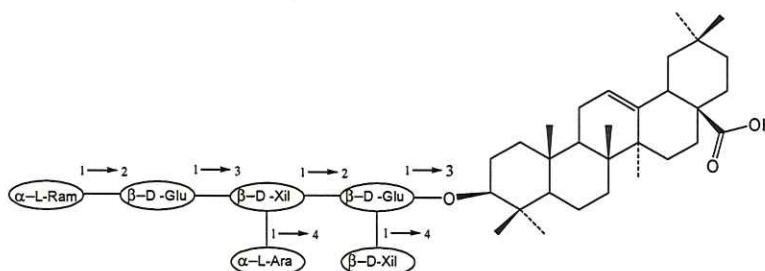
De acuerdo con el número de cadenas de azúcar sobre la genina, las saponinas se clasifican en:

-Monodesmosídicas (fig 20-a): tienen una sola cadena azúcar la que generalmente está unida a C-3 por unión éter glicosídica.

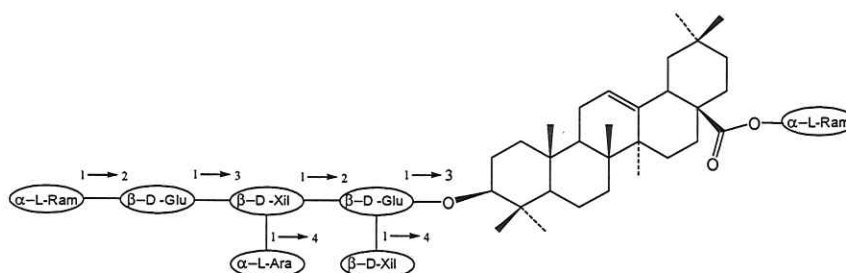
-Bidesmosídicas (fig 20-b): tienen dos cadenas de azúcar, una unida a C-3 por enlace éter glicosídico y la otra generalmente unida como éster glicosídico al COOH de C-28.

Figura 20: Ejemplo de una saponina monodesmosídica (a) y de una bidesmosídica (b)

a)



b)

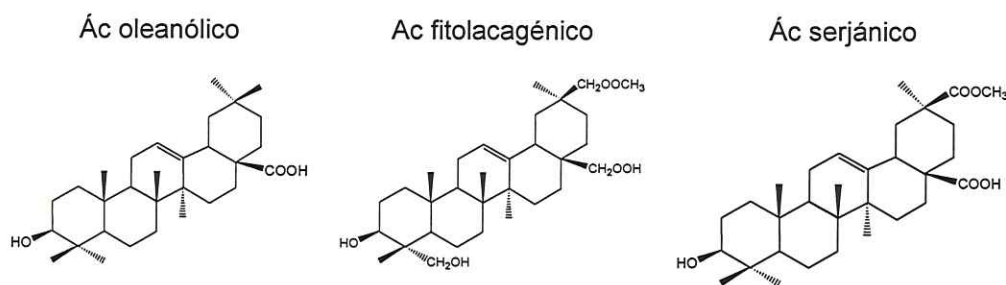


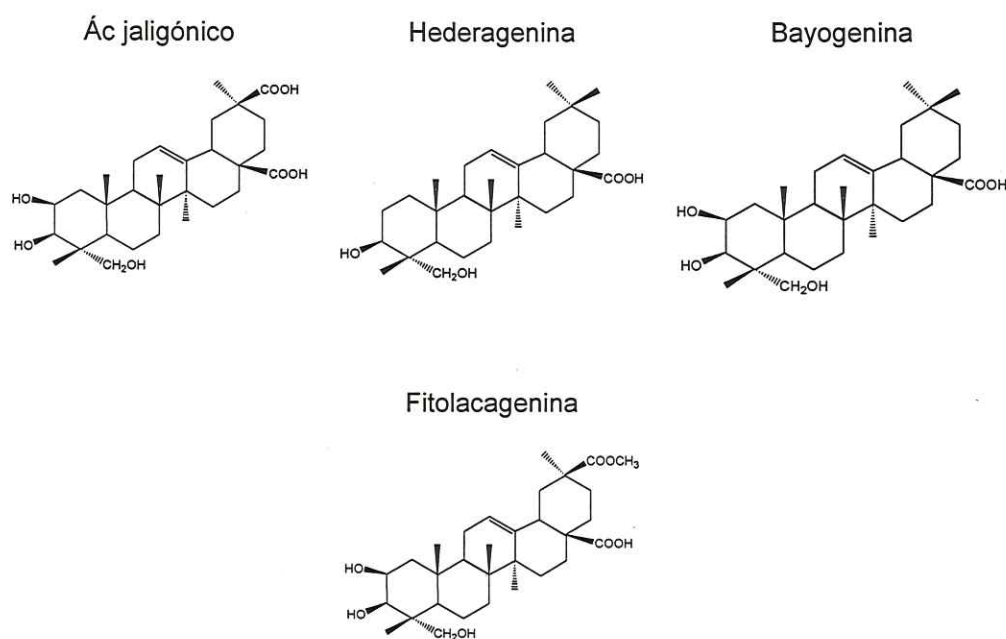
III.3.1.1.2.1- Saponinas aisladas del género *Phytolacca*

En 1929, Domínguez demostró la presencia de saponinas en las hojas de *P. dioica* (ombú). El análisis fitoquímico posterior de varias especies del género *Phytolacca*, mostró también que ellas eran ricas en saponinas y particularmente en saponinas triterpenoides (Woo y col., 1975; 1976).

La sapogeninas más comúnmente encontradas formando parte de saponinas en el género *Phytolacca*, son derivadas del ácido oleanólico, poseyendo un carboxilo en C-17, un doble enlace en C-12 y un -OH en C-3. Son los ácidos fitolacagénico, serjánico, jaligónico, hederagenina, bayogenina y fitolacagenina (fig. 21).

Figura 21: Geninas más comúnmente encontradas en el género *Phytolacca*.





Estas geninas se han encontrado formando parte de heterósidos mono ó bidesmosídicos, los cuales se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Algunas saponinas triterpenoides aisladas del género *Phytolacca*. M (monodesmosídicas); B (bidesmosídicas).

Genina	Estructura número	Tipo	Azúcares	Planta	Referencias
Ác. oleanólico	16	M	3-Glc ⁴ -Glc Glc	<i>P. dodecandra</i>	Parkhurst y col., 1973 Slalcanin y col., 1988
	17	B	3-Glc ⁴ -Glc Glc 28-Glc	<i>P. dodecandra</i>	Slalcanin y col., 1988
	18	M	Glc ² -Glc ² -Rha	<i>P. dodecandra</i>	Parkhurst y col., 1973
Ác. serjánico	19	M	3-Glc	<i>P. thyrsiflora</i>	Haraguchi y col., 1988
	20	B	3-Glc 28-Glc	<i>P. thyrsiflora</i>	Haraguchi y col., 1988
	21	M	3-Glc ³ -Gal ² -Gal	<i>P. thyrsiflora</i>	Haraguchi y col., 1988
Hederagenina	22	M	3-Glc ⁴ -Glc Glc	<i>P. dodecandra</i>	Slalcanin y col., 1988
	23	B	3-Glc ⁴ -Glc Glc 28-Glc	<i>P. dodecandra</i>	Slalcanin y col., 1988
Ác. fitolacagénico	24	B	3-Xyl ⁴ -Glc 28-Glc	<i>P. esculenta</i>	Yi, 1991a
	25	B	3-Glc ⁴ -Xyl ⁴ -Glc 28-Glc	<i>P. esculenta</i>	Yi, 1991b

Bayogenina	26	M	3-Glc ⁴ -Glc	<i>P. dodecandra</i>	Slalcanin y col., 1988
	27	B	3-Glc ⁴ -Glc 28-Glc	<i>P. dodecandra</i>	Slalcanin y col., 1988
Ác. jaligónico	28	M	3-Xyl	<i>P. americana</i>	Woo y col., 1977
Ác. sculentagénico	29	B	3-Xyl ⁴ -Glc 28-Glc	<i>P. esculenta</i>	Yi y col., 1991
Fitolacagenina	30	M	3-Glc	<i>P. thyrsoiflora</i> <i>P. esculenta</i>	Haraguchi y col., 1988 Yi, 1992
	31	B	3-Xyl ⁴ -Glc 28-Glc	<i>P. esculenta</i>	Yi, 1992

Se muestran abajo algunos ejemplos de estructuras de saponinas presentes en el género *Phytolacca* (ver figuras 22-29).

Figura 22: Saponinas mono y bidesmosídicas del ácido oleanólico aisladas de *P. dodecandra*

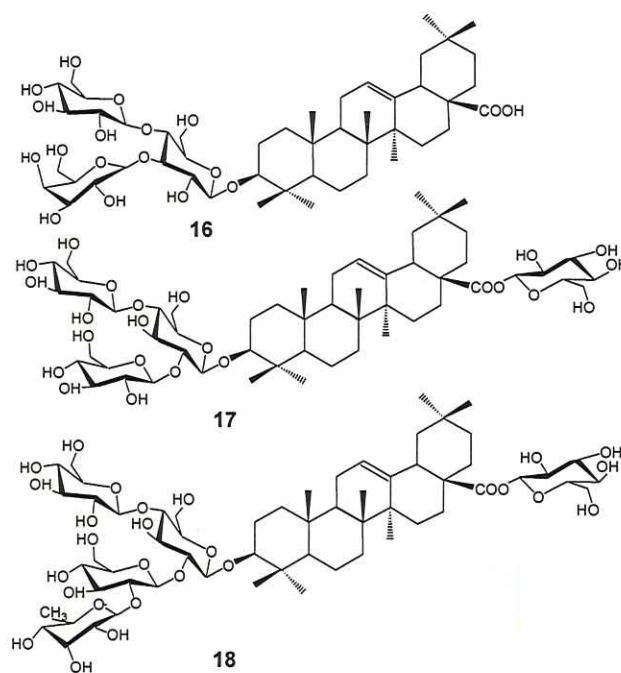


Figura 23: Saponinas mono y bidesmosídicas del ácido serjánico aisladas de *P. thyrsoiflora*

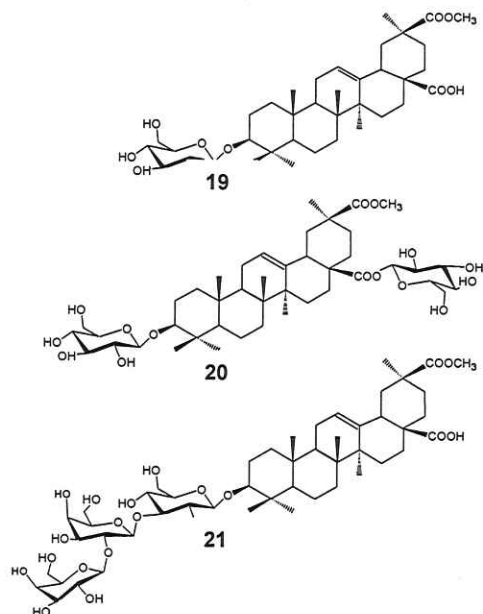


Figura 24: Saponinas mono y bidesmosídicas de hederagenina, aisladas de *P. dodecandra*.

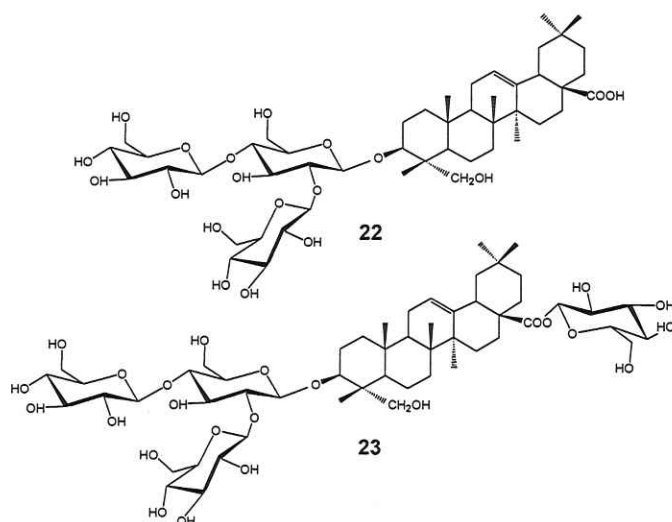


Figura 25: Saponinas bidesmosídicas del ácido fitolacagénico presentes en *P. esculenta*.

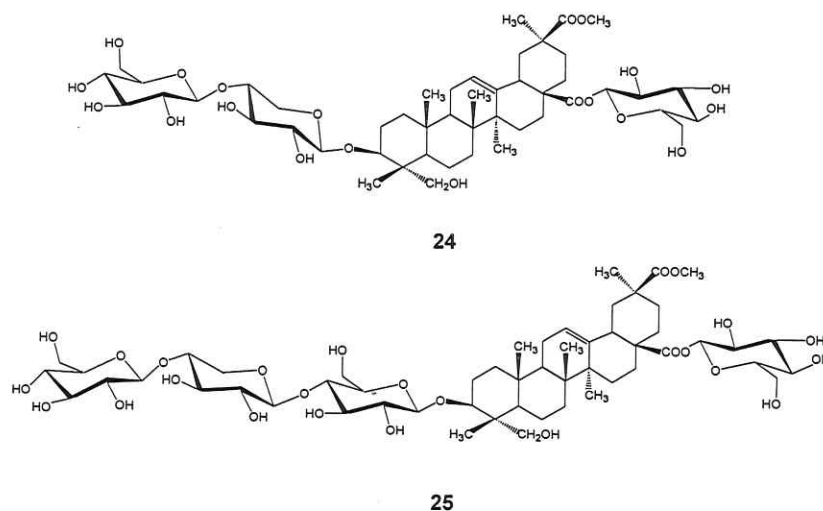


Figura 26: Saponinas mono y bidesmosídicas de la bayogenina, aisladas de *P. dodecandra*.

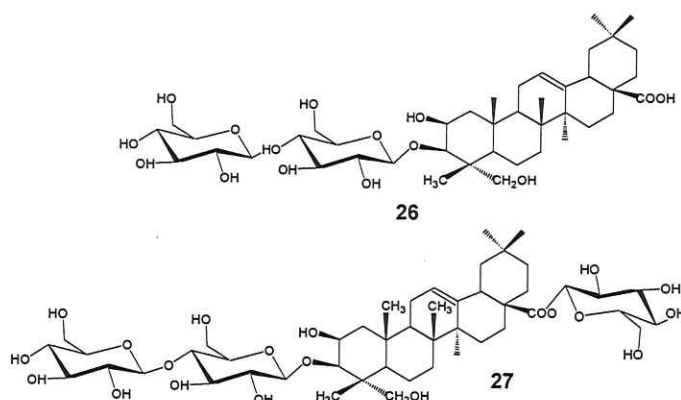


Figura 27: Saponina monodesmosídica del ácido jaligónico aislada de *P. americana*.

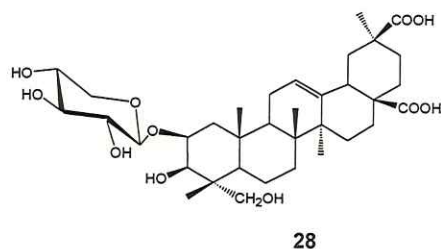
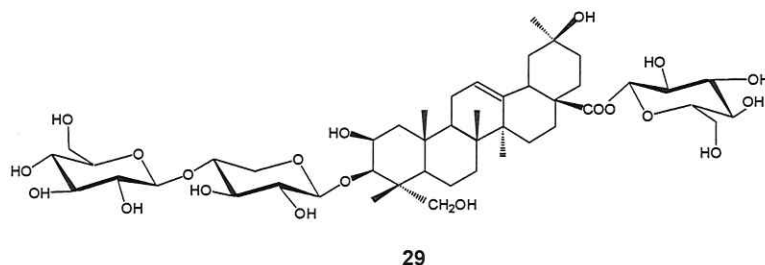
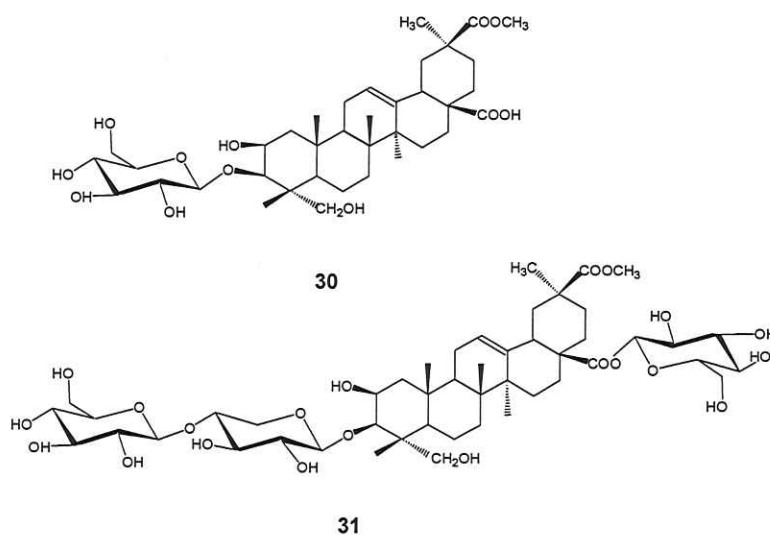


Figura 28: Saponina bidesmosídica del ácido esculantagénico aislada de *P. esculenta*.**Figura 29:** Saponinas mono y bidesmosídicas de fitolacagenina, aisladas de *P. americana*, *P. esculenta* y *P. thyrsoiflora*

III.3.1.2- Estudios previos de actividad biológica en especies del género *Phytolacca*

Estudios previos han mostrado actividad fungistática contra hongos fitopatogénicos y patógenos para el humano en *P. octandra* (Moreno y col., 1981; Favel y col., 1994; Sparg y col., 2004) y en *P. americana* (Nickell, 1959), ambas especies ricas en saponinas triterpenoides (Quiroga y col., 2001).

P. esculenta mostró actividad inductora del interferón inmune (IFN-r), del factor de necrosis tumoral (TNF) y también potente actividad antiinflamatoria (Yi, 1992; Yi y col., 1991).

El extracto acuoso de frutos de *P. icosandra* mostró actividad molusquicida contra distintas especies de caracoles de los géneros *Biomphalaria*, *Bulinus* y *Oncomelania*, huéspedes intermediarios en el ciclo de vida del *Schistosoma mansoni*, causante de la esquistosomiasis americana (Hostettmann y col., 1995; Coelho y col., 2004). Treyvaud y col. (2000) atribuyeron esta actividad a la presencia de saponinas monodesmosídicas del ácido serjánico.

P. dodecandra también mostró actividad molusquicida (Molgaard y col., 2000) además de actividad antiinflamatoria (Yi, 1992; Yi y col., 1991;), las que fueron atribuidas a la presencia de saponinas.

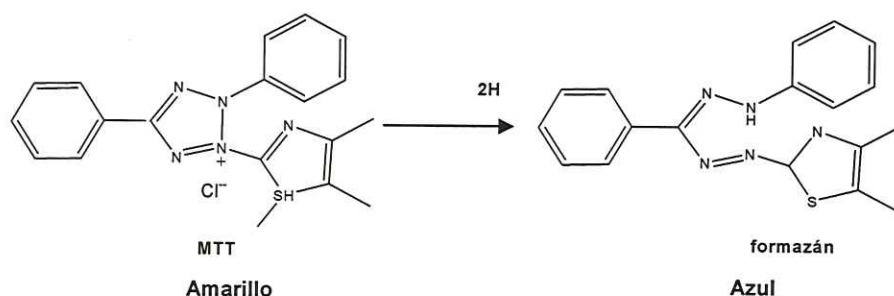
**III.4- Estudio fitoquímico de *Phytolacca tetramera*
guiado por actividad antifúngica y elucidación
estructural de los compuestos puros aislados**

III.4.1- Estudio de la actividad antifúngica de los extractos crudos de rizomas, partes aéreas y frutos con semilla de *P. tetramera*

Antes de comenzar el fraccionamiento bio guiado de *P. tetramera*, hicimos un estudio de la actividad de las distintas partes de la planta a fin de elegir la más activa.

Se prepararon extractos metanólicos crudos de rizomas, partes aéreas y frutos con semillas de *P. tetramera*. En este caso, usamos en primer lugar el método bioautográfico en capa de agar. Sobre la placa cromatográfica previamente desarrollada con los extractos de cada uno de los órganos de *P. tetramera*, agregamos agar inoculado con *C. albicans*. Luego de un tiempo de incubación, los halos de inhibición se visualizaron con el colorante vital cloruro de metiltiazoliltetrazolio (MTT) que se agregó sobre la placa (Rahalison y col., 1991). En las zonas donde el hongo estaba metabólicamente activo, el MTT se visualizó de un color azul oscuro (formazán) por ruptura reductiva del anillo tetrazolio (fig. 30), mientras que en las zonas donde hubo inhibición del crecimiento, se observaron halos claros de inhibición.

Figura 30: Reacción de reducción del MTT a formazán.



El extracto metanólico de rizomas no mostró un halo de inhibición en la bioautografía mientras que los extractos de partes aéreas y frutos con semillas sí mostraron halos de inhibición (fig. 31). La relación de frente (Rf) de los halos de las dos fracciones activas eran coincidentes, sugiriendo que los compuestos activos en ambos extractos podrían ser los mismos.

Figura 31: Bioautografía de los extractos metanólicos de partes aéreas (E.Pa.), rizomas (E.R) y frutos con semillas (E.F) de *P. tetramera*, revelada con Cl⁻ de MTT.



Dado que la bioautografía es un método cualitativo, cuantificamos luego la actividad de los tres extractos metanólicos por el método de dilución en agar. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos metanólicos de partes aéreas (Pa), frutos con semillas (fr) y rizomas (r) de *P. tetramera*, por el método de dilución en agar.

Extracto	CIMs (µg/ml)											
	Ca	Ct	Sc	Cn	Afu	Afl	An	Mc	Mg	Tm	Tr	Ef
MeOH Pa	750	750	500	500	>1000	500	>1000	250	250	250	250	500
MeOH r	>1000	>1000	1000	>1000	>1000	1000	>1000	1000	1000	1000	1000	1000
MeOH fr	500	500	250	250	>1000	250	>1000	250	250	125	250	250
Anfot B	0,75	0,625	1,50	0,40	3	3	0,90	50	6,25	6,25	25	0,3
Ket	8	5	6	2	20	30	12,5	15	6,25	12,5	15	25
Terbinaf	1,56	0,78	3,12	0,39	0,78	0,78	1,56	0,01	0,04	0,04	0,01	0,004

Candida albicans ATCC 10231; *C. tropicalis* C 131; *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264; *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934; *A. flavus* ATCC 9170; *A. niger* ATCC 9029; *Microsporum canis* C112; *M. gypseum* C115; *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972; *T. rubrum* C113. *Epidermophyton floccosum* C114. Anfot B: Anfotericina B; Ket: Ketoconazol. Terbinaf.: Terbinafina; MeOH h: extracto metanólico de hojas; MeOH f: extracto metanólico de frutos, MeOH r: extracto metanólico de rizomas.

El método de dilución mostró, en concordancia con el método bioautográfico, que el extracto metanólico de rizomas era inactivo (CIM $\geq$ 1000 µg/ml). En contraste, los extractos metanólicos de partes aéreas y de frutos fueron activos contra diez de los doce hongos probados con valores de CIM entre 250-750 µg/ml para partes aéreas y de 125-500 µg/ml para frutos. Dada su mayor actividad, decidimos continuar con la purificación del extracto metanólico de frutos de *P. tetramera*.

III.4.2- Fraccionamiento y purificación del extracto crudo de frutos de *Phytolacca tetramera*

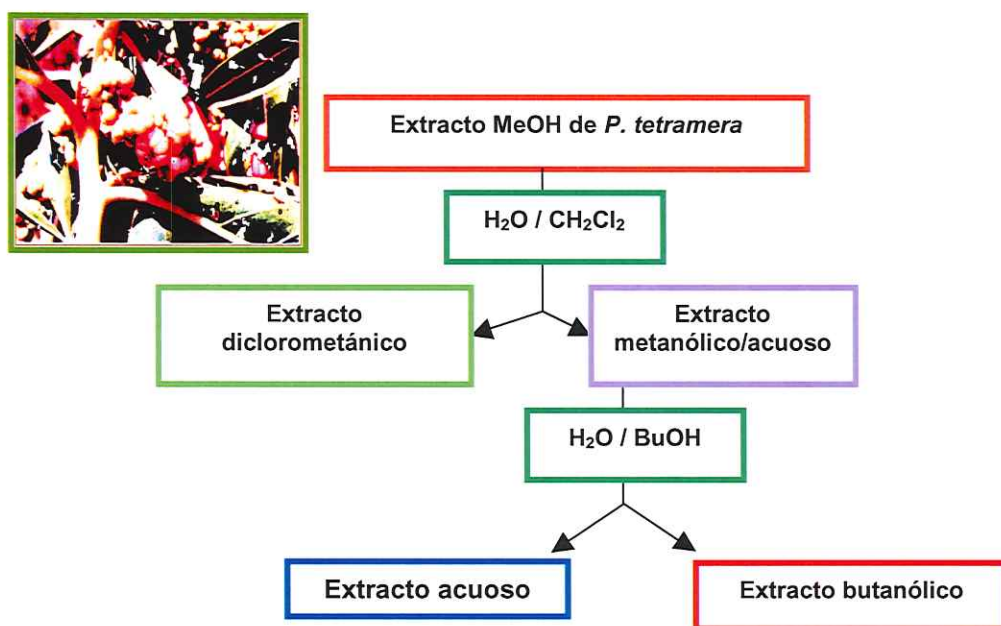
Dado los antecedentes químicos de las especies del género *Phytolacca*, realizamos un fraccionamiento con solventes de acuerdo con la metodología recomendada para plantas conteniendo saponinas.

Para la separación de saponinas, la planta se trata con éter de petróleo o diclorometano para extraer las sustancias apolares (lipídicas) y posteriormente se extrae con metanol-H₂O. Este último extracto se fracciona con n-butanol ya que con este solvente se logra una mejor extracción de saponinas. (Hostettmann y

col., 1997).

Siguiendo el procedimiento recomendado por Hostettmann, al extracto metanólico crudo de frutos se le agregó agua (H_2O) y se lo extrajo con diclorometano tres veces (CH_2Cl_2 , 3x). Las soluciones diclorometánicas fueron reunidas y concentradas a sequedad para dar el “Extracto diclorometánico” (fig. 32). La solución hidroalcohólica remanente (“Extracto metanólico/acuoso”), fue extraída con butanol (n -BuOH, 3x) obteniéndose una solución butanólica que fue llevada a sequedad para dar el “Extracto butanólico” y una solución acuosa que fue liofilizada para dar el “Extracto acuoso” (fig. 32).

Figura 32: Partición del extracto metanólico de partes aéreas de *Phytolacca tetramera*



Todos los extractos fueron evaluados por el método de dilución en agar, obteniéndose los siguientes resultados (tabla 7):

Tabla 7: Concentración inhibitoria mínima (CIM, µg/ml) del extracto metanólico crudo de frutos con semillas de *P. tetramera* y de los sub-extractos diclorometánico, butanólico y acuoso obtenidos a partir de él.

CIM (µg/ml)												
Tipo de extracto	Ca	Ct	Sc	Cn	Afu	Afl	An	Mc	Mg	Tm	Tr	Ef
MeOH	750	500	250	500	>1000	500	>1000	250	250	125	250	500
CH ₂ Cl ₂	800	750	>1000	500	>1000	>1000	>1000	500	500	250	400	250
BuOH	250	500	125	250	>1000	125	>1000	250	250	100	250	250
H ₂ O	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Anfot B	0,75	0,625	1,50	0,40	3	3	0,90	50	6,25	6,25	25	0,3
Ket	8	5	6	2	20	30	12,5	15	6,25	12,5	15	25
Terbinaf	1,56	0,78	3,12	0,39	0,78	0,78	1,56	0,01	0,04	0,04	0,01	0,004

De todos los extractos probados, el butanólico resultó ser el más activo, mostrando valores de CIM entre 100-500 µg/ml frente a diez de las doce especies fúngicas. Para separar las saponinas de otros componentes del extracto butanólico, evaporamos el butanol, resolubilizamos el extracto en metanol y precipitamos las saponinas con éter etílico (Hostettmann y col., 1997). De esta forma, obtuvimos un precipitado que fue fraccionado por cromatografía en columna. Cada fracción obtenida fue evaporada al vacío y ensayada para actividad antifúngica (fig. 33). Los resultados obtenidos en las pruebas de dilución en agar se muestran en la tabla 8.

Figura 33: Purificación del precipitado del extracto butanólico activo de frutos con semilla de *P. tetramera* y evaluación de la actividad antifúngica de las diecisiete fracciones obtenidas (1-17).

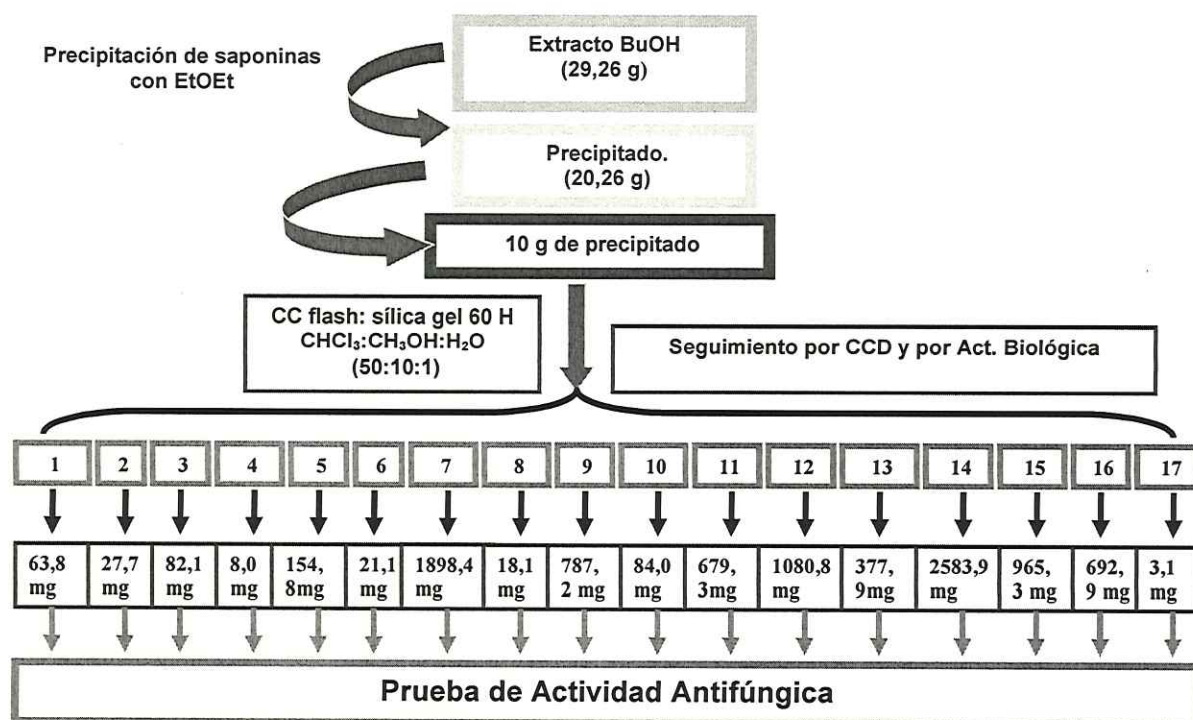


Tabla 8: Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs, $\mu\text{g/ml}$) obtenidas por el método de dilución en agar de las fracciones (1-17) obtenidas por cromatografía en columna (CC) del precipitado del extracto butanólico de frutos de *P. tetramera*

Fracción	C.a.	C.t.	S.c.	C.n.	A.fu.	A.fl.	A.n.	M.c	M.g.	T.m.	T.r.	E.f.
1	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	250	500	750
2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000		>1000	250	500	750
3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000
4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000	1000
5	250	500	62,5	>1000	>1000	250	>1000	250	125	125	125	250
6	250	500	250	250	750	>1000	500	500	500	125	500	500
7	125	500	250	250	1000	250	750	500	250	125	500	250
8	62,5	125	50	125	750	62,5	125	125	62,5	50	125	50
9	62,5	62,5	62,5	125	750	40	125	125	50	50	62,5	62,5
10	62,5	62,5	62,5	125	750	62,5	125	125	125	50	62,5	50
11	500	750	250	500	>1000	250	>1000	500	250	125	250	125
12	250	500	250	500	>1000	250	>1000	250	250	125	250	250
13	250	>1000	250	>1000	>1000	250	1000	750	250	250	500	750
14	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	500	>1000	>1000
15	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
16	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
17	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

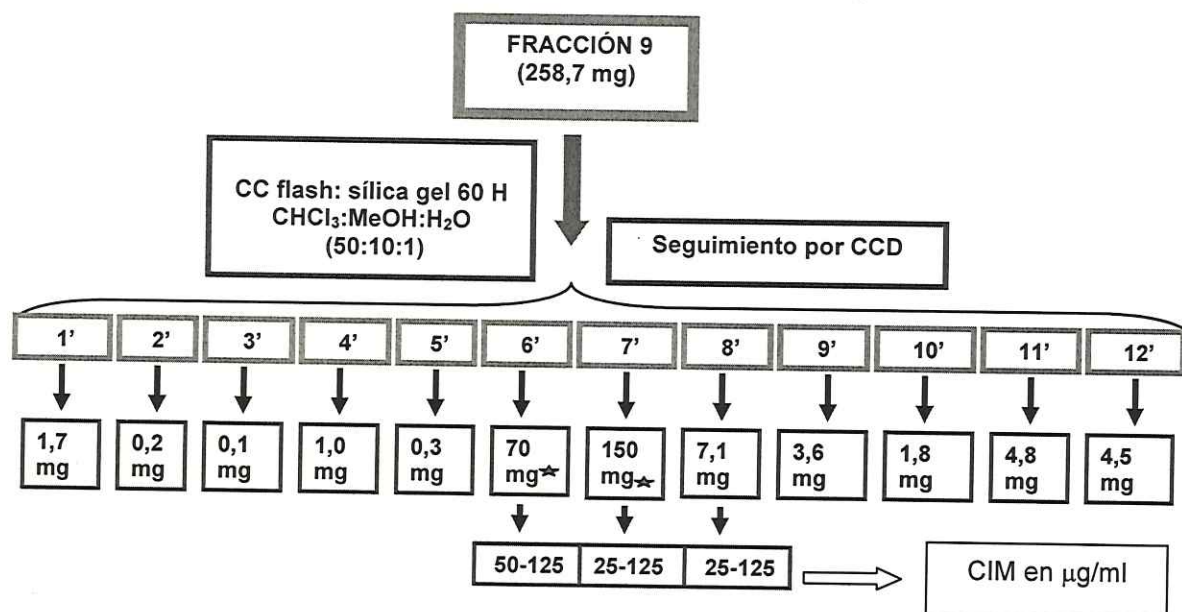
Las fracciones 8, 9 y 10 fueron las más activas mostrando valores de CIM muy similares entre sí frente a cada hongo probado. La bioautografía de estas fracciones frente a *C. albicans*, mostró (fig. 34) que las tres fracciones presentaban un halo de inhibición a la misma distancia del frente del solvente, sugiriendo que en las tres, el compuesto activo era el mismo.

Figura 34: Bioautografía de las fracciones 8, 9 y 10, obtenidas de la purificación del extracto butanólico de frutos de *Phytolacca tetramera*, utilizando *C. albicans* como hongo de prueba.



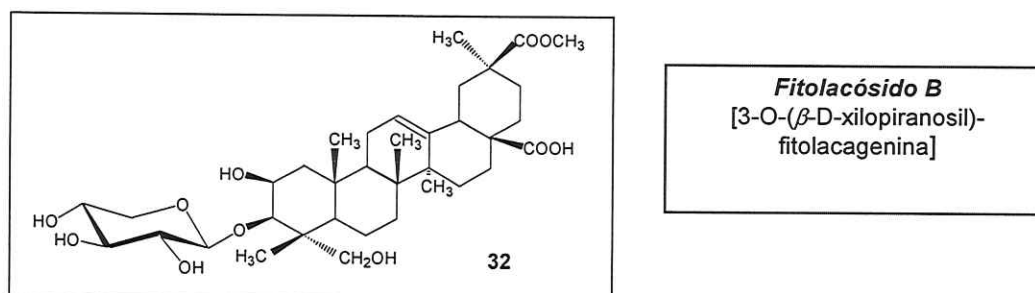
Por tal razón, reunimos las tres fracciones y procedimos a su purificación, nombrándolas de aquí en adelante “fracción 9”. Esta fracción 9 fue purificada por cromatografía en columna (CC) y cada una de las fracciones fue evaluada por actividad antifúngica.

Figura 35: Purificación de la fracción 9 obtenida del extracto BuOH de frutos con semillas de *P. tetramera* por cromatografía en columna (CC) seguida por cromatografía en capa delgada (CCD) y evaluación de la actividad biológica de las fracciones obtenidas (1'-12').



Para esta instancia de evaluación se utilizó el método de dilución en agar y dado que se trataba de sub-extractos mucho más purificados que el extracto crudo de partida, la evaluación se realizó desde una concentración de $250 \mu\text{g/ml}$ considerándose activos aquellos sub-extractos que tuvieran una $\text{CIM} \leq 250 \mu\text{g/ml}$ (fig. 35) (Mitscher y col., 1972).

La actividad de las sub-fracciones 6'-8' (CIM entre $50\text{-}125 \mu\text{g/ml}$) fue mayor que la de la fracción de partida (CIM entre $50\text{-}750 \mu\text{g/ml}$). Por sucesivas cromatografías en columna guiadas por actividad, de las tres fracciones obtuvimos fitolacósido B (**32**) = $[3\text{-O-(}\beta\text{-D-xilopiranosil)-fitolacagenina}]$ (fig. 36), cuya estructura fue elucidada utilizando diferentes métodos espectroscópicos: IR, EM, RMN de ^1H y ^{13}C en 1 dimensión (1D) y en 2 dimensiones (2D: DEPT, HECTOR, COSY, ROESY, HMQC y HMBC).

