

Fraccionamiento bioguiado del
extracto hidro-etanólico de
Aristeguietia glutinosa Lam. y
elucidación estructural de los
principios activos anti-*Trypanosoma*
cruzi

Tesina de grado en Bioquímica

Javier Varela Ubillos

Tutores:

Dr. Hugo Cerecetto, Dra. Mercedes González

**Grupo de Química Medicinal,
Laboratorio Química Orgánica,
Facultad de Ciencias-Facultad de Química
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay**

Julio, 2011

Índice

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Enfermedad de Chagas	1
1.3. Plantas Medicinales	3
1.4. <i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam. (‘Matico’)	3
1.4.1. Aspectos taxonómicos	4
1.4.2. Descripción botánica	4
1.4.3. Propiedades y usos	5
1.4.4. Estudios previos relacionados con compuestos aislados de Matico	5
2. Objetivos	6
2.1. Objetivo general	6
2.2. Objetivos específicos	6
3. Procedimientos experimentales	6
3.1. Preparación del extracto	6
3.2. Fraccionamiento bioguiado	7
3.3. Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti- <i>T.cruzi</i>	8
3.4. Ensayo de hemólisis	9
3.5. Elucidación estructural	9
3.5.1. Espectroscopía resonancia magnética nuclear	9
3.5.2. Espectroscopía ultravioleta	10
3.5.3. Espectroscopía infrarroja	10
3.5.4. Espectrometría de masas	10
3.5.5. Reacciones químicas	11
3.6. Determinación del poder rotatorio específico	11
4. Resultados	12
4.1. Fraccionamiento bioguiado	12

4.2. Elucidación estructural	14
4.2.1. Espectroscopía resonancia magnética nuclear	14
4.2.2. Espectroscopía ultravioleta	17
4.2.3. Espectroscopía infrarroja	17
4.2.4. Espectrometría de masas	18
4.2.5. Reacciones químicas	19
4.3. Poder rotatorio específico	19
5. Discusión	20
5.1. Fraccionamiento bioguiado	20
5.2. Elucidación estructural	21
5.2.1. Espectroscopía resonancia magnética nuclear	22
5.2.2. Reacciones químicas	32
5.2.3. Espectroscopía ultravioleta	34
5.2.4. Espectroscopía infrarroja	34
5.2.5. Espectrometría de masas	35
5.2.6. Actividad óptica de las fracciones aisladas	37
5.3. Diterpenos tipo copalano	37
6. Conclusiones	40
7. Bibliografía	41
8. Agradecimientos	45
9.1. Anexo I	46
9.2. Anexo II	50

Abreviaturas

Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de Etilo
ATP	Adenosintrifosfato
Bnz	Benzimidazol
CcCLS	ADNc específico de tricoma de <i>Cistus creticus</i>
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
COSY	Acrónimo del inglés de <i>correlation spectroscopy</i>
DEPT	Acrónimo del inglés de <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EP	Éter de petróleo (destilado entre 60-70 °C)
Et ₃ N	Trietilamina
EtOH	Etanol
FM1	Fracción metanólica uno
FM2	Fracción metanólica dos
FM3	Fracción metanólica tres
FPP	Farnesil pirofosfato
GGDP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
HSQC	Acrónimo del inglés de <i>heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
HMBC	Acrónimo del inglés de <i>heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy</i>
HPLC	Acrónimo del inglés de <i>high-performance liquid chromatography</i>
IPP	Isopentenil pirofosfato
IR	Infrarrojo
Lam.	La abreviatura Lamarck se emplea para indicar a Jean-Baptiste Lamarck como autoridad en la descripción y taxonomía en zoología
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
MVA	Ácido meválonico
Nfx	Nifurtimox
NOE-diff	Acrónimo del inglés de <i>nuclear Overhauser effect difference spectroscopy</i>
NOESY	Acrónimo del inglés de <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
PBS	Acrónimo del inglés de <i>phosphate buffered saline</i>

PP	Pirofosfato
RMN	Resonancia magnética nuclear
TLC	Acrónimo del inglés de <i>thin layer chromatography</i>
UV	Ultravioleta

Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es una endemia ampliamente difundida en América Central y del Sur que genera graves problemas sanitarios, económicos y sociales en los países afectados. A más de un siglo de su descubrimiento, esta patología compromete la salud de un gran número de habitantes en Latinoamérica, no existiendo hasta el momento fármacos completamente efectivos para su tratamiento. Esta investigación busca posibles nuevos agentes anti-*T. cruzi*, provenientes de una planta medicinal, que puedan proveer tratamientos eficaces y seguros para la enfermedad.

Se encontró que el extracto hidro-etanólico de las sumidades floridas y foliáceas de *Aristeguietia glutinosa* Lam. ('Matico') presenta actividad anti-*T. cruzi* ($CI_{50} = 19.6 \mu\text{g/mL}$). Se realizó el fraccionamiento bioguiado del extracto hidro-etanólico donde primero se obtuvo una fracción diclorometánica que conserva la actividad antiproliferativa ($CI_{50} = 26.3 \mu\text{g/mL}$). Ésta se fraccionó en una componente metanólica y una *n*-hexánica, ambas con interesantes actividades anti-*T. cruzi*, $CI_{50} = 25.5$ y $31.1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. De la fracción metanólica, fracción que muestra mayor actividad, se aislaron dos compuestos puros con relevante actividad anti-*T. cruzi*. La elucidación estructural de los mismos, por combinación de técnicas espectroscópicas, indicó que se trata de diterpenos tipo copalanos, específicamente labd-7-en-13,12-ólido y 12-hidroxi-labd-7-en-13-al. Este último es el compuesto con mayor actividad anti-*T. cruzi* aislado del extracto hidro-etanólico de *Aristeguietia glutinosa* Lam. ($CI_{50} = 3.0 \mu\text{g/mL}$, $12.0 \mu\text{M}$) presentando, además una mayor selectividad hacia el parásito, índice de selectividad *T. cruzi*/glóbulos rojos humanos para el compuesto 2.2 vs < 0.6 para el extracto entero. Por otro lado, esta es la primera vez que se describe el aislamiento de 12-hidroxi-labd-7-en-13-al de la naturaleza.

Los resultados obtenidos muestran que las hojas de *Aristeguietia glutinosa* Lam. pueden ser una fuente de nuevos fármacos con actividad antiprotozoaria. Sin embargo, estudios adicionales *in vitro* e *in vivo* son necesarios para validar el uso de Matico en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

1. Introducción

1.1. Antecedentes

Este trabajo forma parte de una investigación que nace en el hallazgo de la actividad anti-fúngica [1] del extracto hidro-etanólico de *Aristiguieta glutinosa* Lam. ('Matico') por el grupo ecuatoriano de la Dra. Ximena Chiriboga (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador). Matico es una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional ecuatoriana desde hace ya muchos años [2]. El grupo de la Dra. Chiriboga en Ecuador ha estudiado las propiedades farmacológicas de Matico desde comienzos de la década del 90, especialmente orientado hacia el estudio de las actividades anti-viral y antiinflamatoria [3,4]. En las líneas de trabajo de la Dra. Chiriboga se incluye la componente de costumbres ancestrales, trabajando en la profundidad del Amazonas Ecuatoriano, interaccionando con los grupos de indígenas cuya práctica habitual es el uso de plantas medicinales. De ahí que más recientemente, a partir de la información tradicional, el grupo de Chiriboga, al igual que otros grupos en el mundo [5], identificó que el extracto hidro-etanólico de las sumidades floridas y foliáceas de Matico poseen importantes propiedades antivirales, antibacteriales y antifúngicas [1,3]. Dado que numerosos agentes antifúngicos han sido descritos como potentes inhibidores del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el agente responsable de la enfermedad de Chagas [6], se pensó que el extracto hidro-etanólico de Matico podría ser un buen agente para inhibir el crecimiento de este parásito. Así, en el Grupo de Química Medicinal, Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-Facultad de Química, Universidad de la República (Montevideo, Uruguay) se evaluó dicho extracto frente a la forma epimastigote de *T. cruzi*, encontrando que el mismo presenta una relevante actividad antiproliferativa, con un porcentaje de inhibición de crecimiento del 50% a una concentración de 18.3 µg/mL (CI₅₀) [7].

1.2. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es provocada por el protozoario flagelado *T. cruzi*. Se transmite a los humanos por picaduras y la concomitante defecación del insecto vector *Triatoma infestans* ('vinchuca'), que lleva el parásito en sus heces contaminadas. Otras vías de transmisión son la transfusión sanguínea o la infección sanguínea desde la madre infectada a su hijo, o la vía oral por ingestión de alimentos contaminados con parásitos [8]. Se trata de una endemia que afecta a millones de personas generando problemas sanitarios, económicos y sociales en los países afectados [9], está ampliamente difundida en América Central y del Sur, afectando a 21 países en la región. Se ha estimado que la enfermedad afecta entre 9.8 y 11.0 millones de habitantes, mientras que 60.0 millones están en riesgo [10]. Esto

obedece a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo o a la residencia en zonas endémicas.

A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileño que la descubrió en 1909, todavía no se dispone de una quimioterapia eficaz para todas las formas clínicas de la enfermedad [9]. Al igual que otras enfermedades olvidadas, es un importante problema de salud como consecuencia de la terapia inadecuada y la falta de una vacuna eficaz [11]. A pesar de los datos reveladores de la situación actual no ha recibido suficiente atención por parte de la industria farmacéutica, principalmente debido a consideraciones económicas. Los actuales tratamientos farmacológicos se basan en dos compuestos (Figura 1): nifurtimox (Nfx, *N*-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina, Lampit[®], recientemente suspendida la producción y venta por parte de la compañía Bayer) y benznidazol (Bnz, *N*-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, Rochagan[®], Roche, ahora producido por LAFEPE en Brasil) descubiertos empíricamente hace más de tres décadas atrás. Estos medicamentos son nitroheterociclos que presentan efectos secundarios significativos, por ejemplo, Nfx puede causar la pérdida de peso, erupción cutánea, psicosis, leucopenia, neurotoxicidad, neuropatía periférica, alteraciones del tejido, náuseas y vómitos. Por otra parte, Bnz puede provocar edema, fiebre, erupción cutánea, neuropatía periférica, linfadenopatía, agranulocitosis, púrpura trombocitopénica, dolor articular y muscular. El uso de estos fármacos durante la fase aguda de la enfermedad es ampliamente aceptado, pero su eficacia en la fase crónica es controversial [12].

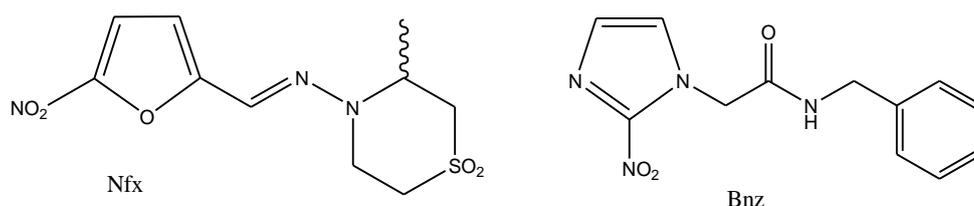


Figura 1 – Estructuras químicas de los fármacos Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Bnz).

La química médica de la enfermedad de Chagas ha utilizado diferentes aproximaciones en la búsqueda de nuevas entidades terapéuticas. Unas orientadas al desarrollo químico (síntesis) de nuevos agentes con mecanismos de acción particulares, como por ejemplo inhibición de rutas biosintéticas específicas del parásito, inhibición o interacción con biomoléculas claves para el parásito, o producción de especies tóxicas [13,14]. Otras estrategias han estado orientadas a la identificación y aislamiento de nuevos agentes de origen natural [15].

A pesar de estos esfuerzos, aún es de suma importancia el trabajo de investigación en esta área médica olvidada con el objetivo de encontrar nuevas soluciones a un problema que no parece tener fin [12]. Esta investigación busca respuestas en la naturaleza y siempre recuerda la motivación primaria: que las personas afectadas carentes de los recursos necesarios encuentren en su hábitat natural plantas medicinales que provean un posible tratamiento avalado por la ciencia, eficaz y sin efectos secundarios.

1.3. Plantas Medicinales

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban. Este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia. Sin los recursos que le ofreció la naturaleza, el ser humano no hubiera sobrevivido. Gradualmente el ser humano, al dominar la naturaleza, ha roto muchos de los lazos que lo unen a ella. Hoy la medicina se vale de fármacos sintéticos para aliviar todas las enfermedades. Muchos de estos fármacos son benéficos, pero también muchos, por mal uso o abuso, han perdido su eficacia y en incontables casos provocan efectos secundarios nocivos [16,17].

En los países latinoamericanos el uso de plantas medicinales es la práctica habitual de los grupos indígenas y es frecuentemente utilizado por ciertos sectores de la sociedad [18]. Esta práctica suele ser una alternativa económica a los precios impuestos por las industrias farmacéuticas y en muchos casos la única posibilidad de tratamiento [18,19].

La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples, debido a la presencia de más de un principio activo. Estos últimos corresponden a compuestos químicos propios de la planta, que están sometidos a variables, tales como humedad del suelo, condiciones de luz, temperatura, fecha de siembra y cosecha, condiciones de secado, entre otros [20].

Afortunadamente en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza, y por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar nuestras afecciones [16].

1.4. *Aristeguietia glutinosa* Lam. (‘Matico’)

Dado que en la presente tesina de grado se ha trabajado con el extracto hidro-etanólico de Matico, a continuación se describirán algunos aspectos botánicos de dicha planta.

1.4.1. Aspectos taxonómicos [21].

Reino: Plantae

División: Magnoliopsida

Especie: *Aristeguietia glutinosa* Lam. o *Eupatorium glutinosum* Lam.

Nombre común: Matico, Yerba del soldado, Chuzalongo, Matigo, Migla

1.4.2. Descripción botánica

Se trata de arbustos perennes que alcanzan una altura de 1 a 3 m. Presentan ramas grises (Figura 2a), hojas aromáticas, opuestas de color verde brillante, de 7 a 10 cm de largo por 2.5 a 3.5 cm de ancho, de base cordada, ápice agudo, margen dentado, haz verrucosa glabra y brillante, y envés tomentoso albescente. Panículas de 10 – 15 cm de longitud por 12 cm de ancho, laxas. Brácteas café oscuras. Las flores son tubulares, en espigas solitarias, de tonalidad fucsia (Figura 2b). El fruto es de color negro y contiene una semilla pequeña oscura en su interior. Cipsela de 2.5 mm de longitud por 1 mm de ancho, glabro de color crema.