Figura 36: Estructura química de Fitolacósido B.

El xilósido Fitolacósido B había sido aislado previamente de *P. americana* (Woo y col., 1975, 1976; Suga y col. 1978; Spengel y col, 1995), de *P. esculenta*, (Woo y col., 1975, 1977), de *P. dodecandra* y de *P. acinosa* (Spengel y col. 1995) aunque en algunos trabajos se le dio nombres diferentes: fitolacasaponina G (Spengel y col., 1995) y esculentósido B (Strauss y col. 1995).

Los desplazamientos químicos (δ) del espectro de ^{13}C de Fitolacósido B se presentan en la tabla 9.

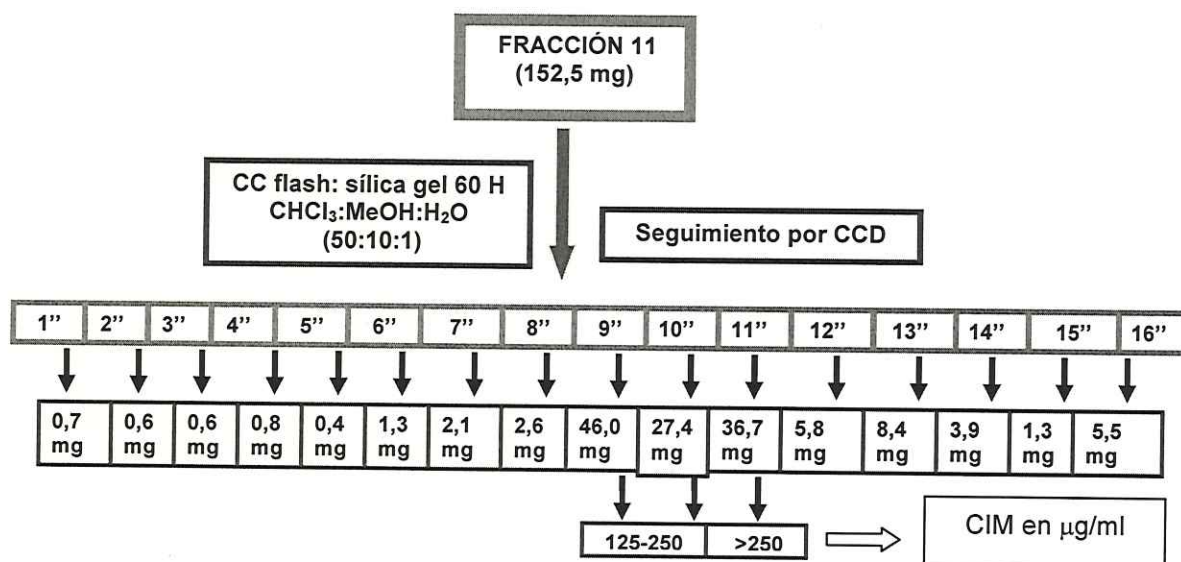
Tabla 9: Datos espectroscópicos de RMN- ^{13}C de fitolacósido B [δ (ppm); (Piridina d_5)].

Porción azúcar		Sapogenina			
	δ_c	Posición	δ_c	Posición	δ_c
Xilosa		C-1	43,90	C-21	30,60
1'	106,50	C-2	70,80	C-22	34,30
2'	75,10	C-3	82,80	C-23	65,20
3'	78,10	C-4	42,50	C-24	14,80
4'	70,80	C-5	48,40	C-25	17,30
5'	67,00	C-6	17,80	C-26	17,10
		C-7	32,80	C-27	26,00
		C-8	39,70	C-28	179,70
		C-9	47,60	C-29	28,20
		C-10	36,80	C-30	176,90
		C-11	23,70	OMe	51,40
		C-12	123,10		
		C-13	144,30		
		C-14	42,00		
		C-15	28,10		
		C-16	23,60		
		C-17	46,00		
		C-18	43,20		
		C-19	42,60		
		C-20	44,00		

De la misma forma que trabajamos con la fracción 9, trabajamos con la fracción 11 biológicamente activa (ver fig. 33 y tabla 8), en la cual detectamos por CCD la presencia de otro compuesto más polar que Fitolacósido B.

Procedimos así a la purificación de la fracción 11 por cromatografía en columna (CC) tal como se muestra en la figura 37.

Figura 37: Purificación de la fracción 11 obtenida del extracto BuOH de frutos con semillas de *P. tetramera* por cromatografía en columna (CC) seguida por cromatografía en capa delgada (CCD) y evaluación de la actividad biológica de las fracciones obtenidas (1"-16").

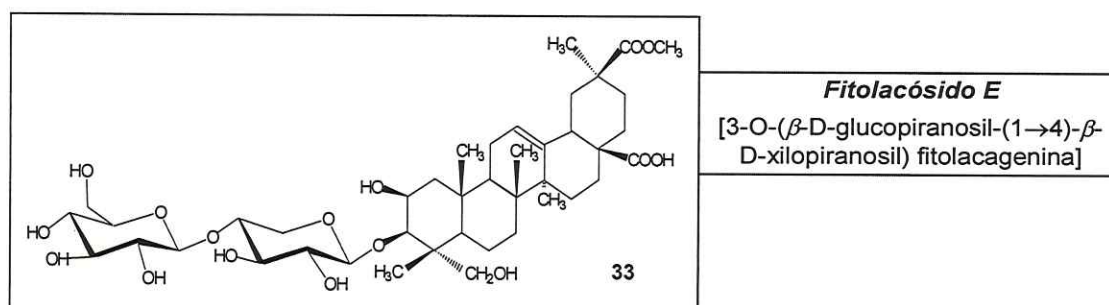


Dado que sólo las sub-fracciones 9"-11" resultaron activas, con valores de CIM entre 125-250 µg/ml, continuamos con su purificación y la posterior determinación estructural de sus componentes.

Tanto los espectros de RMN como los de masas nos permitieron elucidar la estructura presente en las sub-fracciones activas, encontrando que la misma correspondía a una saponina de dos azúcares: Fitolacósido E (**33**) = [3-O-(β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-xilopiranosil)]- fitolacagenina (fig. 38), cuya genina es la misma que la de Fitolacósido B y su porción azúcar es un disacárido formado por

dos monosacáridos, xilosa y glucosa unidos mediante una unión éter-glicosídica al C-3. Este diglicósido había sido aislado previamente por Kobayashi y col. (1995) quienes la habían nombrado fitolacasaponina E y por Spengel y col. (1993), quienes le habían dado el nombre de esculentósido A. También había sido encontrada en *P. americana* (Suga y col. 1978; Woo y col, 1978) y en *P. esculenta* (Woo y col., 1975).

Figura 38: Estructura de Fitolacósido E



Los desplazamientos químicos del espectro de ^{13}C obtenidos para este compuesto se muestran en la tabla 10.

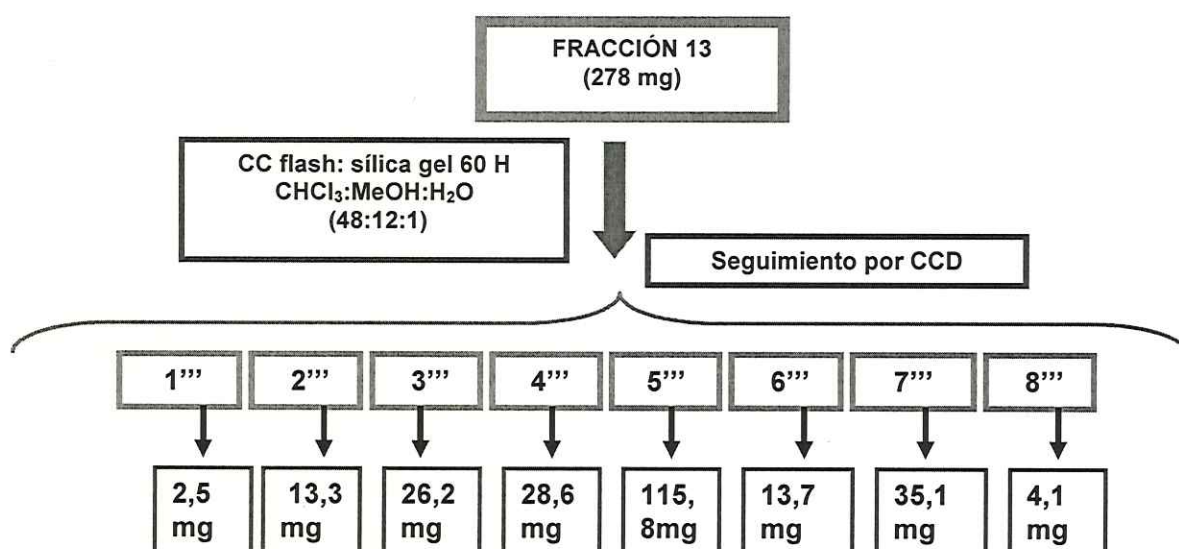
Tabla 10: Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de fitolacósido E [δ (ppm); (Piridina d_5)]

Porción azúcar		Sapogenina			
	δ_c	Posición	δ_c	Posición	δ_c
Xilosa		C-1	43,90	C-16	23,60
1'	106,30	C-2	70,80	C-17	45,90
2'	74,80	C-3	82,50	C-18	43,20
3'	76,10	C-4	41,90	C-19	42,60
4'	77,00	C-5	48,30	C-20	43,90
5'	64,90	C-6	17,70	C-26	17,00
Glucosa		C-7	32,70	C-27	25,90
1''	103,30	C-8	39,60	C-28	179,50
2''	73,90	C-9	47,50	C-29	28,22
3''	78,80	C-10	36,70	C-30	176,90
4''	71,40	C-11	23,70	OMe	51,40
5''	77,90	C-12	123,90		
6''	62,40	C-13	144,20		
		C-14	42,40		
		C-15	28,10		

El rendimiento de Fitolacósido B y Fitolacósido E fue de 0,51 y 0,35 % respectivamente en la especie en estudio, resultando altos en comparación a los obtenidos para las mismas saponinas en *P. americana* (0,013 y 0,037 %, respectivamente) (Suga y col., 1978). Estos resultados mostraban que *P. tetramera* era una fuente importante de fitolacósidos B y E.

Finalmente, realizamos la purificación de la fracción 13 (ver fig. 33 y tabla 8) por CC tal como se esquematiza en la figura 39.

Figura 39: Purificación por cromatografía en columna (CC) de la fracción 13 obtenida del fraccionamiento bioguiado del precipitado del extracto butanólico de frutos con semillas de *P. tetramera*.



Si bien las sub-fracciones obtenidas (1'''-8''') no mostraron actividad antifúngica hasta 250 µg/ml, igualmente decidimos continuar con su purificación, ya que como dijimos anteriormente, *P. tetramera* era una planta no estudiada previamente y en riesgo de extinción, por lo que toda información que pudiéramos obtener sobre su composición química era de mucho valor.

La purificación de la fracción 5''' por CC y posterior CCD, nos permitió aislar una saponina de tres azúcares cuya estructura tratamos de determinar por RMN de ^1H y ^{13}C . Los espectros obtenidos con equipos operando a 200, 300 y 500 MHz no permitían establecer claramente la estructura de la sapogenina ni diferenciar las uniones existentes entre los azúcares.

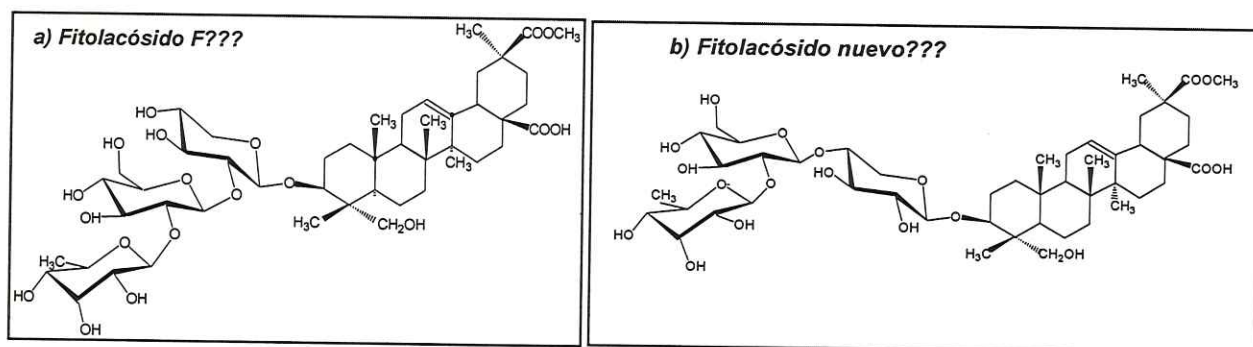
La saponina resultante parecía estar formada por ácido fitolacagénico y un trisacárido formado por los monosacáridos ramnosa, glucosa y xilosa, unidos de una de las dos formas siguientes:

- $\alpha 1 \rightarrow 2$ - $\beta 1 \rightarrow 2$ en posición 3 (fig. 40-a)

- $\alpha 1 \rightarrow 2$ - $\beta 1 \rightarrow 4$ en posición 3 (fig. 40-b)

Si el enlace entre los azúcares correspondía al primer tipo de unión, la saponina era conocida (Fitolacósido F) (fig. 40-a); pero si el tipo de enlace entre los azúcares era el segundo, la saponina presentaría una estructura novedosa (fig. 40-b).

Figura 40: Posibles estructuras de la tercer saponina aislada de frutos con semillas de *P. tetramera*



Por esta razón, hicimos nuevos estudios espectroscópicos para lograr determinar la estructura química de la tercera saponina aislada.

III.4.3- Estrategias para la elucidación estructural de saponinas

La elucidación estructural de saponinas es una tarea compleja que comprende la determinación de:

- la estructura de la aglicona o genina*
- la ubicación de la porción carbohidrato en la genina*
- la composición y secuencia de los monosacáridos componentes de la porción carbohidrato*
- la configuración del carbono anomérico de cada monosacárido*

La espectrometría de masas y la espectroscopía de RMN han resultado esenciales para la determinación estructural de saponinas complejas. Así, la espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR siglas en inglés HR-MS) da información sobre el peso molecular y en algunos casos sobre la secuencia de los azúcares, mientras que las técnicas de RMN en 1-D y 2-D permiten elucidar los tipos de uniones entre los azúcares (Hostettmann y col., 1995).

Sin embargo, las cantidades de saponinas puras aisladas a partir de productos naturales, suelen ser muy pequeñas, por lo cual se requieren métodos de alta sensibilidad, alta resolución y en lo posible que no degraden a los compuestos, para lograr la determinación estructural. Asimismo, la complejidad de sus estructuras requiere de técnicas espectroscópicas más sofisticadas que no pueden realizar equipos de rutina.

Fueron necesarios nuevos estudios espectroscópicos con un equipo de resolución mayor a los ya utilizados para lograr elucidar inequívocamente la estructura de la tercera saponina encontrada.

III.4.3.1- Elucidación estructural de la saponina de tres azúcares

La elucidación estructural de la saponina en estudio, a la que llamamos saponina **X**, fue realizada por los siguientes métodos espectroscópicos: RMN ^1H , RMN ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC, TOCSY y ROESY (que se explicarán más adelante), con un equipo Bruker de 700 MHz.

- Espectros 1D

El espectro de RMN de ^1H (700 MHz, piridina- d_5 /TMS, fig. 41 a-b y tabla 11) fue analizado desde los δ más bajos hacia los más altos, asignando una letra para cada una de las señales encontradas y en los casos en que la señal tenía la apariencia de un doblete ó triplete, la letra fue acompañada de un subíndice numérico (ej.: M_1 , M_2); en el caso de señales nuevas que aparecieron en el espectro ampliado (fig. 41-b), se nombraron agregando primas (ej.: M_2') ó doble prima (ej.: M_2'').

La primera señal, H_a , apareció en δ 0,83 (fig. 41-a). A pesar de la complejidad del espectro se observaron claramente a continuación cinco singletes que por su ubicación e intensidad podrían corresponder a las señales de cinco grupos metilo: δ 0,85 (3H, s, H_b); 0,96 (3H, s, H_c); 0,98 (3H, s, H_d); 1,17 (3H, s, H_g) y 1,19 (3H, s, H_h); un singlete para un posible O-Metilo: δ 3,61 (3H, s, H_f) y una señal típica de protones olefinicos en δ 5,56 (1H, s, H_t). Tres señales características de protones anoméricos en δ 5,11 (1H, d, $J=6,86$ Hz, H_s); 5,80 (1H, d, $J=7,77$ Hz, H_u) y 6,28 (1H, s, H_v) pusieron de manifiesto la presencia de al menos tres azúcares en la saponina en estudio. La zona entre δ 4 - 4,5 ppm, fue ampliada para su mejor análisis (fig. 41-b).

Figura 41-a: Espectro de RMN ^1H (*Piridina*_{d5}, 700 MHz) de la saponina en estudio.

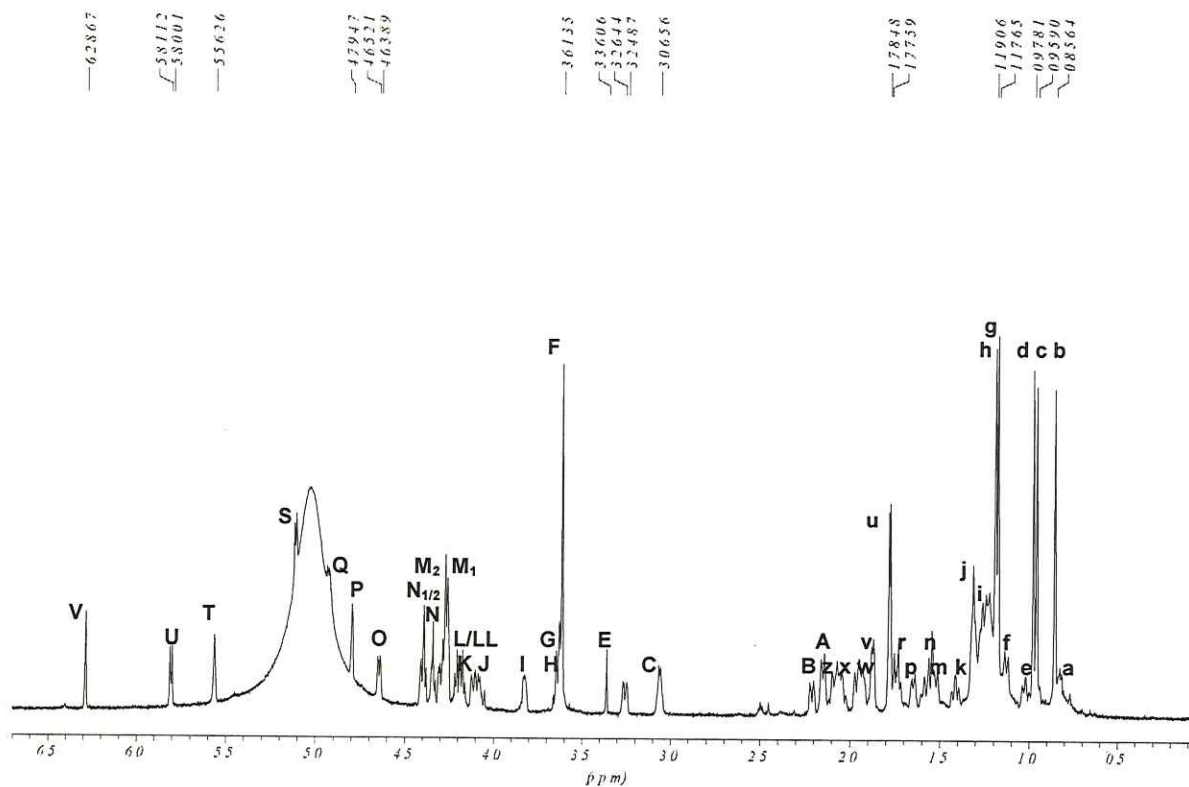


Figura 41-b: Espectro de RMN ^1H (*Piridina*_{d5}, 700 MHz), ampliado en el rango de $\delta = 4 - 4,5$ ppm, de la saponina en estudio

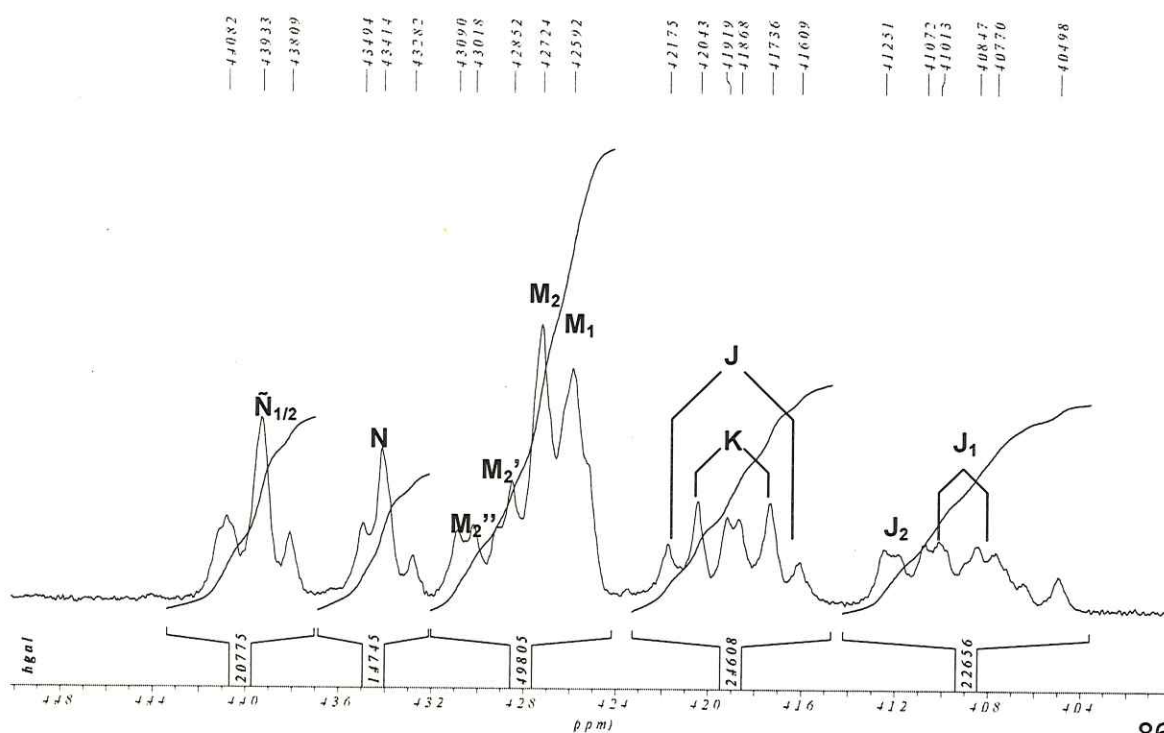


Tabla 11: Desplazamientos químicos de H (δ_H) obtenidos del espectro de RMN 1H de la saponina en estudio (*Piridina*_{d5}, 700 MHz)

H _a	0,8270 (H, d)
H _b	0,8564 (3H, s)
H _c	0,9590 (3H, s)
H _d	0,9781 (3H, s)
H _e	1,0207 (H, t)
H _f	1,1278 (H, d, j= 12,8)
H _g	1,1765 (3H, s)
H _h	1,1906 (H, s)
H _i	1,2346 (2H, d, j= 13,4)
H _{j/k}	1,3140 (2H, s)
H _l	1,4157 (H, t, j= 15,55; 15,61)
H _m	1,5219 (H, d, j= 14,77)
H _{n/o}	1,5605 (H, t)
H _{p/q}	1,6496 (H, d, j= 15,55)
H _{r/s/t}	1,7537 (H, t)
H _u	1,7848 (3H, d)
H _v	1,8700 (H, d, j= 7,77)
H _w	1,9376 (H, d, j= 14,84)
H _x	1,9729 (H, d, j= 7,77)
H _z	2,0721 (H, t, j= 14,84)
H _A	2,15065 (H, d, j= 13,37)
H _B	2,21105 (H, d, j= 12,81)
H _D	3,2565 (H, d, j= 10,99)
H _F	3,6135 (3H, s)
H _G	3,6288 (H, s)
H _H	3,6458 (H, s)
H _I	3,8242 (H, m)
H _{J1}	4,0930 (H, dd)
H _{J2}	4,1251 (H, m)
H _K	4,1673 (H, d)
H _{L/LL}	4,2043 (H, t)
H _{M1}	4,2592 (H, s)
H _{M1'/M2}	4,2658 (2H, d)
H _{M2'}	4,2852 (H, s)
H _{M2''}	4,3048 (H, d)
H _N	4,3414 (H, t)
H _{N1/2}	4,3933 (H, d)
H _{N3}	4,4082 (H, s)
H _O	4,6455 (H, dd, j= 9,24)
H _P	4,7947 (H, s)
H _Q	4,9282 (H, d, j= 8,55)
H _S	5,1133 (H, d, j= 6,86)
H _T	5,5626 (H, s)
H _U	5,8056 (H, d, j= 7,77)
H _V	6,2867 (H, s)
H _W	7,1919 (H, s)
H _X	8,6902 (H, s)

El espectro de RMN ^{13}C (*Piridina*_{d5}, fig. 42) se analizó de forma similar al de 1H , adoptando una denominación numérica para cada señal de carbono. A la primera señal: δ 13,70 se le asignó la denominación de **C₁**, procediendo de igual manera con las siguientes y distinguiendo a los carbonos cuaternarios con un

asterisco (C^* , ver tabla 12). En coherencia con el espectro de protones, el de ^{13}C mostró señales correspondientes a carbonos anoméricos: δ 102,34 (C_{35}); δ 102,61 (C_{36}) y δ 104,51 (C_{37}). También se observó una señal característica de OCH_3 a δ 51,63 (C_{19}) y otras dos a δ 123,12 y 144,17 correspondientes a los carbonos olefínicos (C_{38} y C^*_7).

Para reconocer los carbonos cuaternarios (C^*), terciarios ($-CH$), secundarios ($>CH_2$) y primarios ($-CH_3$) de la molécula, se utilizó el experimento DEPT que permite diferenciarlos.

Figura 42: Espectro de RMN ^{13}C (*Pyridina* d_5 , 175 MHz) de la saponina en estudio.

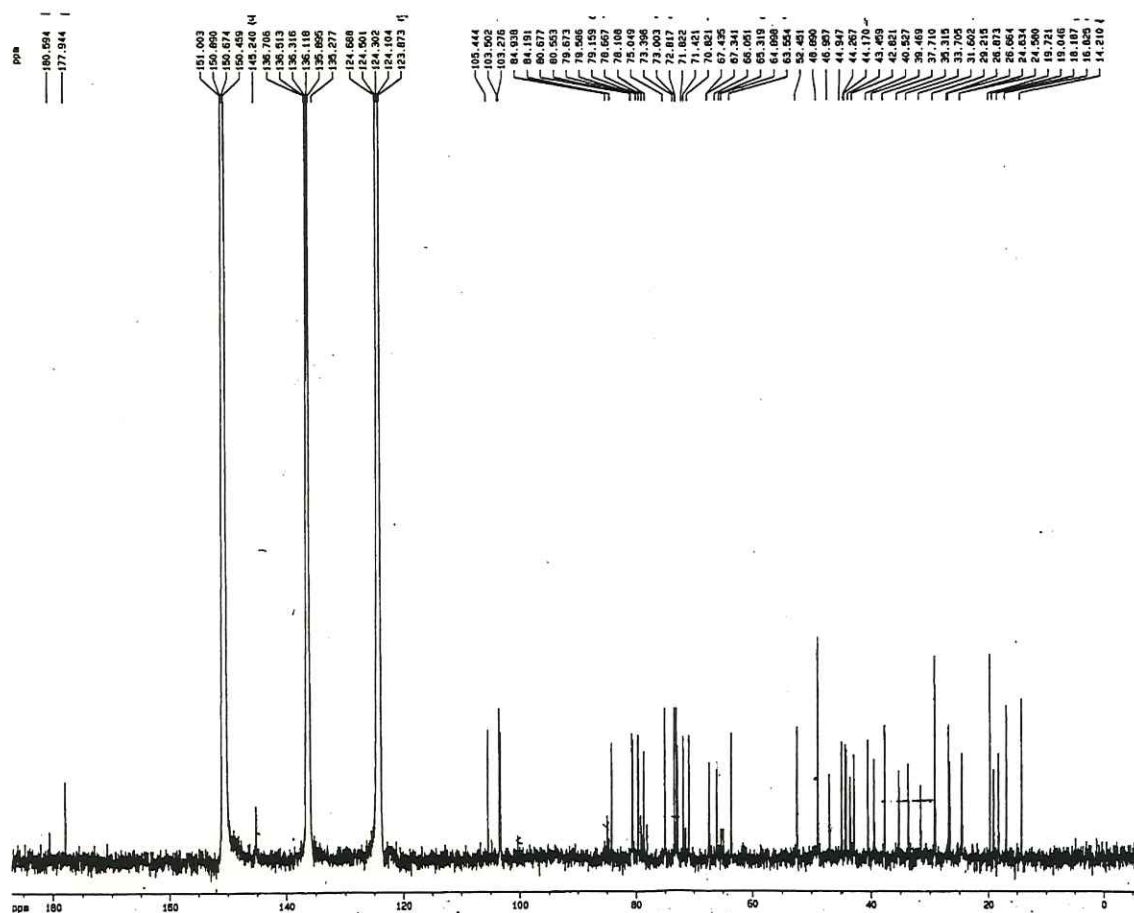


Tabla 12: Desplazamientos químicos de ^{13}C (δ_c) obtenidos del espectro de RMN ^{13}C de la saponina en estudio, combinado con los datos obtenidos por DEPT (Piridina d_5 , 175 MHz).

C	δ_c	DEPT	C	δ_c	DEPT
C ₁	13,7106	CH ₃	C ₂₂	66,5952	CH ₂
C ₂	16,0220	CH ₃	C ₂₃	70,0708	CH
C ₃	17,4884	CH ₃	C ₂₄	70,9603	CH
C ₄	18,4624	CH ₂	C ₂₅	71,9949	CH
C ₅	18,9200	CH ₃	C ₂₆	72,2404	CH
C ₆	23,9533	CH ₂	C ₂₇	72,5116	CH
C ₇	25,8060	CH ₃	C ₂₈	74,1388	CH
C ₈	26,0886	CH ₂	C ₂₉	77,7425	CH
C ₉	28,1737	CH ₂	C ₃₀	78,7491	CH
C ₁₀	29,9010	CH ₃	C ₃₁	78,7500	CH
C ₁₁	30,8169	CH ₂	C ₃₂	79,6967	CH
C ₁₂	32,9523	CH ₂	C ₃₃	80,1051	CH
C ₁₃	34,63	CH ₂	C ₃₄	83,34	CH
1	36,6500	C	C ₃₅	102,3432	CH
C ₁₄	38,7482	CH ₂	C ₃₆	102,6144	CH
2	39,4500	C	C ₃₇	104,5128	CH
3	41,75	C	C ₃₈	123,1184	=CH
C ₁₅	42,5613	CH ₂	*7	144,5000	= C <
4	43,2300	C	*8	177,9440	C*
C ₁₆	43,4869	CH	*9	180,5940	C*
5	43,9100	C			
6	45,8900	C			
C ₁₇	47,9032	CH			
C ₁₈	48,1631	CH			
C ₁₉	51,6294	CH ₃			
C ₂₀	62,7988	CH ₂			
C ₂₁	65,2128	CH ₂			

- Espectros 2D

Al analizar el espectro HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation: correlación heteronuclear de pares H-C directamente unidos, 1J) (700 MHz, *Piridina*_{d5}, fig. 43) se comprobó, por ejemplo, que el protón anomérico de δ 6,28 (H_V) se correlacionaba con el carbono anomérico de δ 102,61 (C_{36}), lo cual indicaba que estos núcleos estaban directamente unidos y por esto se denominó a esta correlación: C_{36} - H_V . A la vez, pudo observarse que la señal del protón olefínico de δ 5,56 (H_T) se vinculaba directamente con el δ 123,12 (C_{38}), indicando una correlación C_{38} - H_T . Siguiendo este criterio de escritura se asignaron todas las correlaciones C-H encontradas (tabla 13).

Figura 43: Espectro HMQC de la saponina en estudio mostrando algunas correlaciones H-C (*Piridina*_{d5} 700 y 175 MHz).

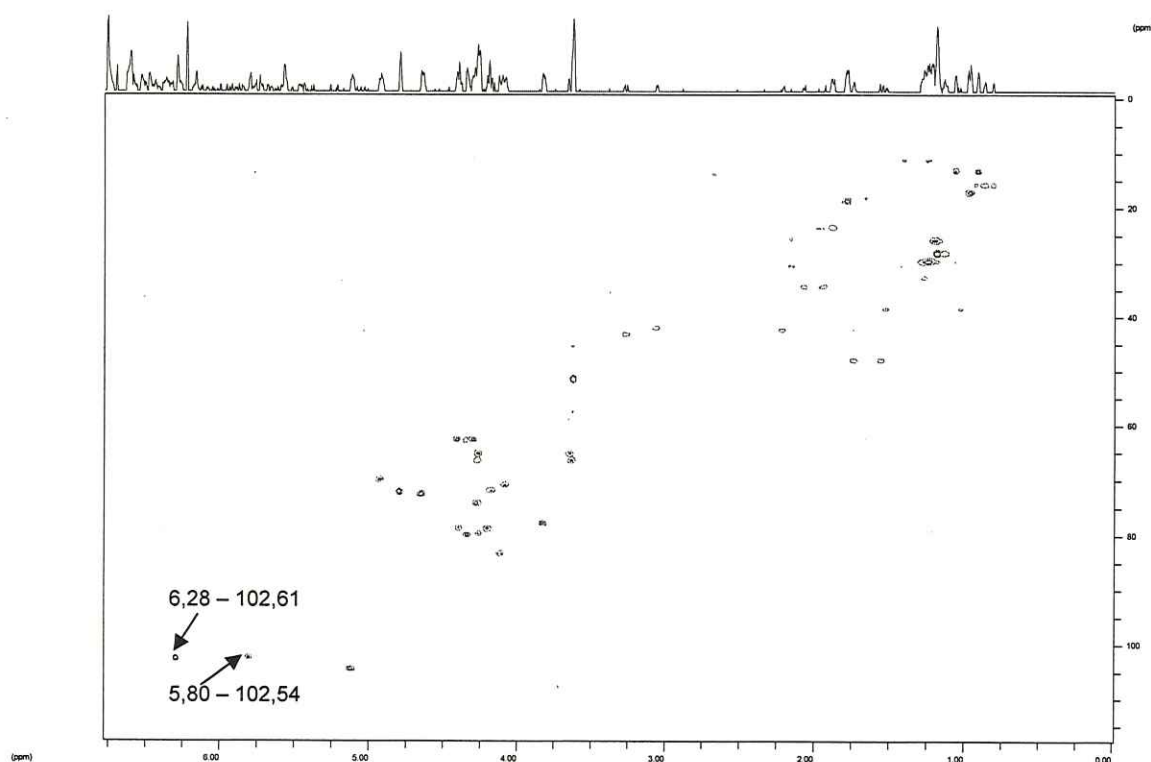


Tabla 13: Correlaciones H-C (1J) obtenidas del espectro HMQC de la saponina en estudio (Piridina- d_5 700 y 175 MHz).

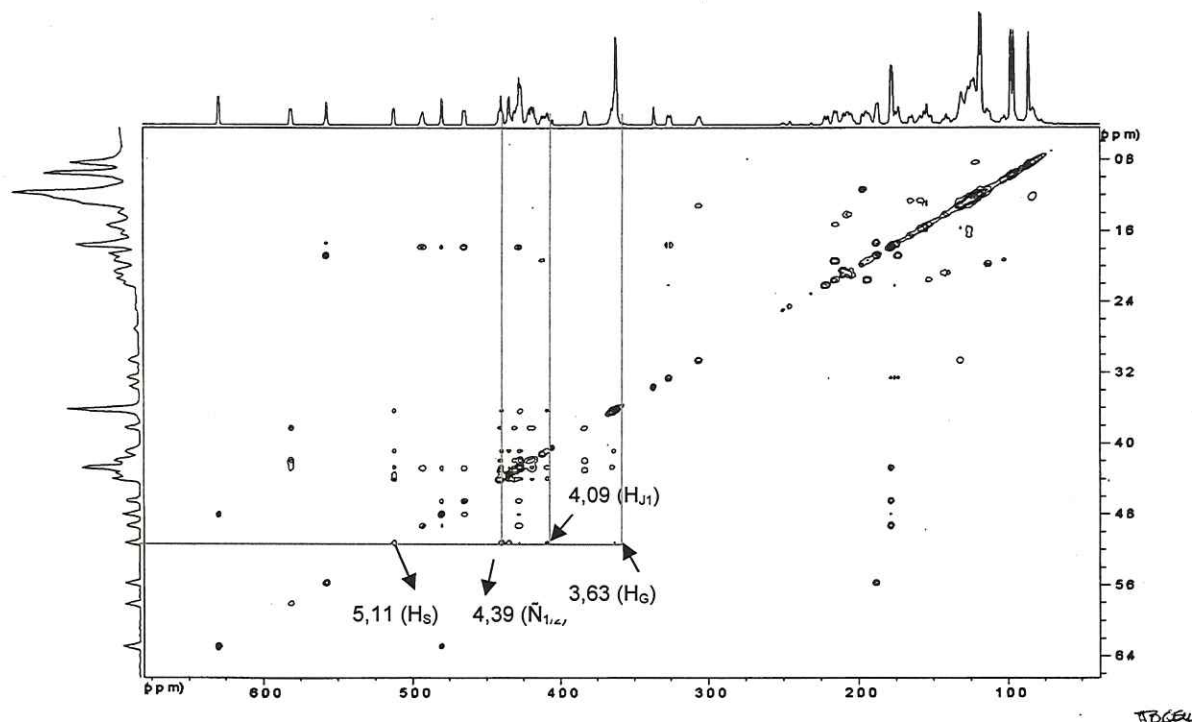
H _b 0,8564	C ₂ 16,0220
H _c 0,9590	C ₃ 17,4884
H _d 0,9781	C ₁ 13,7106
H _e 1,0207	C ₁₄ 38,4022- (H _m)
H _f 1,1278	C ₉ 28,1737
H _g 1,1765	C ₇ 25,8060
H _h 1,1906	C ₁₀ 29,9010
H _i 1,2346	C ₈ 26,0886
H _{j/k} 1,3140	C ₁₂ 32,9523
H _m 1,5219	C ₁₄ 38,7482- (H _e)
H _{n/n'o} 1,5605	C ₁₈ 48,1631
H _{p/q} 1,6496	C ₄ 18,4624
H _{r/s/t} 1,7537	C ₁₇ 47,9032
H _u 1,7803	C ₅ 18,9200
H _v 1,8686	C ₆ 23,9533- (H _x)
H _w 1,9376	C ₁₃ 34,6300- (H _z)
H _x 1,9729	C ₆ 23,9533
H _z 2,0721	C ₁₃ 34,6300
H _A 2,1506	C ₁₁ 30,8169
H _B 2,21105	C ₁₅ 42,5613
H _D 3,2509	C ₁₆ 43,4869
H _F 3,6135	C ₁₉ 51,6294
H _G 3,6288	C ₂₂ 66,5952- (H _{M1'})
H _H 3,6458	C ₂₁ 65,2128- (H _{M1})
H _I 3,8242	C ₂₉ 77,7425
H _{J1} 4,0930	C ₂₆ 70,9603
H _{J2} 4,1251	C ₃₄ 83,3400
H _K 4,1673	C ₂₅ 71,9949
H _{L/LL} 4,2043	C ₃₀ 78,7491- (H _{N1/2})
H _{M1} 4,2592	C ₂₁ 65,2128
H _{M1'} 4,2645	C ₂₂ 66,5952
H _{M2} 4,2724	C ₃₂ 79,6967
H _{M2'} 4,2852	C ₂₈ 74,1388
H _{M2''} 4,3048	C ₂₀ 62,7988- (H _{N3})
H _N 4,3414	C ₃₃ 80,1051
H _{N1/2} 4,3933	C ₃₁ 78,7491
H _{N3} 4,4082	C ₂₀ 62,7988
H _O 4,6455	C ₂₇ 72,5116
H _P 4,7947	C ₂₆ 72,2404
H _Q 4,9282	C ₂₃ 70,0708
H _S 5,1133	C ₃₇ 104,5128
H _T 5,5626	C ₃₈ 123,1184
H _U 5,8056	C ₃₅ 102,3432
H _V 6,2867	C ₃₆ 102,6144

Para deducir la secuencia de los **azúcares** se utilizaron además de HMQC, experimentos TOCSY (Total Correlation Spectroscopy).

TOCSY es una de las herramientas más poderosas para la elucidación estructural de glicósidos, ya que permite relacionar a todos los ^1H que integran un sistema de spines: esto implica la inmediata determinación de todos los ^1H mutuamente acoplados en azúcares y sistemas cíclicos en general.

TOCSY se usó en primera instancia para mostrar las correlaciones sucesivas entre sistemas de spines vecinos que permitieron asignar los ^1H de cada unidad azúcar completa, conectando los respectivos picos a través de una diagonal en el espectro que los vincula. Comenzando entonces por el pico del ^1H de δ 6,28 (H_V), se encontraron las siguientes correlaciones: 6,28–4,92–4,79–4,64–4,28–1,78, correspondientes a todos los ^1H de uno de los azúcares ($\text{H}_V \rightarrow \text{H}_Q \rightarrow \text{H}_P \rightarrow \text{H}_O \rightarrow \text{H}_{M2'} \rightarrow \text{H}_U$). A partir del pico del siguiente ^1H anomérico, δ 5,80 (H_U), se establecieron las correlaciones 5,80–4,40–4,30–4,27–4,20–4,17–3,82, correspondientes a todos los protones de otra unidad azúcar: $\text{H}_U \rightarrow \text{H}_{N3} \rightarrow \text{H}_{M2''} \rightarrow \text{H}_{M2} \rightarrow \text{H}_{L/LL} \rightarrow \text{H}_K \rightarrow \text{H}_I$. Finalmente, para el pico del ^1H anomérico encontrado a δ 5,11 (H_S), se encontró la secuencia $\text{H}_S \rightarrow \text{H}_{N1/2} \rightarrow \text{H}_N \rightarrow \text{H}_{M1'} \rightarrow \text{H}_{J1} \rightarrow \text{H}_G$, correspondiente a una unidad azúcar más (correlación 5,11–4,39–4,34–4,26–4,09–3,63) (fig. 44).

Figura 44: Correlaciones obtenidas por TOCSY (*Piridina*_{d5}, 700 MHz) de la saponina en estudio.



Utilizando los datos obtenidos del experimento HMQC (tabla 13) se pudieron establecer qué carbonos pertenecían a cada uno de los ^1H de los tres azúcares encontrados. De igual manera se analizó el espectro TOCSY para la porción correspondiente a la sapogenina.

- Análisis de las estructuras de los azúcares

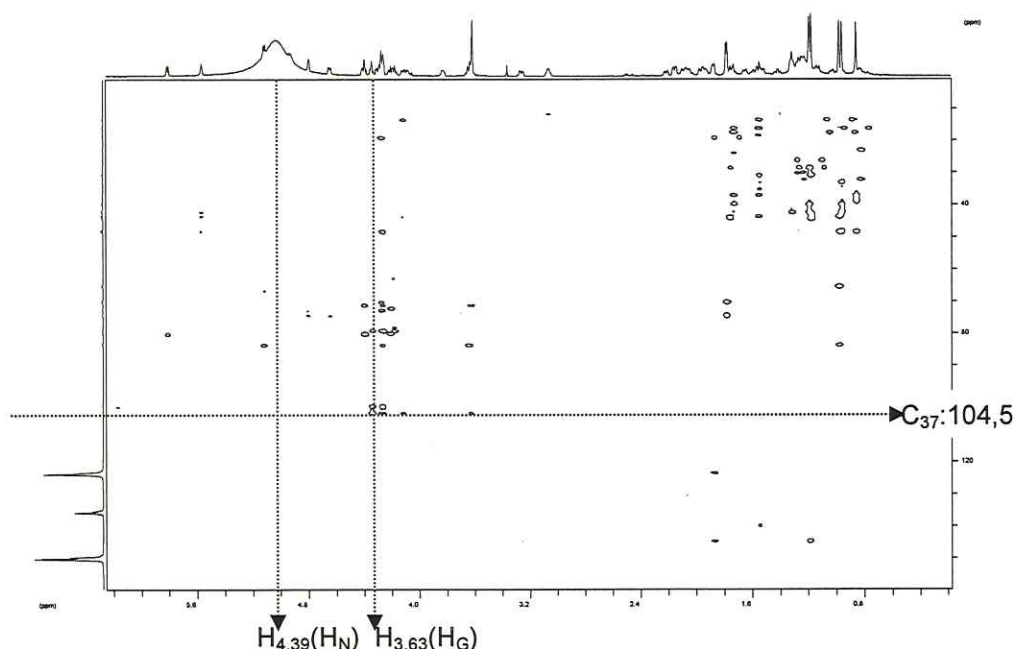
Para la determinación inequívoca de las uniones entre todos los átomos de un mismo azúcar (uniones **intraglicosídicas**) y de las uniones entre los azúcares (uniones **interglicosídicas**) se utilizaron las secuencias obtenidas por TOCSY y experimentos HMBC (Heteronuclear Multiple Binding Correlation: correlaciones entre pares de H y C separados por dos o tres enlaces, ^2J o ^3J).

HMQC (^1J) + TOCSY permitieron identificar todos los átomos de carbono de cada monosacárido.

Utilizando HMBC (^2J y ^3J), pudimos confirmar estos datos y al mismo tiempo establecer los puntos de unión interglucosídicos.

Así, el espectro HMBC (figura 45), mostró que la señal del protón de $\delta_{\text{H}} = 4,28$ ($\text{H}_{\text{M2}'}$) correspondiente a un azúcar, se correlacionaba con los átomos de carbono de $\delta_{\text{C}} 70,07$ y $\delta_{\text{C}} 72,51$ pertenecientes a C_{23} y C_{27} respectivamente (ver tabla 12). Estos átomos unidos a los protones H_{Q} y H_{O} (ver tabla 13), demostraron que el $\text{H}_{\text{M2}'}$ podía encontrarse vecino a ellos; además, el átomo de carbono C_{28} (unido al $\text{H}_{\text{M2}'}$) se correlacionó con el $\delta_{\text{H}} 1,78$ correspondiente a los protones metílicos H_{u} y éstos a su vez se correlacionaron con el C_{23} ($\delta_{\text{C}} 70,07$).

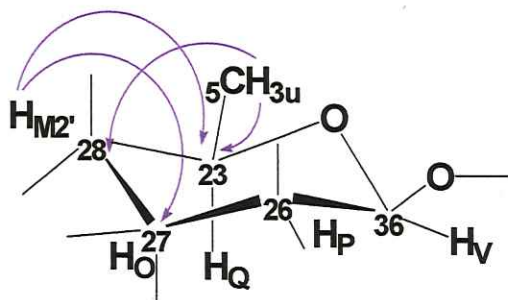
Figura 45: Espectro HMBC (*Piridina*_{d5}, 700 MHz) de la saponina en estudio.



Esto confirmó la unión ($\text{H}_{\text{u}}\text{-C}_5$)-($\text{H}_{\text{Q}}\text{-C}_{23}$)-($\text{H}_{\text{M2}'}\text{-C}_{28}$)-($\text{H}_{\text{O}}\text{-C}_{27}$) entre cuatro de

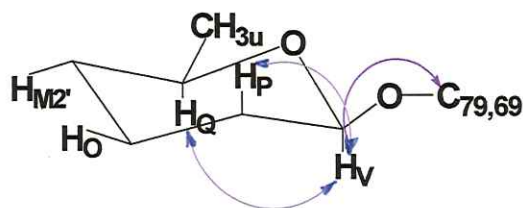
los seis carbonos del primer azúcar encontrado (fig. 46-a, correlaciones HMBC marcadas en fucsia).

Figura 46-a: Correlaciones HMBC señaladas en fucsia. Los números que reemplazan a los **C** no corresponden a la numeración propia del azúcar sino a la numeración dada a las señales en orden de su desplazamiento (δ) en el espectro de RMN de ^{13}C (*Piridina-d₅*, 700 MHz) de la saponina en estudio.



A la vez, su protón anomérico H_V (δ 6,28) se correlacionó con el carbono de δ_c 79,69 del segundo azúcar (δ_c 79,69= C_{32} , tabla 12/ C_{32} - H_{M2} , tabla 13/ H_{M2} perteneciente a la secuencia obtenida por TOCSY para el segundo azúcar). Teniendo en cuenta que ese mismo protón (H_V) mostró interacciones importantes tanto con los H_Q como con H_P (TOCSY), y que la correlación entre dicho protón anomérico (H_V) y el carbono C_{32} (δ_c 79,69) del azúcar siguiente indicaba el punto de conexión entre ambos (unión **interglucosídica**), propusimos la estructura de la figura 46-b para el primer azúcar encontrado, donde las correlaciones TOCSY se señalan en azul.

Figura 46-b: Estructura propuesta para el primer azúcar encontrado. Correlaciones TOCSY señaladas en azul y correlaciones HMBC en fucsia (*Piridina-d₅*, 700 MHz).



$$\text{H}_V\text{-C}_{79,69} = {}^3J_{\text{H-C}}$$

- Análisis de las secuencias de los azúcares restantes

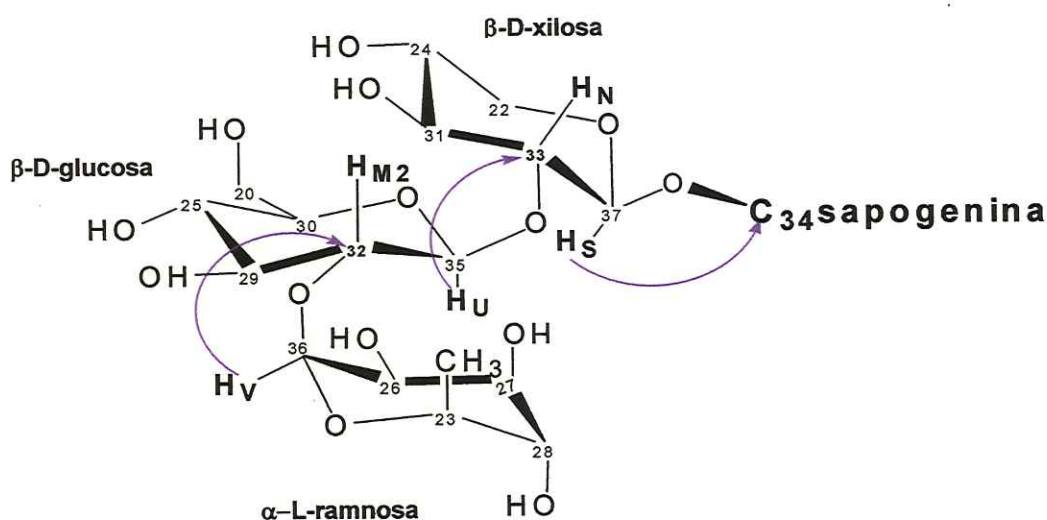
Los altos valores de J obtenidos para los protones anoméricos H_U : $^3J = 7,77$ Hz (δ 5,80 perteneciente al azúcar de la segunda secuencia obtenida por TOCSY), y H_S : $^3J = 6,86$ Hz (δ 5,11 perteneciente al azúcar de la tercer secuencia obtenida por TOCSY), sugerían una disposición **axial** para cada uno de ellos en sus respectivos monosacáridos, ya que los altos valores de acoplamiento entre H_U-H_{M2} y H_S-H_N indicaban una relación **trans** para cada par de protones (Morrison y col., 1996). Por lo tanto, los $^3J = 7,77$ Hz y $^3J = 6,86$ Hz en uno y otro azúcar, confirmaban sus respectivas configuraciones β .

A partir de estos datos y continuando con el mismo criterio de análisis que el aplicado para el primer azúcar, se realizó el esbozo de las probables estructuras de los dos azúcares restantes y a través de un estudio bibliográfico comparativo con espectros de 1H y ^{13}C de monosacáridos conocidos (Seo y col., 1978) pudimos establecer que los azúcares de la saponina eran del tipo piranosa y no furanosa, coincidentes con ramnosa (δ_{C-36} 102,61; δ_{H_V} 6,28), glucosa (δ_{C-35} 102,34; δ_{H_U} 5,80) y xilosa (δ_{C-37} 104,51; δ_{H_S} 5,11), lo cual fue posteriormente confirmado por espectrometría de masa. El estudio comparativo con los datos bibliográficos (Seo y col., 1978), también nos permitió comprobar que la unidad ramnosa era la terminal y que se unía al C_{32} de la glucosa (δ 79,70) mostrando un desplazamiento hacia campos bajos de 5,70 ppm para dicho carbono, ocurriendo lo mismo en el C_{33} de la xilosa cuando la glucosa se unía a él (C_{33} aparece en δ 80,10 con un desplazamiento hacia campos bajos de aproximadamente 6 ppm). Distinguimos así un valor de δ_C más alto que el normalmente encontrado para estos carbonos cuando sus respectivos azúcares están libres de toda sustitución y **no** unidos entre

sí, demostrando que los azúcares estaban unidos de forma: **1→2**. Además, también pudimos observar que el $\delta_{C23} = 70,07$ de la ramnosa, coincidente con el δ_C del quinto C del azúcar de la saponina, poseía ese valor de desplazamiento químico cuando la configuración de su carbono anomérico era del tipo α (para la β -L-ramnosa el δ_{C5} hubiera sido de 73,5 ppm). Esto nos permitió sugerir la presencia de α -L-ramnosa en la saponina.

A la vez, las correlaciones HMBC mostraron uniones **entre** los azúcares a través de acoplamientos **C-H** de largo rango (2J , 3J) encontradas a partir de los protones anoméricos de los azúcares: H_V de ramnosa y H_U de glucosa se correlacionaron con el C_{32} de glucosa y C_{33} de xilosa respectivamente; mientras que el protón anomérico H_S de la xilosa se correlacionó con el C_{34} perteneciente a la **sapogenina** (δ_C **83,34**) (fig. 47).

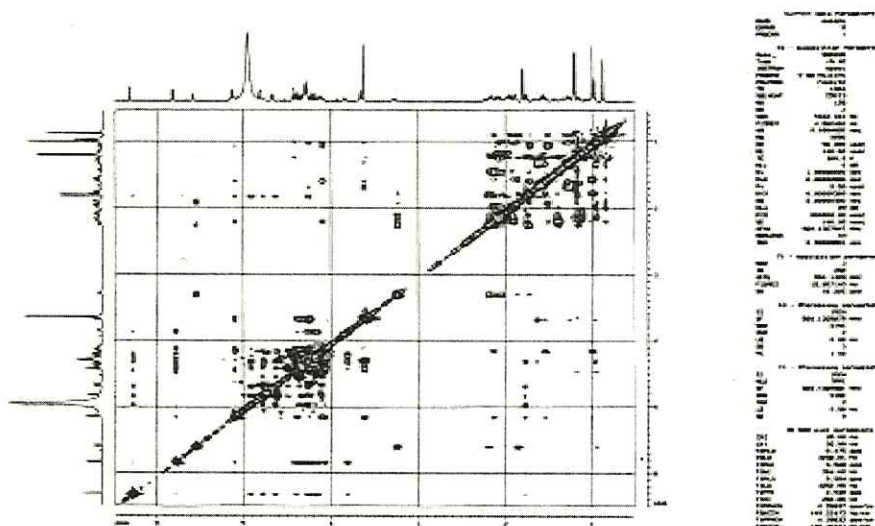
Figura 47: Correlaciones HMBC encontradas entre los protones anoméricos de cada monosacárido y el átomo de carbono de cada azúcar vecino, señaladas en fucsia. También se muestra la correlación entre el protón anomérico del azúcar unido a la genina y el átomo de carbono de la misma al cual este azúcar está unido (*Piridina- d_5* , 700 MHz).



- Análisis de la sapogenina

Para deducir la secuencia de los átomos de carbono de la **genina** utilizamos experimentos TOCSY y HMBC mientras que para la estereoquímica combinamos además experimentos ROESY (Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy: correlación homonuclear entre ^1H que interaccionan espacialmente) (fig. 48).

Figura 48: Correlaciones ^1H - ^1H obtenidas por ROESY (*Piridina*_{d5}, 500 MHz).



Por medio de TOCSY pudimos observar correlaciones entre el H_{J2} de la sapogenina y los protones: H_{e} (por HMQC vimos que están unidos al mismo C_{14} que los H_{m}), $\text{H}_{\text{H/M1}}$ que por sus δ podrían corresponder a un hidroximetilo (unidos al C_{21}), $\text{H}_{\text{n/n/o}}$ (unido al C_{18}), $\text{H}_{\text{r/s/t}}$ (unido al C_{17}) y $\text{H}_{\text{j/k}}$ (unidos al C_{12}) (ver tabla 13).

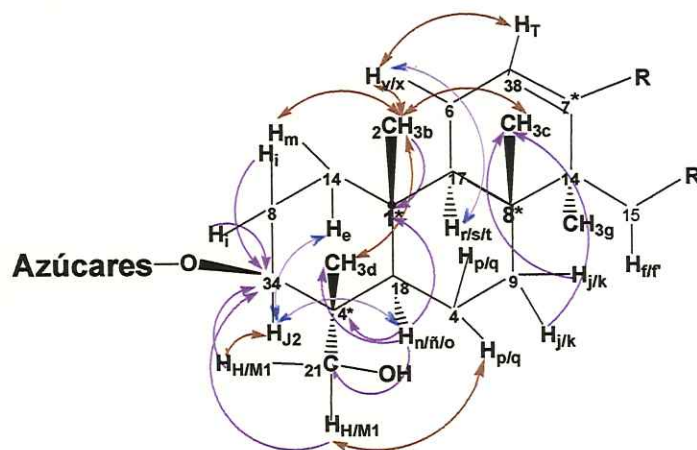
A través de HMBC se encontraron correlaciones entre el C_{34} (unido al H_{J2}) y los protones: H_{d} (metílicos, unidos a C_1), $\text{H}_{\text{H/M1}}$ y H_{i} (unido al C_8); también se encontraron correlaciones entre el $\text{H}_{\text{n/n/o}}$ y los carbonos C_4^* y C_1^* (cuaternarios, ver

tabla 12), C_{21} , C_1 , y C_2 (unido a los protones metílicos H_b); entre el C_4^* cuaternario y los protones metílicos H_d , los hidroximetílicos $H_{H/M1}$, y los $H_{p/q}$ (unidos a C_4). A su vez, los protones metílicos H_b se correlacionaron con el carbono cuaternario C_1^* .

Por medio de los experimentos ROESY (tabla 14), pudimos observar que el H_b estaba vinculado espacialmente con H_d , H_c , H_m e H_i .

Teniendo en cuenta todos estos datos, construimos el fragmento de la sapogenina que se muestra en la figura 49 (algunas de las correlaciones TOCSY, HMBC y ROESY se señalan en azul, fucsia y rojo respectivamente).

Figura 49: Porción de la estructura armada de acuerdo a los espectros analizados.



Los acoplamientos entre el H_T y los $H_{v/x}$ fueron observados por HMBC y ROESY, mientras que el fuerte acoplamiento entre $H_{v/x}$ y $H_{r/s/t}$ se observó en TOCSY.

Ambigüedades en las asignaciones de los protones metilénicos $H_{p/q}/H_{j/k}$ y $H_{f/f'}/H_{v/x}$ pudieron ser resueltas observando los acoplamientos HMBC entre el $H_{j/k}$ y los protones metílicos H_c y entre el $H_{f/f'}$ y los protones metílicos H_g (fig. 49).

Tabla 14: Correlaciones ^1H - ^1H obtenidas por ROESY (*Piridina*_{d5}, 500 MHz).

	b	c	d	e	f	g	h	i	j/k	m	n/ñ/ o	p/q	r/s/t	u	v	w	x	z	A	B	D	F	G	H	I	J1	J2	K	L	M1	M1'	M2	M2'	M2''	N	Ñ1/2	Ñ3	O	P	Q/R	S	T	U	V							
b	+	+						+		+					+																																				
c	+								+						++		+																																		
d	+							+																																											
e										+			+														+																								
f																	++										+																								
g													+																																						
h															+		+																																		
i	+	+																																																	
j/k		+										+																																							
m	+		+											+																																					
n/ñ/c													+													+																									
p/q								+	+														+																												
r/s/t			+							+										+																															
u																																																			
v	+	+								+																																									
w	+						+											++																																	
x				+														+																																	
z	+			+	+										+					+																															
A							+								++				+																																
B												+								+																															
D																		+++																																	
F																																																			
G																																																			
H												+														+																									
I																	+											+																							
J1																																																			

La asignación inequívoca de la configuración de átomos de carbono quirales en alcoholes triterpénicos y derivados oleanólicos puede resolverse utilizando

experimentos ROESY (Baxter y col., 1990).

Las interacciones encontradas por ROESY entre los $H_{H/M1}$, H_e , $H_{n/\bar{n}/o}$ y el H_{J2} de la sapogenina (ver tabla 14), mostraron **orientación ecuatorial** para el hidroximetilo de protones $H_{H/M1}$ y **orientación axial** para el metilo de protones H_d ; lo cual fue posteriormente confirmado con la correlación encontrada por HMBC entre H_d y H_b : interacción **1,3 diaxial**. Este mismo tipo de interacción fue encontrada entre los protones metílicos H_b y H_c . Esta forma de análisis se aplicó para determinar la estructura completa de la sapogenina.

Al realizar la comparación de los datos espectroscópicos aquí descriptos con los existentes en la bibliografía de saponinas triterpenoides (Baxter y col., 1990; Kang y col., 1987; Strauss y col., 1995) encontramos que la **sapogenina** en estudio se trataba de un derivado del ácido oleanólico llamado **ácido fitolacagénico**, que al presentarse unido a la secuencia de azúcares: xilosa→glucosa→ramnosa con uniones interglucosídicas (1→2) recibía la denominación de **Fitolacósido F (34)** (fig 50, tabla 15).

Figura 50: Estructura de Fitolacósido F

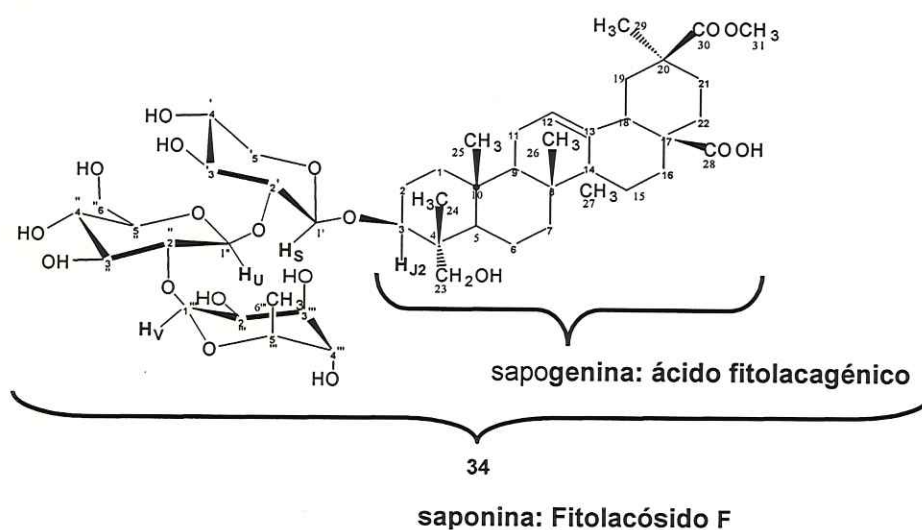


Tabla 15: Comparación de los δ_c obtenidos para la saponina en estudio con los δ_c de Fitolacósido F, obtenidos con equipos de RMN de diferente resolución (Piridina- d_5 /TMS).

Fitolacósido F (P. Med. 53, 338, 1987)	Saponina en estudio (espectro de C a 125 MHz)	Saponina en estudio (espectro de C a 175 MHz)
CH2-1:	38,9	38,40 (C ₁₄)
CH2-2:	26,0	25,66 (C ₈)
CH-3:	82,3	83,20 (C ₃₄)
C-4:	43,4	43,26 (C* ₄)
CH-5:	48,2	47,80 (C ₁₇)
CH2-6:	18,6	18,04 (C ₄)
CH2-7:	33,1	32,70 (C ₁₂)
C-8:	39,8	39,50 (C* ₂)
CH-9:	48,2	47,80 (C ₁₈)
C-10:	37,0	36,70 (C* ₁)
CH2-11:	23,9	23,58 (C ₆)
CH-olefinico-12:	123,5	123,15 (C ₃₈)
C-13:	144,5	144,9 (C* ₇)
C-14:	42,1	41,80 (C* ₃)
CH2-15:	28,5	28,21 (C ₉)
CH2-16:	23,9	23,58 (C ₆)
C-17:	46,2	45,90 (C* ₆)
CH-18:	43,4	43,11 (C ₁₆)
CH2-19:	42,7	42,40 (C ₁₅)
C-20:	44,2	43,90 (C* ₅)
CH2-21:	31,0	30,60 (C ₁₁)
CH2-22:	34,6	34,30 (C ₁₃)
CH2OH-23:	65,4	65,05 (C ₂₁)
CH3-24:	13,3	13,20 (C ₁)
CH3-25:	16,1	15,80 (C ₂)
CH3-26:	19,4	17,18 (C ₃)
CH3-27:	26,1	25,87 (C ₇)
COOH-28:	179,8	179,50 (C* ₉)
CH3-29:	28,5	28,21 (C ₁₀)
COOCH3-30:	177,2	176,90 (C* ₈)
OCH3:	51,7	51,45 (C ₁₉)
Xil-1:	104,4	104,48 (C ₃₇)-5,1
Xil-2:	83,4	79,55 (C ₃₃)
Xil-3:	77,6	78,50 (C ₃₁)
Xil-4:	70,9	70,82 (C ₂₄)
Xil-5:	66,0	66,34 (C ₂₂)
Glu-1:	102,2	102,20 (C ₃₅)-5,89
Glu-2:	79,8	79,60 (C ₃₂)
Glu-3:	78,4	77,66 (C ₂₉)
Glu-4:	72,1	71,81 (C ₂₅)
Glu-5:	78,7	78,67 (C ₃₀)
Glu-6:	62,9	62,55 (C ₂₀)
Ram-1:	102,2	102,53 (C ₃₆)-5,89
Ram-2:	72,1	72,00 (C ₂₆)
Ram-3:	72,1	72,39 (C ₂₇)
Ram-4:	74,2	74,05 (C ₂₈)
Ram-5:	69,8	69,82 (C ₂₃)
Ram-6:	18,6	18,73 (C ₅)

Para corroborar los resultados encontrados, utilizamos espectroscopía de masa. La técnica aplicada fue EM-MALDI: fragmenta la molécula con radiación láser generando iones de una gran distribución de masas. La saponina estudiada mostró un pico $[M+Na]^+$ en m/z 979,7 y tres fragmentos iónicos: m/z 833.8 $[(M+Na)-146]^+$, 671.5 $[(M+Na)-(146+162)]^+$ y 481.2 $[146+162+132+Na]^+$, los cuales correspondían a las sucesivas pérdidas de ramnosa terminal, del residuo ramnosil-glucosilo y del trisacárido (ramnosa-glucosa-xilosa), respectivamente.

Finalmente, el IR de la saponina mostró señales en 3400 (típica de-OH), 1715 ($-COOCH_3$), 1709 y 1667 ($-COOH$), 1071 y 1042 ($-C-O$), 825, 805 ($C=C$) y el PM fue coincidente con el peso molecular de Fitolacósido F (PM= 956).

En resumen, la estructura de la saponina aislada de los frutos de *Phytolacca tetramera* fue elucidada inequívocamente como: [3-O- α -L-ramnopiranosil - (1 $\rightarrow$ 2) β -D-glucopiranosil - (1 $\rightarrow$ 2) β -D-xilopiranosil] - ácido fitolacagénico o Fitolacósido F (**34**). Es una saponina monodesmosídica aislada previamente de *P. americana* (Chi y col., 1981) y de *P. acinosa* (Favel y col., 1994). En la tabla 16 se muestra la secuencia ordenada de los valores de δ_c de Fitolacósido F, aclarándose también la asignación dada para dichos **C** durante el análisis.

Tabla 16: Datos de RMN de ^{13}C de Fitolacósido F (Piridina- d_5 , 175 MHz)
Se indica entre paréntesis la nomenclatura de las señales de ^{13}C utilizadas durante todo el análisis

Porción azúcar		Sapogenina			
	δ_c	Posición	δ_c	Posición	δ_c
Xilosa					
1'	104,51 (C ₃₇)	C-1	38,75 (C ₁₄)	C-21	30,82 (C ₁₁)
		C-2	26,09 (C ₈)	C-22	34,63 (C ₁₃)
2'	80,10 (C ₃₃)	C-3	83,34 (C ₃₄)	C-23	65,21 (C ₂₁)
3'	78,75 (C ₃₁)	C-4	43,23 (C ₄)	C-24	13,71 (C ₁)
4'	70,96 (C ₂₄)	C-5	47,90 (C ₁₇)	C-25	16,02 (C ₂)
5'	66,59 (C ₂₂)	C-6	18,46 (C ₄)	C-26	17,49 (C ₃)
Glucosa		C-7	32,95 (C ₁₂)	C-27	25,80 (C ₇)
1''	102,34 (C ₃₅)	C-8	39,45 (C ₂)	C-28	180,59 (C ₉)
2''	79,70 (C ₃₂)	C-9	48,16 (C ₁₈)	C-29	28,90 (C ₁₀)
3''	77,74 (C ₂₉)	C-10	36,65 (C ₁)	C-30	177,94 (C ₈)
4''	72,00 (C ₂₅)	C-11	23,95 (C ₆)	OMe	51,63 (C ₁₉)
5''	78,75 (C ₃₀)	C-12	123,12 (C ₃₈)		
6''	62,80 (C ₂₀)	C-13	144,50 (C ₇)		
Ramnosa		C-14	41,75 (C ₃)		
1'''	102,61 (C ₃₆)	C-15	28,17 (C ₉)		
2'''	72,24 (C ₂₆)	C-16	23,95 (C ₆)		
3'''	72,51 (C ₂₇)	C-17	45,89 (C ₆)		
4'''	74,14 (C ₂₈)	C-18	43,49 (C ₁₆)		
5'''	70,07 (C ₂₃)	C-19	42,56 (C ₁₅)		
6'''	18,92 (C ₅)	C-20	43,91 (C ₅)		

III.4.4- Determinación de la CIM de las saponinas aisladas e identificadas

La actividad antifúngica de las tres saponinas aisladas (32, 33 y 34) se muestra en la tabla 17.

Tabla 17: Concentración inhibitoria mínima (CIM, $\mu\text{g/ml}$) de los fitolacósidos B, E y F (**32**, **33** y **34**) aislados de *P. tetramera*.

Compuestos	CIMs (µg/ml)											
	Ca	Ct	Sc	Cn	Afu	Afl	An	Mc	Mg	Tm	Tr	Ef
32 Fit. B	100	100	100	25	125	50	125	125	50	25	50	125
33 Fit. E	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	250	250	250	125	250
34 Fit. F	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Anf	0,75	0,625	1,50	0,40	3	3	0,90	50	6,25	6,25	25	0,3
Ket	8	5	6	2	20	30	12,5	15	6,25	12,5	15	25
Terbinaf	1,56	0,78	3,12	0,34	0,78	0,78	1,56	0,01	0,04	0,04	0,01	0,004

Los resultados mostraron que **32** (Fitolacósido B) posee un amplio espectro de acción. Inhibió el crecimiento tanto de levaduras, como de hongos filamentosos incluyendo dermatofitos, con CIMs entre 25 y 125 $\mu\text{g/ml}$, siendo *T. mentagrophytes* la especie más susceptible. Fitolacósido B fue activo contra las dos especies del género *Candida* probadas, que tal como mencionamos previamente, son agentes etiológicos importantes de las micosis sistémicas en humanos. Su análogo, **33** (Fitolacósido E), con una cadena glicosídica más larga, también posee actividad antifúngica, aunque mostró menor capacidad de inhibición y un espectro de actividad también menor. Inhibió solamente a especies de dermatofitos, con valores de CIM entre 125-250 $\mu\text{g/ml}$. En cambio, **34** (Fitolacósido F) no presentó actividad contra ninguno de los hongos probados.

Considerando que Sparg y col. (2004) y Favel y col. (1994) encontraron que:

- *un mayor número de monosacáridos en la porción azúcar disminuye la actividad antifúngica de las saponinas*

nuestros resultados aportan una nueva evidencia de que la actividad antifúngica de las saponinas podría estar influenciada por el número de residuos de azúcar

tal como lo sugirieron los autores citados. Al comparar las actividades de los fitolacósidos B y E, que difieren en que el último posee un unidad de glucosa extra respecto del primero, encontramos que un incremento en la longitud de la cadena disminuye las propiedades antifúngicas. Además, fitolacósido F, que posee tres azúcares en su estructura, no mostró actividad.

También es de hacer notar que la estructura de la genina podría estar relacionada con la actividad antifúngica observada. Los dos fitolacósidos activos (B y E) poseen la genina fitolacagenina con OH en C-2, mientras fitolacósido F posee como genina ácido fitolacagénico que no posee OH en esa posición.

III.4.5- Determinación de la CFM de Fitolacósido B

Finalmente, determinamos la concentración fungicida mínima (CFM) del compuesto más activo: Fitolacósido B (32). La tabla 18 muestra los valores de CIM y de CFM obtenidos.

Tabla 18: Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIM, (µg/ml) y Fungicidas mínimas (CFM, (µg/ml) de Fitolacósido B.

	FITOLACÓSIDO B (32)											
	<i>Ca</i>	<i>Ct</i>	<i>Sc</i>	<i>Cn</i>	<i>Afu</i>	<i>Afl</i>	<i>An</i>	<i>Mc</i>	<i>Mg</i>	<i>Tm</i>	<i>Tr</i>	<i>Ef</i>
CIM / CFM	100/100	100/100	100/100	25/75	125/300	50/150	125/150	125/150	50/150	25/100	50/100	125/200
CIM Anfotericina B	0,75	0,625	1,50	0,40	3	3	0,90	50	6,25	25	6,25	0,3
CIM Ketoconazol	8	5	6	2	20	30	12,5	15	6,25	12,5	15	25

Los resultados mostraron que además de ser fungistático, Fitolacósido B era fungicida hacia todos los hongos. Su CFM coincidió con la CIM para *C. albicans*, *C. tropicalis* y *S. cerevisiae* mientras que resultó ser 1-4 veces mayor que la CIM para el resto de los hongos.