Esta planta es nativa de la Sierra del Ecuador, esta especie crece al borde de caminos, entre los matorrales cordilleranos y plantaciones de piretro en la región interandina del Ecuador, entre 3000 a 3700 m sobre el nivel del mar, así como también a la vera de los caminos, como matorrales.

a)



b)



Figura 2 – Aspecto de las sumidades de Matico. **a)** Ramas, hojas y flores. **b)** Detalle.

1.4.3. Propiedades y usos

La medicina tradicional le atribuye propiedades variadas. Las hojas en decocción se usan como cicatrizante en el tratamiento de hemorragias, en lavados antisépticos sobre heridas y en infusión para evacuar cálculos biliares, para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio (antiinflamatorio, expectorante y antitusígeno), en dolencias gastrointestinales (“empacho”, diarreas agudas o crónicas) y tópicamente en infusión de las hojas para hacer gárgaras.

Además es utilizada como emoliente y protector de la piel. El jabón antiséptico de Matico es comercializado con éxito [22].

1.4.4. Estudios previos relacionados con compuestos aislados de Matico

Ha sido descrito el aislamiento de ciertos componentes del extracto metanólico de Matico con actividad antibacteriana. La elucidación estructural determinó que se trataban de diterpenos del tipo copalano (compuestos **A** y **B**, Figura 3) [5]. Existen además otros estudios que resaltan las actividades antifúngica y antibacteriana de extractos obtenidos de *Aristeguietia glutinosa* Lam. donde otros diterpenos de estructura copalano (compuestos **C** y **D**, Figura 3) y ciertos triterpenos (compuestos **E**, **F** y **G**, Figura 3) han sido identificados como los responsables de dicha actividad [2,3,23].

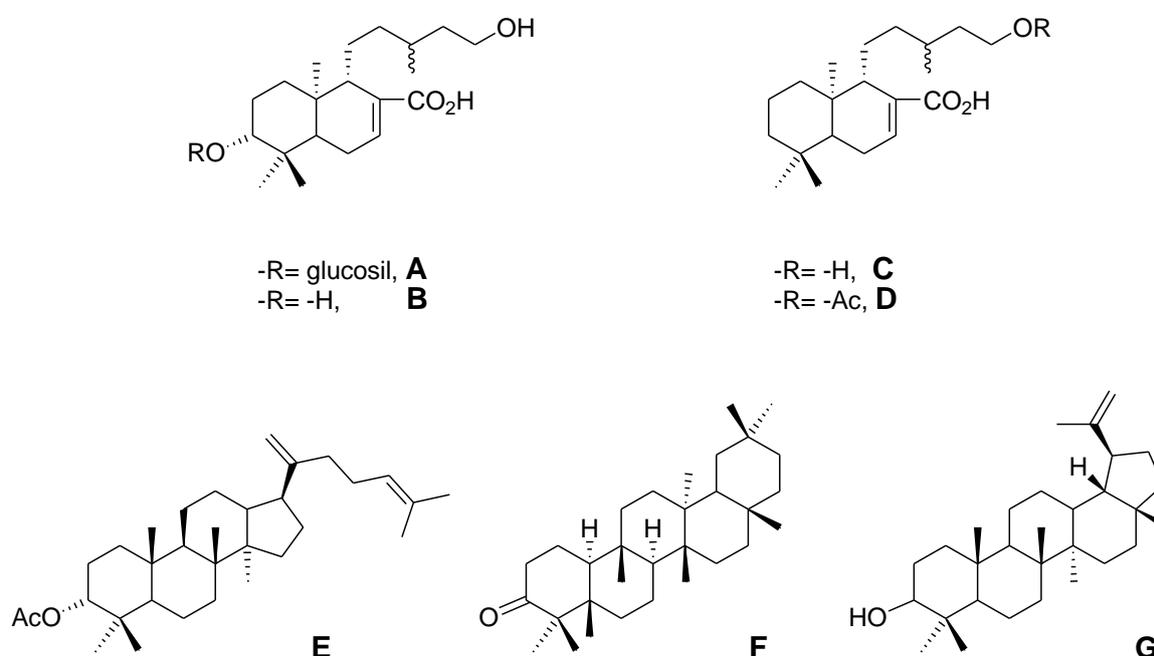


Figura 3 – Estructura química de di y triterpenos aislados de ciertos extractos de Matico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Realizar el fraccionamiento bioguiado del extracto hidro-etanólico de *Aristeguietia glutinosa* Lam. para determinar que compuesto(s) es(son) el(los) responsable(s) de la actividad anti-*T. cruzi*.

2.2. Objetivos específicos

- Aislar y purificar los compuestos que presentan mayor actividad anti-*T. cruzi*.
- Estudiar biológicamente dichos compuestos frente a la forma epimastigote de *T. cruzi* y frente a glóbulos rojos humanos.
- Determinar la estructura química de los compuestos que presentan mayor actividad anti-*T. cruzi*.

3. Procedimientos experimentales

3.1. Preparación del extracto [24]

El extracto hidro-etanólico fue preparado y provisto por la Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central de Quito, Ecuador.

Origen y colecta: Las plantas de matico son cultivadas en los páramos de Pangor, sin utilizar insecticidas químicos. Se recolectan las partes aéreas completamente desarrolladas de la planta.

Preparación del polvo seco: Se procede a seleccionar las sumidades floridas y foliáceas, que son las partes de la planta utilizadas para la extracción. El material vegetal, se seca en forma natural, a la sombra y a temperatura ambiente, para lo cual la planta se extiende sobre telas metálicas que permiten una mayor aireación, en un lugar cerrado, con buena ventilación y evitando el ingreso de agentes que puedan producir cualquier tipo de contaminación, este proceso se lleva a cabo durante un período de tiempo comprendido entre 10 a 14 días. Posteriormente se procede al secado con aire, para lo que se utiliza una estufa industrial a una temperatura de 23 a 30° C, con ventilación forzada e impulsada de aire, de esta manera se garantiza la conservación de los componentes de la planta. Se coloca sobre bandejas con un piso de mallas de acero inoxidable, que permiten un mejor secado, el proceso dura de 18 a 24 h, hasta que el material vegetal tenga una humedad residual máxima del 5 - 8 %. La planta seca se somete a molienda para lo que se emplea un molino excéntrico (Molino triturador de pivotes), hasta reducirla a un polvo fino, con un diámetro de partícula comprendido entre 1 - 2 mm. La planta pulverizada se almacena en

tambores de cartón, en cantidad de 25 Kg, se conserva a temperatura no superior a 25° C y con un máximo de humedad relativa del 60 %.

Preparación del extracto hidro-alcohólico de Matico: Se pesa una cantidad exacta de las sumidades foliaceas secas de la planta previamente pulverizada, se añade alcohol etílico al 72 % (V/V) hasta que tenga una cantidad correspondiente al doble del volumen ocupado por la planta, se somete a agitación por 30 min y se deja macerar por 48 h, se filtra a vacío. El residuo del material vegetal se somete a percolación hasta agotar. El filtrado y percolado se concentran a sequedad a presión reducida, utilizando un evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor de 40 °C.

3.2. Fraccionamiento bioguiado (Esquema) [7,25]

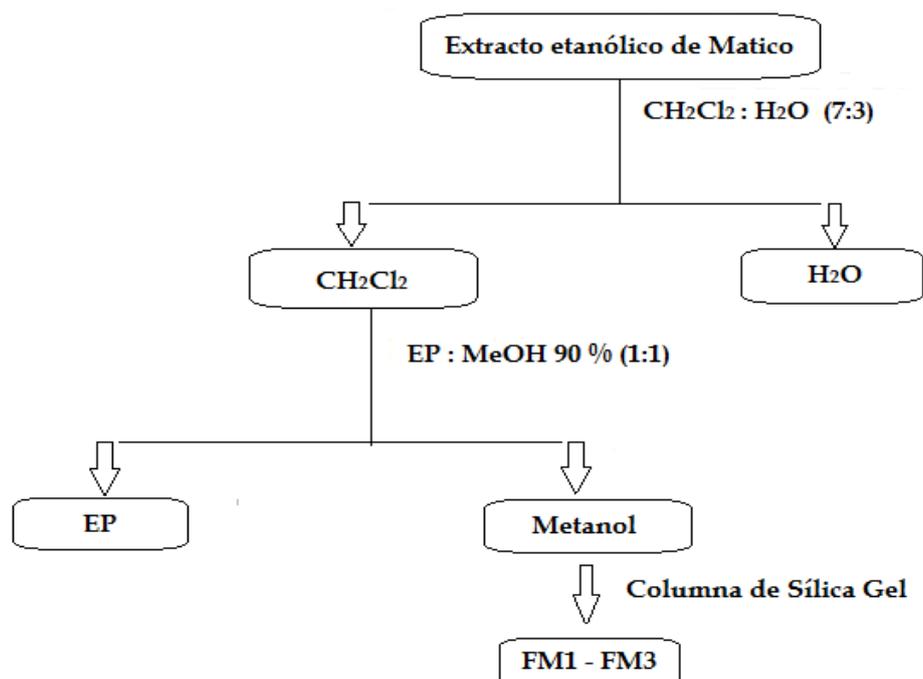
Dos gramos del extracto hidro-etanólico de Matico (obtenido según se describe en el punto anterior) se reparten entre diclorometano (70 mL) y agua destilada (30 mL). La fase orgánica se seca sobre MgSO₄ anhidro y se evapora a presión reducida, utilizando un evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor de 40 °C. La fase acuosa se liofiliza.

A las fracciones obtenidas se les evalúa la actividad anti-*T. cruzi* (ver apartado 3.3.) y se continúa el fraccionamiento con la fracción más activa (residuo de la capa orgánica).

Se realiza el reparto del residuo de la capa orgánica (CH₂Cl₂) en éter de petróleo (EP, fracción 60-70 °C):metanol (10% de agua), 1:1. Las fases se secan sobre MgSO₄ anhidro y se evaporan a presión reducida, utilizando un evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor de 40 °C. El residuo de la fase metanólica se coloca en un desecador a vacío, a temperatura ambiente y protegido de la luz, hasta peso constante.

A las fracciones obtenidas se les evalúa la actividad anti-*T. cruzi* (ver apartado 3.3.) y se continúa el fraccionamiento con la porción más activa (residuo de la capa metanólica).

Se fraccionan por cromatografía en columna de sílica gel (Merck, 60-230 mesh) los componentes de la porción metanólica. El régimen de elución fue el siguiente: 1) montaje de la columna: EP; 2) comienzo de la elución con EP:AcOEt (en cantidades crecientes de AcOEt, 4:1 a 1:1); 3) cambio a EP:AcOEt:CHCl₃ (4:1:1); 4) final de la elución con EP:AcOEt:CHCl₃ (1:1:1). El seguimiento del fraccionamiento se realiza por cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel 60, utilizando la fase móvil EP:AcOEt:CHCl₃ (4:1:1) y revelando con luz UV a 254 nm. Las fracciones de contenido homogéneo, según TLC (FM1, FM2 y FM3, Esquema), se evaporan a presión reducida conjuntamente, utilizando un evaporador rotatorio a vacío a una temperatura no mayor de 40 °C. A las fracciones obtenidas se les evalúa la actividad anti-*T. cruzi* (ver apartado 3.3.).



Esquema del procedimiento realizado en el fraccionamiento bioguiado del extracto hidro-etanólico de *Aristeguetia glutinosa* Lam..

3.3. Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti-*T. cruzi* [26]

Cultivos de *T. cruzi*: Epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2 o Y, se cultivan a 28 °C en medio axénico constituido por una infusión cerebro-corazón (33 g/L), triptosa (3 g/L), hemina (0.02 g/L), D-(+)-glucosa (0.3 g/L), estreptomycin (0.2 g/L) y penicilina (200000 U/L) complementado con 10 % de suero bovino fetal. Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones de aerobiosis. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL).

Ensayo: Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4 millones de células/mL y se inocula 0.6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Las fracciones a evaluar se preparan en una solución stock de DMSO (solución madre de 7.0 mg/mL) y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes (58.7 µg/mL – 48.9 µg/mL – 39.1 µg/mL – 29.3 µg/mL – 19.5 µg/mL – 9.8 µg/mL – 4.9 µg/mL – 2.4 µg/mL). Los parásitos son incubados con las fracciones a 28 °C por 5 días.

El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células [27]. El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calcula como: % = $\{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, donde A_p es A_{610} del cultivo conteniendo

el compuesto al día 5; A0p es A610 del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0); Ac es A610 del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5; A0c es A610 en ausencia del compuesto al día 0. La CI_{50} corresponde a la concentración de fracción capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar Log (concentración) vs. % Inhibición de crecimiento, ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann. Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes.

3.4. Ensayo de hemólisis [28,29]

Se trabaja con sangre anticoagulada con una solución de citrato de sodio (3.8 %). Se centrifuga a 200g, 10 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante y se lava 2 veces con PBS, pH 7.2, enfriado en hielo. Se resuspenden las células en PBS, pH 7.2, para obtener una suspensión 1.5 % peso/volumen de eritrocitos. Se trabaja con 10 tubos cónicos de 1.5 mL, para cada una de las concentraciones, de cada fracción a evaluar. En cada tubo de reacción se colocan 400 µL de la suspensión de eritrocitos. Como control positivo de 100 % hemólisis se utiliza 400 µL de agua milli Q. Como control negativo de lisis se utiliza 400 µL de PBS. Como control de agente hemolítico se utiliza anfotericina B, que produce un 50 % de hemólisis a 1.5 µM en las condiciones del ensayo. Los estudios se realizan por quintuplicado. Para la evaluación de la fracción FM2 se agregan 400 µL de PBS. Se determina la absorbancia de los sobrenadantes en un lector de Elisa EL 301 MICROWELL STRIP READER a 405 nm inmediatamente iniciado el experimento (A0). Los tubos de reacción se incuban a 37 °C durante 24 horas. Transcurridas las 24 horas, se centrifugan a 4 °C y se lee la absorbancia de los sobrenadantes en el lector (A1). Se ajusta el blanco del espectrofotómetro con el control negativo. Los resultados son expresados como porcentaje, y se calcula: $\% = [(A1 - A0) / A1 \text{ agua milli Q}] \times 100$, donde A1: A405 del sobrenadante al día 1, A0: A405 del sobrenadante al día 0 y A1 agua milli Q: A405 del agua milli Q al día 1. Todos los resultados obtenidos son la media de dos experimentos realizados en forma independiente.

3.5. Elucidación estructural

3.5.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear [30]

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizan a 22.16 °C en un equipo Bruker AVANCE DPX-400 que trabaja con el programa Topspin 1.3. Las muestras se preparan en 0.6 mL de $CDCl_3$ (0.05 % de TMS como referencia interna). Los espectros son procesados usando el programa MestRe-C NMR [31]. Los 1H -RMN se adquieren a 400.132 MHz usando un pulso de 90 °, con un tiempo de adquisición de 1.3664 segundos, abarcando un ancho espectral de 14.983 ppm.

Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las multiplicidades se designan como: singulete (s), doblete (d), triplete (t), múltiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt) y señal ancha (sa). Los ^{13}C -RMN se adquieren a 100.033 MHz usando un pulso de 90° , con un tiempo de adquisición de 1.3664 segundos, abarcando un ancho espectral de 14.983 ppm. Para los experimentos de correlación homo y heteronuclear COSY, HSQC y HMBC se utilizan las secuencias de pulsos disponibles en el software del equipo. Experimentos de NOE-diff, NOESY, DEPT90 y DEPT135 disponibles en el software del equipo, fueron realizados para estudiar la estereoquímica de las moléculas.

3.5.2. Espectroscopía Ultravioleta [30]

Los espectros de transmisión en la región ultravioleta se adquieren a temperatura ambiente en un espectrómetro de gota ACTGene (tipo Nanodrop) utilizando cloroformo como disolvente.

3.5.3. Espectroscopía Infrarroja [30]

Los espectros vibracionales en la región del infrarrojo se realizan a temperatura ambiente en un equipo Shimadzu IRPRESTIGE-21. Las fracciones se disuelven en éter sulfúrico y se depositan, por evaporación, en una pastilla pre-fabricada de bromuro de potasio.

3.5.4. Espectrometría de masas [30]

Los análisis de HPLC-MS se realizan en un equipo de HPLC Agilent 1200 equipado con un detector de arreglo de diodos, bomba binaria y columna termostaticada a 40°C , acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 6000 (Bruker Daltonik GmbH). Las muestras se analizan utilizando una columna analítica de fase reversa Zorbax EclipseXDB- C18 (Agilent Technologies) de 150mm largo, 4.6mm de diámetro y $5\ \mu\text{m}$ de tamaño de partícula. La fase móvil consiste en ácido fórmico (10mM en agua ultrapura) (A) y acetonitrilo (B). Las muestras disueltas en metanol se inyectan ($2\ \mu\text{L}$), con una velocidad de flujo de 0.8 mL/min. El método cromatográfico consiste en un gradiente lineal desde 20 a 100% de (B) en 50 min y una etapa isocrática de 100% de (B) por 5 min, seguido de una re-equilibración a 20% de (B), con un tiempo total de corrida de 62 min. Las longitudes de onda de detección son 220, 274, 520 y 650 nm. El análisis en tandem de espectrometría de masas se realiza en trampa de iones con ionización por electrospray, operado en la opción automática MS/MS en modo de ión-positivo. Las condiciones del electrospray son las siguientes: endplate off set voltage -500V, capillary voltage -4000V, nebulización con nitrógeno a 50 psi, secado con nitrógeno a un flujo de 9.0 L/min y una temperatura de 365°C .

3.5.5. Reacciones químicas [32]

Acetilación

Se hace reaccionar 5 mg de la fracción en estudio (FM1 y FM2, cada una por separado) con anhídrido acético (Ac_2O) y trietilamina (Et_3N), 0.3 mL, en un balón protegido del contacto con el oxígeno y la humedad por medio de un codo que contiene cloruro de calcio (CaCl_2). El agregado de los reactivos se realiza en baño de hielo. El proceso transcurre a temperatura ambiente mientras se agita la solución con agitador magnético. El avance de la reacción se monitorea mediante TLC. Para el revelado de las cromatografías se utiliza luz UV a 254 nm y asperjado y posterior quemado con una solución de reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina), reactivo:EtOH:H₂SO₄(c), 1:95:4.

3.6. Determinación del poder rotatorio específico

El poder rotatorio específico (α_D) fue determinado a temperatura ambiente en un equipo P8000 A Kruss Optronic (Software V3.0) utilizando metanol como disolvente y a una concentración de fracción de 5.6 mg/mL para FM1 y de 6.1 mg/mL para FM2.

4. Resultados

4.1. Fraccionamiento bioguiado

El fraccionamiento bioguiado del extracto hidro-etanólico de Matico, según el esquema de la página 8, puede ser tabulado en rendimiento y actividad biológica como se muestra en el Tabla 1. El extracto hidro-etanólico de Matico fue evaluado, inicialmente, frente a dos cepas de *T. cruzi*, las cepa Tulahuen 2 y la cepa Y, observándose similares valores de Cl_{50} para ambas, 19.6 ± 0.9 y $21.8 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por tal motivo, el resto de las muestras del fraccionamiento fueron evaluadas sólo frente a la cepa Tulahuen 2 (Tabla 1, Figura 4).

Fracción	EtOH ^a	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	MeOH	EP	FM1 ^b	FM2 ^b	FM3 ^b
Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^c	19.6 ± 0.9	26.3 ± 4.0	no activa ^d	25.5 ± 3.1	31.1 ± 0.9	15.6 ± 2.9	3.0 ± 0.8	26.7 ± 2.8
Rendimiento (%) ^e	-	93	nd ^f	67	18	2.5	2.5	2.5

^a Extracto original recibido de Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central de Quito (Ecuador). ^b Numeradas de acuerdo al orden de elución. FM1 eluye principalmente con mezcla de EP:AcOEt, FM2 al incrementar la polaridad EP:AcOEt:CHCl₃ (4:1:1) y FM3 lo hace con la fase EP:AcOEt:CHCl₃ (1:1:1). ^c Frente a epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen 2. ^d Cl_{50} superior a $200 \mu\text{g/mL}$. ^e Promedio de tres experimentos independientes. Se calcula a partir de la masa inicial de extracto hidro-etanólico utilizado (2.0 g). ^f nd: no determinado.

Tabla 1 – Resultados de los ensayos biológicos anti-*T. cruzi* de las fracciones obtenidas y rendimientos de las mismas con respecto al extracto hidro-etanólico entero de Matico.

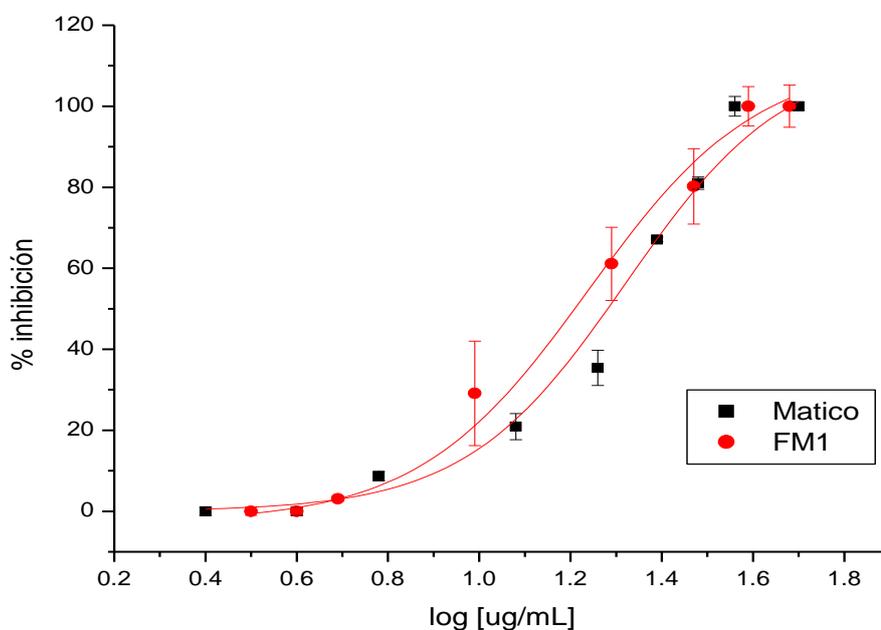


Figura 4a – Curva dosis-respuesta para la actividad antiproliferativa de la fracción FM1 de Matico frente a epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2. En el mismo gráfico se incluye la curva dosis-respuesta del extracto hidro-etanólico entero de Matico.

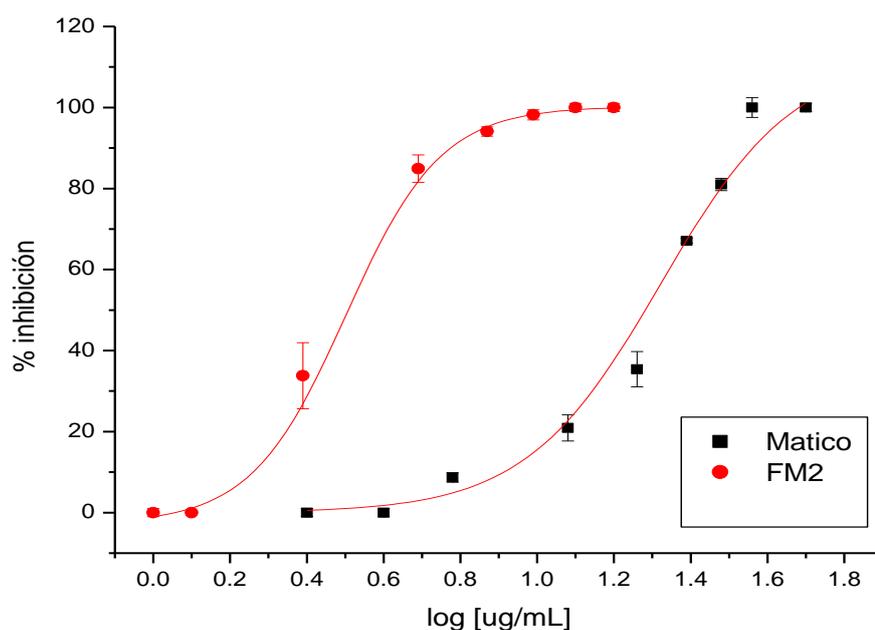


Figura 4b – Curva dosis-respuesta para la actividad antiproliferativa de la fracción FM2 de Matico frente a epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2. En el mismo gráfico se incluye la curva dosis-respuesta del extracto hidro-etanólico entero de Matico.

Por otro lado, como forma de estudiar la selectividad hacia el parásito de la fracción más activa FM2, proveniente de la fracción metanólica, se evaluó la capacidad de la misma en producir lisis de eritrocitos (Tabla 2). Se incluye, además, la medida de la capacidad hemolítica del extracto hidro-etanólico original. Como se observa el índice de selectividad ($IS, CI_{50, \text{eritrocito}}/CI_{50, T. cruzi}$) es favorable hacia el parásito.

Fracción	EtOH ^a	FM2	Anfotericina B
CI ₅₀ ^b	19.6 ± 0.9 µg/mL	3.0 ± 0.8 µg/mL	0.15 ± 0.01 µM
CI ₅₀ eritrocitos ^c	< 12.2 µg/mL ^d	6.5 ± 1.3 µg/mL	1.5 µM
IS ^e	< 0.6	2.2	10.0

^a Extracto original recibido de Escuela de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central de Quito (Ecuador). ^b Frente a epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen 2. ^c CI₅₀ lisis de eritrocitos. ^d A dicha dosis, la menor evaluada, se observa 100% de hemolisis. ^e índice de selectividad $CI_{50, \text{eritrocito}}/CI_{50, T. cruzi}$

Tabla 2 – Resultados de los estudios de selectividad de la fracción FM2 más activa.

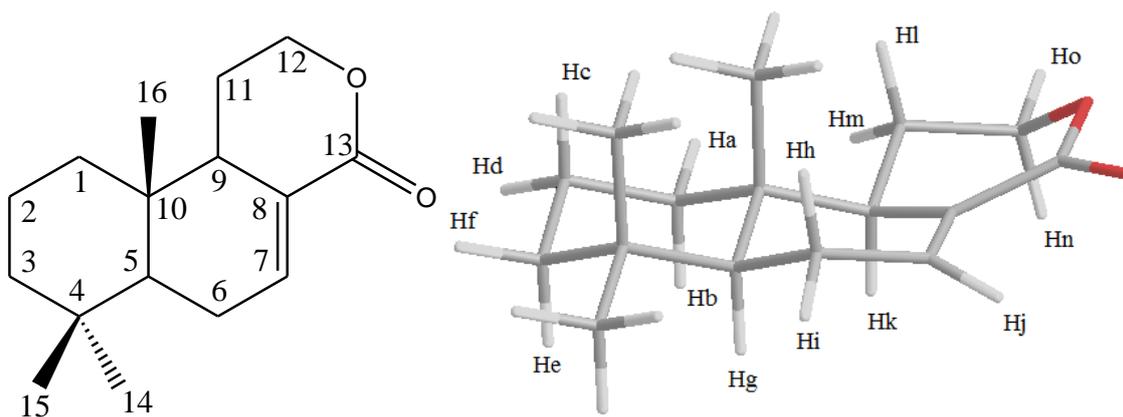
4.2. Elucidación estructural

Como forma de conocer la estructura de los compuestos responsables de la actividad biológica se procedió a realizar los estudios espectroscópicos correspondientes para las dos fracciones más activas, FM1 y FM2.

Para ello, en primera instancia se realizaron los estudios de resonancia magnética nuclear, ^1H , ^{13}C , experimentos bidimensionales homonucleares y heteronucleares. De estos estudios iniciales, se confirmó la pureza de las fracciones aisladas y se propuso estructuras compatibles con los espectros, las cuales se confirmaron con la espectroscopía ultravioleta, infrarroja y de masas.