III.5- Derivados químicos de Fitolacósido B

III.5.1- Preparación de derivados de Fitolacósido B y evaluación de actividad antifúngica

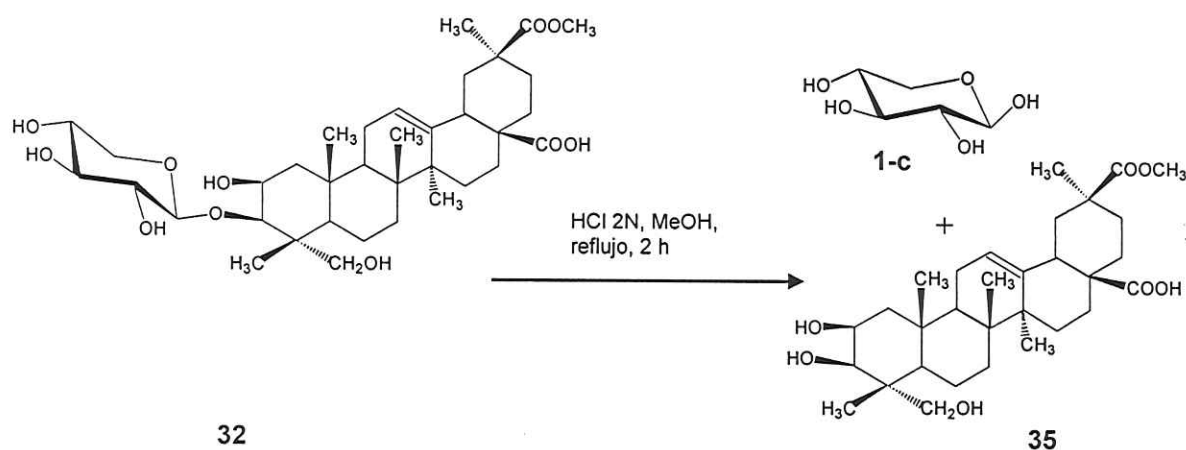
Preparamos derivados de Fitolacósido B, a través de reacciones de hidrólisis, esterificación y permetilación, que son las reacciones más frecuentemente utilizadas para derivatizar saponinas (Hostettmann y col., 1995), con el objetivo de establecer relaciones entre la estructura de la saponina en estudio y su actividad antifúngica.

III.5.1.1- Preparación de derivados de Fitolacósido B

III.5.1.1.1- Hidrólisis

La hidrólisis de Fitolacósido B (**32**) en medio ácido (Spengel y col., 1995), nos permitió obtener cuantitativamente fitolacagenina (**35**) (fig. 51) que fue extraída con un solvente orgánico (Suga y col., 1978).

Figura 51: Reacción de hidrólisis de Fitolacósido B

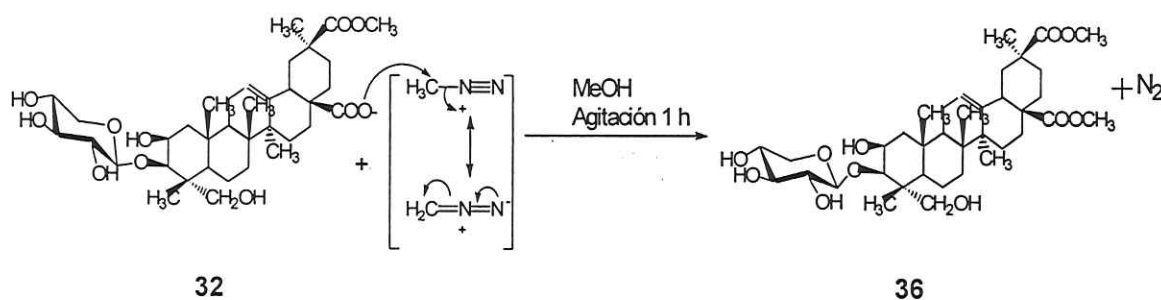


III.5.1.1.2- Metilación

Para llevar a cabo la reacción, una solución metanólica de Fitolacósido B (32) fue tratada con CH_2N_2 (Woo y col., 1976), obteniéndose cuantitativamente el compuesto 36, cuya estructura fue confirmada por RMN ^1H .

La esterificación procede por un mecanismo $\text{S}_{\text{N}}2$ en la que un O^- del carboxilato ataca el C del grupo CH_3 desplazando simultáneamente el N_2 , que es un muy buen grupo saliente (fig. 52).

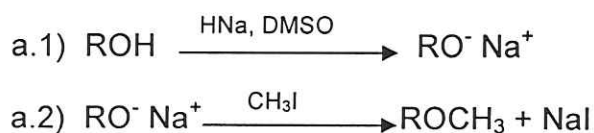
Figura 52: Reacción de metilación de Fitolacósido B y obtención de su derivado metilado



III.5.1..13- Permetilación

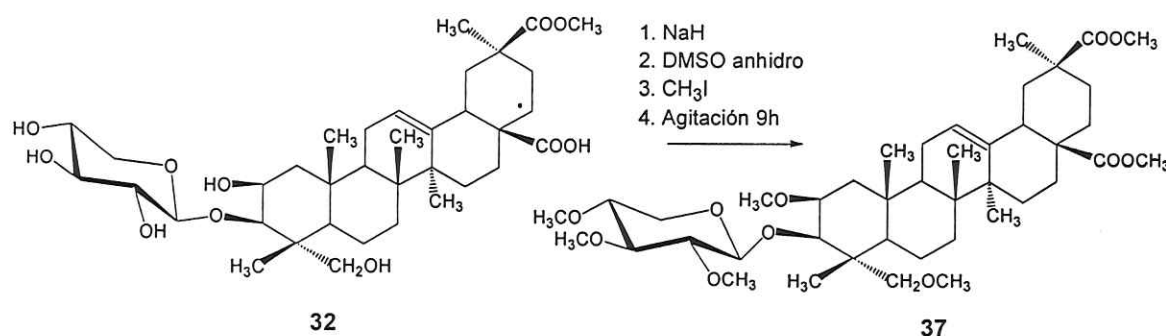
Para esta reacción se utilizó el método de Hakomori (Hakomori, 1964) que ha sido el más utilizado en la permetilación de saponinas (Woo y col., 1976; Favel, 1994).

Este método utiliza HNa en DMSO , que permite la formación de alcóxido de sodio (Hakomori, 1964) (a.1) el cual reaccionan con CH_3I para dar el éter (a.2) correspondiente. Esta reacción es sumamente útil para la metilación de OH de azúcares.



La reacción de metilación de fitolacósido B por el método de Hakomori dio cuantitativamente el derivado permetilado **37** (fig. 53) cuya estructura fue confirmada por RMN ^1H y por IR (no hay picos a $\approx 3440\text{ cm}^{-1}$).

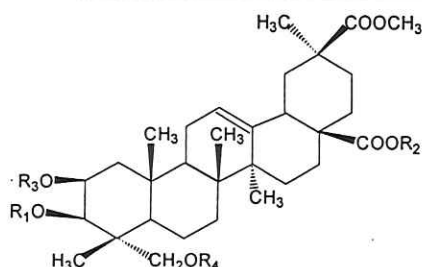
Figura 53: Reacción de permetilación de Fitolacósido B



III.5.1.2- Determinación de la actividad antifúngica de los derivados de Fitolacósido B

La actividad antifúngica de los derivados de Fitolacósido B fue evaluada por el método dilución en agar a concentraciones 250-7,8 $\mu\text{g/ml}$. Se consideraron activos los compuestos con CIM < 250 $\mu\text{g/ml}$ (Zacchino y col., 2003). Las CIMs obtenidas se muestran la tabla 19.

Los resultados mostraron (tabla 19) que ni la genina (**35**) ni los derivados metilados (**36**, **37**) inhibían el crecimiento fúngico hasta 250 $\mu\text{g/ml}$, sugiriendo que la porción glicona así como los hidroxilos libres y el carboxilo de C-28 de la genina eran necesarios para la actividad antifúngica de Fitolacósido B (**32**).



Compuestos		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	^a Ca	^b Ct	^c Sc	^d Cn	^e Afu	^f Afl	^g An	^h Mc	ⁱ Mg	^j Tm	^k Tr	^l Ef
32	Fit. B	Xil-	H	H	H	125	125	50	50	125	50	125	125	50	25	50	125
35	Fitogen	H	H	H	H	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
36	28-Me-Fit. B	Xil-	CH ₃	H	H	>250	>250	250	250	>250	250	>250	>250	250	250	250	>250
37	2,23,28-Me-FitB	2',3',4'- triMe- Xil	CH ₃	CH ₃	CH ₃	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
Anfotericina B						0,75	0,63	1,50	0,40	3	3	0,90	50	6,25	6,25	25	0,3
Ketoconazol						8	5	6	2	20	30	12,5	15	6,25	12,5	15	25
Terbinafina						-	-	-	-	-	-	-	0,01	0,04	0,04	0,01	0,04

^a*Candida albicans* ATCC 10231; ^b*Candida tropicalis* C 131; ^c*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; ^d*Cryptococcus neoformans* ATCC 32264; ^e*Aspergillus fumigatus* ATCC 26934; ^f*Aspergillus flavus* ATCC 9170; ^g*Aspergillus niger* ATCC 9029; ^h*Microsporium canis* C112; ⁱ*Microsporium gypseum* C115; ^j*Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972; ^k*Trichophyton rubrum* C113. ^l*Epidermophyton floccosum* C114. Fit. B.: Fitolacósido B; Fit. E.: Fitolacósido E; 28-Me-Fit.B.: Fitolacósido B metilado; 2,23,28-Me-Fit.B.: Fitolacósido B permetilado.

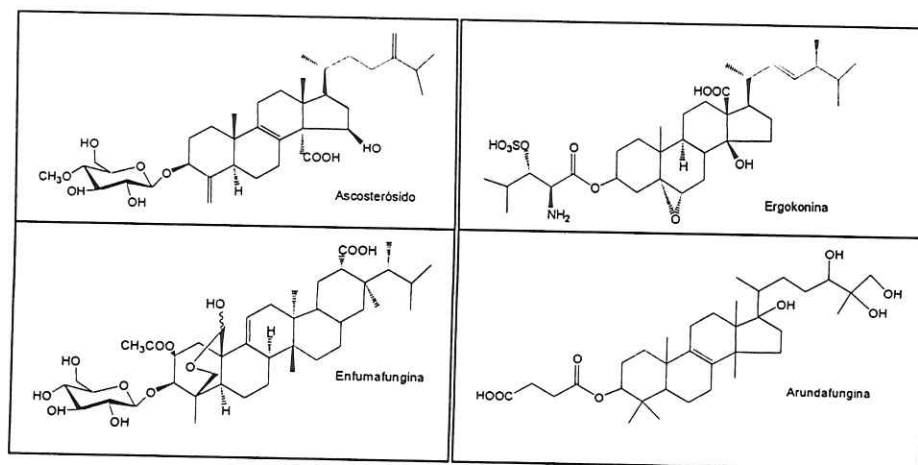
III.6- Estudios de Mecanismo de acción de Fitolacósido B

III.6.1- Estudios del mecanismo de acción de Fitolacósido B

Para orientarnos en el posible mecanismo de acción de Fitolacósido B, observamos el efecto que éste produjo sobre la morfología fúngica, dado que se conoce que los cambios en la morfología de los hongos pueden sugerir el posible blanco o modo de acción de un agente antifúngico (Frost y col., 1995).

Gunji y col. (1983), describieron los cambios morfológicos que producían ciertos antifúngicos cuyo blanco de acción era la pared celular fúngica sobre diferentes especies de hongos. Por ejemplo Polioxina causaba hinchamiento de las hifas y protuberancias características en *Piricularia oryzae* y *Mucor racemosus*; Aculeacina A producía retracción e hinchamiento de varias levaduras y de otros hongos filamentosos entre ellos *A. fumigatus*. Onishi y col. (2000) mostraron que los terpenoides Arundafungina y Ergokonina A y las saponinas triterpenoides Enfumafungina y Ascosterósido (fig.54), cuyo blanco de acción era la pared celular fúngica, producían hifas muy ramificadas en *A. niger*. Este último dato resultó muy interesante dada la semejanza estructural de estos compuestos con Fitolacósido B.

Figura 54: Estructuras químicas de compuestos recientemente informados como antifúngicos inhibidores de la pared celular fúngica (Onishi y col., 2000).



III.6.1.1- Estudio de las malformaciones de las hifas producidas por Fitolacósido B

Para realizar este estudio, se utilizó el hongo *N. crassa* el cual tiene una larga historia como excelente modelo para investigaciones celulares, bioquímicas y genéticas (Seiler y col, 2003). Es un hongo filamentoso de crecimiento rápido que normalmente crece en una forma ramificada difusa con hifas conidiadas más o menos septadas.

Las observaciones con microscopio óptico (400x) permitieron detectar que Fitolacósido B producía engrosamientos de los ápices é hifas muy ramificadas y acortadas (fig. 55, superior). Las mismas alteraciones se observaron por microscopía electrónica de barrido (MEB) (1340x) (fig. 55, inferior).

El tipo de alteración morfológica producida por Fitolacósido B fue muy semejante a la obtenida con inhibidores de la pared celular fúngica (Gunji y col. 1983; Seiler y col., 2003; Onishi y col., 2000)

Para corroborar si Fitolacósido B producía alteración de la pared celular fúngica, utilizamos dos métodos celulares más: el bioensayo de *Neurospora crassa* (Fukuda, 1991) y el del uso del protector osmótico sorbitol (Frost y col., 1995).

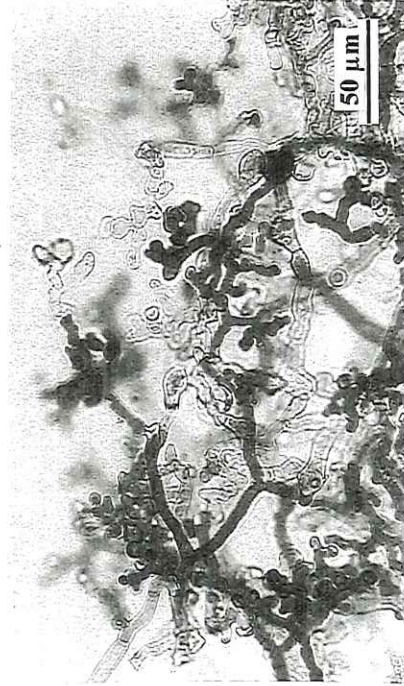
Figura 55: Efecto de Fitolacósido B sobre la morfología de *Neurospora crassa* en medio líquido.



Hifas controles

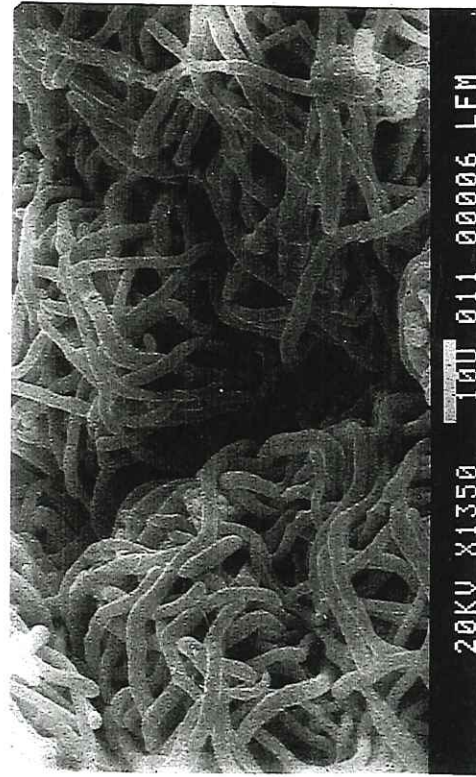


Tratadas 100 µg/ml



Tratadas 100 µg/ml

Microscopio óptico
Neurospora crassa (ATCC 9279): CIM = 125 µg/ml



Hifas controles



Tratadas 100 µg/ml

Microscopio Electrónico de Barrido
Neurospora crassa (ATCC 9279): CIM = 125 µg/ml

III.6.1.2- Estudios que tienen como blanco la pared celular fúngica

III.6.1.2.1- Bioensayo de *Neurospora crassa*

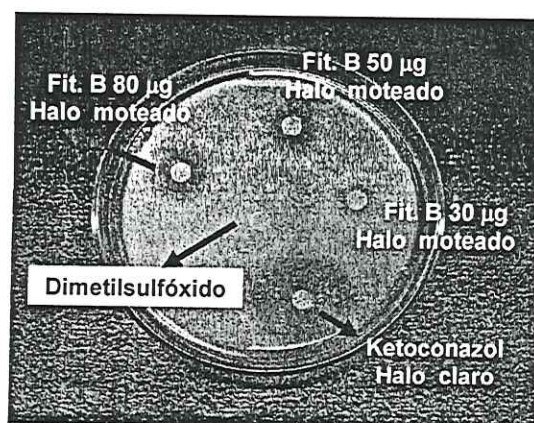
Es un método de difusión en agar (ver sección I.1.C.1) que permite detectar macroscópicamente compuestos antifúngicos inhibidores de pared (Selitrennikoff, 1983). Discos conteniendo el compuesto a probar se colocan sobre la superficie de placas de agar inoculadas con esporas de *N. crassa*. Los halos de inhibición de crecimiento producidos por antifúngicos cuyo blanco es la pared celular fúngica, aparecen moteados, mientras que los que no la alteran producen zonas claras de inhibición.

- Resultados del bioensayo de *Neurospora crassa* con Fitolacósido B

Para realizar este bioensayo colocamos Fitolacósido B en discos de papel, de acuerdo con Materiales y Métodos.

Los resultados mostraron que alrededor de los discos cargados con Fitolacósido B se producían halos moteados. El disco conteniendo Ketoconazol, formó un halo claro mientras que el solvente DMSO no produjo halo alguno (fig. 56).

Figura 56: Halos moteados obtenidos con distintas cargas de Fitolacósido B y halos claros obtenidos con Ketoconazol en el ensayo de *Neurospora crassa*.



Este resultado fue un nuevo indicio de que Fitolacósido B podría estar actuando sobre la pared celular fúngica.

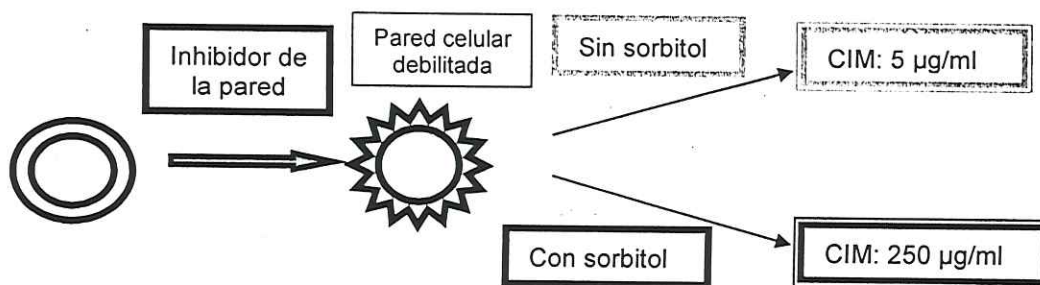
III.6.1.2.2- Bioensayo de Sorbitol

Este método se basa en que las células fúngicas que carecen de pared, ó que presentan alteraciones en la misma, no pueden crecer en ausencia de un osmo-protector en un medio líquido, pero su crecimiento será posible en presencia del mismo.

Los inhibidores de la pared celular se identifican cuando la CIM obtenida con sorbitol es más alta que sin él luego de 7 días de incubación (fig. 57). Por ejemplo, Frost y col. (1995) informaron que Papulacandina B, un conocido inhibidor de la pared celular fúngica, mostraba valores de CIM de 2 y 250 $\mu\text{g/ml}$ frente a *C. albicans* sin y con sorbitol respectivamente.

Con este ensayo se pueden detectar no sólo agentes que afectan la síntesis de los componentes de la pared celular, sino también los mecanismos regulatorios involucrados en ese proceso (Frost y col. 1995).

Figura 57: Diagrama esquemático del bioensayo de sorbitol con valores de CIM supuestos que se obtendrían frente a inhibidores de pared.



- *Resultados del ensayo de sorbitol con Fitolacósido B*

La CIM de Fitolacósido B frente a *S. cerevisiae* no se modificó (50 µg/ml), por la presencia de sorbitol 0,8 M, por lo que este bioensayo sugirió que Fitolacósido B no actuaría alterando la pared celular fúngica.

Dado que los bioensayos anteriores daban resultados contradictorios, se realizaron nuevos ensayos tendientes a dilucidar si Fitolacósido B tenía como blanco la pared celular fúngica.

III.6.1.2.3- Ensayos de inhibición de glucan y quitin sintasas

III.6.1.2.3.1- Estructura de la pared celular fúngica

La pared fúngica es una matriz compleja formada por 1,3 α -, 1,3 β - y 1,6 β - D-glucanos, mananos, proteínas y quitina (fig. 58).

Figura 58: Esquema simplificado de la pared celular fúngica (modificado de Selitrennikof, 1995)



1,3 β -D-glucano es uno de los componentes principales de la pared celular fúngica. Es un polisacárido constituido por unidades de 1,3 β -D-glucosa. La inhibición

de su biosíntesis produce células osmóticamente frágiles que son lisadas fácilmente (Onishi y col., 2000).

La quitina es otro constituyente importante de la pared fúngica. Es un polisacárido formado por unidades de N-acetil-glucosamina (NAcGA). Se ha demostrado que alteraciones en el contenido de quitina producen la inhibición del crecimiento y modificaciones sustanciales en la estructura de la pared (Georgopapadakou, 2001; Roncero y col., 1985).

Las enzimas (1,3) β -glucan-sintasa y quitin-sintasa, que catalizan la síntesis de los polímeros 1,3 β -D-glucano y quitina respectivamente, han mostrado ser importantes blancos para la detección de agentes antifúngicos (Onishi y col, 2000; López y col, 2001; Vargas y col. 2003) .

III.6.1.2.3.2- Ensayo de inhibición de 1,3 β -D-glucan sintasa

Para la realización del ensayo se utiliza un extracto semipurificado de membranas de *S. cerevisiae*, el cual puesto en contacto con UDP-[¹⁴C]-glucosa soluble, forma [¹⁴C]-1,3 β -D-glucano insoluble (Georgopapadakou, 2001) el cual es cuantificado con un contador de centelleo. El esquema que sigue muestra las reacciones que se realizan en paralelo para detectar inhibidores de 1,3 β -D-glucan-sintasa [(a) en ausencia del inhibidor; (b) en presencia del inhibidor]:

Reacción		Glucano formado
(a) 2n UDP-[¹⁴ C]-glucosa	Extracto con 1,3β-D-glucan-sintasa $\rightarrow$ [¹⁴ C]-1,3β-glucano + 2n UDP	100%
(b) 2n UDP-[¹⁴ C]-glucosa	Extracto con 1,3β-glucan sintasa + Inhibidor $\rightarrow$ [¹⁴ C]-1,3β-glucano + 2n UDP	* 

* La flecha indica que en presencia de inhibidores habrá una disminución del glucano formado con respecto al control

La UDP-[¹⁴C]-glucosa soluble no incorporada en cada una de las reacciones (a) y (b), es separada del [¹⁴C]-1,3β-D-glucano insoluble por filtración. Se espera que si el compuesto agregado es inhibidor de la enzima, la cantidad de glucano formado en la segunda reacción será menor que el formado en la primera (que se considera el 100%), lo que se expresa como % de inhibición (% I) del compuesto ensayado.

- Resultados del ensayo de inhibición de 1,3β-D-glucan-sintasa con Fitolacósido B

Los resultados mostraron que Fitolacósido B produjo 5% de inhibición a 20 μg/ensayo (500 μg/ml) (Tabla 20) (droga control Papulacandina B), sugiriendo que Fitolacósido B no sería inhibidor de 1,3β-D-glucan-sintasa.

Tabla 20: Capacidad de Fitolacósido B de inhibir 1,3β-D-glucan-sintasa expresada en % inhibición y valores de IC₅₀

Compuesto	% I*	IC ₅₀
Fitolacósido B	5,0 ± 0,54	> 500 μg/ml
Papulacandina B	98,0 ± 2,0	0,5 μg/ml

% I: Porcentaje de inhibición a 20 μg/ensayo (volumen final 40 μl, 500 μg/ml). * El resultado es un promedio de dos replicados ± el desvío estándar

IC₅₀: Concentración que inhibe el 50 % de la actividad de la enzima

III.6.1.2.3.3- Ensayo de inhibición de quitin-sintasa

Para la realización del ensayo se utiliza un extracto semipurificado de membranas de *S. cerevisiae* el cual puesto en contacto con UDP-[¹⁴C]-N-acetilglucosamina soluble, forma [¹⁴C]-quitina insoluble, que es cuantificada con un contador de centelleo. El esquema que sigue muestra las reacciones que se realizan en paralelo para detectar inhibidores de quitin-sintasa [(a) en ausencia del inhibidor; (b) en presencia del inhibidor]:

Reacción		Quitina formada
(a) 2n UDP-[¹⁴ C]-N-acetilglucosamina	Extracto con quitin-sintasa →	100%
(b) 2n UDP-[¹⁴ C]-N-acetilglucosamina	Extracto con quitin-sintasa + Inhibidor →	* ↓

* La flecha indica que en presencia de inhibidores habrá una disminución de la quitina formada con respecto al control

La UDP-[¹⁴C]-N-acetilglucosamina (soluble) se separa de [¹⁴C]-quitina (insoluble) de la misma forma que en el ensayo de (1,3)β-D-glucan sintasa.

Se cuantifica la quitina insoluble para ambos casos (a) y (b), con un contador de centelleo.

- Resultados del ensayo de inhibición de quitin-sintasa con Fitolacósido B

Los resultados obtenidos mostraron que Fitolacósido B no era un inhibidor de quitin-sintasa sino que por el contrario, la activaba, produciendo 85 % de aumento de la actividad a 20 µg/ensayo (400 µg/ml).

Para corroborar que se producía un aumento de quitina en las paredes fúngicas por acción de Fitolacósido B, se realizaron tres nuevos ensayos:

- i. Tinción con calcofluor
- ii. Valoración de quitina
- iii. Observación del grosor de la pared de *N. crassa* por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

III.6.1.2.4- Tinción con Calcofluor

Calcofluor es un colorante fluorescente que se une selectivamente a las microfibrillas de quitina permitiendo su visualización con técnicas microscópicas adecuadas. En levaduras, la observación se hace principalmente en los brotes de las células, ya que el anillo que separa a la célula madre de la célula hija contiene mayor cantidad de quitina. En hongos filamentosos, la observación se realiza principalmente en los septos y ápices de las hifas.

Realizamos la tinción de las células fúngicas tratadas con Fitolacósido B con este fluorocromo, con el fin de detectar un aumento de quitina con respecto al control.

-Resultados de la tinción con Calcofluor en células tratadas con Fitolacósido B

Células de *S. cerevisiae* y de *N. crassa* tratadas con concentraciones sub-inhedoras de Fitolacósido B fueron teñidas con 1 µg de Calcofluor de acuerdo con la metodología descrita por Arellano y col. (1996) y Pringle J.R. (1991). Luego de cinco minutos de exposición, las células se lavaron y se observaron en microscopio de contraste diferencial y de fluorescencia. Los resultados obtenidos se presentan en las figuras 59 y 60.

Figura 59: Fotografías obtenidas en el ensayo de tinción con Calcofluor de células de *S. cerevisiae* sin tratamiento (a) y tratadas con 50 $\mu\text{g/ml}$ de Fitolacósido B (b).

[Observaciones realizadas con Microscopio de contraste diferencial (izq.) y de fluorescencia (der.), 400 x].

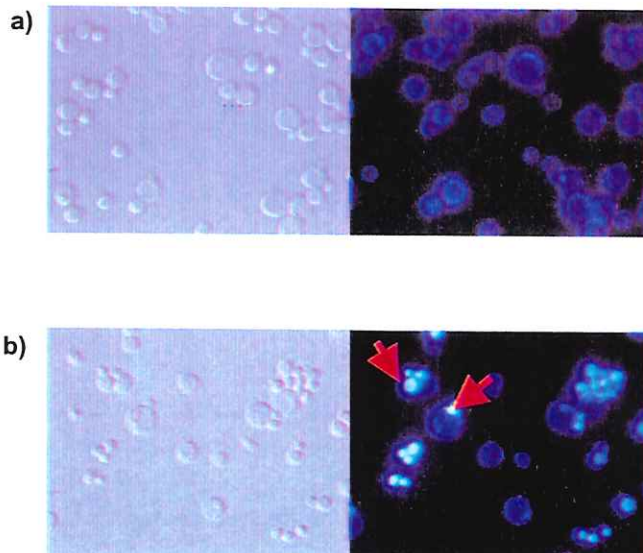
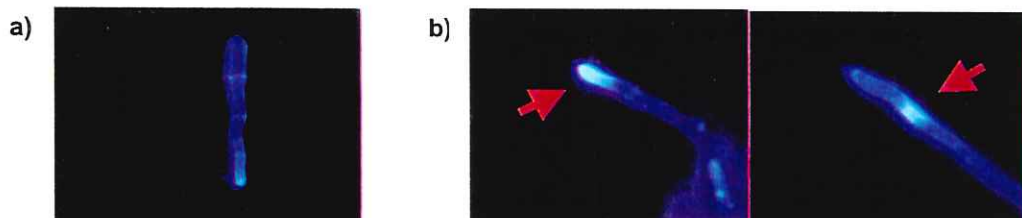


Figura 60: Fotografías obtenidas en el ensayo de tinción con Calcofluor de hifas de *N. crassa* sin tratamiento (control) (a) y tratadas con 62,5 $\mu\text{g/ml}$ de Fitolacósido B (b).

[Observaciones realizadas con Microscopio de fluorescencia, 400x].



Los resultados de las células tratadas respecto de las control mostraron un aumento marcado de fluorescencia especialmente en los anillos de separación de las células con brotes, de *S. cerevisiae* (flechas rojas en fig. 59-b), mientras que en *N. crassa* la fluorescencia fue más marcada en los septos y ápices de las hifas (flechas rojas en fig. 60-b), evidenciando en ambos casos un aumento de quitina.

III.6.1.2.5- Valoración de quitina

El ensayo se fundamenta en la extracción de quitina a partir de células de *S. cerevisiae* y su posterior hidrólisis a unidades de N-Acetilglucosamina (N-AcGA), las cuales se hacen reaccionar con el Reactivo de Reissig (3,5-N,N-diaminobenzaldehído, ácido clorhídrico y ácido acético glacial), produciendo un color rosa-liláceo que se mide a 585 nm. Se considera representativa una diferencia en la producción de quitina $\geq 20\%$ entre las células tratadas y las control (Cabib, 1994).

- Resultados de la valoración de quitina en células tratadas con Fitolacósido B

Para la realización de este ensayo, las células de *S. cerevisiae* fueron cultivadas y tratadas siguiendo la metodología descrita en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos mostraron que 100 mg de células control y de células tratadas producían respectivamente 123,96 nmoles y 153,62 nmoles de N-AcGA, lo que representa un 29,64 % de aumento de quitina producida por las células tratadas con Fitolacósido B, respecto de las células control.

Estos resultados concordaron con los obtenidos en los dos ensayos previos que indicaban un aumento de la producción de quitina en células tratadas con Fitolacósido B.

III.6.1.2.6- Observación por MET de la pared de *N. crassa* tratadas con Fitolacósido B

La observación por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de las hifas de *N. crassa*, crecida en medio líquido en ausencia y presencia de concentraciones sub-inhedoras de Fitolacósido B, dio los siguientes resultados:

- *N. crassa* sin tratar mostró la pared celular de la hifa con un grosor de $\cong 200$ nm (fig. 61-A);
- *N. crassa* tratada con Fitolacósido B mostró la pared celular de la hifa con un grosor de $\cong 400$ nm (fig. 61-B), es decir el doble del observado en *N. crassa* sin tratar.

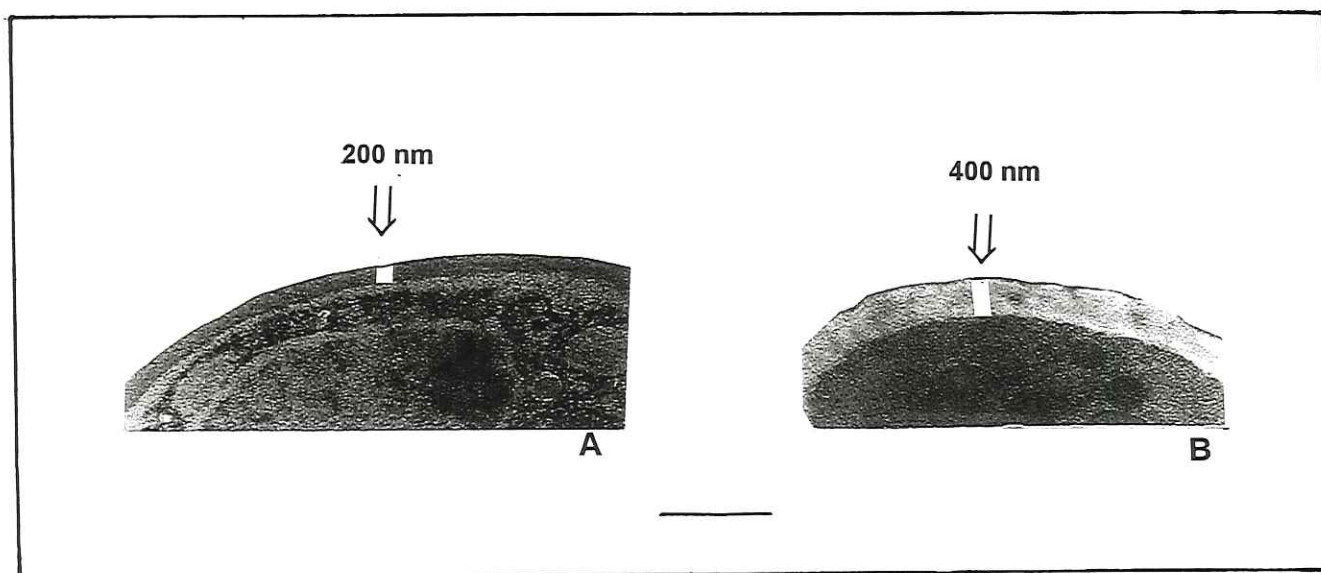


Figura 61: Fotografías obtenidas por MET (8000x) de la pared celular de *N. crassa* control (A) y tratada con Fitolacósido B (B). La escala representa 1 μ m.

Considerando que estudios previos han informado que un depósito anormal de quitina produce un debilitamiento de la pared y una inmediata interrupción del crecimiento (Roncero y col., 1985), los resultados obtenidos en los tres ensayos anteriores sugerían que la activación directa de quitin-sintasa con el consecuente

aumento de quitina podría ser el mecanismo por el cual Fitolacósido B ejercería su efecto antifúngico.

Sin embargo, dado que una alteración de las membranas fúngicas puede también desencadenar la hiperproducción de quitina y crecimiento fúngico anormal (Yoshida, 1988; Georgopapadakou y col.; 1988; Morrissey y col., 1999; Phillip y col., 2001), decidimos estudiar si el aumento de quitina producido por Fitolacósido B se debía a un efecto directo sobre quitin-sintasa o también respondía a un efecto indirecto sobre membrana, ya que quitin-sintasa es una enzima unida a la membrana fúngica y cualquier alteración de esta última podría activar a quitin-sintasa y producir un aumento de quitina (Georgopapadakou y col.; 1988).

Es sabido que algunas saponinas interactúan con componentes de la membrana fúngica alterando su composición y su función. Las interacciones más comúnmente descritas son la formación de complejos con el ergosterol ó la extracción del mismo de las membranas fúngicas. El resultado de dicha interacción puede ser la destrucción de la membrana con muerte celular ó un cambio en la estructura de la misma que llevaría a una modificación de la permeabilidad y otros efectos biológicos específicos. Sin embargo, esta interacción con el ergosterol no la muestran todas las saponinas ya que dependerá fuertemente de su estructura molecular y de su concentración (Yoshida, 1988; Georgopapadakouy col.; 1988; Morrissey y col., 1999; Phillip y col., 2001).

Para determinar si un compuesto actúa como antifúngico uniéndose al ergosterol, utilizamos el Ensayo del Efecto del Ergosterol que se explica a continuación.

III.6.1.3- Ensayos que tienen como blanco la membrano celular fúngica

III.6.1.3.1- Ensayo del efecto del Ergosterol

El ensayo consiste en determinar la CIM de un compuesto frente a levaduras con y sin agregado de ergosterol exógeno por el método de dilución en caldo. En el caso de que el compuesto tenga como mecanismo de acción la unión al ergosterol, la CIM del compuesto será mucho más alta en presencia de ergosterol que en su ausencia (Lee y col., 1999).

- Resultado del efecto de Ergosterol con Fitolacósido B.

En este ensayo, se determinó la CIM del Fitolacósido B frente a *S. cerevisiae* en ausencia y en presencia de cantidades crecientes de ergosterol exógeno (50-200 $\mu\text{g/ml}$). Como control positivo se usó Anfotericina B, ya que como dijimos previamente es un antifúngico que actúa a través de la unión al ergosterol.

Nuestros resultados mostraron que la CIM de Anfotericina B frente a *S. cerevisiae* aumentó con el agregado de ergosterol llegando a ser 4 veces mayor en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol que en su ausencia (1,5 $\mu\text{g/ml}$ $\rightarrow$ 6 $\mu\text{g/ml}$) (fig. 62 y 63). En contraste, la CIM de Fitolacósido B frente a *S. cerevisiae* (100 $\mu\text{g/ml}$) no fue alterada por la presencia de ergosterol (hasta 200 $\mu\text{g/ml}$).

Figura 62: Efecto de 50-200 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol sobre las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de Fitolacósido B y Anfotericina B frente a *S. cerevisiae* (ATCC 9279).