4.2.1. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

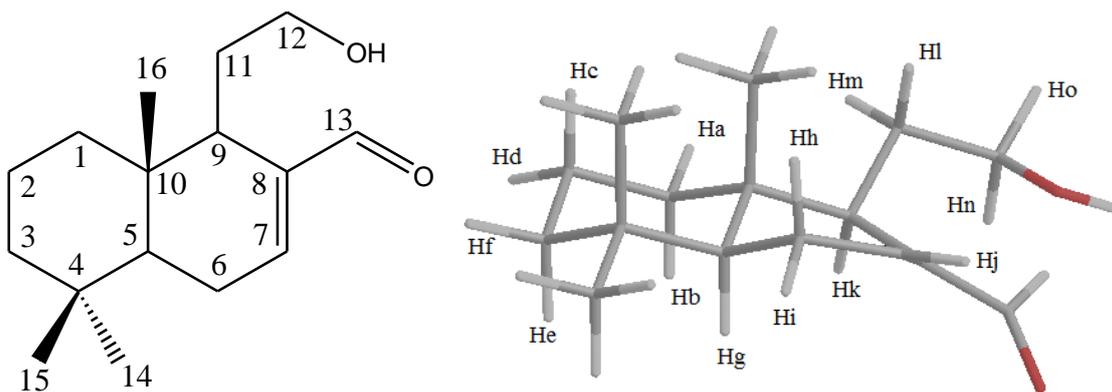
Los experimentos de RMN indican que FM1, ($R_f = 0.41$, SiO_2 , EP:AcOEt:CHCl₃, 4:1:1) aquella fracción de la fase metanólica que eluye en la columna de sílica gel con EP:AcOEt (1:1), resulta ser una lactona diterpénica derivada del sistema copalano (Tabla 3). Mientras que la FM2, ($R_f = 0.22$, SiO_2 , EP:AcOEt:CHCl₃, 4:1:1) aquella fracción de la fase metanólica que eluye en la columna de sílica gel con EP:AcOEt:CHCl₃ (1:1:1), resulta ser un hidroxialdehído diterpénico derivado del sistema copalano (Tabla 4). En el Anexo de la presente memoria se adjuntan los experimentos completos de RMN de la fracción FM1 y FM2 y en el apartado de discusión se expone el procedimiento que llevó a dicha asignación estructural.



¹ H	δ _H (ppm), integración	multiplicidad	<i>J</i> _{H,H} (Hz) ^a	¹³ C	δ _C (ppm)
Hb Ha	1.07, 1H 1.81, 1H	ddd m	<i>J</i> = 4.3 , <i>J</i> = 12.9 , <i>J</i> = 12.7 nd ^b	1	38.6
Hc Hd	1.51, 1H 1.58, 1H	m m	nd nd	2	18.6
He Hf	1.21, 1H 1.49, 1H	m m	nd nd	3	41.9
-	-	-	-	4	34.2
Hg	1.33, 1H	dd	<i>J</i> _{<i>g,i</i>} ^c = 5.0 , <i>J</i> = 12.1	5	48.8
Hh Hi	2.13, 1H 2.39, 1H	ddd dddd	<i>J</i> _{<i>h,j</i>} = 3.0 , <i>J</i> = 4.7 , <i>J</i> _{<i>h,i</i>} = 12.4 <i>J</i> _{<i>i,j</i>} = 3.0 , <i>J</i> _{<i>i,k</i>} = 5.0 , <i>J</i> _{<i>i,g</i>} = 5.0 , <i>J</i> _{<i>i,h</i>} = 12.6	6	25.1
Hj	7.33, 1H	ddd	<i>J</i> _{<i>j,h</i>} = 2.8 , <i>J</i> _{<i>j,i</i>} = 2.8 , <i>J</i> = 5.2	7	143.1
-	-	-	-	8	126.4
Hk	2.22, 1H	dddd	<i>J</i> = 3.0 , <i>J</i> = 4.5 , <i>J</i> _{<i>k,i</i>} = 4.7 , <i>J</i> = 10.1	9	49.7
-	-	-	-	10	39.9
Hl Hm	1.71, 1H 1.77, 1H	dd m	<i>J</i> _{<i>m,o</i>} = 4.2 , <i>J</i> _{<i>m,l</i>} = 12.5 nd	11	22.7
Hn Ho	4.25, 1H 4.46, 1H	ddd ddd	<i>J</i> = 2.2 , <i>J</i> = 2.3 , <i>J</i> _{<i>n,o</i>} = 11.0 <i>J</i> = 2.4 , <i>J</i> _{<i>o,m</i>} = 4.1 , <i>J</i> _{<i>o,n</i>} = 11.0	12	68.5
-	-	-	-	13	165.8
14	0.91, 3H	s	-	14	13.4
15	0.94, 3H	s	-	15	21.5
16	0.79, 3H	s	-	16	32.9

^a Las constantes de acoplamiento determinadas tienen un error de ± 0.4 Hz. ^b El solapamiento de señales no permite determinar las constantes de acoplamiento involucradas. ^c Aquellas constantes de acoplamiento que han sido inequívocamente asignadas son indicadas con subíndices que indican los protones involucrados en las mismas.

Tabla 3 –Estructura propuesta para el compuesto eluido como la fracción FM1 y los resultados de resonancia magnética nuclear (protón y carbono) que dan cuenta de dicha asignación.



¹ H	δ _H (ppm), integración	multiplicidad	<i>J</i> _{H,H} (Hz) ^a	¹³ C	δ _C (ppm)
Hb	1.03, 1H	m	nd ^b	1	38.6
Ha	1.89, 1H	m	nd		
Hc	1.51, 1H	m	nd	2	18.6
Hd	1.58, 1H	m	nd		
He	1.21, 1H	m	nd	3	42.0
Hf	1.49, 1H	m	nd		
-	-	-	-	4	34.2
Hg	1.20, 1H	m	nd	5	49.5
Hh	2.22, 1H	ddd	<i>J</i> _{h,j} ^c = 2.4 , <i>J</i> = 4.1 , <i>J</i> _{h,i} = 12.0	6	25.3
Hi	2.38, 1H	dddd	<i>J</i> _{i,j} = 2.3 , <i>J</i> = 5.2 , <i>J</i> = 5.2 , <i>J</i> _{i,h} = 12.1		
Hj	6.81, 1H	ddd	<i>J</i> _{j,h} = 2.4 , <i>J</i> _{j,i} = 2.4 , <i>J</i> = 5.1	7	152.6
-	-	-	-	8	144.8
Hk	1.95, 1H	m	nd	9	50.8
-	-	-	-	10	39.9
Hl	1.32, 1H	m	nd	11	24.5
Hm	1.65, 1H	m	nd		
Ho	3.70, 1H	ddd	<i>J</i> = 6.6 , <i>J</i> = 6.6 , <i>J</i> _{n,o} = 10.6	12	61.2
Hn	3.78, 1H	ddd	<i>J</i> = 6.7 , <i>J</i> = 6.7 , <i>J</i> _{o,n} = 10.7		
Hp	9.39, 1H	s	-	13	195.1
14	0.91 (3H)	s	-	14	13.4
15	0.95 (3H)	s	-	15	21.5
16	0.81 (3H)	s	-	16	32.9

^a Las constantes de acoplamiento determinadas tienen un error de ± 0.4 Hz. ^b El solapamiento de señales no permite determinar las constantes de acoplamiento involucradas. ^c Aquellas constantes de acoplamiento que han sido inequívocamente asignadas son indicadas con subíndices que indican los protones involucrados en las mismas.

Tabla 4 –Estructura propuesta para el compuesto eluido como la fracción FM2 y los resultados de resonancia magnética nuclear (protón y carbono) que dan cuenta de dicha asignación.

4.2.2. Espectroscopía Ultravioleta

Los resultados experimentales de la espectroscopía ultravioleta de ambas fracciones (FM1 y FM2), que se muestran a continuación, resultan ser completamente compatibles con los datos teóricos predichos para un sistema carbonílico- α,β -insaturado.

Valores experimentales

FM1	FM2
$\lambda_{\text{máx}} (\text{CHCl}_3) = 214 \text{ nm}$	$\lambda_{\text{máx}} (\text{CHCl}_3) = 228 \text{ nm}$

Cálculo teórico [30]

FM1	FM2
Fundamental = 193 nm	Fundamental = 207 nm
1 exo = 5	1 α = 10
1 α = 10	<u>1 β = 12</u>
<u>1 β = 12</u>	$\lambda_{\text{máx}} = 229 \pm 5 \text{ nm}$
$\lambda_{\text{máx}} = 220 \pm 5 \text{ nm}$	

4.2.3. Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja de FM1 y FM2 (Tabla 5) confirma los grupos funcionales evidenciados a través de las otras técnicas espectroscópicas.

Fracción	Frecuencias Significativas (intensidad)	Inferencias
FM1	1719 cm^{-1} (fuerte) 1270 y 1253 cm^{-1} (fuerte) 1640 cm^{-1} (fuerte) 1391 y 1367 cm^{-1} (media-fuerte) 1461 cm^{-1} (media)	grupo carbonílico C-O-C C=C conjugado al C=O gem-dimetilo metilo
FM2	1689 cm^{-1} (fuerte) 2850 y 2720 cm^{-1} (débiles) 1630 cm^{-1} (débil) 3200-3600 cm^{-1} (ancha) 1059 cm^{-1} (media) 1380 y 1369 cm^{-1} (media) 1460 cm^{-1} (media)	grupo carbonílico C-H aldehído C=C conjugado al C=O grupo OH alcohol primario gem-dimetilo metilo

Tabla 5 – Resultados obtenidos en espectroscopía Infrarroja de las fracciones FM1 y FM2.

4.2.4. Espectrometría de masas

Los resultados obtenidos en los experimentos confirman el aislamiento y purificación de copal-7-en-13,12-ólido (FM1) y de 12-hidroxicopal-7-en-13-al (FM2). El espectro de masas de la fracción FM1 presenta un pico $[M + H]^+$ de m/z 249.2 (Tabla 6) correspondiente con la fórmula molecular $C_{16}H_{24}O_2$, además se observan los iones m/z de las sales sódica y potásica. Mientras que en el experimento HPLC – MS de la fracción FM2 se obtienen de la cromatografía varios picos (ver discusión) que confirman la estructura propuesta. Claramente uno de los picos del PLC se corresponde a $[M + H]^+$ (m/z 251.1) (Tabla 6).

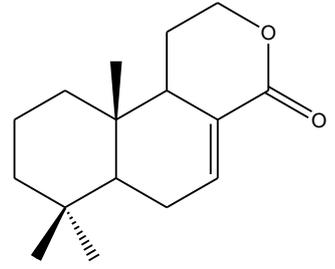
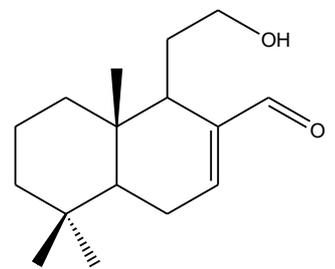
Sustancia	Estructura Química	Formula	PM monoisotópico	Iones observados	Tipo Químico
Fracción metanólica 1		$C_{16}H_{24}O_2$	248.177630	$[M+H]^+=249.2$ $[M+Na]^+=271.2$ $[M+K]^+=287.1$ $[2M+H]^+=497.0$ $[2M+Na]^+=519.3$	Diterpeno copalano
Fracción metanólica 2		$C_{16}H_{26}O_2$	250.193280	$[M+H]^+=251.1$ $[M+Na]^+=273.1$ $[M+K]^+=289.1$	Diterpeno copalano

Tabla 6 – Resultados de los experimentos de espectrometría de masas de las fracciones FM1 y FM2.

4.2.5. Reacciones químicas

En el procedimiento de elucidación estructural de los componentes de FM1 y FM2 surgió la posibilidad de la existencia del grupo alcohol en FM2. Para confirmar la existencia y determinar el número de grupos alcoholes se plantea la realización de una reacción que corrobore, a través de los cambios cromatográficos y espectroscópicos, dicha propuesta. Así, se elige la reacción de acetilación, que es realizada para ambas fracciones. Los resultados se presentan en la tabla 6 y en el apartado de discusión se discute el resultado espectroscópico.

<u>Fracción FM1</u>		
Reactivos	Resultados	Inferencias
Ac ₂ O y Et ₃ N	No hay cambio de color No hay cambio de Rf	No hay grupos -OH libres u otros grupos acetilables

<u>Fracción FM2</u>		
Reactivos	Resultados	Inferencias
Ac ₂ O y Et ₃ N	Se observa cambio de color Aumento del valor de Rf Positivo ^a con reactivo de Brady ^b	Presenta grupos -OH libres u otros grupos acetilables Conserva grupo carbonilo

^a Spot color naranja (a temperatura ambiente). ^b Positivo al asperjar la placa cromatográfica una vez eluida con reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina).

Tabla 7 – Resultados de la reacción de acetilación sobre las fracciones FM1 y FM2.

4.3. Poder rotatorio específico (α_D)

La fracción FM1 desvía la luz polarizada arrojando un valor de $[\alpha]_D^{25} + 19.1$, mientras que la fracción FM2 también desvía la luz polarizada $[\alpha]_D^{25} + 32.4$.