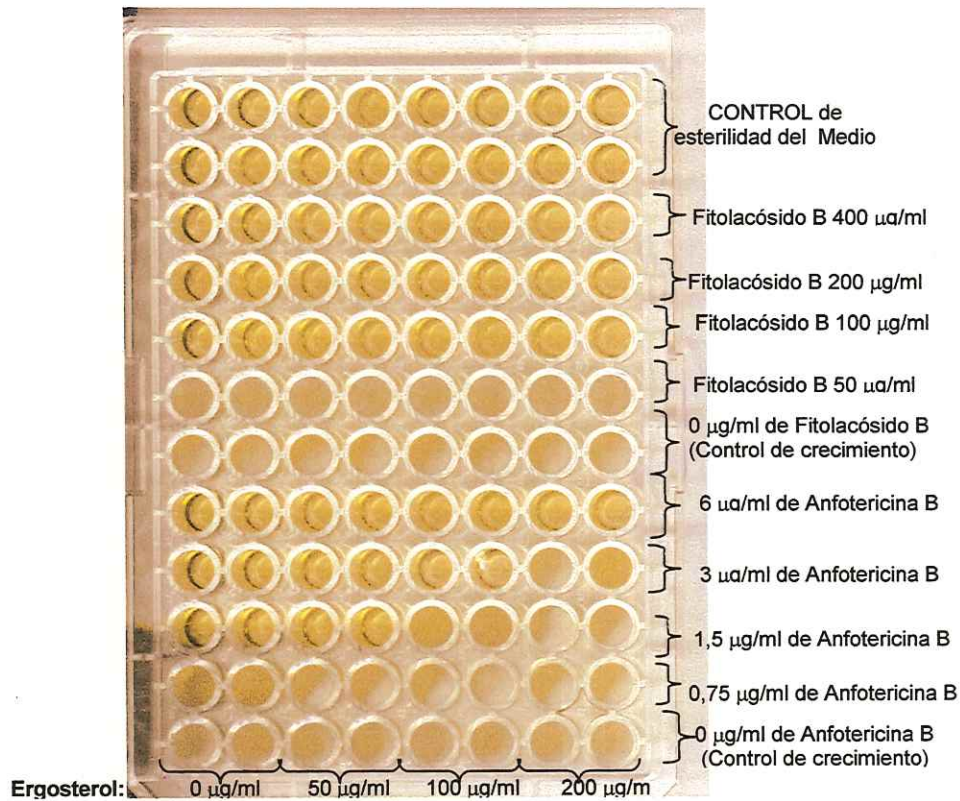
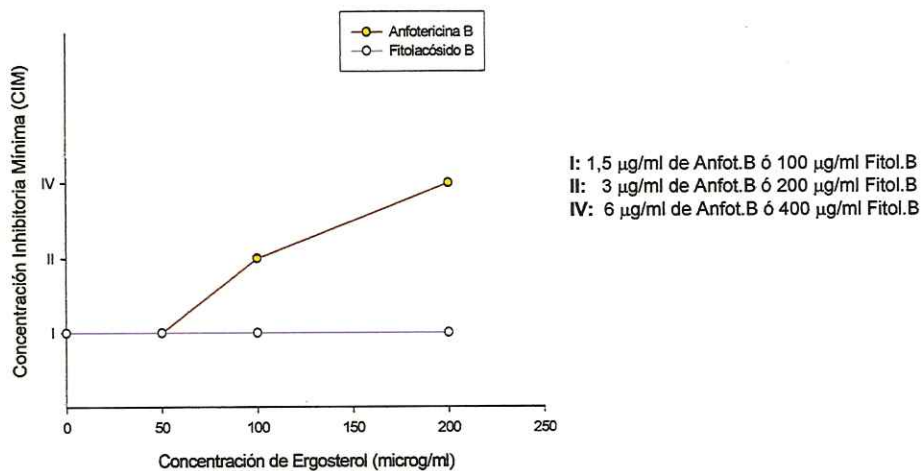


Figura 63: CIM de Fitolacósido B y de Anfotericina B frente a *S. cerevisiae* en presencia de 50-200 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol.



Para corroborar los resultados obtenidos, realizamos un nuevo ensayo:

III.6.1.3.2- Ensayo de unión al ergosterol medido por espectroscopia UV

Este ensayo se basa en estudios previos que mostraron que el agregado de esteroides a soluciones acuosas ó alcohólicas de compuestos que tiene la capacidad de unirse a los esteroides (Anfotericina B, Nistatina, Filipina), produce una alteración grande en el espectro de absorción ultravioleta de los mismos (Norman y col., 1972a; 1972b; Gruda y col., 1980).

-Resultados del ensayo de unión de Fitolacósido B y ergosterol medido por espectroscopia UV

Realizamos los espectros de UV de ergosterol y Fitolacósido B puros y de mezclas de ellos, con el propósito de observar si a concentraciones a las cuales Fitolacósido B inhibía el crecimiento fúngico, se producían picos diferentes de los de cada uno de los componentes de la mezcla (Norman y col., 1972a; 1972b).

Se determinó en primer lugar el rango de concentraciones en que ergosterol y Fitolacósido B cumplían la Ley de Lambert & Beer determinando que ergosterol mostraba linealidad entre las concentraciones 21,26 y 63 μM (fig. 64-a y b) y Fitolacósido B entre las concentraciones 37,5 y 301 μM (fig. 65-a y b).

Figura 64: Espectros UV de ergosterol a diferentes concentraciones (21,26-63 μM) en EtOH de 50° (a) y su respectiva curva de calibración a $\lambda_{\text{max}} = 281 \text{ nm}$ (b).

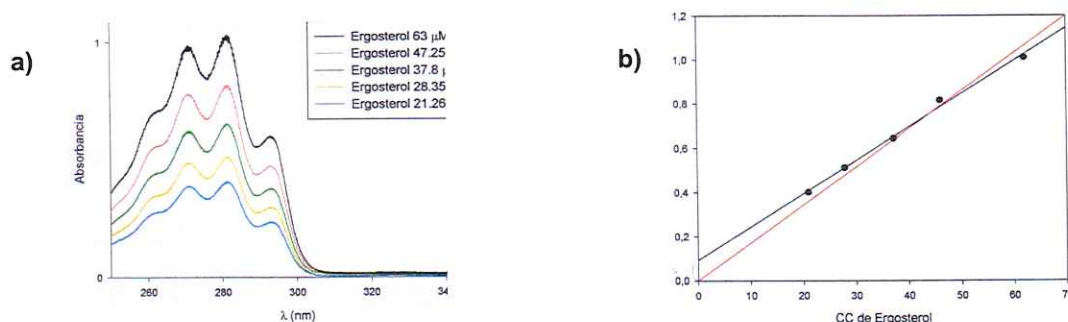
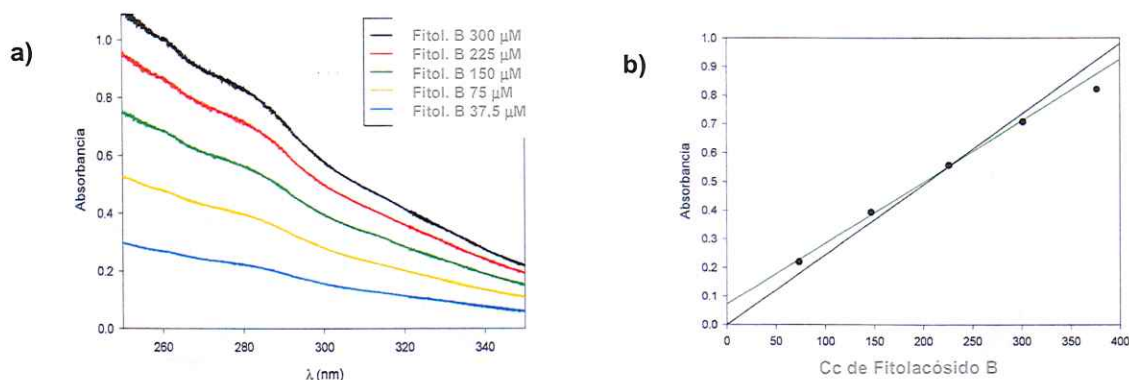
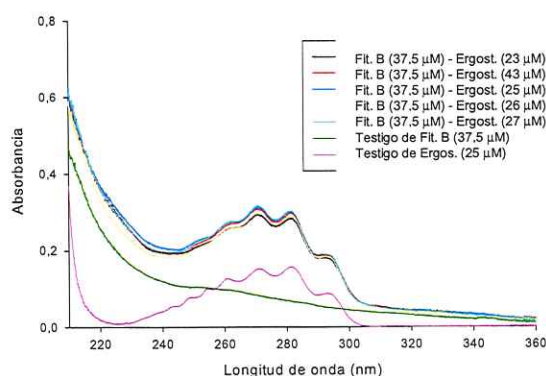


Figura 65: Espectros UV de Fitolacósido B a diferentes concentraciones (37,5-301,2 μM) en EtOH 50° (a) y su respectiva curva de calibración a $\lambda_{\text{max}} = 281 \text{ nm}$ (b).



Se probaron mezclas de soluciones hidroalcohólicas de ergosterol comercial y de Fitolacósido B, a distintas concentraciones finales de ergosterol: 23-27 μM (11,5-13,5 $\mu\text{g/ml}$) y a una concentración fija de Fitolacósido B: 37,5 μM (25 $\mu\text{g/ml}$). Con las soluciones de los testigos y las mezclas obtuvimos los espectros UV que se muestran en la figura 66.

Figura 66: Espectros UV de las soluciones hidroalcohólicas de ergosterol puro, Fitolacósido B puro y de las mezclas Ergosterol-Fitolacósido B.



El espectro UV de ergosterol presentó dos picos de absorción característicos: $\lambda_{\max}$ 270 y 281 nm, mientras que el de Fitolacósido B no presentó ningún pico característico entre 220 y 360 nm.

Las mezclas mostraron los mismos picos de absorción que el testigo de ergosterol sugiriendo que en las condiciones de este ensayo no había interacción entre Fitolacósido B y ergosterol, resultado que concordaba con el ensayo de unión al ergosterol (páginas 130-131).

Finalmente, realizamos un ensayo para estudiar la pérdida de elementos intracelulares de los hongos producida por Fitolacósido B, lo que nos daría idea de si Fitolacósido B, a pesar de no unirse al ergosterol tenía capacidad de alterar la membrana fúngica.

III.6.1.3.3- Ensayo de pérdida de componentes intracelulares

Este ensayo, conocido por su nombre en inglés *Cellular Leakage Effect* (Lunde y col., 2000), se fundamenta en medir a 260 nm los componentes intracelulares liberados al medio por levaduras, cuando son tratadas con compuestos antifúngicos. Los componentes intracelulares que absorben a 260 nm son principalmente ácidos nucleicos (adenina, timina, guanina citosina y uracilo) (fig. 67-a, tabla 21) y aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina, fenilalanina) (fig. 67-b, tabla 22).

Figura 67-a: Bandas de absorción características de los ácidos nucleicos.

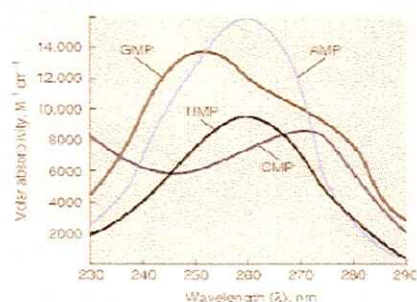


Tabla 21: $\lambda_{\max}$ y coeficientes de absortividad molar (ϵ) de los ácidos nucleicos.

	Adenina	Guanina	Citosina	Uracilo
$\lambda_{\max}$	260,5	275,5	267,0	259,5
$\epsilon \times 10^3$ ($M^{-1} cm^{-1}$)	13,4	8,1	6,1	8,2

Figura 67-b: Bandas de absorción características de algunos aminoácidos aromáticos.

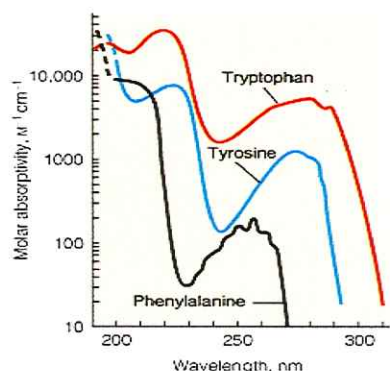


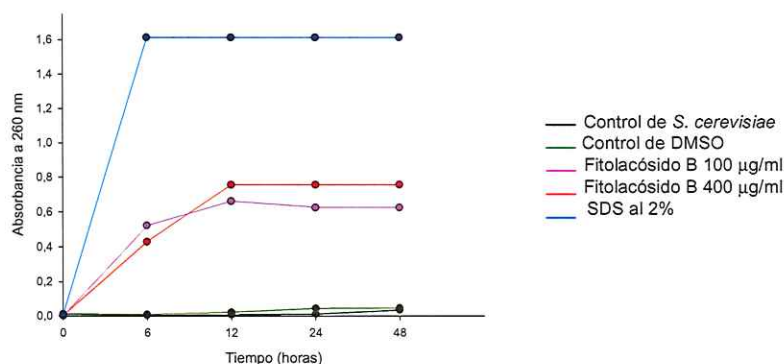
Tabla 22: $\lambda_{\max}$ y coeficientes de absorptividad molar (ϵ) de algunos aminoácidos.

	Triptófano	Tirosina	Fenilalanina
$\lambda_{\max}$	210 y 280	274	257
$\epsilon \times 10^3$ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	47,0 y 5,6	1,4	0,2

- Resultados del ensayo de pérdida de componentes intracelulares con Fitolacósido B

Para realizar el ensayo, se trataron células de *S. cerevisiae* con dos concentraciones diferentes (CFM y 4xCFM), de Fitolacósido B utilizándose como control positivo el detergente dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 0,2% que produce la pérdida del 100% de componentes intracelulares (fig. 68). Se usó DMSO como control negativo. La figura 68 muestra la pérdida de componentes intracelulares de *S. cerevisiae* producida por Fitolacósido B durante un período de 48 horas.

Figura 68: Pérdida de componentes intracelulares de *S. cerevisiae* producida por Fitolacósido B a sus respectivas CFM y 4xCFM. SDS al 2% y DMSO fueron usados como control positivo y negativo respectivamente.



Los resultados mostraron que Fitolacósido B producía una pérdida de los componentes intracelulares de *S. cerevisiae* de 37,5% a 100 µg/ml (CIM) y del 50% a 400 µg/ml (4xCIM) a las 48 h.

Si bien los ensayos del efecto del ergosterol y medidas de espectroscopía UV indicaban que Fitolacósido B no se unía al ergosterol, los resultados obtenidos en el ensayo de Pérdida de Componentes Intracelulares indicaban que había una alteración de la membrana fúngica por efecto de Fitolacósido B. Este efecto podría explicarse considerando que Fitolacósido B, por su carácter anfifílico, podría penetrar dentro de la membrana e interaccionar con otros componentes diferentes de ergosterol (fosfolípidos por ejemplo), produciendo alteraciones en la misma que se podrían traducir en una modificación de la permeabilidad y en la pérdida parcial de sus componentes intracelulares. Este cambio en la composición de la membrana podría generar la activación de quitin-sintasa con el consiguiente aumento de quitina.

De todos los resultados obtenidos podemos sugerir que Fitolacósido B podría actuar como antifúngico a través de los siguientes mecanismos de acción:

- 1) activación directa de la enzima quitin-sintasa y aumento de quitina en pared, lo cual interrumpiría el crecimiento fúngico con la posterior muerte celular;
- 2) alteración de la membrana fúngica que conduciría a la pérdida parcial de elementos intracelulares vitales y que podría activar también a la enzima quitin-

sintasa unida a la membrana, con el consiguiente aumento de quitina que, como dijimos arriba, interrumpiría el crecimiento del hongo con la posterior muerte celular.

III.7- Estudios de Toxicidad de Fitolacósido B

III.7.1- Estudios de Toxicidad de Fitolacósido B en células humanas

La toxicidad del Fitolacósido B en células humanas fue probada utilizando los siguientes ensayos:

- 1) Capacidad de hemólisis de Glóbulos Rojos Humanos (GRH).
- 2) Citotoxicidad frente a distintas líneas tumorales humanas.

III.7.1.1- Determinación de la actividad hemolítica

Muchas saponinas han mostrado tener capacidad de lisar glóbulos rojos, aunque esta actividad varía mucho dependiendo del tipo de aglicona y de la cantidad de azúcares que poseen (Sparg y col., 2004).

Por sus propiedades hemolíticas, una saponina puede ser tóxica para el humano cuando es administrada por vía parenteral. Es por éso que conocer la concentración de la misma necesaria para producir la hemólisis total de eritrocitos, es un buen indicador de su toxicidad para humanos y constituye un ensayo indispensable para evaluarla.

Una saponina biológicamente activa que no muestre propiedades hemolíticas a la concentración en la que ejerce su actividad biológica, sugiere con alta probabilidad que no será tóxica para el humano a las dosis terapéuticas.

Es de hacer notar que las saponinas son inocuas por vía oral. Muchos de los alimentos que se ingieren a diario, contienen gran cantidad de saponinas (Dewick, 2002).

III.7.1.1.1- Actividad hemolítica de Fitolacósido B

La capacidad hemolítica de Fitolacósido B sobre las membranas de GRH se estudió a concentraciones entre 25-125 $\mu\text{g/ml}$ (rango de CIM frente al panel de

hongos utilizados en este trabajo), a 30, 60 y 120 minutos. Concentraciones crecientes de Fitolacósido B se pusieron en contacto con cantidades fijas de GRH de acuerdo con Materiales y Métodos. Se determinó la Concentración Lítica 100 (CL₁₀₀), es decir la menor concentración de compuesto que produjo la lisis completa de los eritrocitos.

Como control positivo se utilizó Anfotericina B a concentraciones entre 0,3-50 µg/ml (Lee y col., 1998).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 23.

Tabla 23: Propiedades hemolíticas de Fitolacósido B y de Anfotericina B expresadas como concentración lítica 100 (CL₁₀₀) en µg/ml.

Tiempo de incubación (min.)	CL ₁₀₀ (µg/ml) <i>Fitolacósido B</i>	CL ₁₀₀ (µg/ml) <i>Anfotericina B</i>
30	>125	50
60	>125	25
120	>125	12,5

Los resultados mostraron que Fitolacósido B no presentó actividad hemolítica a concentraciones menores ó iguales a 125 µg/ml, concentraciones a las cuales sí mostró actividad antifúngica. Anfotericina B mostró actividad hemolítica a concentraciones 12,5-50 µg/ml, las cuales estaban dentro de sus valores de CIM frente a dos de los hongos probados *T. rubrum* (CIM 25 µg/ml) y *M. canis* (50 µg/ml).

III.7.1.2- Actividad citotóxica

El estudio de citotoxicidad fue realizado de acuerdo con la metodología utilizada por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (National Cancer

Institute, NCI-USA) (Skehan y col., 1990; Boyd, 1995; Monks y col., 1991), utilizando siete líneas tumorales humanas: UACC.62 (melanoma), MCF.7 (mama), NCI.460 (pulmón), OVCAR (ovario), PC0.3 (próstata), C786.0 (riñón) y NCI.ADR* (línea celular de mama que expresa un fenotipo de resistencia a múltiples drogas).

En el ensayo, las células tratadas con distintas concentraciones del compuesto en estudio y las células control, son teñidas con sulforrodamina B (SRB), colorante que ha demostrado la mejor combinación entre intensidad de color y número de células, midiéndose sus valores de absorbancia a 560 nm (Skehan y col., 1990). El % relativo de crecimiento celular se determina utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ crecimiento celular} = \frac{(\text{Abs. Cél. Tratadas 48hs} - \text{Abs. Cél. Ttadas 0h})}{(\text{Abs. Cél. Control 48hs} - \text{Abs. Cél. Control 0h})} \times 100$$

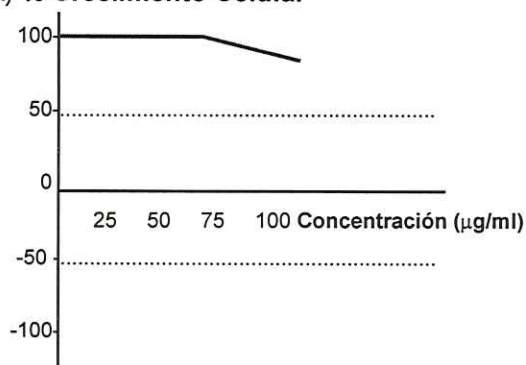
Con los resultados obtenidos se construyen gráficos que relacionan % de crecimiento celular con las concentraciones de la sustancia probada. Los porcentajes de crecimiento que figuran debajo de la línea cero significan muerte celular (actividad citocida); los que figuran por encima de dicha línea corresponden a la inhibición del crecimiento (actividad citostática).

Algunos ejemplos de los gráficos resultantes se muestran en la figura 69. Esta figura ilustra tres situaciones: en (A) el compuesto probado no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento o viabilidad de la línea celular; en (B) el compuesto probado sólo tuvo actividad citostática con 0-5 % de crecimiento celular; en (C) el compuesto probado tuvo actividad citotóxica con [-60] % de crecimiento celular (= 60 % de muerte celular).

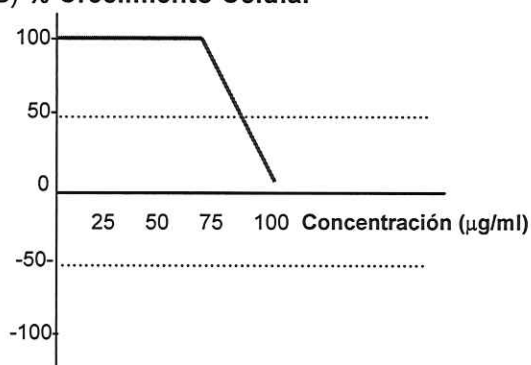
Para determinar la citotoxicidad se preparan diluciones del compuesto desde 0,25 a 100 $\mu\text{g/ml}$. Se considera citotóxico un compuesto que a 100 $\mu\text{g/ml}$ produce más del 50 % de muerte celular en al menos tres líneas de células humanas. Este ensayo permite también determinar la concentración a la cual el compuesto produce el 50 % de muerte celular [-50%] (IC_{50}).

Figura 69: Curvas de % de crecimiento celular–concentración obtenidas de un ensayo hipotético de actividad citotóxica hasta 100 $\mu\text{g/ml}$. (A) El compuesto prueba no muestra ningún efecto sobre el crecimiento o viabilidad de la línea celular; (B) el compuesto prueba sólo muestra actividad citostática (0-5 % de crecimiento celular); (C) el compuesto prueba muestra el 50 % actividad citotóxica [-50 %] (IC_{50}) a 100 $\mu\text{g/ml}$.

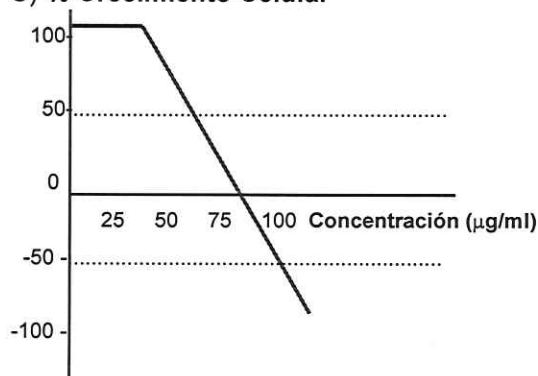
A) % Crecimiento Celular



B) % Crecimiento Celular



C) % Crecimiento Celular



III.7.1.2.1- Determinación de la actividad citotóxica de Fitolacósido B

III.8- Estudios Morfo-anatómico e Histoquímico de ***Phytolacca tetramera***

III.8- Estudio morfo-anatómico e histoquímico de *Phytolacca tetramera* Haumann

La OMS recomienda que para toda especie vegetal con propiedades medicinales, los estudios de actividad deben estar acompañados por una descripción macroscópica y micrográfica de la planta (WHO, 1998), con el propósito de que la misma esté perfectamente identificada y asegurado su grado de pureza para su utilización posterior. También se piden reacciones histoquímicas para la localización de sus principios activos.

Esto cobra un interés particular en el caso de plantas endémicas y debe realizarse con urgencia para las especies en riesgo de extinción como es el caso de *P. tetramera*.

III.8.1- Estudio morfo-anatómico

Este estudio se realizó teniendo como base la última revisión de las Phytolaccaceae de Argentina (Guaglianone, 1999) y el estudio anatómico del vástago aéreo de las especies de *Phytolacca* argentinas (Gattuso, 1996).

III.8.1.1- Morfología externa

Es un subarbusto dioico, rizomatoso, con un complicado y difuso sistema subterráneo (geófilo) del que emergen numerosos vástagos densamente foliados de 0,40 a 1,00 m de altura.

- Rizomas

Sus rizomas (sin raíces) miden 0,25 a 1,50 m de largo por 1 a 2,5 cm de diámetro (fig. 71), horizontales y algunos verticales provistos de catáfilos y yemas.

Figura 71: Rizoma sin raíces de *P. tetramera*



- Raíz

La raíz principal, de más de 75 cm de longitud por 12 cm de diámetro, y otras raíces de menor desarrollo, se originan a partir de un grueso xilopodio (fig. 72), el cual posee lenticelas.

Figura 72: Xilopodio de *P. tetramera* mostrando los entrenudos y las delgadas raíces



- Partes aéreas

Posee vástagos aéreos de 1,5 a 2 cm de diámetro en la base, con ramas laterales más o menos desarrolladas en casi todos los nudos. Las hojas son largamente lanceoladas, espatuladas, las más jóvenes subespatuladas, de ápice obtuso con pequeño diente o mucrón, coriáceas subcarnosas, verde claro de 10 a 20 cm de longitud y de 1,5 a 5 cm de ancho (fig. 73). Son levemente emarginadas, atenuadas hacia la base y se prolongan en el pecíolo. Se presentan con un pecíolo craso de 1 a 3 cm de longitud; nervio medio y laterales blanquecinos y bien marcados. Yemas múltiples, por lo menos 2 seriales

Figura 73: Hoja de *P. tetramera*



- Inflorescencia

Racimos simples, el superior terminal y los demás axilares o terminales sobre ramas laterales. Los racimos llevan 3 ó 4 catáfilos en la base.

- Flores

Flores con raquis anguloso, casi sésiles, con un perigonio de 4 tépalos (tetramera) fuertemente cóncavos, margen hialino; de ellos el más angosto ocupa una porción inferior y exterior respecto de los restantes. Las flores masculinas tienen

12-15 estambres exertos, irregularmente dispuestos en dos ciclos, de los cuales el interno madura primero. Pistiloide de 2 a 3 carpelos desiguales sobre un grueso disco basal. Las flores femeninas tienen un gineceo formado por 6 a 9 carpelos, más o menos unidos cerca de la base, con 8-12 estigmas, ligeramente papiloso. Se observa la presencia de disco nectarífero.

- Fruto

El fruto es una baya carnosa múltiple, ligeramente compresada y deprimida, de 10 mm de longitud y 8,5 mm de lat., verdoso-amarillenta (fig. 74-A) y marrón al desecar (fig. 74-B). Presentan 6-9 costillas.

Figura 74: Frutos de *P. tetramera* (bayas) antes del proceso de secado (a), y luego de secar (b)



A



B

- Semillas

Una semilla por carpelo, de 3 a 3,2 mm de longitud y 3 mm de lat., comprimida, lisa, brillante y negra; cubierta por una capa membranacea, verde clara, con nervios marcados.

III.8.1.1.1- Estudio morfológico comparativo de *P. tetramera* con otras especies argentinas del género *Phytolacca*.

En el cuadro I pueden observarse las características morfológicas de *P. tetramera* en comparación con el resto de las *Phytolacca* spp. de Argentina.

El cuadro I mostró los siguientes elementos sustanciales para identificar y diferenciar de otras especies argentinas de *Phytolacca* a *P. tetramera*:

- es un *subarbusto* al igual que *P. bogotensis*, *P. rivinoides* y *P. americana*, a diferencia de *P. dioica* que es un árbol;
- es dioico como *P. dioica*, a diferencia del resto de las especies argentinas de *Phytolacca* que son hermafroditas;
- es la única especie que presenta un xilopodio con raíces y un rizoma, a diferencia de las demás que no los tienen;
- su flor presenta 4 tépalos, mientras que las especies restantes tienen 5 o 6.

Cuadro I: Estudio morfológico comparativo de especies argentinas de *Phytolacca*: *P. tetramera*, *P. dioica*, *P. rivinoides*, *P. bogotensis* y *P. americana*

Caracteres morfológicos	<i>Phytolacca tetramera</i>	<i>Phytolacca dioica</i>	<i>Phytolacca rivinoides</i>	<i>Phytolacca bogotensis</i>	<i>Phytolacca americana</i>
Porte	Subarbusto dioico, de 0,40-1,00 m de alto.	Árbol dioico, de 25 m de alto.	Subarbusto hermafrodita de 2,5 m de alto.	Subarbusto hermafrodita de 0,5-1 m de alto.	Subarbusto hermafrodita de 3 m de alto.
Raíces	Raíces fusiformes que emergen de un xilopodio	- Raíces tabulares. - No presenta xilopodio.	- Raíces fusiformes - No presenta xilopodio.	- Raíces fusiformes - No presenta xilopodio.	- Raíces fusiformes - No presenta xilopodio.
Partes aéreas	Tallos - Tallos aéreos, herbáceos, densamente foliosos, color verde. - Rizomas desarrollados.	- Tronco marrón de hasta 30 m de diámetro y tallos basales coalescentes. - No presenta rizomas.	- Tallo semidecumbente, fistuloso, color verde o rojizo. - No presenta rizomas.	- Tallos erguidos, color rojizo. - No presenta rizomas.	- Tallos erguidos, color rojizo. - No presenta rizomas.
	Hojas - Hojas subcarnosas - Limbo espatulado, lanceolado, ápice mucronado. - Subpeciolada.	- Hojas coriáceas. - Limbo ovado, ápice acuminado. - Pecíolo de 7 cm de long.	- Hojas membranáceas. - Limbo, ovado lanceolado, ápice acuminado. - Pecíolo de 1-6 cm de long.	- Hojas algo succulentas. - Limbo lanceolado a elíptico, ápice acuminado. - Pecíolo de 3,5 cm de long.	- Hojas algo succulentas. - Limbo lanceolado a elíptico, ápice acuminado. - Pecíolo de 3,5 cm de long.
Inflorescencias	- Racimos axilares estaminados de 4-5 cm de long. - Racimos axilares pistilados de 10 cm de long.	- Racimos axilares o terminales estaminados de 10 cm de long. - Racimos axilares o terminales pistilados de 10 cm de long.	Racimos axilares o terminales, de flores perfectas, de 10-45 cm de long.	Espigas axilares o terminales de flores perfectas, de 20 cm de long.	Racimos axilares de flores perfectas, de más de 30 cm de long.
	Flores - Flores estaminadas. Tépalos 4. Estambres 12-15. Ovario ausente o de 2-3 carpelos abortivos. - Flores pistiladas. Tépalos 4. Carpelos 6-9, más o menos unidos. Estilos conniventes.	- Flores estaminadas. Tépalos 5. Estambres 20-25 en dos ciclos. Ovario ausente o de 2-4 carpelos abortivos. - Flores pistiladas. Tépalos 5. Estambres 10 rudimentarios. Carpelos 8-12, incompletamente unidos. Estilos no conniventes.	Flores perfectas. Tépalos 5. Estambres 7-10 en un solo ciclo. Ovario de 7-10 carpelos totalmente soldados. Estilos delgados.	Flores perfectas. Tépalos 5. Estambres 10 en un solo ciclo. Ovario de 10 carpelos soldados a veces con los ápices libres. Estilos conniventes.	
Fruto	Baya múltiple deprimida, 8,5 mm de diámetro, presenta 6-9 costillas. Verdoso amarillenta.	Baya múltiple deprimida, 6-8 mm de diámetro, presenta 8-12 costillas. Verdoso amarillenta.	Baya múltiple, 5-6 mm de diámetro, presenta 7-10 costillas. Morada casi negra.	Baya múltiple, 6-8 mm de diámetro, presenta 10 costillas. Purpúrea.	
Semilla	Semillas 6-9. Una por carpelo, lenticular. Negra brillante con el endocarpio adherido.	Semillas 8-12. Una por carpelo, sublenticular. Negra brillante con el endocarpio adherido.	Semillas 9-18. Una por carpelo, lenticular. Negra brillante.	Semillas 7-10. Una por carpelo. Negra brillante.	Semillas 10. Una por carpelo. Negra brillante.

III.8.1.2- Anatomía de los distintos órganos de *P. tetramera*

- Estructura foliar

La arquitectura foliar es cerrada, pinada, camptódroma, broquidódroma. Muestra una venación última marginal incompleta con vénulas ramificadas dos y tres veces. Las vénulas están constituidas por traqueidas prosenquimáticas en número de 3 a 5 dispuestas paralelamente, dando un aspecto dilatado a las terminaciones vasculares.

La epidermis de la lámina en vista superficial muestra células isodiamétricas poligonales, algo papilosas, de contorno recto, los estomas son anomocíticos grandes con 5 a 6 células de contacto. La epidermis abaxial presenta iguales características que la adaxial pero constituida por células más chicas y mayor número de estomas. La hoja resulta anfiestomática.

La lámina en corte transversal (fig. 75-A) muestra la epidermis uniestratificada con células aplanadas tangencialmente y los estomas están a nivel en ambas epidermis. El mesófilo es generalmente de estructura dorsiventral, a veces isolateral. Junto a la epidermis adaxial encontramos de 2 a 3 hileras de células de parénquima en empalizada. Ocasionalmente junto a la epidermis abaxial se observa una hilera de células de parénquima en empalizada, el parénquima esponjoso se halla poco desarrollado (fig. 75-B). El nervio medio está constituido por un haz colateral abierto, grande, de posición central y dos haces pequeños de posición lateral. A la altura del nervio medio y en posición subepidérmica encontramos de 3 a 4 capas de colénquima angular. El pecíolo en corte transversal es de contorno plano convexo.

La epidermis es uniestratificada con estomas. El colénquima angular ocupa todo el contorno. El nervio medio está constituido por 3 haces colaterales abiertos, acompañado por 2 haces menores a cada lado (fig. 75-A).

- Estructura caular

-Estructura primaria de tallo

El tallo en corte transversal en la zona media del primer o segundo entrenudo muestra una estructura primaria completamente desarrollada presentando una epidermis uniestratificada con células aplanadas y estomas. La corteza está constituida por seis capas de células de colénquima de tipo angular y parénquima cortical clorofiliano dispuesto en ocho capas de células. En la médula los haces colaterales abiertos se disponen en círculo (euestela). En el parénquima se observan idioblastos con ráfides de oxalato de calcio. En los vasos xilemáticos no se observan microcristales de oxalato de calcio.

-Estructura secundaria de tallo y rizoma

La base de los tallos y los rizomas presentan estructura inusual. En corte transversal (fig. 75-C) se puede observar un fino súber, cuyo felógeno es de origen subepidérmico. El colénquima es de tipo angular y se dispone en 6 a 8 estratos celulares. El parénquima cortical consta de 2 a 5 capas de células. El esclerénquima compuesto constituye un anillo discontinuo por fuera del floema. El *cambium* fascicular e interfascicular es de actividad reducida (fig. 75-D). En la periferia del floema aparece el primer *cambium* supernumerario; éste adopta la forma de arco, luego se extiende lateralmente y completa el anillo cambial, el que produce

centrípetamente elementos del xilema y en forma centrífuga da origen a elementos del floema y escaso parénquima celulósico. En la base de los tallos se diferencian dos ó tres *cambia* supernumerarios, mientras que en los rizomas se diferencian un número elevado de *cambia* supernumerarios dependiendo del diámetro del mismo. En el xilema, la porosidad es difusa. Los vasos xilemáticos se disponen en series radiales cortas y solitarias, con parénquima paratraqueal vasicéntrico. En el corte longitudinal tangencial se observa la estructura no estratificada. Los radios parenquimáticos muestran de 2 a 4 series de células (angostos) y de 12 a 20 células de alto. La médula es entera, sin haces medulares. El rizoma presenta estructura inusual muy desarrollada.

El material disociado muestra elementos vasales que carecen de apéndices, con puntuaciones areoladas dispuestas en forma alterna. La placa de perforación es simple y oblicua; también se observan algunas traqueidas, fibras libriformes fuertemente engrosadas y células del parénquima axial disyunto.

- Estructura radical

La estructura primaria tiene 4 polos de xilema, rápidamente superada por el inicio de la estructuración secundaria. El xilema y floema secundarios no forman un anillo completo sino que se hallan interpuestos por parénquima acuífero (fig. 75-E). Esta estructura secundaria limita su desarrollo constituyéndose a continuación una estructura secundaria inusual, poco desarrollada, por la aparición de *cambia* supernumerarios que se originan en el parénquima del último floema diferenciado.

Los *cambia* supernumerarios se dividen y diferencian en forma bidireccional dando xilema secundario hacia adentro y floema secundario hacia fuera (fig. 75-F).

En la zona cortical de la raíz se observa un súber pluriestratificado con 5-6 capas de células de paredes delgadas, sin engrosar.

- Fruto

La sección transversal muestra un epicarpo uniestratificado (fig. 76-A), fuertemente cutinizado; continúa una hilera de colénquima de paredes poco engrosadas. El mesocarpo consiste en células grandes de parénquima de paredes delgadas presentando espacios intercelulares. El endocarpo es uniestratificado y se confirma su adherencia a la semilla (fig. 76-B).

- Semilla

La semilla deriva de un óvulo anacampilótrofo, compreso, saco embrionario curvado y periférico con respecto al nucelo. La parte micropilar es corta, extendiéndose hacia fuera sobre el hilio, el cual ocupa un área deprimida en el extremo de la semilla. La sección de la semilla (fig. 76-C) muestra la testa con dos regiones bien delimitadas. La más externa posee células estrechas y largas de color marrón oscuro. Ésta capa de células muertas es muy dura y brillante por la presencia de silicato de calcio en la pared celular. La testa restante consiste en varias hileras de células de parénquima, comprimidas tangencialmente, de color oscuro brillante. Todo el endosperma celular que rodea al embrión tempranamente, desaparece en el proceso de desarrollo excepto en la porción terminal del hipocótilo (fig. 76-D). Esta porción que presenta 6 hileras de células sobre la parte terminal del embrión,

gradualmente disminuye a una célula en grosor. Las células del endosperma tienen paredes finas conteniendo granos de almidón. La nucela, limitada por el embrión maduro, se encuentra representada por células de parénquima que, a la madurez, constituye el perisperma de la semilla.