5. Discusión

5.1. Fraccionamiento bioguiado

El trabajo comenzó con la evaluación de la actividad biológica del extracto hidro-etanólico de Matico frente a la forma epimastigote del *Trypanosoma cruzi* en las cepas Tulahuen 2 y Y, dicho extracto presentó una relevante actividad antiproliferativa con CI_{50} de 19.6 ± 0.9 y 21.8 ± 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

Con el objetivo de aislar y purificar los compuestos químicos responsables de la actividad anti-*T. cruzi* se realizó el fraccionamiento bioguiado del extracto hidro-etanólico iniciando con el reparto en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (7:3). Las fracciones obtenidas son sometidas a ensayos de actividad biológica anti-*T. cruzi* donde se obtiene que la capa orgánica (CH_2Cl_2) conserva la capacidad antiproliferativa con un CI_{50} de 26.3 ± 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que la capa acuosa no presenta actividad a las dosis ensayadas (máxima dosis estudiada 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

El fraccionamiento continúa con el reparto de la fracción CH_2Cl_2 en EP:MeOH (10% de H_2O) (1:1) donde se obtienen rendimientos de 67% para la fracción metanólica y 18% para la fracción de EP a partir de la fracción hidro-etanólica (2.0 g). Los ensayos de actividad biológica anti-*T. cruzi* de estas fracciones determinan mayor actividad de la fracción metanólica con un CI_{50} de 25.5 ± 3.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en tanto que la fracción de EP presenta un CI_{50} de 31.1 ± 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El revelado con luz UV de una TLC de la fracción metanólica indica la presencia de tres compuestos, o tres mezclas de compuestos, de polaridad variable (Figura 5). Los componentes que se observan en la TLC, utilizando revelador UV, se logran separar por cromatografía en columna de sílica gel, donde se obtienen tres fracciones metanólicas denominadas FM1, FM2, FM3 según el orden de elución de la columna. El ensayo de actividad anti-*T. cruzi* permite determinar valores de CI_{50} de 15.6 ± 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para FM1, 3.0 ± 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para FM2 y 26.7 ± 2.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para FM3. Por otro lado, FM2 resulta más de dos veces menos tóxica para glóbulos rojos humanos (CI_{50} de 6.5 ± 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo que está mostrando una selectividad particular hacia *T. cruzi*. Cabe destacar que la selectividad hacia el parásito aumenta notablemente una vez realizada la purificación de la fracción FM2 ya que el extracto hidro-etanólico entero de Matico presenta un índice de selectividad menor a 0.6.

Hasta esta instancia, no es posible determinar con exactitud si las fracciones constan de un sólo compuesto o de una mezcla de compuestos, aunque variando la polaridad de la fase móvil y utilizando otros revelados, tales como vapores de yodo o asperjado con una mezcla de anisaldehído:EtOH: H_2SO_4 (c) (1:95:4) y posterior quemado, no se observan nuevas manchas. Por lo que cabe pensar que se obtuvieron fracciones metanólicas puras (un único compuesto para

cada fracción). Con el fin de confirmar la unicidad de las mismas se procedió a la aplicación de técnicas espectroscópicas que permitirán, además, la elucidación estructural de los compuestos activos.

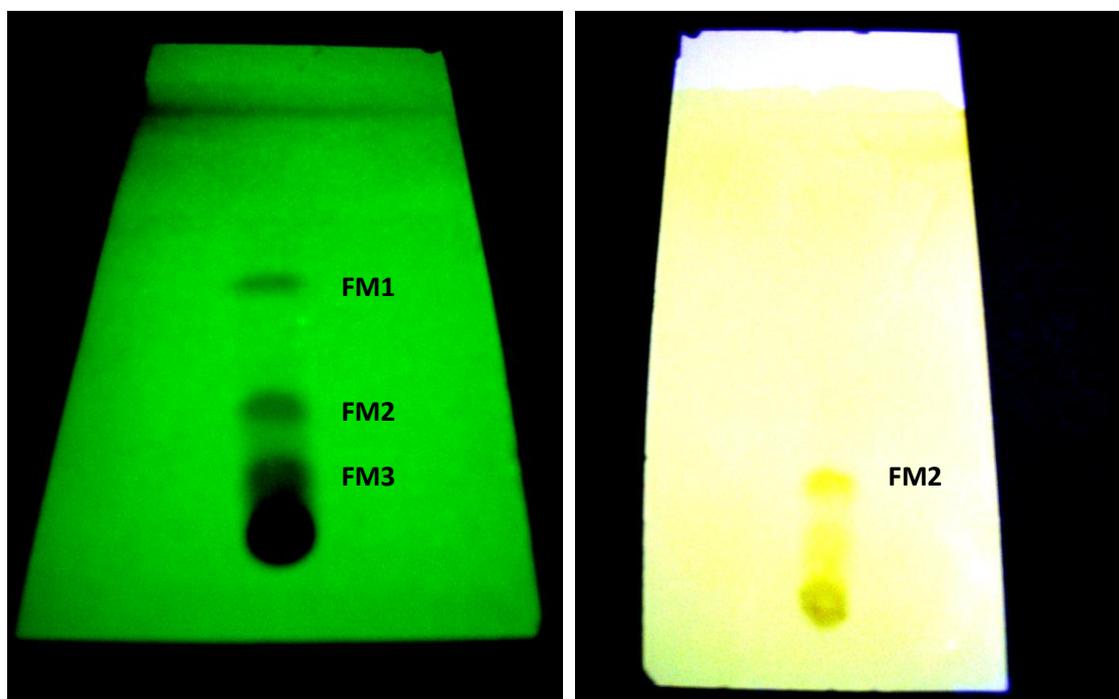


Figura 5 – Fotografía de la TLC (SiO_2 , EP:AcOEt:CHCl₃ (4:1:1)) de la fracción metanólica, revelada con luz UV (izq.) y con reactivo de Brady (der.).

5.2. Elucidación estructural

En el marco de este trabajo se propone la elucidación estructural de los componentes de las fracciones de Matico más activas frente a *T. cruzi* por lo que a continuación se discuten los resultados obtenidos para las fracciones FM1 y FM2, las cuales presentan las mayores actividades antiproliferativa.

El primer dato que se obtiene con respecto a la fracción más activa (FM2) es que el revelado de la TLC con reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina) colorea la fracción de naranja intenso (Figura 5 der.), lo que indica la presencia de un grupo carbonílico (aldehído o cetona) en la molécula. Este revelador no colorea la mancha correspondiente en la fracción FM1 resultado que permitiría descartar la presencia de dicho grupo funcional.

5.2.1. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

El espectro de ^1H RMN de la fracción FM1 presenta señales muy características, las que pueden ser asignadas a tres grupos metilos ($\delta = 0.79$, 3H, s; $\delta = 0.91$, 3H, s; y $\delta = 0.94$, 3H, s) y un¹ hidrógeno olefínico ($\delta = 7.33$, 1H, ddd, $J = 2.8, 2.8, 5.2$). Por otro lado, se observa un número importante de señales que por el tipo de multiplicidad y desplazamiento químico (1.0 – 2.5 ppm) podrían corresponder a protones metilénicos (ver espectro completo en el anexo I de la correspondiente memoria). Adicionalmente, por el tipo de integración y multiplicidad en la región 4.1 – 4.6 ppm aparece un grupo de señales que se podrían corresponder con metilenos unidos a grupos desblindantes (Figura 6).

El desplazamiento químico y la multiplicidad del protón a 7.3 ppm hace pensar en una situación de hidrógeno alquénico expuesto a un entorno químico particular, por ejemplo al efecto de anisotropía magnética de un grupo carbonilo espacialmente próximo.

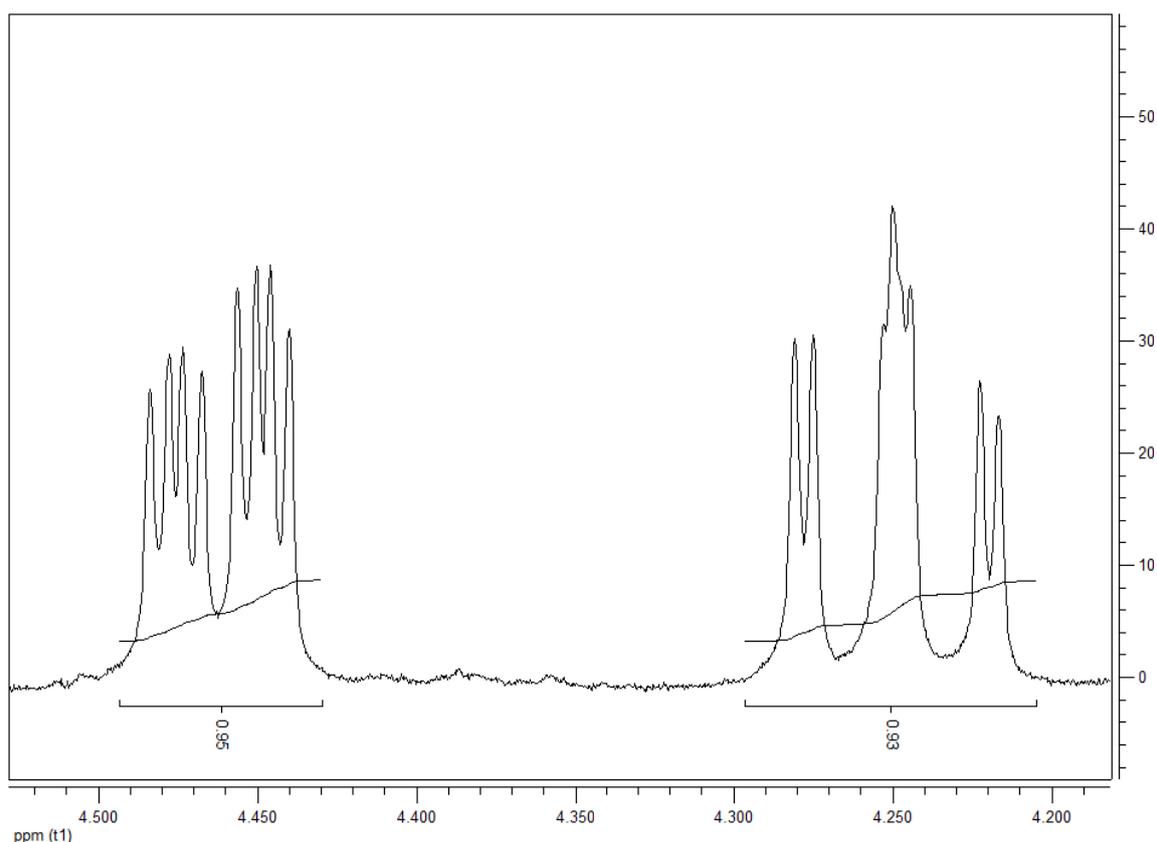


Figura 6 – Señales de los protones unidos a C12 (según denominación usada en Tabla 3, página 15) presente en la fracción FM1.

¹ En ambas fracciones, que poseen un hidrógeno olefínico, el mismo fue utilizado como referencia para la integración de las señales asignándole una integración uno (1).

Partiendo del protón olefínico y a través de los experimentos homonucleares de COSY se determinan los hidrógenos vecinos a dicho protón. Paralelamente, este experimento permite reconocer otros grupos de protones acoplados escalaramente (protones unidos a C1-C2-C3 y protones unidos a C9-C11-C12, según denominación usada en Tabla 3) (Figura 7, página siguiente).

Por otro lado, la información obtenida de los experimentos ^{13}C RMN y DEPT (ver anexo I de la presente memoria) permite inferir que la molécula que compone la fracción FM1 posee tres carbonos metílicos (C14, C15 y C16, Tabla 3, página 15), seis carbonos metilénicos (C1, C2, C3, C6, C11 y C12, Tabla 3, página 15), dos carbonos metínicos (C5 y C9, Tabla 3, página 15), un carbono carbonílico (C13, Tabla 3, página 15), dos carbonos alquénicos (C7 y C8, Tabla 3, página 15) y dos carbonos cuaternarios sp^3 (C4 y C10, Tabla 3, página 15).

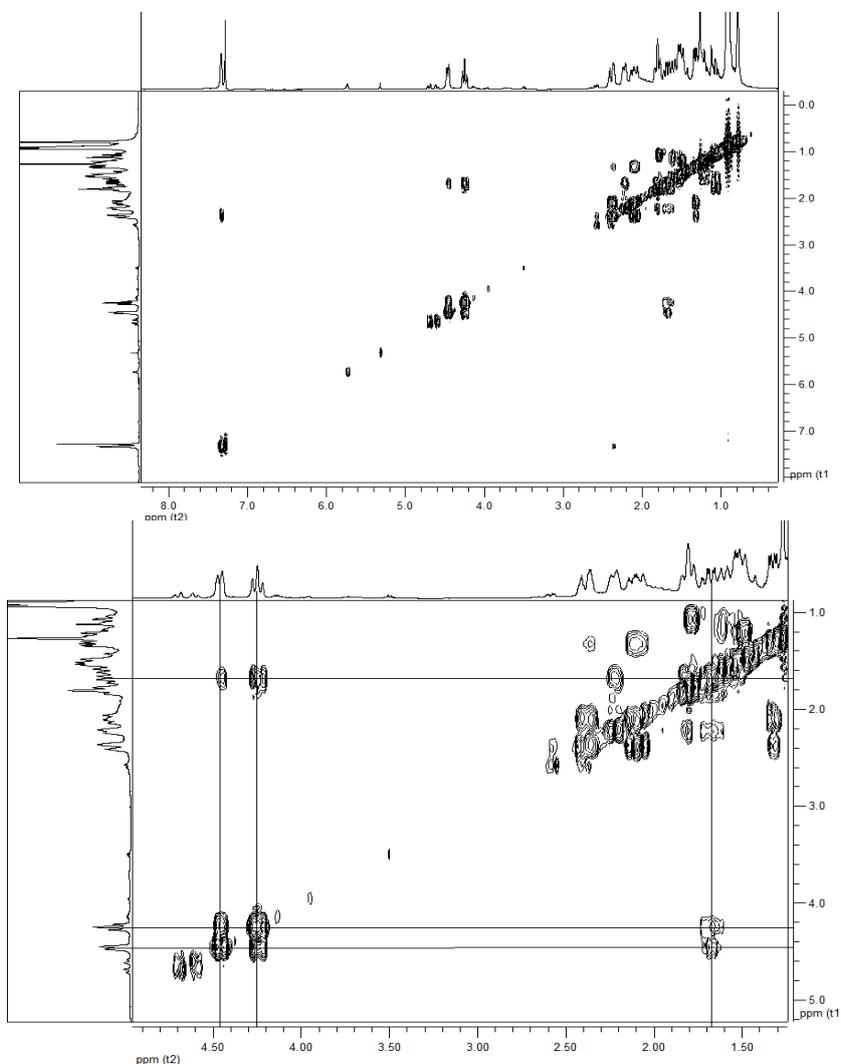
Los estudios heteronucleares, ^1H - ^{13}C (experimentos HSQC y HMBC, ver espectros completos en anexo I), permiten evidenciar, como se observa en la Tabla 3, que todos los grupos metilénicos poseen hidrógenos magnéticamente diferentes, por ejemplo el grupo metileno del C12 (Tabla 3, página 15) con $\delta = 4.25$ (1H, ddd, $J = 2.2, 2.3, 11.0$) y $\delta = 4.46$ (1H, ddd, $J = 2.4, 4.1, 11.0$) (Figura 6). Esto indica, que existe un fenómeno de falta de equivalencia química posiblemente por un tema estereoquímico, o sea los hidrógenos se encuentran ubicados en carbonos con movilidad restringida (estructura cíclica) o próximos a un centro quiral. Finalmente, combinando la información aportada por estas técnicas (HSQC y HMBC, Figura 8, página 25) con los datos de los otros experimentos se llega a que la estructura química del componente de FM1 que es el diterpeno copal-7-en-13,12-ólido.

Finalmente, otro aspecto que restaba confirmar en referencia a la estructura propuesta de la lactona² integrante de FM1 fue la estereoquímica del sistema diterpénico, o sea saber exactamente la distribución espacial relativa de los carbonos cabeza de puente (C5, C9 y C10, según la numeración mostrada en la Tabla 3, página 15). Para ello se realizó un experimento de NOESY, donde se observaron efectos NOE entre las señales: i) de los metilos 16 y 15; ii) de los metilos 15 y 14; iii) del metilo 14 y Hi (asignación según Tabla 3, página 15); iv) del metilo 14 y Hk; v) del metilo 14 y Hb; vi) del Hi y el Hk; vii) del Hk y el Hn (Figura 9, página 26) Debido a que, por los desplazamientos químicos, los protones Hb y Hn son axiales y el protón Hi es ecuatorial se puede proponer que Hk, ubicado sobre uno de los carbonos cabeza de puente, se encuentra en una posición axial (distribución α) y por ende el metilo 16 (ubicado sobre el otro carbono cabeza

² El grupo funcional lactona- α,β -insaturada fue confirmado por las otras técnicas espectroscópicas (UV e IR).

de puente) estaría en una posición β . Al no encontrar efecto NOE entre el metilo 16 y el protón Hg (ubicado en el otro carbono cabeza de puente) hace suponer que la disposición de dicho hidrógeno es α , por lo que ambos anillos de ciclohexano conforman una situación de *trans*-decalina.

a)



b)

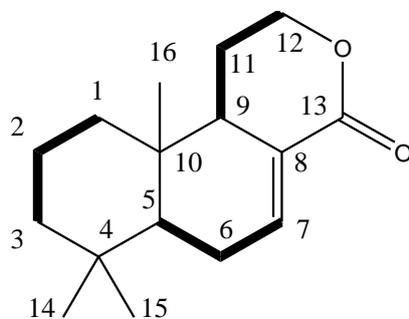
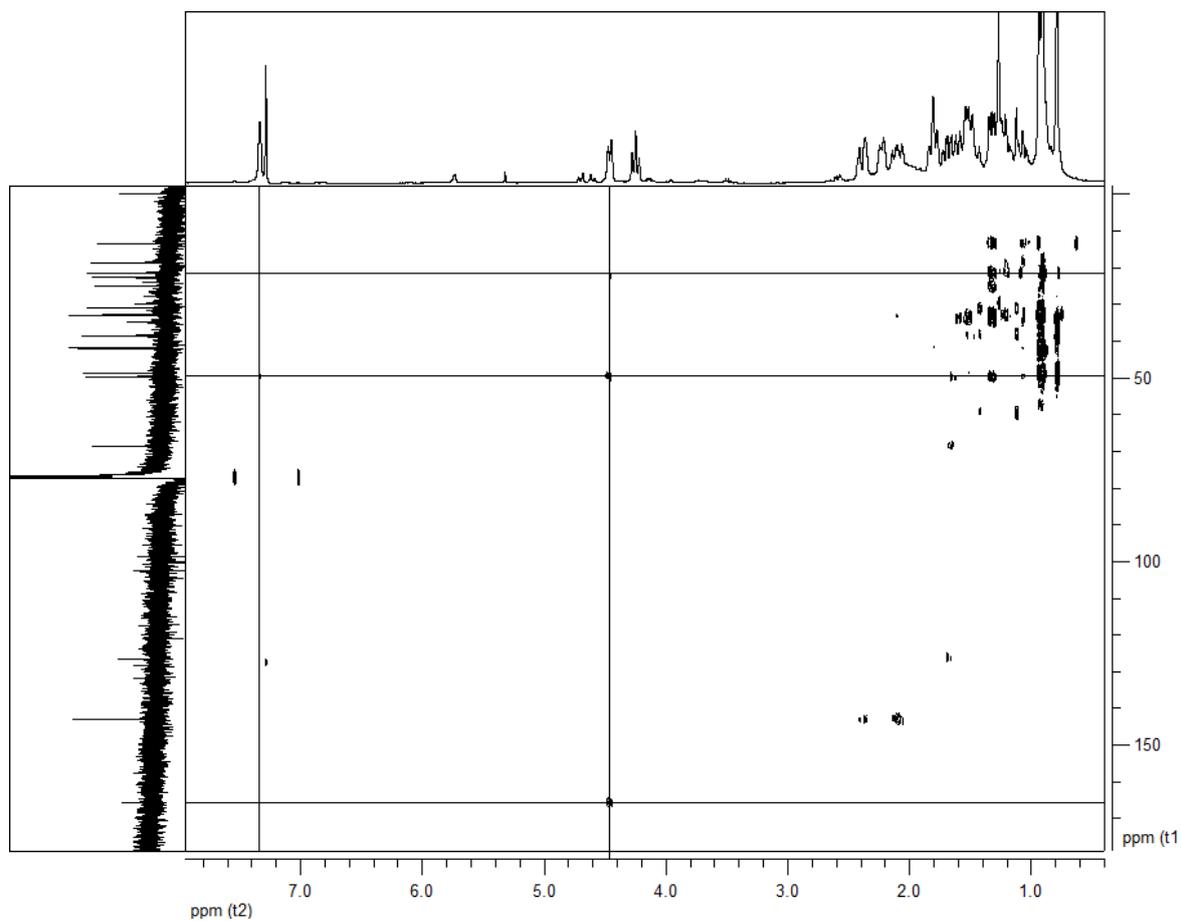


Figura 7 – a) Experimento COSY donde se muestran algunos de los acoplamientos escalares identificados.

b) En línea gruesa se muestran las correlaciones ^1H - ^1H identificadas con este experimento. Nota: se muestra la estructura que fue finalmente elucidada.

a)



b)

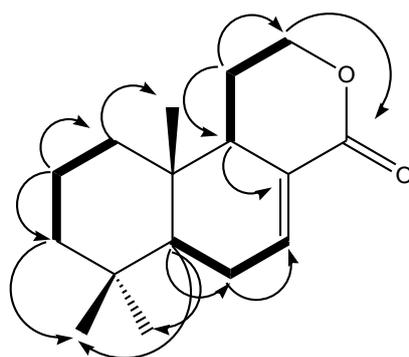
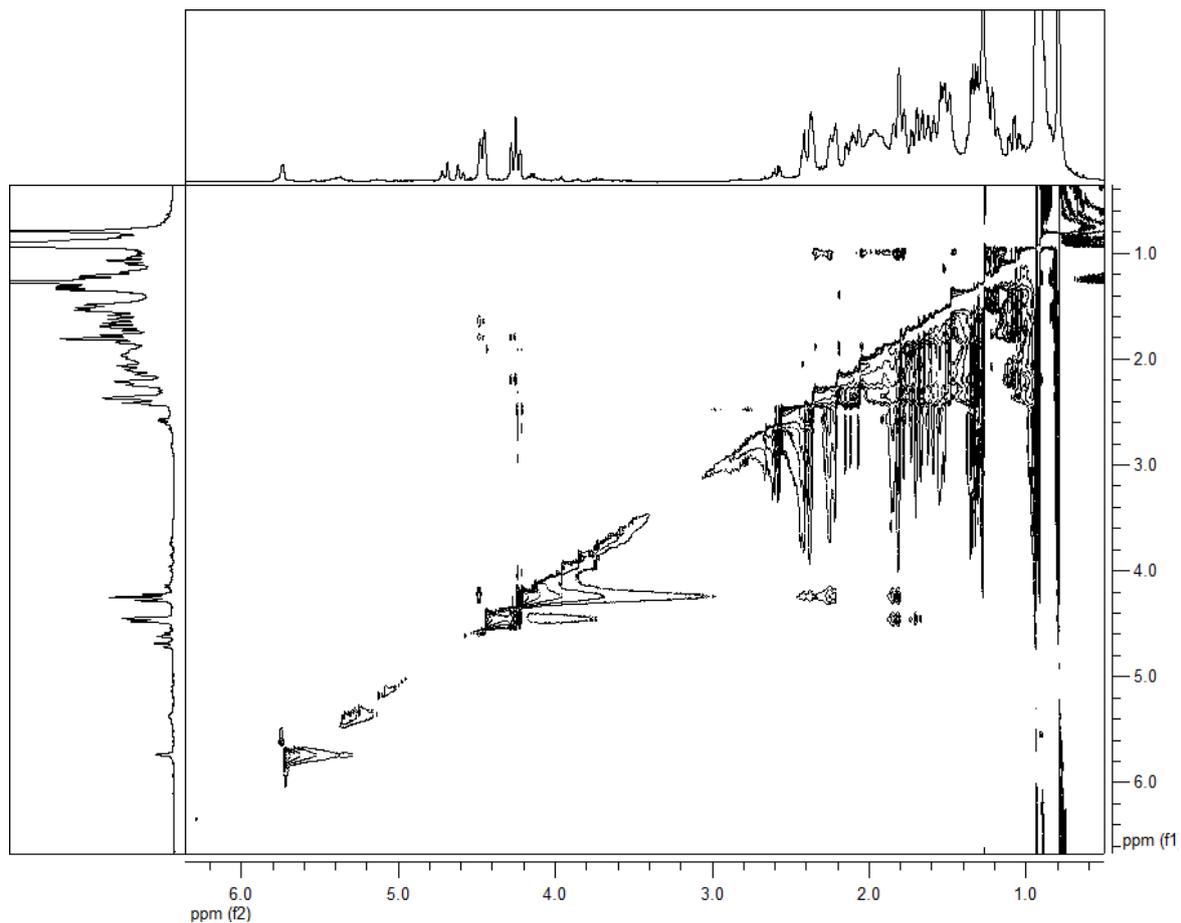


Figura 8 – a) Experimento HMBC de FM1 donde se muestra algunas de las correlaciones observadas en el copal-7-en-13,12-ólido. **b)** Representación gráfica de correlaciones homo y heteronucleares identificadas en FM1. En líneas gruesas se muestran las correlaciones ^1H - ^1H (COSY, Figura 7) y las flechas indican las correlaciones del HMBC útiles para confirmar la estructura.

a)



b)

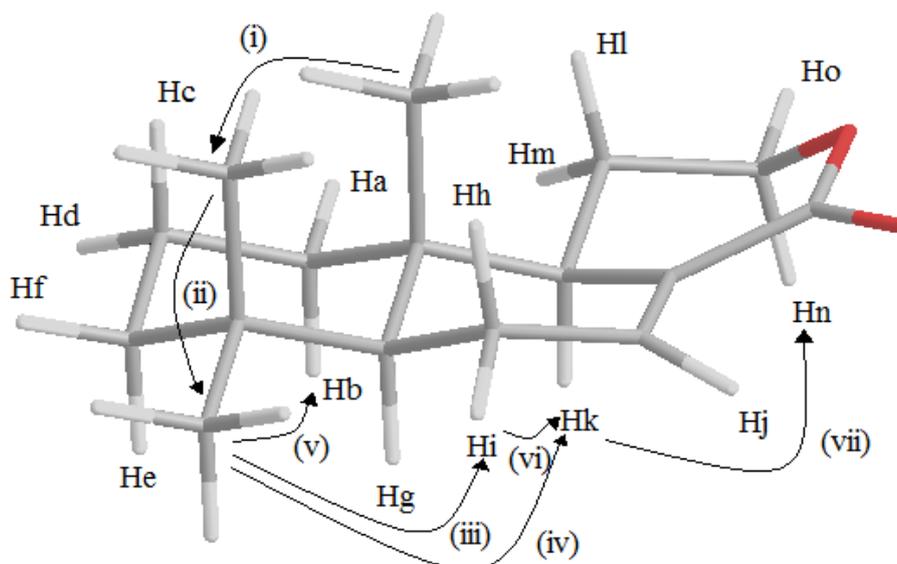


Figura 9 – a) Experimento NOESY de FM1 donde se muestran las correlaciones más relevantes observadas para determinar la estereoquímica de copal-7-en-13,12-ólido. **b)** Representación gráfica de las correlaciones de NOESY útiles para la elucidación estructural marcadas como flechas.

La fracción FM2 presenta patrones muy similares a la fracción FM1, el espectro de ^1H RMN muestra señales muy características, las que pueden ser asignadas a tres grupos metilos ($\delta = 0.81$, 3H, s, $\delta = 0.91$, 3H, s, $\delta = 0.95$, 3H, s), un hidrógeno olefínico ($\delta = 6.81$, 1H, ddd, $J = 2.4$, 2.4, 5.1) y un hidrógeno de grupo aldehído ($\delta = 9.39$, 1H, s). De igual forma que para la fracción FM1, se observa un número importante de señales que por el tipo de multiplicidad y desplazamiento químico (1.0 – 2.5 ppm) podrían corresponder a protones metilénicos (ver espectro completo en el anexo I de la correspondiente memoria). A su vez, también aparece un grupo de señales en la región 3.6 – 3.9 ppm que por el tipo de integración y multiplicidad se podrían corresponder con metilenos unidos a grupos desblindantes (Figura 10).

El desplazamiento químico y la multiplicidad del protón a 6.8 ppm hace pensar en una situación similar a la del hidrógeno alquénico de la fracción FM1, expuesto a un entorno químico particular, por ejemplo al efecto de anisotropía magnética de un grupo carbonilo espacialmente próximo.