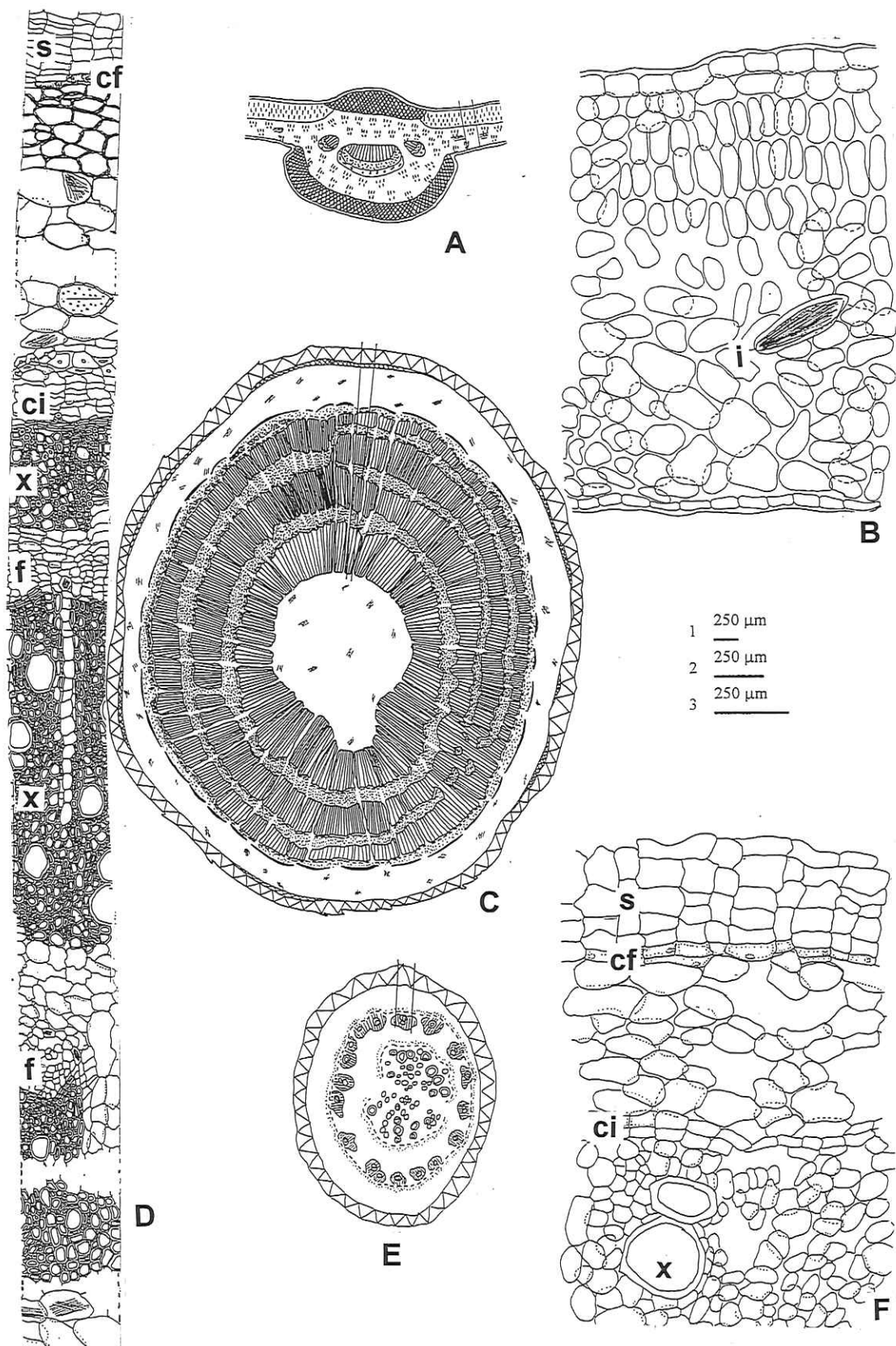


Figura 75: *Phytolacca tetramera* Hauman. Anatomía del corno. A, representación esquemática del transcorte del limbo foliar; **B**, detalle de lo indicado en **A**; **C**, representación esquemática del transcorte del tallo basal con estructura secundaria inusual; **D**, detalle de lo indicado en **C**; **E**, representación esquemática del transcorte de raíz mostrando el inicio de la estructura secundaria inusual; **F**, detalle de lo indicado en **E**. cf, cambium felogénico; ci, cambium inusual; f, floema secundario; i, idioblasto de oxalato de calcio; s, súber; x, xilema secundario. Las reglillas corresponden, 1 a **D**; 2 a **A, C, E**; 3 a **B, E**

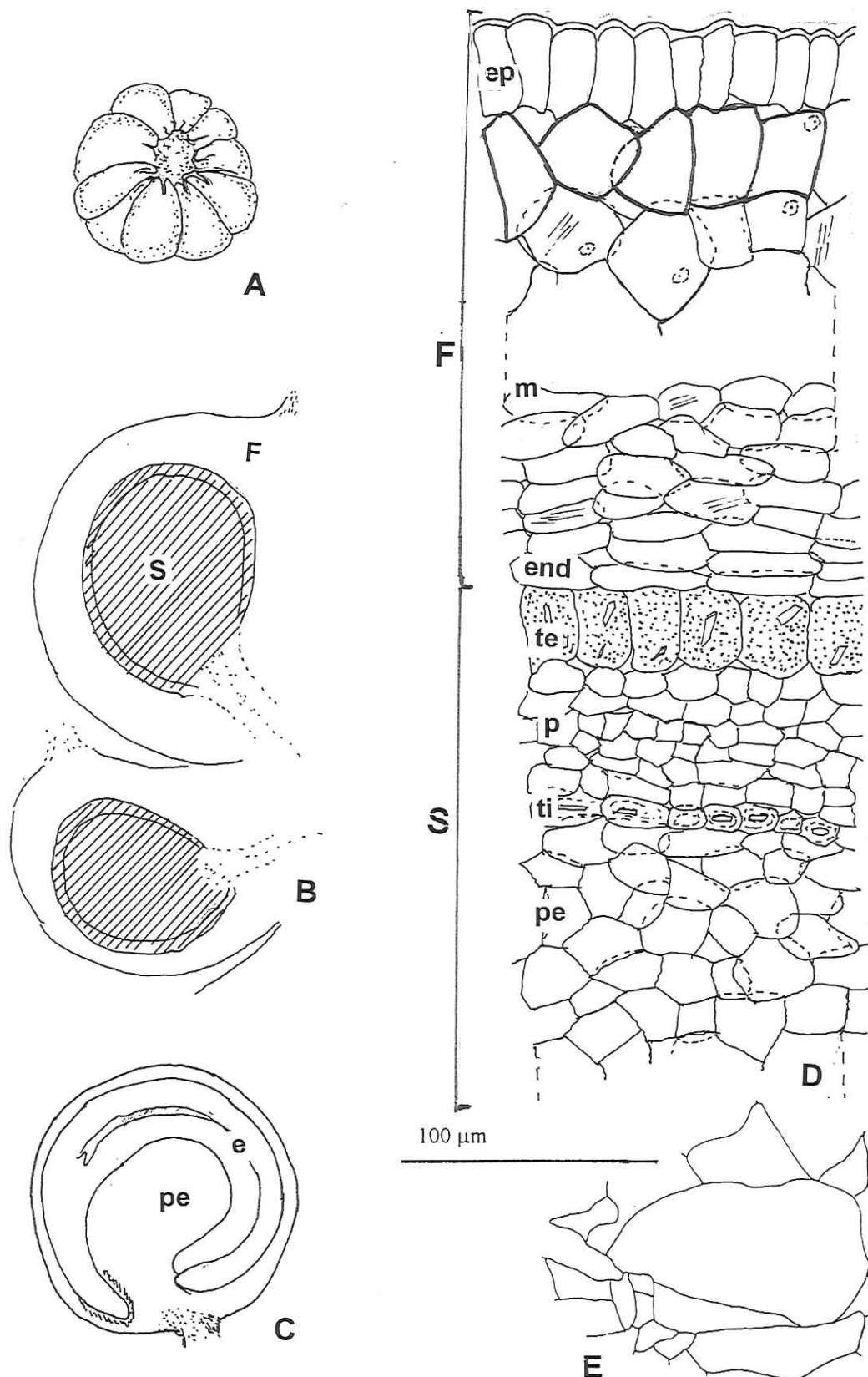


Figura 76: *Phytolacca tetramera* Hauman. Fruto y semilla. **A**, exomorfología del fruto; **B**, fruto, representación esquemática de la sección longitudinal de dos hojas carpelares, cada carpelo contiene una semilla; **C**, semilla, representación esquemática de la sección longitudinal conteniendo al embrión, **e**; **D**, fruto y semilla detalle en transcorte; **E**, endosperma; **F**, fruto: **ep**, epicarpo; **m** mesocarpio; **end**, endocarpo. **S**, semilla: **teg**, tegumento externo; **p**, parénquima; **ti**, tegumento interno; **pe**, perisperma. La reglilla corresponde a **D** y **E**.

III.8.1.2.1- Estudio anatómico comparativo de *P. tetramera* con el resto de las especies del género *Phytolacca* que crecen en Argentina

En el cuadro II pueden observarse las características anatómicas de las especies de *Phytolacca* que crecen en Argentina. El mismo permite establecer semejanzas y diferencias entre ellas:

- *P. tetramera* presenta un parénquima floemático celulósico al igual que el resto de las *Phytolacca*, excepto *P. rivinoides* que muestra un parénquima floemático lignificado;
- en *P. tetramera* como en las demás especies de *Phytolacca*, los haces medulares están ausentes mientras que la médula de *P. dioica* sí tiene haces medulares;
- el floema secundario de *P. tetramera* está acompañado por escasa cantidad de parénquima, a diferencia de *P. americana* cuyo floema secundario está acompañado por gran cantidad de parénquima;
- los radios parenquimáticos de *P. tetramera*, *P. dioica*, *P. rivinoides* y *P. americana* son angostos a diferencia de *P. bogotensis* que muestra radios parenquimáticos anchos;
- *P. tetramera* es la única especie que presenta terminaciones vasculares con traqueidas prosenquimáticas dispuestas en series paralelas. Las demás especies del género no presentan esta disposición.

Este trabajo es de gran utilidad para la taxonomía de las especies del género *Phytolacca* existentes en Argentina.

Cuadro II: Estudio anatómico comparativo de algunos órganos de especies argentinas de *Phytolacca*: *P. tetramera*, *P. dioica*, *P. rivinoides*, *P. bogotensis* y *P. americana*

Caracteres anatómicos	<i>Phytolacca tetramera</i>	<i>Phytolacca dioica</i>	<i>Phytolacca rivinoides</i>	<i>Phytolacca bogotensis</i>	<i>Phytolacca americana</i>
Raíz	• Estructura inusual escasamente desarrollada. • Euestela con haces colaterales abiertos. • Vasos del xilema primario sin microcristales de oxalato de calcio.	• Estructura inusual muy desarrollada. • Euestela con haces colaterales abiertos. • Vasos del xilema primario con microcristales de oxalato de calcio.	• Estructura inusual desarrollada. • Euestela con haces colaterales abiertos. • Vasos del xilema primario con microcristales de calcio.	• Estructura inusual desarrollada. • Euestela con haces colaterales abiertos. • Vasos del xilema primario con microcristales de oxalato de calcio.	• Estructura inusual desarrollada. • Euestela con haces colaterales abiertos. • Vasos del xilema primario con microcristales de oxalato de calcio.
Tallos con Estructura Primaria	• Estructura inusual; el floema y xilema constituyen anillos alternos concéntricos originados por cambio supernumerarios. • Parénquima floemático celulosico. • Médula entera sin haces medulares. • Floema acompañado por escaso parénquima celulosico. • Radios parenquimáticos de 2-4 series de células y 12-20 células de alto (angosto). • Rizoma con estructura inusual.	• Estructura inusual; el floema y xilema constituyen anillos alternos concéntricos originados por cambio supernumerarios. • Parénquima floemático celulosico. • Médula entera con haces anfibasales. • Floema acompañado por escaso parénquima celulosico. • Radios parenquimáticos de 2-3 series de células y 7-14 células de alto. • Sin rizoma	• Estructura inusual; el floema y xilema constituyen anillos alternos concéntricos originados por cambio supernumerarios. • Parénquima floemático lignificado. • Médula tabicada sin haces medulares. • Floema acompañado por parénquima lignificado (F. incluido) • Radios parenquimáticos de 2-3 series de células y 13-20 células de alto. • Sin rizoma	• Estructura inusual; el floema y xilema constituyen anillos alternos concéntricos originados por cambio supernumerarios. • Parénquima floemático celulosico. • Médula tabicada sin haces medulares. • Floema acompañado por gran cantidad de parénquima celulosico. • Radios parenquimáticos de 3-8 series de células y 9-16 células de alto. • Sin rizoma.	• Estructura inusual; el floema y xilema constituyen anillos alternos concéntricos originados por cambio supernumerarios. • Parénquima floemático celulosico. • Médula tabicada sin haces medulares. • Floema acompañado por gran cantidad de parénquima celulosico. • Radios parenquimáticos de 3-8 series de células y 9-16 células de alto. • Sin rizoma.
Hojas	• Arquitectura foliar, cerrada, pinada, camptódroma, broquidódroma. Vénulas ramificadas formadas por 3-5 traqueidas proserquimáticas dispuestas paralelamente. • Estructura foliar con mesófilo dorsiventral. • Estomas anomocíticos. • Anfiestomática. • Epidermis sin tricomas.	• Arquitectura foliar, cerrada, pinada, camptódroma, broquidódroma. Vénulas simples o ramificadas formadas por traqueidas simples. • Estructura foliar con mesófilo dorsiventral. • Estomas anomocíticos y tetra-cíticos hundidos. Anfiestomática. • Epidermis sin tricomas.	• Arquitectura foliar, cerrada, pinada, camptódroma, broquidódroma. Vénulas ojaladas, sin vénulas terminales formadas por traqueidas simples. • Estructura foliar con mesófilo dorsiventral. • Estomas anomocítico-tetracíticos. Hipostomática. • Epidermis con tricomas unicelulares.	• Arquitectura foliar, cerrada, pinada, camptódroma, broquidódroma. Vénulas incompletas. Vénulas simples o ramificadas formadas por traqueidas simples. • Estructura foliar con mesófilo dorsiventral. • Estomas anisocíticos y tetracíticos. Anfiestomática. • Epidermis con tricomas unicelulares.	• Arquitectura foliar, cerrada, pinada, camptódroma, broquidódroma. Vénulas simples o ramificadas formadas por traqueidas simples. • Estructura foliar con mesófilo dorsiventral. • Estomas anisocíticos y tetracíticos. Anfiestomática. • Epidermis con tricomas unicelulares.
Fruto	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.
Semillas	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.	• Mesocarpo parénquimático. • Endocarpo uniestratificado. • Perisperma con almidón.

III.8.1.3- Localización histoquímica de saponinas

En los cortes de los distintos órganos utilizados para estudiar la anatomía, se realizaron las reacciones histoquímicas para poner en evidencia a las saponinas. Se utilizó *p*-anisaldehído sulfúrico para localizar a las saponinas que se muestran de color azul-violáceo luego de la reacción (Wagner y col, 1984). Los resultados fueron: negativo en tallos, rizomas y raíces; levemente positivo en hojas y marcadamente positivo en el mesocarpo del fruto (fig. 77-A) y en el perisperma de la semilla (fig. 77-B).

III.8.1.3.1- Histoquímica de *P. tetramera* comparada con la del resto de las especies del género *Phytolacca* que crecen en Argentina

De los estudios histoquímicos realizados surge que:

- no existen saponinas en raíces, rizomas ni tallos de *P. tetramera*; a diferencia de *P. americana* en cuyas raíces se encontraron saponinas (Kang y col., 1987);
- las hojas de *P. tetramera* dieron reacción levemente positiva para saponinas, mientras que esta misma reacción resultó fuertemente positiva en frutos y semillas. *P. dioica*, *P. bogotensis*, *P. rivinoides* y *P. americana* también contienen saponinas en sus hojas (Domínguez, 1928; Parkhurst, 1973; Nielsen, 1995), pero nunca se ha descripto la presencia de saponinas en sus frutos o semillas.

Es importante destacar que este es el primer trabajo que describe histoquímicamente la presencia y localización de saponinas en frutos y semillas de una especie del género *Phytolacca*.

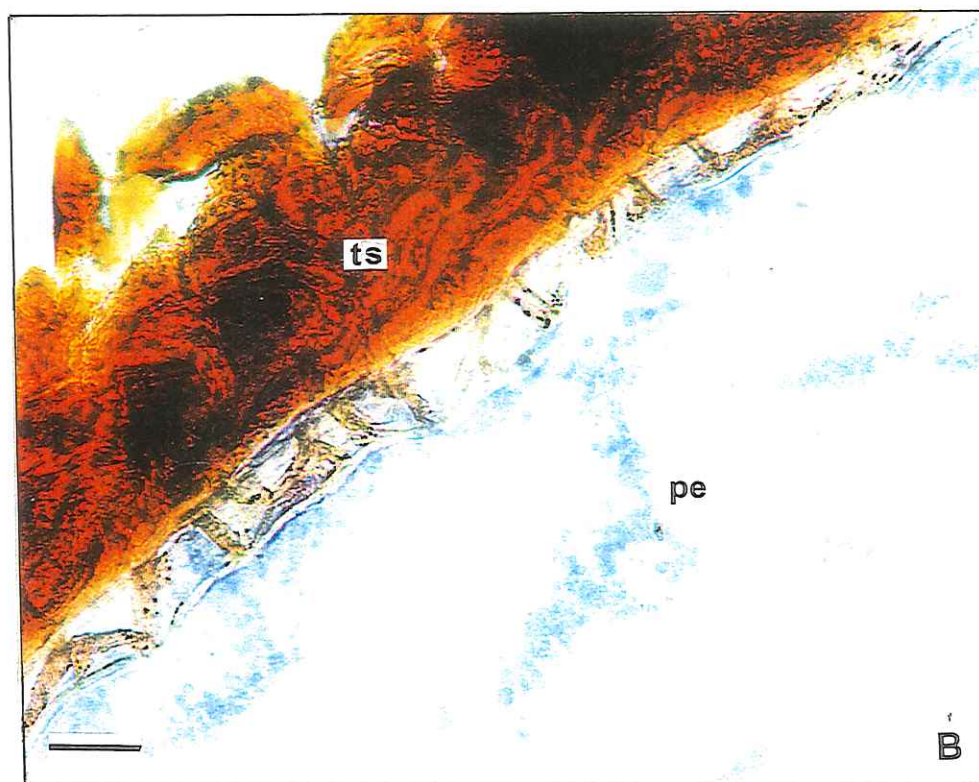
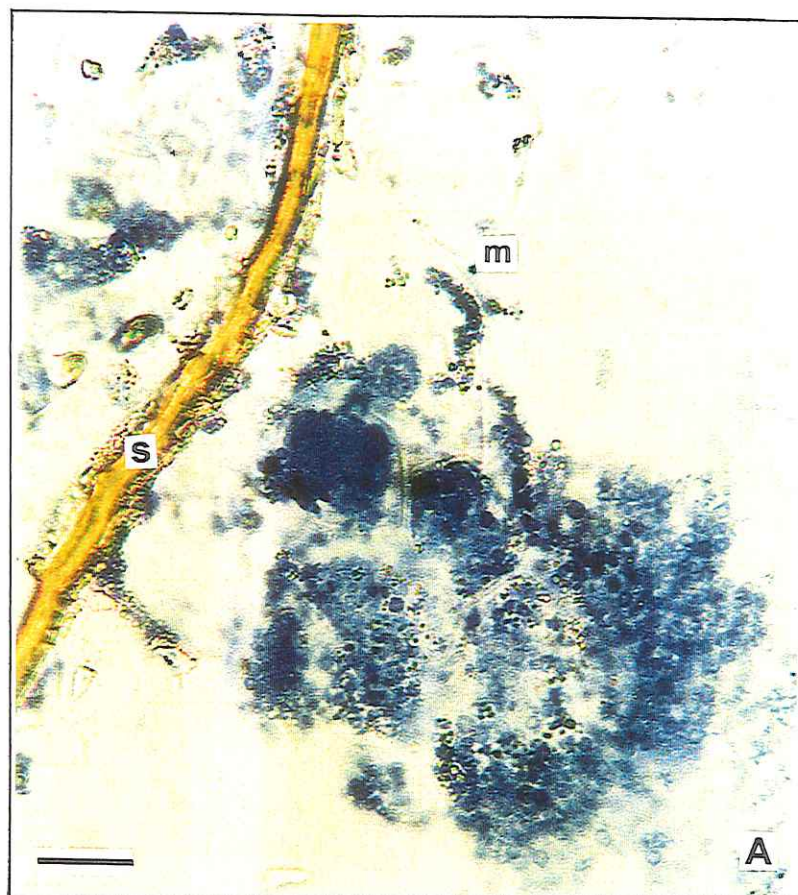


Figura 77: *Phytolacca tetramera* Hauman. Identificación histoquímica de saponinas en fruto y semilla. **A**, localización en el mesocarpio del fruto; **B**, localización en el perisperma de la semilla. m, mesocarpio; pe, perisperma; s, septo del fruto; ts, tegumento seminal. Las reglillas corresponden a 25 μ m.

CAPÍTULO IV

RESUMEN Y CONCLUSIONES

IV- Resumen y Conclusiones

A través de un relevamiento de plantas argentinas utilizadas en la medicina popular para dolencias relacionadas con infecciones fúngicas en humanos, seleccionamos una serie de especies pertenecientes a las familias Phytolaccaceae y Acanthaceae para la evaluación de actividad antifúngica frente un panel de hongos oportunistas patógenos para el hombre estandarizados de ATCC (EEUU) y aislados clínicos de CEREMIC (UNR). Agregamos a esta lista, un grupo de plantas seleccionadas al azar que no tenían estudios previos.

De las especies probadas, *Phytolacca tetramera*, una especie endémica de Argentina en serio riesgo de extinción y sin ningún estudio previo, resultó la especie más activa.

De todos los órganos de esta planta, el fruto conteniendo a la semilla, mostró la mejor actividad, por lo que la elegimos para continuar su estudio. El fraccionamiento bioguiado del extracto metanólico crudo de frutos de *P. tetramera*, permitió el aislamiento de tres saponinas, Fitolacósido B = [3-O-(β -D-xilopiranosil)-fitolacagenina], E = [3-O-(β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-xilopiranosil) fitolacagenina] y una 3ª saponina con tres azúcares, cuya elucidación estructural no pudo ser realizada con los elementos con que podíamos contar en Argentina. Para la elucidación estructural inequívoca de la 3ª saponina, que resultó ser Fitolacósido F = {3-O-[α -L-ramnopiranosil - (1 $\rightarrow$ 2) β - D - glucopiranosil - (1 $\rightarrow$ 2) β - D - xilopiranosil]-ácido fitolacagénico} fue necesario utilizar un aparato de RMN de alta resolución (700 Mz, Univ. Cattolica Sacro Cuore, Roma), con el que se hicieron espectros de

RMN ^1H , RMN ^{13}C en una dimensión y una serie de espectros en dos dimensiones: HMQC, HMBC, TOCSY y ROESY.

Fitolacósido B, que se aisló de los frutos en un porcentaje (0,51 %) muy superior al de *P. americana* (0,013 %) (Suga y col., 1978), fue el compuesto más activo como antifúngico, con valores de CIM entre 25 µg/ml y 125 µg/ml frente a un panel de 12 hongos oportunistas patogénicos para el humano. Además de su capacidad fungistática, Fitolacósido B mostró ser fungicida a concentraciones entre 75-300 µg/ml.

La hidrólisis, metilación y permetilación de fitolacósido B nos permitió obtener Fitolacagenina (**35**), el 28-Me-Fitolacósido B (**36**) y el derivado permetilado (**37**) los cuales no mostraron actividad hasta 250 µg/ml.

Para orientarnos en el posible mecanismo de acción de Fitolacósido B, observamos el efecto que éste produjo sobre la morfología fúngica, dado que se conoce que los cambios en la morfología de los hongos pueden sugerir el posible blanco o modo de acción de un agente antifúngico (Frost y col., 1995).

La semejanza de las malformaciones producidas por Fitolacósido B, (observadas por microscopia óptica y corroboradas por MEB) con la producida por compuestos que inhibían la síntesis de los polímeros de la pared fúngica, hicieron pensar que el blanco de acción de este compuesto, era la pared del hongo. Sin embargo, el agregado de un estabilizador osmótico (sorbitol) no mostró un efecto de protección a las células fúngicas tal como la que se produce cuando la célula fúngica tiene alterada su pared. Para dilucidar esta aparente contradicción, se probó si Fitolacósido B inhibía (1,3)β-glucan sintasa y/o quitin sintasa, enzimas

que catalizan la síntesis de los principales polímeros de la pared, (1,3) β -glucano y quitina respectivamente.

Los resultados mostraron que Fitolacósido B no inhibía (1,3) β -glucan sintasa y sorprendentemente activaba quitin sintasa, produciendo aproximadamente un 85 % de aumento de quitina con respecto al control. Esta hiperproducción de quitina fue corroborada con los ensayos de tinción con Calcofluor y de Valoración de Quitina donde Fitolacósido B produjo un incremento de alrededor del 30 % en la concentración de N-AcGlucosamina (unidades constitutivas de quitina), respecto de las células control. También se observó un incremento del 100% en el grosor de la pared celular fúngica de *N. crassa*, por microscopía electrónica de transmisión (MET).

Esta activación de quitin sintasa (con el consecuente aumento de quitina) producida por Fitolacósido B, podría ser el mecanismo a través del cual esta saponina ejerce su efecto antifúngico, ya que, de acuerdo con Roncero y col. (1985), un depósito anormal de quitina producirá un debilitamiento de la pared y una inmediata interrupción del crecimiento fúngico.

Sin embargo, teniendo en cuenta estudios previos que han demostrado que una alteración de las membranas fúngicas puede desencadenar la hiperproducción de quitina y crecimiento fúngico anormal (Yoshida, 1988; Georgopapadakou y col.; 1988; Morrissey y col., 1999; Phillip y col., 2001), decidimos estudiar si el aumento de quitina producido por Fitolacósido B se debía no sólo a un efecto directo sobre quitin-sintasa sino que respondía también a un efecto indirecto sobre la membrana.

Considerando que las interacciones más comúnmente descritas para saponinas incluyen la formación de complejos con el ergosterol ó la extracción del mismo de las membranas fúngicas, estudiamos por dos métodos distintos (Ensayo del Efecto del Ergosterol y medidas de UV) si Fitolacósido B se unía al ergosterol. Los resultados mostraron que esta saponina no se uniría al ergosterol.

Sin embargo, dado que Fitolacósido B producía un 37,5 % de pérdida de componentes celulares a concentraciones a las cuales ejerce su efecto antifúngico (CIMs), parecería que este compuesto, a pesar de no unirse al ergosterol producía una alteración de las membranas fúngicas. Este efecto podría explicarse considerando que Fitolacósido B, por su carácter anfifílico, podría penetrar dentro de la membrana é interaccionar con otros componentes diferentes de ergosterol (fosfolípidos por ejemplo), produciendo alteraciones en la misma que se podrían traducir en una modificación de la permeabilidad y en la pérdida parcial de sus componentes intracelulares. Este cambio en la composición de la membrana podría generar una activación adicional de la quitin-sintasa, aumento de quitina y posterior muerte del hongo.

Estos resultados y el hecho que Fitolacósido B no sea citotóxico frente a siete líneas de células tumorales humanas hasta 100 µg/ml y que no produzca hemólisis a concentraciones en las que presenta una interesante actividad antifúngica (CLM>CIM), nos lleva a pensar que Fitolacósido B podría ser utilizado para estudios posteriores como una potencial droga antifúngica.

Por último, dado que *Phytolacca tetramera* es una fuente importante de Fitolacósido B, y con la urgencia que da el hecho de que se trate de una planta en riesgo de extinción, hemos realizado, siguiendo los lineamientos de la OMS, un

estudio morfo-anatómico exhaustivo de las distintas partes de la planta comparando sus caracteres con los de *P. dioica*, *P. rivinoides*, *P. americana*, y *P. bogotensis* que son las otras especies del género *Phytolacca* que crecen en Argentina.

La realización posterior de reacciones histoquímicas sobre los distintos órganos de la planta, corroboró la localización de saponinas tanto en frutos como en semillas, siendo ésta la primera vez que se describe histoquímicamente la presencia de saponinas en semillas del género *Phytolacca*.

Todo este trabajo requirió de un enfoque multidisciplinario (Maciel y col., 2002) ya que las plantas seleccionadas fueron evaluados por su contenido químico y por su actividad biológica y una vez aislados sus principios activos y elucidadas sus estructuras, se realizaron semisíntesis de análogos, estudios de mecanismo de acción y de toxicidad, incluyendo estudios morfo-anatómicos de la planta que fueron comparados con los del resto de las especies del mismo género que crecen en Argentina.

CAPÍTULO V

PARTE EXPERIMENTAL

V- Materiales y Métodos

V.1- General

Los espectros de RMN se realizaron en piridina- d_5 con TMS como estándar interno en espectrómetros Bruker AMX 200 operando en 200 MHz (^1H) y 50 MHz (^{13}C) [IQUIOS (CONICET-UNR)], Varian Gemini 300 operando a 300 MHz (^1H) y 75.5 MHz (^{13}C , Univ. de la Laguna, Tenerife), Bruker AMX 500 operando en 500 MHz (^1H) y 125 MHz (^{13}C , Univ. Cattolica Sacro Cuore, Roma) y en un espectrómetro Bruker 700 (Univ. di Roma "Tor Vergata", Italia). Los espectros de masa (EM) se realizaron en un espectrómetro VG-ZAB-SEQ4F (FAB+) y en un espectrómetro DE-STR (MALDI, Univ. de California, Riverside). Los espectros IR fueron obtenidos en un espectrómetro BRUKER IFS 55 (FTIR). Las rotaciones ópticas fueron medidas en un polarímetro Perkin Elmer 241 usando lámpara de sodio ($\lambda = 589 \text{ nm}$). Los espectros UV-V se realizaron en espectrofotómetro Beckman DU-600. Las determinaciones de PF fueron realizadas en un equipo Electrothermal 9100.

Para CCD se utilizaron cromatofolios de Si gel 60 GF₂₅₄ Merck. Para CC se utilizó Si gel 60 H y Si gel 60 (0,040-0,063 mm) Merck. La concentración de los extractos orgánicos se realizó en un evaporador rotatorio Büchi R-205. La liofilización de los extractos acuosos se realizó en un liofilizador Labconco Freeze Dry Sistem 79340 (Freezone Plus 6).

V. 2- Material vegetal

-*Phytolacca tetramera*: El material fue recolectado en la Prov. de Buenos Aires, Ptdo. Magdalena, camino a Juan Ardití, cruce ruta provincial nº 11, en marzo de

1997 y febrero de 2003. Un ejemplar se encuentra depositado en el herbario de la UNR (MG 134).

-*Seguieria aculeata*: El material fue recolectado en Salta, Dpto. Orán, ruta 18 a Isla de Cañas (18 km al W de ruta 50), en marzo de 1996. Un ejemplar se encuentra depositado en el herbario de la UNR (MG 119).

-*Microtea scabrida*: El material fue recolectado en la Prov. de Entre Ríos, Dpto. Concordia, Nueva Escocia, en enero de 1996. Un ejemplar se encuentra depositado en el herbario de la UNR (MG 131).

-*Justicia gilliesi*: El material fue recolectado en San Luis, Depto. La Capital, San Jerónimo, en marzo de 2001. Un ejemplar se encuentra depositado en el herbario de la Universidad Nacional de San Luis (UNSL) (L.A. Del Vitto, E. Petenatti & M. Petenatti 8988).

-*Justicia tweediana*: El material fue recolectado en San Luis, Depto. La Capital, El Chorrillo, en noviembre de 2000. Un ejemplar se encuentra depositado en el herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 7231).

-*Justicia squarrosa*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. Belgrano: inmediaciones de la Villa de la Quebrada, en el lecho seco del río homónimo, en abril de 2001. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 5070).

-*Tripodanthus flagellaris*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la ciudad de Juana Koslay, en abril de 2003. Un ejemplar se

encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9244).

-*Ayenia lingulata*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la localidad de La Calera, en marzo de 2004. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9251).

-*Boopis anthenoides*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la localidad de La Calera, en marzo de 2004. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9253).

-*Hysterionica jasionoides*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la localidad de La Calera, en marzo de 2004. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9255).

-*Thymophylla pentachaeta*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. Belgrano/Ayacucho: Sierra de las Quijadas en mayo de 2001. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 8999).

-*Xeroaloysia ovatifolia*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la localidad de La Calera, en marzo de 2004. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9252).

-*Ehretia cuneifolia* Gottschling & Hilger (antes conocida como *Cortesia cuneifolia*):

El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital/Belgrano: inmediaciones de San Antonio en abril de 2003. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9237).

-*Flaveria bidentis*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la ciudad de Juana Koslay, en abril de 2003. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9238).

-*Gnaphalium gaudichaudianum*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la ciudad de Juana Koslay, en marzo de 2003. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9239).

-*Schkuria pinnata*: El material fue recolectado en San Luis, Dpto. La Capital: inmediaciones de la ciudad de Juana Koslay, en abril de 2003. Un ejemplar se encuentra depositado en el Herbario de la UNSL (L.A. Del Vitto & E. Petenatti 9240).

V.2.1- Preparación de extractos crudos de partes aéreas de las plantas seleccionadas

200 g de partes aéreas (tallos y hojas) secas y molidas de las especies seleccionadas fueron macerados con MeOH (3 x 24 hs c/u) a 30 °C con agitación mecánica, obteniéndose las soluciones metanólicas respectivas la cuales por filtración y concentración en rotavapor dieron un extracto metanólico crudo para

cada una de las especies vegetales: *P. tetramera* (30,25 g), *S. aculeata* (16,86 g), *M. scabrida* (14,25 g), *J. gillesii* (33,84 g), *J. tweediana* (24,82 g), *J. squarrosa* (26,25 g), *T. flagellaris* (18,20 g), *A. lingulata* (10,28 g), *B. anthenoides* (31,15 g), *H. jasionoides* (20,55 g), *T. pentachaeta* (19,25 g), *V. ovatifolia* (17,35 g), *E. cuneifolia* (30,44 g), *F. bidentis* (18,75 g), *G. gaudichaudianum* (26,25 g), *S. pinnata* (30,08 g).

V.2.2- Preparación de extractos crudos de frutos y rizomas de *P. tetramera*

1000 g de frutos (con semilla) secos y molidos de *P. tetramera* fueron extraídos con MeOH (3 x 24 h c/u) por maceración con agitación a T^a ambiente. Luego de su filtración, las soluciones extractivas fueron reunidas y concentradas a sequedad en rotavapor para dar un extracto metanólico crudo de 298,56 g.

1000 g de rizomas secos y molidos de *P. tetramera* fueron extraídos con MeOH de la misma forma que se realizó con los frutos, obteniéndose 155,49 g de extracto metanólico crudo.

V.2.3- Purificación del extracto crudo de frutos de *P. tetramera*

El extracto crudo de frutos con semilla de *P. tetramera* fue redissuelto en agua (H₂O) y extraído con BuOH, obteniéndose una solución acuosa que fue liofilizada y dio 59,81 g de extracto acuoso y una solución butanólica que fue llevada a sequedad en evaporador rotatorio dando 135,75 g de extracto butanólico. 29,26 g del mismo fueron tratados con Et₂O produciéndose un precipitado (20,26 g). 10 g del precipitado fueron sembrados en una CC de Si gel 60 (0,040 – 0,063 mm) (7 cm de diámetro interno, 25 cm de alto, 500 g). La columna fue sucesivamente eluída con solventes de polaridad creciente desde

CHCl₃:MeOH:H₂O (50:10:1) hasta MeOH:H₂O (70:30), seguida por CCD de Si gel 60 GF₂₅₄ utilizando como reactivos reveladores Godin (1954) y p-anisaldehído sulfúrico (Wagner y col., 1984). Cada fracción obtenida fue evaporada al vacío en rotavapor y ensayada para actividad antifúngica. Por repetidas columnas cromatográficas (Si gel 60 H) de las fracciones activas, obtuvimos tres saponinas puras: Fitolacósido B (787,2 mg), Fitolacósido E (679,3 mg) y Fitolacósido F (377,9 mg).

3-O-(β-D-xilopiranosil) fitolacagenina (Fitolacósido B) (**32**). Fue identificado por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos previamente publicados en la literatura (Woo y col., 1976). Sólido blanco. PF.: 266-267. $[\alpha]^{20}_D +59,19$ (MeOH; *c* 0,250). FAB-MS *m/z* 687 $[M+Na]^+$. IR (ν^{KBr} , cm⁻¹): 3400 (OH); 1730 (COOMe); 1690 (COOH). Las señales más características RMN ¹H (200 MHz, piridina-*d*₅/TMS) son: δ 1,07 (3H, s, H-26); 1,22 (3H, s, H-29); 1,28 (3H, s, H-27); 1,36 (3H, s, H-24); 1,58 (3H, s, H-25); 3,31 (1H, *dd*, *J*=13,6 y 3,7 Hz, H-18); 3,66 (3H, s, OMe); 3,70 (1H, *d*, *J* = 10,9 Hz, H-23); 4,16 (2H, *m*, H-2); 4,33 (1H, *d*, *J*=3,8 Hz, H-3); 4,39 (1H, *d*, *J* = 10,9 Hz, H-23); 5,11 (1H, *d*, *J*=8 Hz); 5,63 (1H, *t*, *J*=2,9, H-12). Los datos de RMN ¹³C se presentan en la tabla 9 (Sección III.4.).

3-O-(β-D-glucopiranosil-(1→4)-β-D-xilopiranosil)fitolacagenina (Fitolacósido E) (**33**). Fue identificado por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos previamente publicados en la literatura (Strauss y col., 1995). Sólido blanco. PF.: 257-258 °C. $[\alpha]^{20}_D +38,18$ (MeOH; *c* 0,275). FAB-MS *m/z* 849 $[M+Na]^+$. IR (ν^{KBr} , cm⁻¹): 3410 (OH); 1730 (COOMe); 1700 (COOH). Las señales más características RMN ¹H (200 MHz, piridina-*d*₅/TMS) son: δ 1,08 (3H, s, H-26); 1,22 (3H, s, H-29); 1,29 (3H, s, H-27); 1,36 (3H, s, H-24); 1,59 (3H, s, H-25); 3,32, (1H, *dd*, *J*=13,6 y

3,7 Hz, H-18); 3,66 (3H, s, OMe); 5,11 (1H, d, $J=8$ Hz); 5,64 (1H, t, H-12); 5,89 (1H, d, $J=8$ Hz). Los datos de RMN ^{13}C se presentan en la tabla 10 (Sección III.4).