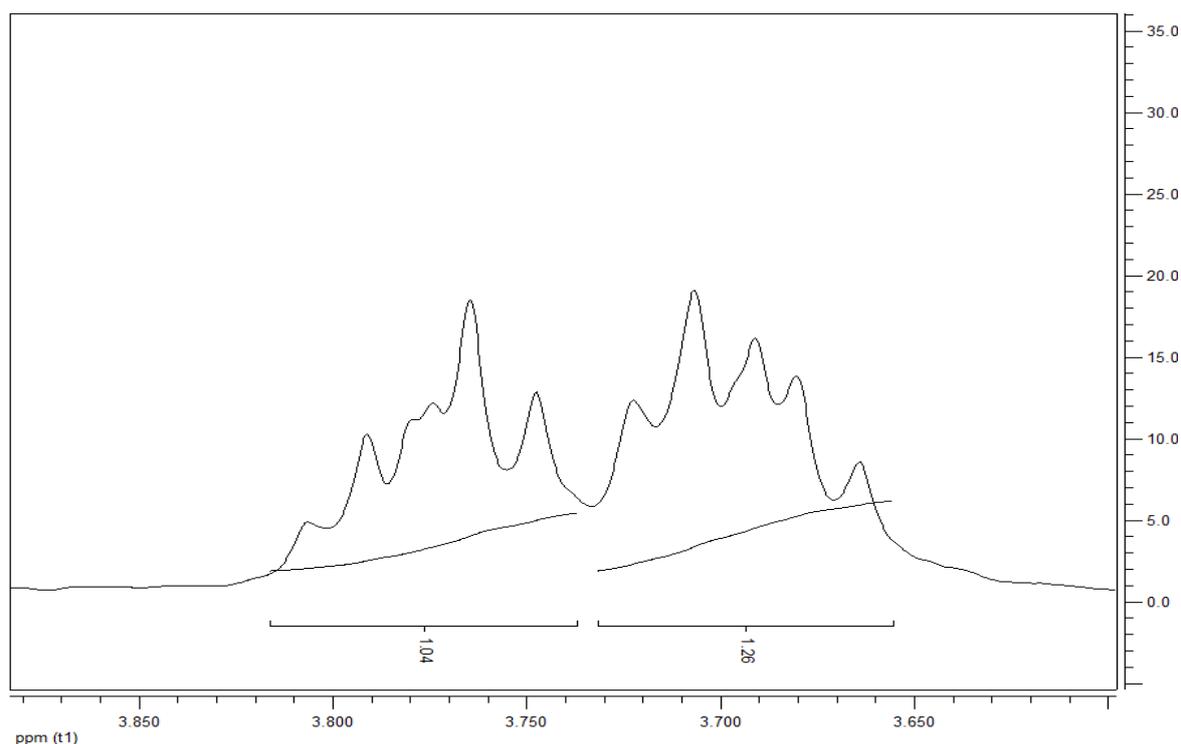


Figura 10 - Señales de los protones unidos a C12 (según denominación usada en Tabla 4, página 16) presente en la fracción FM2.

Partiendo del protón olefínico y a través de los experimentos homonucleares de COSY se determinan los hidrógenos vecinos a dicho protón. Paralelamente, este experimento permite reconocer otros grupos de protones acoplados escalarmemente (protones unidos a C1-C2-C3 y

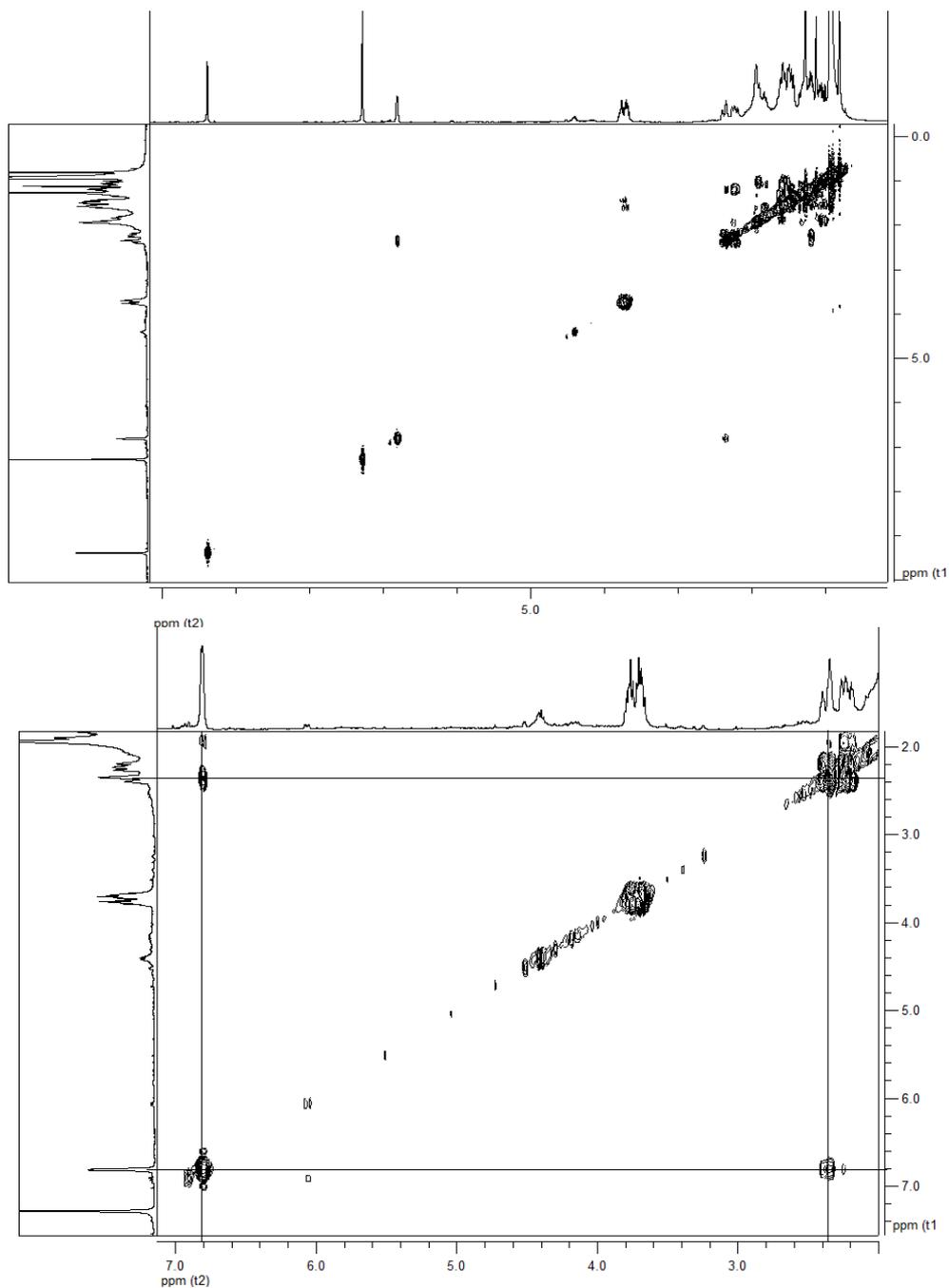
protones unidos a C9-C11-C12, según denominación usada en Tabla 4) (Figura 11, página siguiente).

Por otro lado, la información obtenida de los experimentos ^{13}C RMN y DEPT (ver anexo I de la presente memoria) permite inferir que la molécula que compone la fracción FM2 posee tres carbonos metílicos (C14, C15 y C16, Tabla 4, página 16), seis carbonos metilénicos (C1, C2, C3, C6, C11 y C12, Tabla 4, página 16), dos carbonos metínicos (C5 y C9, Tabla 4, página 16), un carbono carbonílico (C13, Tabla 4, página 16), dos carbonos alquénicos (C7 y C8, Tabla 4, página 16) y dos carbonos cuaternarios sp^3 (C4 y C10, Tabla 4, página 16).

Los estudios heteronucleares, ^1H - ^{13}C (experimentos HSQC y HMBC, ver espectros completos en anexo I), permiten evidenciar, como se observa en la Tabla 4, que todos los grupos metilénicos poseen hidrógenos magnéticamente diferentes, por ejemplo el grupo metileno del C12 (Tabla 4, página 16) con $\delta = 3.70$ (1H, ddd, $J = 6.6, 6.6, 10.6$) y $\delta = 3.78$ (1H, ddd, $J = 6.7, 6.7, 10.7$) (Figura 10). Esto indica, que existe un fenómeno de falta de equivalencia química posiblemente por un tema estereoquímico, o sea los hidrógenos se encuentran ubicados en carbonos con movilidad restringida (estructura cíclica) o próximos a un centro quiral. Finalmente, combinando la información aportada por estas técnicas (HSQC y HMBC, Figura 12, página 30) con los datos de los otros experimentos se llega a que la estructura química del componente de FM2 que es el diterpeno 12-hidroxipal-7-en-13-al.

Finalmente, otro aspecto que restaba confirmar en referencia a la estructura propuesta para FM2 fue la estereoquímica del sistema diterpénico, o sea saber exactamente la distribución espacial relativa de los carbonos cabeza de puente (C5, C9 y C10, según la numeración mostrada en la Tabla 4, página 16). Para ello se realizó un experimento de NOESY, donde se observaron efectos NOE entre las señales: i) de los metilos 16 y 15; ii) de los metilos 15 y 14; iii) del metilo 14 y Hi (asignación según Tabla 4, página 16); iv) del metilo 14 y Hk; v) del metilo 14 y Hb; vi) del Hi y el Hk; vii) del Hk y el Hn (Figura 13, página 31). Debido a que, por los desplazamientos químicos, el protón Hb es axial y el protón Hi es ecuatorial se puede proponer que Hk se encuentra en una posición axial (distribución α) y por ende el metilo 16 (ubicado sobre el otro carbono cabeza de puente) está en posición β . Al no encontrar efecto NOE entre el metilo 16 y el protón Hg (ubicado en el otro carbono cabeza de puente) hace suponer que la disposición de dicho hidrógeno es α , por lo que ambos anillos de ciclohexano conforman una situación de *trans*-decalina.

a)



b)

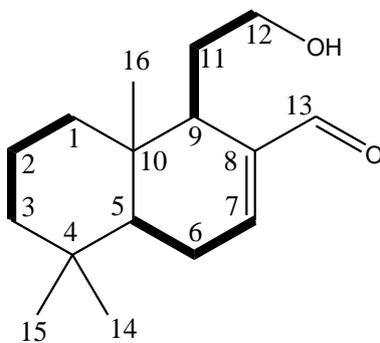
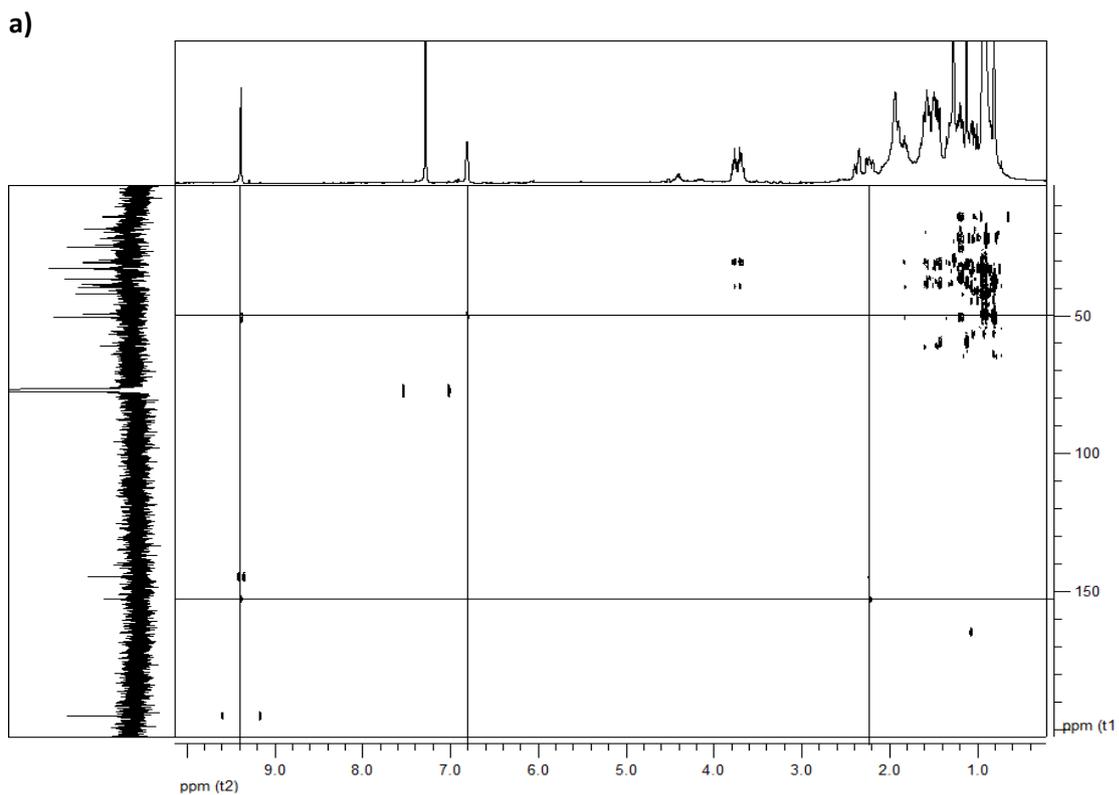


Figura 11 - a) Experimento COSY donde se muestran algunos de los acoplamientos identificados. **b)** En línea gruesa se muestran las correlaciones ^1H - ^1H identificadas con este experimento. Nota: se muestra la estructura que fue finalmente elucidada.



b)

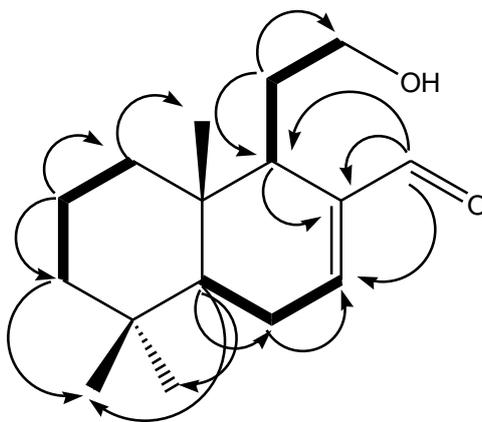


Figura 12 - a) Experimento HMBC de FM2 donde se muestra algunas de las correlaciones observadas en el 12-hidroxipopal-7-en-13-al. **b)** Representación gráfica de correlaciones homo y heteronucleares identificadas en FM2. En líneas gruesas se muestran las correlaciones ^1H - ^1H (COSY, Figura 11) y las flechas indican las correlaciones del HMBC útiles para confirmar la estructura.