3-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-xilopiranosil]

ácido fitolacagénico (Fitolacósido F) (**35**). La identificación completa de este compuesto se presenta en la sección III.4 (págs. 85-104). Sólido blanco. PF.: 229-230. $[\alpha]^{22} +22,1$ (MeOH; c 1,4). MALDI-MS m/z 979,7 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. IR ν^{KBr} cm^{-1} : 3400 (OH), 1715 (COOMe), 1709 (COOH). Las señales de RMN ^1H (700 MHz, piridina- d_5 /TMS) se presentan en la tabla 11 (sección III.4, pág. 87) y los datos de RMN ^{13}C (175 MHz, piridina- d_5 /TMS) se presentan en la tabla 16 (sección III.4, pág. 104).

V.3- Reacciones de derivatización

-Hidrólisis. Obtención de fitolacagenina (**35**).

Fitolacósido B (30 mg, 0,045 mmoles) fue calentado en baño de glicerina a 90 °C durante 2 h con 4 ml de HCl 2 N (Spengel y col., 1995). Luego de enfriar, la solución fue extraída con CHCl_3 (x3). El extracto clorofórmico fue lavado con H_2O , secado (SO_4Na_2 anhidro) y evaporado a sequedad. El residuo fue purificado por CC (Si gel 60 H) con hexano-acetona (4:1) (Suga y col. 1978), para dar (**35**) (21 mg, 0,040 mmoles) como un sólido blanco PF= 312-313 °C. Las señales más características de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) fueron: δ 1,01 (3H, s, CH_3); 1,1 (3H, s, CH_3), 1,32 (3H, s, CH_3); 1,37 (3H, s, CH_3); 1,48 (3H, s, CH_3); 3,89 (3H, s, OCH_3); 4,27 (1H, d, H); 5,55 (1H, t, H-olefínico).

-Metilación. Obtención de 28-metil fitolacósido B (**36**).

A una solución de fitolacósido B (30 mg) en MeOH, se le agregaron 5 ml de una solución etérea de CH_2N_2 (preparada a partir de 10,7 g de diazald y 2,5 g de

KOH). La mezcla de reacción se dejó en reposo 1 h. La mezcla fue evaporada a sequedad y purificada por CC en Si gel 60 H con CHCl_3 :MeOH (10:1) dando (**36**) (29 mg, 0,043 mmoles). Las señales más características de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) fueron: δ 3,50 (3H, s, COOCH_3) y 3,89 (3H, s, COOCH_3).

*-Permetilación. Obtención de [(2, 23, 28, 2', 3',4')-hexametil fitolacósido B] (**37**).*

La reacción de permetilación se realizó en base al Método de Hakomori (Hakomori, 1964; Suga y col.; 1978). NaH (30 mg) fue agitado en DMSO anhidro (750 μl) a 70 °C durante 1 h bajo flujo de N_2 . A este reactivo se le agregó una solución de fitolacósido B (30 mg) en DMSO (750 μl). La mezcla fue agitada a T^a ambiente durante 20 min. bajo flujo de N_2 . Se agregó CH_3I (750 μl) y se agitó a T^a ambiente durante 9 h. Luego de diluir con H_2O , la mezcla se extrajo con CHCl_3 y la capa orgánica fue lavada con H_2O , secada y concentrada. El residuo fue purificado por CC (Si gel 60 H) usando CHCl_3 como solvente de elusión obteniéndose (**37**) (32 mg, 0,042 mmoles). Las señales más características de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) fueron: δ 3,30; 3,34; 3,46; 3,57; 3,61; 3,62; 3,70 (3H x 7, s, COOCH_3) y por IR (ausencia de pico a $\cong 3400\text{ cm}^{-1}$).

V.4- Evaluación biológica

V.4.1- Microorganismos y Medios

Los microorganismos usados para la evaluación antifúngica fueron provistos por la Colección de Cultivos Tipo de Estados Unidos (*American Type Culture Collection*, ATCC, Rockville, MD) ó por el Centro de Referencia en Micología (C, CEREMIC), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Suipacha 531-(2000)-Rosario: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* C 131,

Saccharomyces cerevisiae ATCC 9763, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Aspergillus flavus* ATCC 9170, *A. fumigatus* ATCC 26934, *A. niger* ATCC 9092, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972, *T. rubrum* C 113, *Microsporum canis* C 112, *M. gypseum* C 115, *Epidermophyton floccosum* C 114. Los organismos fueron cultivados en medio Agar-Sabouraud cloranfenicol y sub-cultivados cada 15 días para evitar la pleomorfizaciones.

-Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizaron estructuras del hongo discretas fácilmente cuantificables (levaduras para hongos levaduriformes y conidias generadas por reproducción asexual para hongos filamentosos). La estandarización del inóculo se realizó ajustando su concentración en el rango 10^4 - 10^6 levaduras ó esporas/ml, la cual provee valores de CIM más reproducibles (Espinel-Ingroff y col., 1995).

-Procedimiento para hongos levaduriformes

- a. Una ó dos colonias de un cultivo de levadura obtenido por incubación durante 48 h a 28°C en Sabouraud-glucosa, se transfieren a un tubo conteniendo agua destilada estéril.
- b. Se realiza el recuento de microorganismos en cámara de Neubauer.
- c. Se diluye el inóculo inicial hasta alcanzar una concentración final de 1×10^4 - 1×10^6 levaduras/ml.

-Procedimiento para hongos filamentosos

- a. Para inducir la formación de conidias se hacen crecer a los hongos filamentosos en un medio de agar papa-dextrosa (PDA) a 28-30 °C por 7-14 días. Se desprende el hongo de la superficie del tubo con gancho estéril y se transfiere el micelio a un erlenmeyer conteniendo H₂O destilada estéril y perlas de vidrio.
- b. Se agita por rotación durante 5 min.
- c. Se filtra a través de gasa estéril contenida en un embudo de vidrio.
- d. El filtrado se pasa a través de una jeringa conteniendo algodón (este paso no es recomendable cuando se realiza un inóculo con macroconidias ya que se puede perder gran parte del material), ejerciendo presión positiva.
- e. Se centrifugan las conidias a 3000 r.p.m. durante 15 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento en agua destilada (x3).
- f. Se realiza el recuento de conidias en cámara de Neubauer.
- g. Se realiza la dilución necesaria para alcanzar una concentración final de 1×10^4 - 1×10^6 conidias/ml.

V.3.2- Ensayos antifúngicos

- Método de Dilución en agar.

El bioensayo fue realizado en medio sólido (Agar-Sabouraud) en tubos de Kahn con un volumen final de 500 µl. Se prepararon soluciones madre de los extractos y subextractos (50 mg/ml) y de los compuestos puros (12,5 mg/ml) en DMSO las que fueron agregadas al medio de cultivo tibio para dar una concentración final de 1000 µg/ml para extractos y de 250 µg/ml para compuestos puros. Con estos primeros tubos se hicieron diluciones al ½ en tubos subsiguientes, obteniéndose una serie de tubos de concentraciones decrecientes en el rango 1.000-3,75 µg/ml para los extractos y de 250-1,82 µg/ml para los

compuestos puros. La concentración final de DMSO no excedió el 2%. Una vez sólido el agar, se esparció sobre la superficie del medio un inóculo de 5 μ l de la suspensión de levaduras o conidias de 10^4 - 10^6 elementos/ml. Se incubaron los tubos durante 24, 48 ó 72 hs hasta 15 días a 28-30 °C (de acuerdo con crecimiento fúngico). Se usó Ketoconazol (Janssen Pharmaceutica), Anfotericina B (Sigma Chemical Co.) y Terbinafina (Novartis) como controles positivos y se incluyó un blanco conteniendo medio de cultivo e inóculo del hongo, como control del crecimiento fúngico. Se definió la CIM como la mínima concentración de extracto o de compuesto puro que fue capaz de inhibir totalmente el crecimiento del hongo después del tiempo de incubación. El ensayo se repitió por duplicado.

- Método de Dilución en caldo

El bioensayo fue esencialmente igual que el método de dilución en agar pero realizado en medio líquido (medio Roswell Park Memorial Institute, RPMI-1640, Sigma) y en microplacas de 96 pocillos con un volumen final de 200 μ l siguiendo los lineamientos del Comité Nacional de Estándares para Laboratorios Clínicos para levaduras M27-A2 (NCCLS, 2002-a) y para hongos filamentosos M38A (NCCLS, 2002-b).

El medio RPMI-1640 fue llevado a pH 7 con ácido 3-[N-morfolino propano] sulfónico (MOPS). La concentración del inóculo estuvo en el rango 1×10^4 a 1×10^6 .

La técnica de trabajo fue la siguiente:

- A) Se colocaron 200 μ l de una solución del compuesto prueba disuelto en el medio de cultivo en el primer pocillo.

- B) Se trasvasaron 100 μ l de la solución del punto A al siguiente pocillo conteniendo 100 μ l de medio de cultivo obteniéndose una serie de tubos de concentraciones decrecientes en el rango 1.000-3,75 μ g/ml para los extractos y de 250-1,56 μ g/ml para los compuestos puros. La concentración final de DMSO no excedió el 2%.
- C) Se agregaron 100 μ l de los inóculos a todos los pocillos excepto a los controles a) y c) que se detallan a continuación. Se prepararon controles a) de esterilidad de medio de cultivo (medio de cultivo más agua); b) de crecimiento fúngico (medio de cultivo é inóculo); c) de esterilidad del compuesto (solución del compuesto en DMSO y medio de cultivo).

Las cubetas se incubaron a 28-30°C en una cámara húmeda y oscura por 48 h para levaduras y por un tiempo que depende del crecimiento de la cubeta control, para los hongos filamentosos.

Como control positivo se usaron Anfotericina B y/o Ketoconazol. La CIM se definió de la misma forma que para el método de dilución en agar. El ensayo se realizó por duplicado.

-Preparación del medio.

Por cada 100 ml de solución:

- a) Pesar 2,08 g de RPMI-1640, 7,9g de MOPS y 3,6 g de glucosa.
- b) Agregar agua destilada estéril sin completar el volumen total de la solución.
- c) Ajustar a pH 7.
- d) Completar el volumen de la solución.
- e) Disolverlo y esterilizar por filtración.

-Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM) de Fitolacósido B.

Después de determinar la CIM de fitolacósido B por el método de microdilución en caldo, se tomó una alícuota de 50 μ l de cada pocillo donde no hubo desarrollo fúngico y se colocó en tubos sobre 150 μ l de Agar-Sabouraud glucosa. Se incubó la nueva serie a 28 °C y se observó si hubo crecimiento fúngico. Se determinó la CFM como la mínima concentración de compuesto que no produjo la muerte del hongo.

-Bioautografía (Rahalison y col., 1991).

Los extractos a evaluar (100 μ g ó 10 μ g en caso de fracciones con un alto grado de purificación) se sembraron en placas cromatográficas esterilizadas bajo luz UV (254 nm) por 30 min. y se desarrollaron con la fase móvil más apropiada para una correcta separación de sus componentes.

Luego de evaporado el solvente se vertió medio de cultivo (Agar Sabouraud-glucosa) fundido (mantenido a 45 °C aproximadamente) y conteniendo el inóculo del hongo, sobre la superficie de la placa cromatográfica. Se calculó previamente el volumen necesario del medio inoculado, considerando la superficie de la placa a cubrir. Se calcula 1 ml de medio por cada 10 cm² de área a cubrir. También se debe calcular la cantidad de inóculo necesaria para que haya una concentración de $\cong 1 \times 10^5$ elementos/ml de medio de cultivo.

Las placas se incubaron en cámara húmeda a 28 °C 12 h y luego se rociaron con el colorante vital MTT (cloruro de metiltiazoliltetrazolio, Merck) a una concentración de 1mg/ml. Dado que este compuesto amarillento (MTT sin reducir) se convierte en formazán fuertemente coloreado de azul en las zonas en que el hongo está metabólicamente activo, el resultado positivo (inhibición del desarrollo

fúngico) se evidenció cuando después de un tiempo de incubación a 28 °C se observaron halos amarillos producidos por los compuestos que inhibieron su desarrollo sobre un fondo azul.

IV.5- Ensayos de Mecanismo de acción

V.5.1-Estudio de Malformaciones de las hifas

Este bioensayo se realizó con *N. crassa* (ATCC 9279) en medio líquido. Se colocó un inóculo de *N. crassa* de 1×10^5 conidias/ml en el medio proteasa peptona 0,5%, extracto de levadura 0,5%, sacarosa 4%, agua destilada (100 ml), al cual se le agregó concentraciones sub-inhedorias de Fitolacósido B (50 y 100 µg/ml) (CIM de Fitolacósido B frente a *N. crassa* 150 µg/ml). Como control de crecimiento se utilizó medio con inóculo del hongo sin agregado de Fitolacósido B. Luego de incubar los frascos con agitación a 145 rpm (Agitador orbital New Brunswick Innova 4000) se observaron las hifas coloreadas con Azul de lactofenol (D'Ambrogio, 1986), con un microscopio óptico Zeiss Axiolab a un aumento de 400 X equipado con una cámara fotográfica MC 80. Este ensayo se realizó por triplicado.

También se realizaron observaciones con microscopio electrónico de barrido (MEB), para lo cual las hifas fueron previamente preparadas según la metodología descripta abajo.

- Preparación de las muestras para las observaciones con MEB

El material fresco se fijó durante 3 hs en una solución de glutaraldehído al 4 % en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 7,2 (Boyde y col., 1977; D'Ambrogio, 1986) y luego se mantuvo en solución de cacodilato de sodio con sacarosa. La

deshidratación se realizó por pasajes sucesivos de 1-4 hs. del material en soluciones de EtOH 96°:H₂O:t-BuOH (5:4:1), (5:3:2), (5:1,5:3,5), EtOH 96°:t-BuOH (5:5), EtOH 100°:t-BuOH (2,5:7,5) y finalmente en t-BuOH 100%. Las muestras se adhirieron con una cinta doble faz a un porta-muestras metálico, y se colocaron en un desecador con Si gel durante una noche como mínimo.

Las muestras así tratadas fueron metalizadas utilizando un baño de oro-paladio y empleando un evaporador marca Veeco que operó a 1500 Voltios, 70 mmHg en atmósfera de Argón durante 10 min. La película metálica fue de aproximadamente 20 nm de espesor (O'Braien y col., 1981).

Las observaciones se realizaron en el Instituto de Física de Rosario (IFIR), utilizando un microscopio electrónico de barrido Jeol J S M-35C. El instrumento operó con una tensión de aceleración de 15 Kv y se utilizó un sistema de detección de electrones secundarios (Ipohorski y col., 1981).

V.5.2-Ensayos que tienen como blanco la pared celular fúngica

V.5.2.1-Metodología del bioensayo de *N. crassa*

25 ml de un medio conteniendo 0,5% de peptona, 0,5% de extracto de levadura, 4% de sacarosa y 1,5% de agar fue esterilizado en autoclave (115 °C, 15 min.) Se le agregaron 25 µl de un inóculo de 1×10^7 conidias/ml de *N. crassa* (ATCC 9279) a 40 °C para luego colocarse en una placa de Petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado el medio, se colocaron sobre su superficie discos de papel de filtro (Baxter cat # F-882-1) de 5 mm de diámetro. Sobre éstos se agregaron cargas de 30, 50 y 80 µg de Fitolacósido B disuelto en DMSO. Como control negativo se incluyó un disco impregnado con el máximo volumen de

DMSO utilizado en la carga de los discos. Las placas fueron incubadas 24 h a T^a ambiente en presencia de luz. Las zonas de inhibición fueron examinadas macroscópicamente para ver su aspecto claro. Como testigo de halo claro se utilizó Ketoconazol (20 µg).

V.5.2.2-Metodología del bioensayo de Sorbitol

Se determinó el valor de la CIM de Fitolacósido B con *S. cerevisiae* (ATCC 9763) usando el método de microdilución en caldo descrito más arriba. Se prepararon dos series de pocillos, cada una conteniendo concentraciones decrecientes de Fitolacósido B. A todos los pocillos de una de las series se le colocó sorbitol 0,8 M como soporte osmótico en el medio. Ambas series se incubaron a 28 °C y las placas se leyeron a las 48 hs y a los 7 días (Frost y col., 1995). Se determinó la CIM de Fitolacósido B en ambas series de tubos, en ausencia y en presencia de sorbitol.

Se considera que el blanco de acción del compuesto es la pared celular fúngica si la CIM del compuesto en presencia de sorbitol es mayor que en ausencia de él a los siete días de incubación.

V.5.2.3-Metodología del ensayo de (1,3)β-D-glucan-sintasa

Se siguió la metodología descrita por Ishiguro y col. (1997) El ensayo fue realizado en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Ribas del Instituto de Microbiología Bioquímica de la Universidad de Salamanca, Salamanca, España.

Preparación de membranas: 200 ml de un cultivo de 24 h de *S. cerevisiae* (ATCC 26109) en medio YES (0,5 % de extracto de levadura y 3% de glucosa) se centrifugaron durante 5 min. a 5.000 r.p.m. Las células se lavaron con una

solución amortiguadora (Tris HCl 50 mM pH 7,5, 1mM de EDTA, 1 mM mercaptoetanol) y la suspensión se centrifugó durante 1 min. a 13.000 r.p.m. eliminándose el sobrenadante. Se resuspendió con 500 μ l de solución amortiguadora en tubos de 1,5 ml con rosca. Se añadieron perlas de vidrio (0,5 mm de diámetro, B. Braun, Melsungen, Alemania) y se lo sometió a un proceso de ruptura mecánica en el aparato Fast Prep FP 120 (Savant BIO 101) con un pulso de 15 segundos en velocidad 6. Se observó al microscopio la integridad de las células (50 % de ruptura se consideró suficiente). A partir de ese momento se trabajó a 4 °C. Se centrifugó a 5000 r.p.m. (10 min. a 4°C) se recuperó el sobrenadante y se descartaron las perlas de vidrio. El sobrenadante se centrifugó a 48.000 r.p.m. (30 min. a 4°C) y el sedimento fue resuspendido con varilla de vidrio, se disolvió en solución amortiguadora y se guardó a (-80°C). La concentración de proteínas totales en el preparado de membrana se cuantificó por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando el "Protein Assay Dye Reagent Concentrate" (Biorad) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Se construyó una recta patrón con albúmina sérica bovina a partir de la cual se estimó la concentración de proteínas totales en la preparación de membranas.

Realización del ensayo con fitolacósido B: El ensayo se realizó como fue descrito por Ishiguro y col. (1997) a un volumen final de 40 μ l usando una dilución 1:10 de la suspensión de membranas. El medio de reacción se compone de 3 μ l de Tris HCl 1 M (pH 7,5); 5 μ l de ASB (Albúmina Sérica Bovina); 5 μ l de EDTA 17 mM; 5 μ l de GTP 1,2 mM; 5 μ l de [14 C]UDP-Glc 40 mM (40.000 c.p.m.) (Amersham Int., Gran Bretaña); 10 μ l de proteínas de membrana (30 μ g de proteínas totales); 5 μ l de agua. A esta mezcla de reacción se le agregaron 2 μ l de una solución etanólica

de Fitolacósido B conservada a -20 °C (10 mg/ml, concentración final 500 µg/ml) ó 2 µl de EtOH (96 %) como control. La reacción fue incubada 30 min. a 30 °C y finalizada con el agregado de 1 ml de ácido tricloroacético (ATC) al 10 %. El material insoluble en ácido se filtró (filtros Whatman GF/C prehumedecidos con una solución de ATC 10%) mediante una bomba de vacío, se lavó 3 veces con ATC 10% y se lavó dos veces con EtOH (96 %). El papel de filtro se transfirió a un tubo adecuado para el contador de centelleo y se completó a 2,5 ml con el reactivo de centelleo. Como control se usó Papulacandina B y como blanco la misma reacción sin el agregado de ningún inhibidor. Los resultados se expresaron como % de inhibición que se calculó de la siguiente forma: $\%I = (1 - [\text{CPM del ensayo} / \text{CPM del control}]) \times 100$. El ensayo se realizó por duplicado.

V.5.2.4-Metodología del ensayo de quitin-sintasa

Preparación de las membranas: El ensayo se realizó de acuerdo con Choi y col. (1994). Se hizo crecer la cepa de *S. cerevisiae* (ATCC 26109) 24 h en medio YES. 800 ml del cultivo se centrifugó durante 10 min. a 8.000 r.p.m. Se lavaron las células con 15 ml de solución amortiguadora Tris HCl 0,05 M (pH 7,5) conteniendo MgAc_2 repitiendo la centrifugación en las condiciones anteriormente mencionadas. Se retiró completamente el sobrenadante y 800 mg del sedimento se suspendieron en 1,6 ml de la solución amortiguadora por cada gramo de células. Se agregaron 7 g de perlas de vidrio, se mezclaron con las células las cuales se rompieron de la misma forma que para (1,3)β-D-glucan-sintasa. Esta operación se repitió tres veces. Se comprobó al microscopio la ruptura celular y se retiró todo el extracto celular. Se agregaron a éste 1,5 ml de solución amortiguadora para aislar

las membranas del resto de los componentes celulares (paredes, núcleos, etc.) y se centrifugó a 5.000 r.p.m. (10 min. a 4°C). Se pasó el sobrenadante a un tubo especial para rotor de ultracentrífuga y para sedimentar las membranas se centrifugó a 48.000 r.p.m. (30 min. a 4 °C). Se retiró el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200 µl de una solución Tris HCl 0,035 M (pH 7,5), 30 % de gliclerol. Las membranas se mantuvieron a -80°C.

Realización del ensayo con fitolacósido B: El ensayo se realizó en el laboratorio del Dr. Juan Carlos Ribas del Instituto de Microbiología Bioquímica de la Universidad de Salamanca, Salamanca España.

Se trabajó con 10 µl de la preparación enzimática (30 µg proteína) a un volumen final de 50 µl: 3 µl de Tris HCl 0,3 M (pH 7,5); 5 µl de MgCl₂ 40 mM, 5 µl de [¹⁴C]UDP-NAcGA (20000 cpm/100 nmoles) (Amersham Int., Gran Bretaña), 23 µl de H₂O y 2 µl de tripsina 1,5 mg/ml (activador de la enzima) (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.). A esta mezcla de reacción se le agregaron 2 µl de una solución etanólica de Fitolacósido B (10 mg/ml, concentración final 400 µg/ml) ó 2 µl de EtOH (96 %) para el control. La reacción fue incubada 90 min. a 30 °C y finalizada con el agregado de 1 ml de ATC al 10 %. El material insoluble en ácido fue recogido por filtración y lavado con agua. Se midió la radioactividad con un contador de centelleo de la misma forma que para el ensayo de (1,3)β-glucan sintasa.

Como control positivo se usó Nikomicina Z (Shaman Phramaceuticals, San Francisco, EEUU). Los resultados se expresaron como % de inhibición que se calculó de la siguiente forma: %I = (1-[CPM del ensayo/CPM del control] x100. El ensayo se realizó por duplicado.

V.5.2.5-Metodología para la tinción con Calcofluor

El ensayo fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Arellano y col. (1996) y Pringle J.R. (1991), en el laboratorio de la Dra. Pilar Pérez del Instituto de Microbiología Bioquímica de la Universidad de Salamanca, Salamanca España.

Las células de *S. cerevisiae* (ATCC 9263) y las hifas de *N. crassa* (ATCC 9279) luego de cultivadas en ausencia y presencia de Fitolacósido B, fueron lavadas 3 veces y resuspendidas en agua estéril con Calcofluor (Calcofluor White M 2R New, American Cyanamid Co., Bound Brook, New Jersey) a una concentración final de 1 mg/ml durante 5 min. a Tª ambiente. Luego de lavar tres veces con agua, las células e hifas fueron observadas en un microscopio Leica DMXRA de Contraste Diferencial (Differential Interphase Contrast o DIC) y de Fluorescencia (filtros de excitación UV BP340-380, espejo divisor dicróico 400, filtros de cierre LP 425). Las imágenes se grabaron con una cámara digital DC100.

V.5.2.6-Metodología de valoración de quitina

El ensayo fue realizado de acuerdo con la metodología descrita por Bulawa y col. (1986) y Cabib y col. (1994), en el laboratorio de la Dra. Pilar Pérez del Instituto de Microbiología Bioquímica de la Universidad de Salamanca, Salamanca España.

Metodología:

- 1) 100 mg de células de *S. cerevisiae* ATCC (9263) sin tratar y tratadas con 62,5 µg/ml de Fitolacósido, se resuspendieron en 1 ml de KOH al 6% y se trasvasaron a tubos de vidrio de 10 ml.
- 2) Se incubaron durante 90 min.s a 80 °C.

- 3) Se dejaron enfriar y se les agregó 100 μ l de AcOH 1/10 para la neutralización del pH.
- 4) Se centrifugó a 48.000 r.p.m. (30 min. a 4 °C) y el sobrenadante se eliminó.
- 5) Se resuspendió con 500 μ l de H₂O y se pasó a un tubo eppendorf. Se agregaron otros 500 μ l de H₂O y se agitó. Se centrifugó 1 min. a 13.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió dos veces más.
- 6) Se resuspendió en 500 μ l de solución amortiguadora de fosfato 50 mM (pH 6,3). Se centrifugó 1 min. a 13.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante.
- 7) Se resuspendió con 200 μ l de solución amortiguadora y se agregaron 40 μ l de quitinasa (Quitinasa de *Serratia marcescens*, SIGMA).
- 8) Se llevó a volumen final de 600 μ l con la solución amortiguadora. Se preparó un blanco con 560 μ l de solución amortiguadora fosfato y 40 μ l de quitinasa.
- 9) Se incubó 2 h a 37 °C.
- 10) Se calentó a ebullición durante 1 min. y se centrifugó 1 min. a 13.000 r.p.m.
- 11) Se tomaron 400 μ l del sobrenadante y se agregaron 25 μ l de glucosidasa (Glucosidasa Perkin Elmer).
- 12) Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 13) Se calentó a ebullición durante 1 min. y se centrifugó 1 min. a 13.000 r.p.m.
- 14) La NAcGA liberada se midió por el método de Reissig (Reissig y col., 1955).

Método de Reissig:

- a- Se prepararon por duplicado 6 tubos conteniendo cada uno: 0, 2, 4, 6, 8, 10 μ l de NAcGA comercial (de concentración 10 nmoles/ μ l) + 250 μ l de H₂O + 250 μ l de tetraborato potásico, para construir una recta patrón.

- b- Se tomaron 50 μ l de sobrenadante de cada eppendorf conteniendo NAcGlu liberada de la quitina extraída de *S. cerevisiae* sin tratar y tratada con Fitolacósido B (pasos 1-12) y también del blanco (preparado en pasos 7-12) y se le agregaron 200 μ l de H₂O + 250 μ l de tetraborato potásico.
- c- Luego se tomaron 100 μ l de sobrenadante de cada eppendorf conteniendo NAcGlu proveniente de la quitina extraída de *S. cerevisiae* sin tratar y tratada con Fitolacósido B y se le agregaron 150 μ l de H₂O + 250 μ l de tetraborato potásico.
- d- Se calentó a ebullición 8 min. y luego se enfrió en H₂O/Hielo.
- e- Se agregó a cada tubo 3 ml de reactivo de Reissig.
- f- Se incubó durante 40 min. a 37 °C.
- g- Se leyó en espectrofotómetro a 585 nm.

Preparación del reactivo de Reissig (este reactivo debe prepararse en el momento de ser utilizado):

- 1 g de N,N-3,5-diaminobenzaldehído
- 1,25 ml de HCl 10 N
- Llevar hasta 100 ml con AcOH glacial

V.5.2.7- Preparación de las muestras para la observación con MET

El material a fijar inmerso en el reactivo fijador se cortó bajo lupa; las piezas de 1-2 mm³ se sometieron a una primera fijación, para lo cual se empleó glutaraldehído al 4% en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 7,4 durante 1 h a T^a ambiente. Luego se lavó durante 20 min. en solución de sacarosa al 10% en solución amortiguadora fosfato 0,1 M. A continuación se realizó una pos-fijación

empleando una solución de OsO_4 al 1,5 % en solución amortiguadora fosfato 0,1 M a pH 7,2 durante 1 h a T^a ambiente. Se lavó con agua destilada y el material se trató con una solución de permanganato previamente a la deshidratación con concentraciones crecientes de acetona. Finalmente el material se incluyó en resinas Spurr (Union Carbide International Co.). Los tacos se tallaron en forma de pirámide truncada con una superficie de corte de 100 μm de largo, los cuales incluyeron el material a cortar. Se obtuvieron secciones finas y ultrafinas, estas últimas de 60 nm de grosor, con un ultramicrotomo provisto con cuchilla de diamante. Los cortes finos se colorearon con azul de toluidina al 1 % conteniendo borato de sodio para su observación con microscopio óptico a los fines de corroborar la orientación del material. Las secciones ultrafinas se colocaron sobre la cara opaca de grillas de cobre de 200 mesh. A continuación se realizó una "doble" coloración, empleando en primer término una solución acuosa de acetato de uranilo al 2,5% durante 20 min. seguida por la coloración con la solución de Reynolds o solución de citrato de plomo, durante 4-5 min. En este paso se debió evitar la contaminación con CO_2 atmosférico. A continuación se lavó con agua destilada (Mercer y col., 1972; O'Braien y col, 1981; D'Ambrogio, A., 1986; Roland y col., 1991). Se escurrieron y se secaron las grillas y se procedió a la observación usando un Microscopio Electrónico de Transmisión Philips 300. Las observaciones fueron realizadas en el Centro CRIBABB de Bahía Blanca, Argentina.

V.5.3-Ensayos que tienen como blanco la membrana celular fúngica

V.5.3.1-Efecto del ergosterol en la CIM de Fitolacósido B (Lee y col., 1999)

Se determinó la CIM de Fitolacósido B frente a *S. cerevisiae* (ATCC 9263) por el método de microdilución en caldo explicado previamente, sin y con el agregado de ergosterol exógeno (Sigma Chemical Co.) en las siguientes condiciones:

- a) en ausencia de ergosterol exógeno
- b) en presencia de 50 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol exógeno
- c) en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol exógeno
- d) en presencia de 200 $\mu\text{g/ml}$ de ergosterol exógeno

Se considera que el mecanismo de acción del compuesto prueba es la unión al ergosterol, si la CIM en presencia de ergosterol exógeno es mayor que en ausencia del mismo.

V.5.3.2- Metodología del ensayo de interacción de ergosterol y Fitolacósido B por espectroscopia UV

Soluciones stock de Fitolacósido B y de ergosterol (Sigma Chemical Co.) se prepararon por disolución de 1 mg en 1 ml de EtOH (50%).

Se utilizó un espectrofotómetro UV-V Beckman DU-600 para todos los análisis espectrofotométricos. El paso de luz de la cubeta fue de 1 cm.

Se realizaron diluciones entre 500-6,25 $\mu\text{g/ml}$ de cada una de las soluciones stock y se midió la absorbancia a λ 220-360 nm. Se determinaron así las concentraciones de Fitolacósido B y de ergosterol que cumplían con la Ley de Lambert & Beer, las que fueron utilizadas posteriormente.

Se prepararon mezclas de las soluciones de Fitolacósido B y ergosterol, a concentraciones finales de ergosterol entre 11,5-13,5 $\mu\text{g/ml}$ (23-27 μM) y de

Fitolacósido B a 25 µg/ml (37,5 µM). Se prepararon también testigos de cada uno de ellos.

Se midió por espectroscopía UV la absorbancia a λ 220-360 nm de cada una de las mezclas y de los testigos y se compararon los espectros obtenidos.

V.5.3.3- Metodología del ensayo de liberación o pérdida de componentes celulares

La liberación de componentes intracelulares fue medida a través de los materiales liberados al medio que absorben a 260 nm (Lunde y col., 2000).

Se cultivó *S. cerevisiae* (ATCC 9263) a 30 °C durante 18 h, luego de las cuales las células fueron lavadas dos veces y ajustadas a aproximadamente a una concentración de 5×10^7 levaduras/ml con MOPS frío a pH 6. Los inóculos se colocaron en eppendorf y se pusieron en contacto con Fitolacósido B a concentraciones finales iguales a la CFM y 4 veces la CFM frente al hongo prueba. Se continuó la incubación a 30 °C y a distintos intervalos de tiempo (0, 2, 4 y 6 h). Las células tratadas fueron centrifugadas a 3.000 r.p.m. durante 5 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 260 nm. Se considera positivo un aumento de la absorbancia a 260 nm de las células tratadas con respecto a las controles. Se utilizó dodecilsulfato (SDS) de sodio al 2% para comparar el efecto ya que este detergente produce el 100 % de lisis celular. El ensayo se realizó por duplicado.

V.6- Ensayos de Toxicidad

V.6.1- Ensayo de hemólisis de Fitolacósido B

Se preparó una serie de tubos con diluciones al medio de Fitolacósido B en glucosa al 5% (a partir de una solución madre en DMSO) para dar concentraciones finales de 1.000 a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ en un volumen de 0,75 ml. A cada tubo se le agregó 0,25 ml de suspensión de Glóbulos Rojos (GR) humanos al 4% (2 ml de GR en 50 ml de glucosa 5%) y los tubos se incubaron 120 min. Se centrifugaron los tubos a 3.000 r.p.m. y luego se observó el sobrenadante a diferentes tiempos (30, 60 y 120 min.). Se determinó a cada uno de esos tiempos la concentración lítica mínima (CLM) que se define como la menor concentración de compuesto probado que produce la lisis total de los eritrocitos.

V.6.2.2- Ensayos de citotoxicidad

La actividad citotóxica fue determinada de acuerdo al método de Monks y col. (1991) y Boyd y col. (1995) utilizando líneas celulares tumorales humanas provistas

por el Instituto Nacional del Cancer de EEUU (National Cancer Institute, NCI-USA) denominadas UACC.62 (melanoma), MCF.7 (mama), NCI.460 (pulmón), OVCAR (ovario), PC0.3 (próstata), C786.0 (riñón) y NCI.ADR* (línea celular de mama que expresa un fenotipo de resistencia a múltiples drogas).

2×10^4 células de cada línea fueron cultivadas en RPMI con 5% de suero bovino fetal incorporados en una microplaca de 96 pocillos (100 μl /pocillo), conteniendo la sustancia a probar en concentraciones finales de 0,25; 2,5; 25 y 250 $\mu\text{g/ml}$. Luego de un período de incubación de 48 hs a 37 °C con atmósfera de CO_2 al 5%, las células fueron fijadas por adición de 50 μl de ATC al 50% a 4 °C durante 60 min.; posteriormente el ATC fue aspirado y las células fueron lavadas con agua corriente 4-5 veces y secadas al aire. Las células fijadas

fueron coloreadas con 100 μ l de sulforrodamina B (SRB; 0,4 %P/V en AcOH al 1%), durante 15 minutos. El exceso de SRB fue eliminado de las placas a través de lavados con AcOH al 1% (5 veces). Las placas fueron secadas al aire y el colorante fue solubilizado en 100 μ l de Tris-base 10 mM. La absorbancia fue medida en un lector de microplacas Elisa (Bio-Tek Instruments, Inc. Modelo ELX-800) a 560 nm (Skehan y col., 1990). Con los datos obtenidos se calculó el % de crecimiento celular y finalmente se construyeron gráficos relacionando el porcentaje de crecimiento con la concentración de la sustancia probada. Se considera citotóxico el compuesto que a 100 μ g/ml produce la muerte del 50% de las células (-50 % de crecimiento) de al menos tres líneas celulares

V.7- Metodología para el estudio morfo-anatómico e histoquímico de *P. tetramera*

V.7.1-Preparación de las muestras para el estudio anatómico y micrográfico

Los distintos órganos (raíz, tallo, hoja, fruto y semilla), se incluyeron en parafina. Para ello, se realizó una deshidratación en alcoholes de distinta graduación (70°-100°) y una clarificación en alcohol-xilol (50:50) hasta llegar a xilol puro. Luego se realizó una infiltración en xilol-parafina (50:50) hasta parafina pura. El material incluido se cortó a 10-12 μ m de espesor en forma transversal y longitudinal con micrótopo tipo Minot. Las coloraciones empleadas fueron Safranina, Fast-Green (Strittmatter 1979). Los cortes coloreados fueron montados con Bálsamo de Canadá. Las epidermis fueron obtenidas por desprendimiento y coloreadas con Violeta de Cresilo (Strittmatter, 1980). Los rizomas y raíces fueron

macerados y las hojas fueron clarificadas por métodos convencionales (Boodle, 1916; Strittmatter, 1973). Para la descripción de la arquitectura foliar se utilizó la terminología propuesta por Hickey (1973). La distribución de los cristales de oxalato de calcio se observó en microscopio de polarización (Johansen, 1940; O'Braien y col., 1981). Los dibujos son originales y fueron realizados con tubo de dibujo con un microscopio óptico BH2-DA, Olympus. Las representaciones esquemáticas se realizaron según signos convencionales de Metcalfe y Chalk (1950).

V.7.2-Reacciones histoquímicas

Se realizaron cortes transversales del fruto y la semilla con un crióstato MICROM 500. Los cortes fueron colocados en porta-objetos. Se utilizó *p*-anisaldehído sulfúrico como reactivo histoquímico para detectar saponinas. Dos gotas de *p*-anisaldehído sulfúrico se colocaron sobre cada corte y aproximadamente en cuatro horas se observó la aparición de un color azul debido a la presencia de saponinas (Wagner, 1984).

Las fotomicrografías de la reacción histoquímica fueron obtenidas con un microscopio Zeiss Axiolab equipado con una cámara fotográfica MC 80.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

Referencias bibliográficas

- Ablordeppey, S.; Fan, P.; Ablordeppey, J.; Mardenborough, L.** (1999), Systemic antifungal agents against AIDS-related opportunistic infections: current status and emerging drugs in development; *Curr. Med. Chem.* **6**, 1151-1195.
- Aliff, T.; Maslak, P.; Jurcic, J.; Heaney, M.; Cathcart, K.; Sepkowitz, K.; Weiss, M.** (2003), Refractory *Aspergillus* pneumonia in patients with acute leukemia; *Cancer* **97**, 1025-1032.
- Al Magboul, A.; Bashir, A.** (1997), Antimicrobial activity of vernolepin and vernoladin; *Fitoterapia* **68**, 83-84.
- Alvarado González, J.; San Martín Tellez, J.; Guerrero Guzmán, C.; Alvarado González, E.; Sánchez Hernández, B.; Flores Rojas, A.** (2003), Aislamiento de hongos causantes de cromomicosis en muestras de agua, suelo y caña de azúcar en Atonolinga, municipio de Izúcar de Matamoros, Puebla; XXVIII Congreso Anual de la 23rd AMIMC, Cartel C-03.
- Arellano, M.; Durán, A.; Pérez, P.** (1996), Rho1 GTPase activates the (1-3) β -D-glucan-synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis; The EMBO Journal, **15**, 4584-4591.
- Avato, P.; Vitali, C.; Mongelli, P.; Tava, A.** (1997), Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives; *Planta Med.* **63**, 503-507.
- Barrett-Bee, K.; Ryder, N.** (1992), Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis Inhibition; en: Emerging targets in antibacterial and antifungal chemotherapy, Sutcliffe and Georgopapadakou (eds.), Chapman and Hall (Nueva York), 410-436.

- Baxter**, R.; Price, K.; Fenwick, R. (1990), Sapogenin structure: analysis of the ^{13}C and ^1H -NMR spectra of soyapogenol B; *J. Nat. Prod.* **53**, 298-302.
- Boodle**, L. (1916), A method of macerating fibres. *Bull. Misc. Inform.* **5**, 108-110.
- Boyd**, M.; Paull, K. (1995), Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute *in vitro* anticancer drug discovery screen; *Drug Dev. Res.* **34**, 91-109.
- Boyde**, H.; Bailey, E.; Jones, S.; Tamarin, A. (1977), Dimensional changes during specimen preparation for scanning electron microscopy. *Scanning Electron Microscopy I*, 507-518.
- Bradford**, M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bulawa**, C.E.; Slater, M; Cabib, E; Au-Young, J; Sburlati, A.; Adair, W.L. Jr; Robbins, P.W. (1986), The *S. cerevisiae* structural gene for chitin-synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*; *Cell* **46**, 213-225.
- Cabib**, E.; Choi, W. (1994), The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases; *Anal. Biochem.* **219**, 368-372.
- Cáceres**, A.; Girón, L.; Alvarado, S.; Torres, M. (1987), Screening of antimicrobial activity of poants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases; *J. Ethnopharmacol.* **20**, 223-237.
- Cechinel Filho**, V.; Yunes, R. (2001), Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos; en: plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna, R. Yunes y J. Calixto (eds.), Argos Editora Universitá, Santa Catarina (Brasil), 50-55.

- Chi, H.;** Lee, S. (1981), Phytochemical screening of Korean medicinal plants (III); *Ann. Rep. Natl. Prod. Res. Inst. Seoul Natl. Univ.* **20**, 38-41.
- Choi, W.;** Cabib, E. (1994), The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin-synthases; *Anal. Biochem.* **219**, 368-372.
- Coelho, P.;** Carvalho, O.; Andrade, Z.; Martins-Sousa, R.; Rosa, F.; Barbosa, L.; Pereira, C.; Caldeira, R.; Jannotti-Passos, L.; Godard, A.; Moreira, L.; Oliveira, G.; Franco, G.; Teles, H.; Negrão-Corrêa, D. (2004), *Biomphalaria tenagophila*/ *Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of Schistosomiasis; *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **99**, 109-111.
- Cordell, G.** (2000), Biodiversity and drug discovery, a symbiotic relationship; *Phytochem.* **55**, 463-480.
- Cragg, G.;** Newman, D. (2001), Natural product drug discovery in the next millenium; *Pharm. Biol.*, **39**, 8-17.
- D'Ambrogio, A.** (1986), Manual de Técnicas en Histología Vegetal; Editorial Hemisferio Sur (Argentina), 60-79.
- Delucchi, G.;** Correa; R. (1992), Las especies vegetales amenazadas de la provincia de Buenos Aires; Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC); López, H.L.; Tonni, E.P. (eds.), **2**, 1-39.
- Denning, D.** (2004), Antifungals-Where are we headed?; *Drug Plus Intern.* **3**, 11-13.
- Dewick, P.** (2002), Medicinal Natural Products. A biosynthetic approach, 2nd Ed.; John Wiley & Sons (Nueva York), 212-216.
- Di Domenico, B.** (1999), Novel antifungal drugs; *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 509-515.

- Domínguez, J.A.** (1903), Datos para la Materia Médica; Tomo I., La Semana Médica (Buenos Aires), 231-234.
- Domínguez, J.** (1928), Contribuciones a la Materia Médica Argentina; Edit. J. Peuser (Buenos Aires), 338-345.
- Duke, J.** (1994), Amazonian Ethnobotanical Dictionary (EEUU), 181.
- Espinel-Ingroff, A.; Dawson, K.; Pfaller, M. (1995), Comparative, and collaborative evaluation standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi; *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 314-319.
- Favel, A.; Steinmetz, M.D.; Regli, P.; Vidal-Ollivier, E.; Elías, R.; Balansard, G.** (1994), *In vitro* antifungal activity of triterpenoid saponins; *Planta Med.* **60**, 50-53.
- Filipov, A.** (1997), Farmacopea Pilagá. Farmacopea natural en sistemas terapéuticos de los indígenas Pilagá; *Parodiána* **19**, 35-74.
- Frost, D.; Brandt, K.; Cugier, D.; Goldman, R.** (1995), A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly; *J. Antib.* **48**, 306-310.
- Fukuda, D.; Nakatsukasa, W.; Yao, R.; Hunt, A.; Gordee, R.; Zeckner, D.; Mynderse, J.** (1991), A 45507, a complex of fungal cell wall inhibitors produced by a mold; 31st. ICAAC Meeting, Chicago, IL., Cartel N° 211.
- Gattuso, M.** (1996), Estudio anatómico, ultraestructural y fitoquímico de las Phytolaccaceae de la Argentina; Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, 139 págs.
- Georgopapadakou, N.; Dix, B.; Smith, S.; Feundenberger, J.; Funke, P.** (1988), Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in *Candida albicans*; *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 46-51.

- Georgopapadakou, N.** (2001), Update on antifungals targeted to the cell wall: focus on β -1,3-glucan-synthase inhibitors; *Exp. Opin. Investig. Drugs* **10**, 269-280.
- Ghilsaberti, E.** (1993), Detection and isolation of bioactive natural products, en: *Bioactive Natural Products*; Collegate, S; Molyneux, R. (eds.), CRC Press (Boca Ratón), 9-57.
- Gimlette, J.** (1939), A dictionary of Malayan medicine, Oxford Univ. Press (Nueva York).
- Godin, P.** (1954), A new spray reagent for paper chromatography of polyols and cetoses; *Nature* **174**, 134.
- Gottlieb, O., Kaplan, M.** (1993), Das plantas medicinais aos fármacos naturais; *Ciência Hoje* **15**, 51-54.
- Gottlieb, O.; Borin, M.; de Brito, N.** (2002), Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality?; *Phytochem.* **60**, 145-152.
- Groll, A.; De Lucca, A.; Walsh, T.** (1998), Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics; *Trends in Microbiol.* **6**, 117-123.
- Grosvenor, P.; Gothard, P.; William, N.; Supriono, A.; Gray, D.** (1995), Medicinal plants from Roau Province Sumatra Indonesia; *J. Ethnopharmacol.* **45**, 75-95.
- Gruda, I.; Nadeau, P.; Brajtburg, J.; Medoff, G.** (1980), Aplicatiopn of differential spectra in the Ultraviolet-visible region to study the formation of Amphotericin-B sterol complexes; *Biochim. Biophys. Acta* **602**, 260-268.
- Guglianone, E.** (1999), Phytolaccaceae en: Catálogo de plantas vasculares de Argentina II; Zuloaga, F. y Morrone, O. (eds), Missouri Botanical Garden Press (Londres), 910-913.

- Guiraud, P.;** Steiman, R.; Campos-Takaki, G.; Seigle-Murandi, F.; Simeon, M. (1994), Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -lapachone; *Planta Med.* **60**, 373-374.
- Guiraud, P.;** Steiman, R.; Seigle-Murandi, F.; Buarque, N. (1999), Antimicrobial and antitumor activities of mycosporulone; *J. Nat. Prod.* **62**, 1222-1224.
- Gunji, S.;** Arima, K.; Beppu, T. (1983), Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities; *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2061-2069.
- Hakomori, S.** (1964), A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfynil carbanion in dimethylsulfoxide; *J. Biochem. Tokyo* **55**, 205-208.
- Haraguchi, M.;** Motidome, M.; Gottlieb, O (1988), Estudo químico das saponinas de *Phytolacca thyrsoiflora*; *Acta Amazonica* **18**, 443-448.
- Hattori, M.;** Hada, S.; Watahaki, H.; Shu, Y.; Kakiuchi, N.; Mizuno, T.; Namba, T. (1986), Studies on Dental Caries Prevention by Traditional Medicines; *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 3885-3893.
- Hauman-Merck, L.** (1909), Apuntes de Historia Natural; *An. Mus. Nac. Hist. Nat.* (Buenos Aires), 108.
- He, X.;** Mocek, U.; Floss, H.; Cáceres, A.; Girón, L.; Bukcley, H.; Cooney, G.; Manns, J.; Wilson, B. (1994), An antifungal compound from *Solanum nigrescens*; *J. Ethnopharmacol.* **43**, 173-177.
- Hein, S.;** Gloer, J.; Koster, B.; Malloch, D. (1998), Arugosin F: a new antifungal metabolite from the coprophilous fungus *Ascodesmis sphaerospora*; *J. Nat. Prod.* **61**, 1566-1567.

- Hernández, M.;** Abedini, W.; Delucchi, G. (1998), Estrategias para la conservación de *Phytolacca tetramera* Hauman (Phytolacaceae), especie endémica de la Provincia de Buenos Aires; Abstract. XXVI Jornadas Argentinas de Botánica, Rio Cuarto (Córdoba), Cartel N° 307.
- Hickey, J.** (1973), Classification of the architecture of dicotyledons leaves; *Amer J Bot.* **60**, 17-33.
- Hieronymus, J.** (1882), Plantae diaphoricae florum argentinarum; *Bol. Acad. Nac. Cs. Córdoba*. Tomo IV. Entrega IV, 429-430.
- Hostettmann, K.;** Marston, A. (1995), Saponins; Cambridge University Press (Cambridge), 252-253.
- Hostettmann, K.;** Wolfender, J.; Rodríguez, S. (1997), Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts; *Planta Med.* **63**, 2-10.
- Hostettmann, K.;** Wolfender, J.; Terreaux, C. (2001), Modern screening techniques for plant extracts; *Pharm. Biol.* **39**, 18-32.
- Hufford, C.;** Funderburk, M.; Morgan, J.; Robertson, L. (1975), Two antimicrobial alkaloids from the heartwood of *Liriodendrum tulipifera* L.; *J. Pharm. Sci.* **64**, 789-892.
- Hufford, C.; Liu, S.; Clark, A. (1988), Antifungal activity of *Trillium grandiflorum* constituents; *J. Nat. Prod.* **51**, 94-98.
- Ipohorski, M y** Marrapodi, M. (1981), Interpretación de Imágenes en Microscopía Electrónica de Barrido. Comisión Nacional de Energía Atómica Argentina, 1-51.

- Ishiguro, J.;** Saitou, A.; Durán, A.; Ribas, J. (1997), *cps1⁺*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae fks* genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporine A and papulacandin B; *J. Bacteriol.* **179**, 7653-7662.
- Iwasa, K.;** Kamigauchi, M.; Sugiura, M.; Nanba, H. (1997), Antimicrobial activity of some 13-alkyl substituted protoberberinium salts; *Planta Med.* **63**, 196-198.
- Iwasa, K.;** Lee, D.; Kang, S.; Wiegrebe, W. (1998), Antimicrobial activity of 8-alkyl and 8-phenyl-substituted berberines and their 12-bromo derivatives. *J. Nat. Prod.* **61**, 150-153.
- Jackman, R.;** Smith, J. (1992), Anthocyanins and betalains; en: *Natural Food Colorants*; Hendry, G., Houghton, J. (eds), Blackie (Glasgow), 182-215.
- Jevan Ram, A.;** Bhakshu, L.; Raju, V. (2004), In vitro antimicrobial activity of certain medicinal plants from Eastern Ghats, India, used for skin diseases; *J. Ethnopharmacol.* **90**, 353-357.
- Johansen, D.** (1940), *Plant microtechnique*; ed. Mc Graw Hill (Nueva York) 184 - 202.
- Kang, S.;** Woo, W. (1987), Two new saponins from *Phytolacca americana*; *Planta Med.* **53**, 338-340.
- Kartsonis, N.;** Nielsen, J.; Douglas, C. (2003), Caspofungin: the first in a new class of antifungal agents; *Drug Resistance Updates* **6**, 197-218.
- Kasai, S.;** Watanabe, S.; Kawabata, J.; Tahara, S.; Mizutani, J. (1992), Antimicrobial catechin derivatives of *Agrimonia pilosa*; *Phytochem.* **31**, 787-789.

- Kelly, S.;** Lamb, D.; Corran, A.; Baldwin, B.; Kelly, D. (1995), Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14- α -methyle ergosta-8,24-(28)-dien-3- β -6- α -diol; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 910-915.
- Kobayashi, A.;** Kohtatsu, H.; Kajiya, S. (1995), Antifungal compounds induced in the dual culture with *Phytolacca americana* callus and *Botrytis fabae*; *Zeitsch. Naturf.* **50**, 398-402.
- Kontoyiannis, D.;** Mantadakis, E.; Samonis, G. (2003), Systemic mycoses in the immunocompromised host: an update in antifungal therapy; *J. Hosp. Inf.* **53**, 243-258.
- Kurtzman, C.;** Fell, J. (1998), The yeasts, a taxonomic study; *Elsevier Sci.* (Amsterdam), 9-12.
- Lee, S.;** Lee, J.; Lunde, C.; Kubo, I. (1999), *In vivo* antifungal susceptibilities of *Candida albicans* and other fungal pathogens to poygodial, a sesquiterpene dialdehyde; *Planta Med.* **65**, 204-208.
- Li, D.;** Calderone, R. (2004), Antifungal drugs, targets and target discovery; en: San-Blas, G., Calderone, R. (eds), *Pathogenic Fungi, Host Interaction and emerging strategies for control*, Caister Academic Press (Norfolk), 335-355.
- Li, E.;** Clark, A.; Hufford, C. (1995), Antifungal evaluation of pseudolaric acid B, a major constituent of *Pseudolarix kaempferi*; *J. Nat. Prod.* **58**, 57-67.
- Lifchitz, A.** (1985), Plantas Medicinales; Editorial Kier (Buenos Aires), 154, 162.
- Lima, E.;** Morais, V.; Gomes, S.; Cechinel Filho, V.; Miguel, O.; Yunes, R. (1995), Preliminary evaluation of antifungal activity of xanthoxyline; *Acta Farm. Bon.* **14**, 213-216.

- López, S.;** Castelli, M.; Zacchino, S.; Domínguez, J.; Lobo, G.; Charris-Charris, J.; Cortés, J.; Ribas, J.; Devia, C.; Rodríguez, A.; Enriz, R. (2001), *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationships of a new series of chalcone derivatives and synthetic analogues with inhibitory properties against polymers of the fungal cell wall; *Biorg. Med. Chem.* **9**, 1999-2013.
- Lu, Q.;** Ubillas, R.; Zhou, Y.; Dubenko, L.; Dener, J.; Litvak, J.; Phuan, P.; Flores, M.; Ye, Z.; Gerber, E.; Truong, T.; Bierer, D. (1999), Synthetic analogues of irlbacholine: a novel antifungal plant metabolite isolated from *Irlbachia alata*; *J Nat Prod* **62**, 824-828.
- Lunde, C.;** Kubo, I. (2000), Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*, *Antimicrob. Agents Chem.* **44**, 1943-1953.
- Mabry, T.;** Taylor, A.; Turner, B.(1964), The betacyanins and their distribution; *Phytochem.* **2**, 61-64.
- Maciel, M.;** Pinto, A.; Veiga, Jr.; V.; Grynberg, N.; Echevarria, A. (2002), Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares; *Quím. Nova* **3**, 429-438.
- Magalhaes, A.;** Tozzi, A.; Magalhaes, E.; Souza Moraes, V. (2001), Prenylated flavonoids from *Deguelia hatschbachii* and their systematic significance in *Deguelia*; *Phytochem.* **57**, 77-89.
- Majinda, R.; Abegaz, GB.; Bezabih, M.; Ngadjui, B.; Wanjala, C.; Mdee, L.; Bojase, G.; Silayo, A.; Masesane, I.; Yeboah, S. (2001), Recent results from natural products research at the University of Botswana; *Pure Appl. Chem.* **73**, 1197-1208.
- Manhandar, N.** (1995), Inventory of some herbal drugs of Myagdi district, Nepal; *Econ. Bot.* **49**, 371-379.

- Maoz, M.;** Kashman, Y.; Neeman, I. (1999), Isolation and identification of a new antifungal sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*; *Planta Med.* **65**, 281-282.
- Marco, F.;** Pfaller, M.; Messer, S.; Jones, R. (1998), *In vitro* activity of voriconazole (UKA-109,496) and four other antifungal agents against 394 clinical isolates of *Candida* spp.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 161-163.
- Marr, K.;** Borden, R. (1998), Clinical, cellular and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance; *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 382-402.
- Marston, A.;** Hostettmann, K.; Msonthi, J. (1995), Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplolophium buchanani* by centrifugal partition chromatography; *J. Nat. Prod.* **58**, 128-130.
- Martínez Crovetto, R.** (1981), Las plantas utilizadas en Medicina Popular en el NO de Corrientes (R.A.); *Miscelanea* **69**, 45.
- Mercer, E.;** Birbdck, M. (1972), Manual de Microscopía Electrónica para Biólogos, Blume (Buenos Aires), 4-35.
- Mereles, F.;** Degen, R. (1997), Contribución al conocimiento de los árboles y arbustos indígenas utilizados como medicinales en el Chaco Boreal (Paraguay); *Parodiana* **10**, 75-89.
- Metcalf, C.;** Chalk, L. (1950), Anatomy of the dicotyledons. Vol. II. Clarendon Press (Oxford), 1086-1091.
- Mitscher, L.;** Leu, R.; Bathala, M.; Wu, W.; Beal, J. (1972), Antimicrobial agents from higher plants; *Lloydia* **35**, 157-166.
- Miyazawa, M.; Kasahara, H.; Kameoka, H. (1996), Antifungal activities of 8.O.4'-neolignans from *Myristica fragrans*; *Nat. Prod. Lett.* **8**, 271-273.

- Molgaard, P.;** Chihaka, A.; Lemmich, E.; Furu, P.; Windber, C.; Ingerslev, F.; Halling-Sorensen, B. (2000), Biodegradability of the molluscicidal saponins of *Phytolacca dodecandra*; *Reg. Toxicol. Pharmacol.* **32**, 248-255.
- Monks, A.;** Scudeiro, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. (1991), Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines; *J. Nat. Cancer Inst.* **83**, 757-766.
- Moreno, M.;** Rodríguez, V. (1981), Medicinal pre-hispanic plants. 9. Yiamolosite B, a fungistatic saponin of *Phytolacca octandra*; *Phytochem.* **20**, 1446-1447.
- Morrison, R.;** Boyd, R. (1996), Química Orgánica. 5ª Ed.; Addison-Wesley Iberoamericana Press (Wilmington, Delaware, EEUU), 559-608.
- Morrissey, J.;** Osbourn, A. (1999), Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 708-724.
- Mukhopadhyay, T.;** Nadkarni, S.; Bhat, R.; Gupta, S.; Ganguli, B.; Petry, S.; Kogler, H. (1999), Mathemycin B, a new antifungal macrolactone from actinomycete species HILY-8620959; *J. Nat. Prod.* **62**, 889-890.
- Murphy, M.;** Bernard, E.; Ishimaru, T.; Armstrong, D. (1997), Activity of voriconazole (UKA-109,496) against clinical isolates of *Aspergillus* spp. and its effectiveness in an experimental model of invasive pulmonary aspergillosis; *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 696-698.
- Nandy, A.;** Chakraborty, A.; Podder, G. (1997), Antimicrobial activity of *Terminalia bellerica*; *Fitoterapia* **68**, 178-180.
- NCCLS,** National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002-a), Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2; Second Edition, Wayne, Pennsylvania (USA), **22** (15), 1-29.

- NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002-b), Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standard M38-A; Second Edition, Wayne, Pennsylvania (USA), **22** (16), 1-27.
- Newman, D.;** Cragg, G.; Snader, K. (2003), Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002; *J. Nat. Prod.* **66**, 1022-1037.
- Nickell, L.** (1959), Antimicrobial activity of vascular plants; *Econ. Bot.* **13**, 281-318.
- Nielsen-Salka, E.;** Uffe, A.; Carsten, C.; Claus, C. (1995), Triterpenoid saponins from *Phytolacca rivinoides* and *Phytolacca bogotensis*; *Phytochem.* **39**, 625-630.
- Nisbet, L.;** Moore, M. (1997), Will natural products remain an important source of drug research in the future?; *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 708-712.
- Norman, A.;** Demel, R.; Kruyf, B.; Geurts, W.; Van Deenen, L. (1972a), Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparison of other polyenes with filipin in their ability to interact with sterol; *Biochem. Biophys. Acta* **290**, 1-14.
- Norman, A.; Demel, R.; Kruyf, B.; Geurts, W.; Van Deenen, L. (1972b), Studies on the biological properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol; *J. Biol. Chem.* **247**, 1918-1929.
- Nussbaumer, P.;** Ryder, N.; Stütz, A. (1991), Allylamine antimycotics: Recent trends in structure-activity relationships and synthesis; *Pestic. Sci.* **31**, 437-455.
- O' Braien, T.;** Mc Cully, M. (1981), The study of plant structure principles and selected methods, Ed. Termarcarphi Pty Ltd (Melbourne). 1-5, 14.
- Oehlschlager, A.;** Czyzewska, E. (1992), Rationally designed inhibitors of sterol biosynthesis; en : *Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy*, Sutcliffe and Georgopapadakou (Eds), Chapman and Hall, (Nueva York), 437-475.

- Okunade**, A.; Clark, A.; Hufford, C.; Oguntimein, B. (1999), Azaanthraquinone: an antimicrobial alkaloid from *Mitracarpus scaber*, *Planta Med.* **65**, 447-448.
- Onishi**, J.; Meinz, M.; Curotto, J.; Dreikorn, S.; Rosenbach, M.; Douglas, C.; Abruzzo, G.; Flattery, A.; Kong, L.; Cabello, A.; Vicente, F.; Pelaez, F.; Diez, M.; Martin, I.; Bills, G.; Giacobbe, R.; Dombrowski, A.; Schwartz, R.; Morris, S.; Harris, G.; Tsipouras, A.; Wilson, K.; Kurtz, M. (2000), Discovery of novel antifungal (1,3) β -D-glucan synthase inhibitors; *Antimicrob Agents Chemother.* **44**, 368-377.
- Orabi**, K.; Mossa, J.; El-Feraly F. (1991), Isolation and characterization of two antimicrobial agents from mace (*Myristica fragrans*); *J. Nat. Prod.* **54**, 856-859.
- Pal Singh, I.; Milligan, K.; Gerwick, W. (1999), Tanikolide, a toxic and antifungal lactone from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*; *J. Nat. Prod.* **62**, 1333-1335.
- Parkhurst**, R.; Thomas, D.; Skinner, W. (1973), Molluscidal saponins of *Phytolacca dodecandra* oleanoglycotoxin; *Phytochem.* **12**, 1437-1442.
- Pérez**, P.; Ribas, J.C. (2004), Cell wall analysis; *Methods* **33**, 245-251.
- Phillip, B.; Levin, D. (2001), Wsc1 and Mid2 are cell surface sensor for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1; *Mol. Cell Biol.* **21**, 271-280.
- Piatelli**, M.; Minale, L. (1964), Pigments of Centrospermae II. Distribution of betacyanins; *Phytochem.* **3**, 547-557.
- Pinheiro**, T.; Yunes, R.; López, S.; Santecchia, C.; Zacchino, S.; Cechinel Filho, V. (1999), *In vitro* antifungal evaluation and studies on mode of action of xanthoxylone derivatives; *Arzneim-Forschung/Drug research* **49**, 1939-1943.

Pochettino, M.L.; Martínez, M.R.; Itten, B.; Zucaro, M. (1997), Las plantas medicinales como recurso terapéutico en una población urbana: estudio etnobotánico en Hernández (Pdo. La Plata, Prov. Buenos Aires, Argentina); *Parodiana* **10**, 141-152.

Polak, A. (1999), The past, present and future of antimycotic combination therapy. *Mycoses* **42**, 355-370.

Pringle, J. (1991), Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor; *Methods Enzymol.* **194**, 732-735.

Quiroga, E.; Sampietro, A.; Vattuone, M. (2001), Screening for antifungal activities of selected medicinal plants; *J. Ethnopharmacol.* **74**, 89-96.

Rahalison, L.; Hamburger, M.; Hostettman, K. (1991), A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compound from higher plants; *Phytochem. Anal.* **2**, 199-203.

Rashid, A.; Scott, E.M.; Richardson, M.D. (1995), Inhibitory effect of terbinafine on the invasion of nails by *Tricophyton mentagrophytes*; *J. Am. Acad.Dermatol.* **95**, 718-723.

Rates, S. (2001), Plants as source of drugs; *Toxicon* **39**, 603-613.

Rath, G.; Ndonzao, M.; Hostettmann, K. (1995), Antifungal anthraquinones from *Morinda lucida*, *Int. J. Pharmacogn.* **33**, 107-114.

Reissig, J.; Storminger, J.; Leloir, L. (1955), A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars; *J. Biol. Chem.* **217**, 959-966.

- Roland, J., Vian, B.** (1991), General preparation and staining of thin sections in Electron Microscopy of Plant Cells. Hall, J.; Hawes, C. (eds.) Academic Press, (London), 1-64.
- Roncero, C.; Durán, A.** (1985), Effect of Calcofluor White and Congo Red on fungal cell wall morphogenesis; *J. Bacteriol.* **163**, 1180-1185.
- Rouhi, M.** (2003), Rediscovering Natural Products; *C & EN* **81**, 77-91.
- Salt, T.; Xu, S.; Patterson, G.; Adler, J.** (1991); Diversity of sterol biosynthetic capacity in the Caryophyllidae; *Lipids* **26**, 604-613.
- San Blas, G.** (1991), Antibióticos antifúngicos: hacia la búsqueda de antibióticos selectivos; *Revista Iberoamer. Micol.* **8**, 28-34.
- San Blas, G.; Niño Vega, G.** (2004), Morphogenesis in *Candida albicans* and in other agents of systemic micoses. En: *Pathogenic fungi. Host Interactions and Emergin Strategies for Control*; San Blas, G; Calderone, R. (eds.), Caister Academic Press (England), 167-220.
- Saral, R.** (1991), *Candida* and *Aspergillus* infections in immunocompromised patients: An overview; *Rev. Infect Dis.* **13**, 487-492.
- Sata, N.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Van Soest, R.** (1999), Aurantósidos D, E, and F: new antifungal tetramic acid glycosides from the marine sponge *Siliquariaspongia japonica*; *J.Nat. Prod.* **62**, 969-971.
- Scarpa, G.** (2004), Medicinal plants used by the criollos of northwestern Argentine Chaco; *J. Ethnopharmacol.* **91**, 115-135.
- Schultes, R., Raffauf, R.** (1992), *The ealing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia*; Dioscorides Press (Portland,Oregon), 360-362.

- Seeligmann, P.;** Roncaglia, R. (1973), Distribution of betacyanins in Argentine species of Centrospermales: I; *Lilloa* **33**, 297.
- Segelman, A.;** Farnsworth, N.R. (1969); Biológico and phytochemical evaluation of plants. IV. A new rapid procedure for the simultaneous determination of saponins and tannins; *Lloydia* **32**, 59-65.
- Seiler, S.;** Palmann M. (2003), The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*; *Mol. Biol. Cell* **14**, 4352-4364.
- Selitreñnikoff, C.** (1983), Use of a temperature sensitive, protoplast-forming *Neurospora crassa* strain for the detection of antifungal antibiotics; *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 757-765.
- Selitreñnikoff, C.** (1992), Screening for antifungal drugs; en: *Biotechnology of filamentous fungi; Technology and products*, Finkelstein, D.; Ball, C. (eds), Butterworth Heinemann (Boston), 189-217.
- Selitreñnikoff, C.** (1995), Antifungal drugs: (1,3) β -glucan-synthase inhibitors; Springer-Verlag (Heidelberg), 1-12.
- Seo, S.;** Tomita, Y.; Trol, K.; Yoshimura, Y. (1978), Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy; *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3331-3339.
- Skehan, P.;** Storeng, R.; Scudeiro, D; Monks, A.; Mc Mahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.(1990), New colorimetric citotoxicity assay for anticancer-drug screening; *J. Nat. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.

- Slalcanin**, I.; Marston, A.; Hostettmann, K. (1988), High-performance liquid chromatographic determination of molluscicidal saponins from *Phytolacca dodecandra*; *J. Chrom.* **448**, 265-274.
- Smirnov**, V.; Bondarenko, A.; Prikhodko, V. (1998), Antimicrobial activity of sesquiterpene phenol from *Bidens cernua*; *Fitoterapia* **69**, 84-85.
- Soejarto**, D.; Gyllenhaal, C.; Ashton, P.; Sohmer, S. (1996), Plant exploration in Asia under sponsorship of the National Cancer Institute, 1986-1991: An overview; en: Medicinal Plant Resources of the tropical forest; Balick, M.J. & Elisabetsky, E. S. A. Laird Eds., Columbia University Press (Nueva York), **21**, 284-310.
- Soejarto**, D.; Gillenhaal, Ch. (1997), Información etnomédica en el descubrimiento y desarrollo farmacéutico, VI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina, Guatemala, Conferencia Plenaria.
- Soman**, A.; Gloer, J.; Koster, B.; Malloch, D. (1999), Sporovexins A-C and a new preussomerin analog: antibacterial and antifungal metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella vexans*; *J. Nat. Prod.* **62**, 659-661.
- Souza Brito**, A.R.M. (1996), How to study the pharmacology of medicinal plants in underdeveloped countries; *J. Ethnopharmacol.* **54**, 131-138.
- Sparg**, S.; Light, M.; Van Staden, J. (2004), Biological activities and distribution of plant saponins; *J. Ethnopharmacol.* **94**, 239-243.
- Spengel**, S.; Schaffner, W. (1993), Esculentoside S. A new saponin from the leaves of *Phytolacca acinosa*; *Nat. Prod. Lett.* **2**, 243-247.

- Spengel, S.**; Luterbacher, S.; Schaffner, W. (1995), New aspects on the chemotaxonomy of *Phytolacca dodecandra* with regards to the isolation of phytolaccagenin, phytolaccagenic acid and their glycosides; *Planta Med.* **61**, 385-386.
- Strauss, A.**; Spengel, S.M.; Schaffner, W. (1995), Saponins from root cultures of *Phytolacca acinosa*; *Phytochem.* **38**, 861-865.
- Strittmater, C.** (1973), Nueva técnica de diafanización; *Bol. Soc. Argent. Bot.* **15**, 126-129.
- Strittmater, C.** (1979), Modificación de una técnica de coloración Safranina – Fast green; *Bol. Soc. Argent. Bot.* **18**, 121-122.
- Strittmater, C.** (1980), Coloración con Violeta de cresilo. *Bol. Soc. Argent. Bot.* **19**, 273-276.
- Suffness, M.**; Pezzuto, J.M. (1991), Assays related to cancer drug discovery; en: *Methods in Plant Biochemistry*; Dey, P.; Harborne, J. (eds). Volume 6: Assays for Bioactivity; Hostettmann, K. (ed.), Academic Press (London), 71-133.
- Suga, Y.**; Maruyama, Y.; Kawanishi, S.; Shoji, J. (1978), Studies on the constituents of Phytolaccaceous plants. I. On the structures of phytolaccasaponin B, E, and G from the roots of *Phytolacca americana* L.; *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 520-525.
- Treyvaud, V.**; Marston, A.; Dyatmiko, W.; Hostettmann K. (2000), Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*; *Phytochem.* **55**, 603-609.
- Tyler, V.**; Lynn, R.; Robbers, J. (1988), Pharmacognosy 9th Edition; Lea & Febiger Press (Filadelfia).
- UICN** (1994), Lista Roja de Categorías (Gland, Switzerland), 22.

- Vanden Berghe**, D.; Vlietink, A. (1991), Screening for antibacterial and antiviral agents; en: *Methods in Plant Biochemistry*. Volumen 6: Assays for Bioactivity; Dey, P.; Harborne, J. (eds.), Academic Press (London) **3**, 52-53.
- Vargas**, L.; Castelli, M.; Kouztnesov, V.; Urbina, J.; López, S.; Sortino, M.; Enriz, R.; Ribas, J.; Zacchino, S. (2003), *In vitro* antifungal activity of new series of homoallylamines and related compounds with inhibitory properties of the synthesis of fungal cell wall polymers; *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 1531-1550.
- Verma**, D.; Tripath, V.; Rana, B.; Taneja, V. (1998), Antifungal activity of triterpenoids from *Lantana indica* root; *Fitoterapia* **69**, 188-189.
- Vicente**, M.; Basilio, A.; Cabello, A.; Peláez, F. (2003), Microbial natural products as a source of antifungals; *Clinical Microbiol. Infection* **9**, 15-32.
- Wagner**, H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. (1984), Plant drug analysis. Springer-Verlag (Berlin), 360.
- Weitzmann**, I., Summerbell, R. (1995), The dermatophytes; *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 240-259.
- WHO**-World Health Organization (1998), Quality control methods for medicinal plant materials, Geneva; WHO Library Cataloguing in Publication Data (England), 1-115.
- Woo**, W.; Kang, S. (1975), The occurrence and chemistry of *Phytolacca* triterpenoids; *J. Pharm. Soc. Korea* **19**, 189-208.
- Woo**, W.; Kang, S. (1976), Phytolaccoside B: triterpene glucoside from *Phytolacca americana*; *Phytochem.* **15**, 1315-1317.
- Woo**, W.; Kang, S. (1977), The structure of Phytolaccoside G; *J. Pharm. Soc. Korea* **21**, 159-162.

- Woo, W.;** Kang, S.; Wagner, H.; Seligmann, O.; Chari, V., (1978), Triterpenoid saponins from the roots of *Phytolacca americana*; *Planta Med.* **34**, 87-92.
- Woo, W.;** Kang, S.; Seligmann, O.; Chari, M.; Wagner, H. (1980), The structure of new lignans from the seeds of *Phytolacca americana*; *Tetrah. Lett.* **21**, 4255-4258.
- Wyler, H.;** Dreiding, A.S. (1961), Ueber betaciane, die Stichstoffhaltigen Farbstoffe der Centrospermen; *Experientia* **17**, 23-25.
- Yi, Y.** (1991a), A triterpenoid saponin from *Phytolacca esculenta*; *Phytochem.* **30**, 2552-2554.
- Yi, Y.** (1991b), A triterpenoid and its saponin from *Phytolacca esculenta*; *Phytochem.* **30**, 4179-4181.
- Yi, Y.** (1992), 2 New saponins from the roots of *Phytolacca esculenta*; *Planta Med.* **58**, 89-101.
- Yi, Y.;** Dai, F. (1991), A new triterpenoid and its glycoside from *Phytolacca esculenta*; *Planta Med.* **57**, 162-164.
- Yoshida, Y.** (1988), Cytochrome P-450 of fungi: primary target for azole antifungal agents; en: *Current topics in Medical Mycology*, Mc Ginnis, M. (ed.), Springer-Verlag (Nueva York), 388.
- Yue-Zhong, S.** (1998), Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective; *J. Nat. Prod.* **61**, 1053-1071.
- Zacchino, S.;** Rodríguez, G.; Pezzenati, G.; Orellana, G.; Enriz, R.; Gonzalez Sierra, M. (1997), *In vitro* evaluation of antifungal properties of neolignans-8.O.4'; *J. Nat. Prod.* **60**, 659-662.

Zacchino, S.; López, S.; Pezzenati, G.; Furlan, R.; Santecchia, C.; Muñoz, L.; Giannini, F.; Rodríguez, A.; Enriz, R. (1999), *In vitro* evaluation of antifungal properties of phenylpropanoids and related compounds acting against dermatophytes. *J Nat Prod* **62**, 1353-1357.

Zacchino, S.; Yunes, R.; Cechinel Filho, V.; Enriz, D.; Kouznetsov, V.; Ribas, J.C. (2003), The need for new antifungal drugs: Screening for antifungal compounds with a selective mode of action with emphasis on the inhibitors of the fungal cell wall; en: *Plant-Derived Antimycotics Current Trends and Future Prospects*; Rai, M.; Mares, D. (eds.), Haworth Press (Nueva York), 1-47.

Zemek, J.; Kosikova, B.; Augustin, J.; Koniak, D. (1979), Antibiotic Properties of Lignin Components; *Folia Microbiol.* **24**, 483-486.

Zuloaga, F.; Morrone, O. (1996), Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina, I; Missouri Botanical Garden Press, St. Luis (Missouri, USA), 1-323.

Zuloaga, F.A.; Morrone, O. (1999a), Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina, II; Hollowell, V.C. (ed.), Missouri Botanical Garden Press, St. Luis (Missouri, USA), 1-1170.

Zuloaga, F.A.; Morrone, O.; Rodríguez, D. (1999b), Análisis de la biodiversidad en plantas vasculares de la Argentina; *Kurtziana* **27**, 17-167.