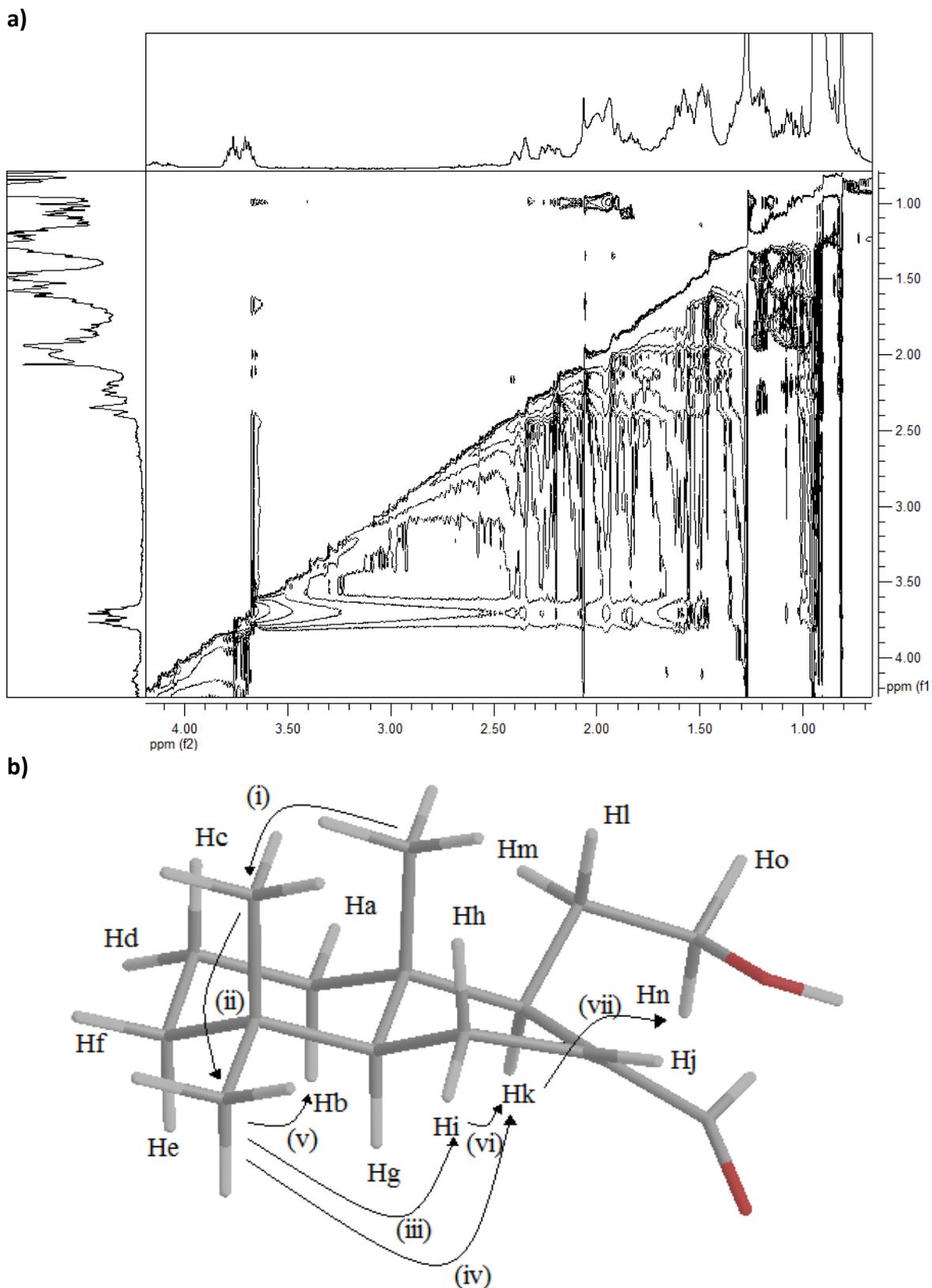


Figura 13 – a) Experimento NOESY de FM2 donde se muestran las correlaciones observadas más relevantes para determinar la estereoquímica del 12-hidroxipopal-7-en-13-al. **b)** Representación gráfica de las correlaciones de NOESY útiles para la elucidación estructural marcadas como flechas.

5.2.2. Reacciones químicas

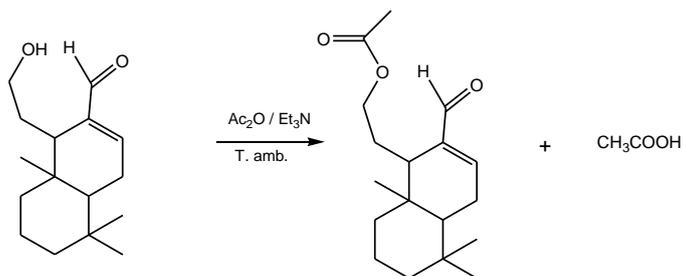
Dado que los datos espectroscópicos indican que el componente de FM2 puede poseer un grupo alcohol se decide confirmar químicamente dicha presencia. La reacción de acetilación mostró resultado positivo para dicha fracción. Este resultado indica la presencia de al menos un grupo hidroxilo libre en la molécula. Al realizar TLC del producto obtenido se observó cambio en el valor de R_f , respecto al reactivo (FM2). El valor de R_f aumenta indicando una menor polaridad de la molécula luego de transcurrido el proceso de acetilación. Al revelar la TLC con reactivo de Brady se observa que el grupo carbonílico de la fracción FM2 continúa intacto ya que la misma se torna de color naranja fuerte.

Por otro lado, el producto obtenido se aisló y se realizó la caracterización espectroscópica (RMN). Con los experimentos de ^1H -RMN y COSY se pudo evidenciar la incorporación de un grupo acetilo, en número y posición (Figura 14, página siguiente), confirmando la estructura de 12-hidroxipal-7-en-13-al. En el experimento de ^1H -RMN se pudo evidenciar que los metilenos en el reactivo, asignados inicialmente a bases de un alcohol, una vez que ocurre reacción son desblindados (ver Figura 14a) lo que estaría indicando una clara reacción a ese nivel. Ya que el grupo acetilo tiene características desblindantes [30] se confirmaría la presencia del grupo alcohol que es acetilado. Por otro lado, la integración del singulete correspondiente al metilo del grupo acetilo (3 H, Figura 14a) confirma la incorporación de un solo grupo éster y por ende la presencia de un solo grupo acetilable (que por el desplazamiento químico de los protones vecinos, en el reactivo, es asignado a un grupo alcohol primario).

Al derivado acetilado de FM2 se le determinó la actividad anti-*T. cruzi*, como forma de comenzar un trabajo de modulación estructural tendiente a la optimización de la estructura química. La CI_{50} resultó ser de $13.9 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$ ($47.6 \mu\text{M}$), mostrando que dicha modificación conduce a una disminución de la actividad biológica observada en 12-hidroxipal-7-en-13-al ($\text{CI}_{50} = 3.0 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$, $12.0 \mu\text{M}$).

La fracción FM1 no presentó ni cambio de color, ni cambio en el valor de R_f en la cromatografía en capa fina, confirmando ausencia de grupos hidroxilo libres en la molécula. Cabe destacar que transcurrido 30 min de reacción a temperatura ambiente y no observarse cambios se procedió a calentar la reacción durante 30 min, en estas condiciones tampoco se produjeron cambios confirmando que la acetilación no era posible.

a)



b)

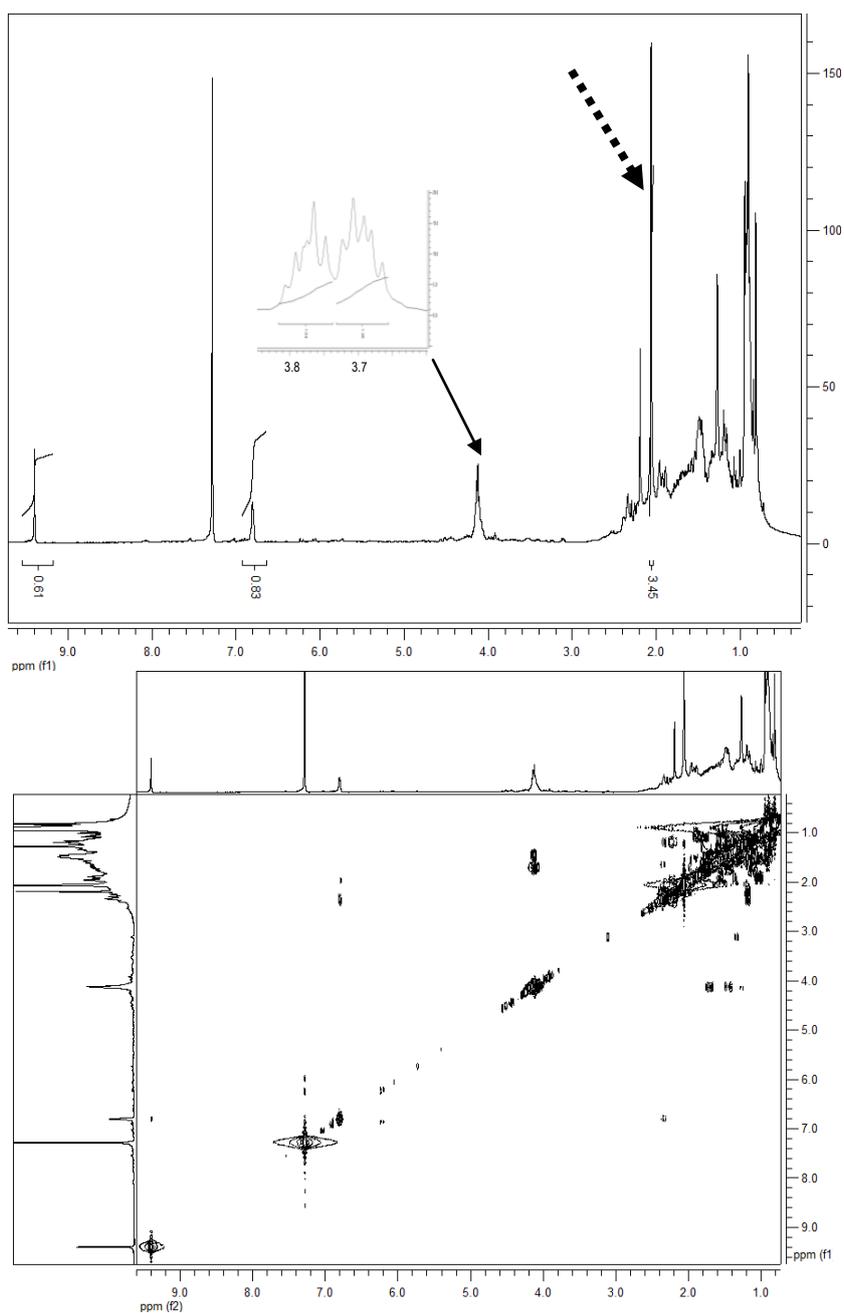


Figura 14 – a) Reacción de acetilación de la fracción FM2 y producto obtenido. **b)** Experimentos de ^1H RMN y COSY que confirman la incorporación de un grupo acetilo en el alcohol primario de la estructura propuesta para FM2. En el experimento de ^1H RMN se marca el cambio de la señal de los metilenos alcohólicos (insertado: metilenos del reactivo), después de la esterificación (flecha entera), y la aparición de un singlete de integración 3 H (flecha punteada).

5.2.3. Espectroscopía ultravioleta

Los espectros UV presentan máximos de absorción en 214 nm y 228 nm para las fracciones FM1 y FM2 respectivamente. Estos resultados infieren la presencia de una lactona α,β -insaturada- α,β -dialquilsustituida en FM1 y un aldehído α,β -insaturado- α,β -dialquilsustituida para FM2. Lo que está en total concordancia con las estructuras propuestas para ambos copalanos aislados de la parte aérea de Matico.

5.2.4. Espectroscopía infrarroja

El espectro de IR de la fracción FM1 (anexo I) presenta un pico de intensidad fuerte en 1719 cm^{-1} , el mismo se asocia a la frecuencia de estiramiento (γ) del enlace C=O de una δ -lactona (ciclo de seis) α,β insaturada. En 1640 cm^{-1} se observa un pico de intensidad media correspondiente a la frecuencia de estiramiento del enlace C=C conjugado al grupo carbonilo. Se observan picos de intensidad fuerte en la región de $2850\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a las frecuencias de estiramiento de los grupos metílicos, metilénicos y metínicos. En 1391 cm^{-1} y 1367 cm^{-1} el espectro presenta picos de intensidad fuerte que se asocian a las frecuencias de deformación (δ) de un doblete en gem-dimetilos. En 1461 cm^{-1} se observa un pico de intensidad media que corresponde a la frecuencia de deformación de un grupo metilo. Este estudio permitió establecer con certeza la presencia de un grupo lactona α,β -insaturada de seis miembros en el copalano. Lo que conjuntamente con las otras espectroscopias utilizadas (RMN, UV) permite inferir que el compuesto FM1 se corresponda con copal-7-en-13,12-ólido. Este compuesto ya había sido descrito previamente por Urones y col. en su forma (-)-enantioisomérica [33].

La fracción FM2 en su espectro de IR presenta un pico de intensidad fuerte en 1689 cm^{-1} correspondiente a la frecuencia de estiramiento del enlace C=O de un aldehído α,β -insaturado. Confirmando la presencia del grupo aldehído se observan dos picos de intensidad débil en 2720 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} que corresponden a la frecuencia de estiramiento del enlace C-H, este tipo de señales son características de grupos aldehídos. En la región de $3200\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ se observa un pico ancho correspondiente a la frecuencia de estiramiento de un enlace O-H. Concomitantemente, en 1059 cm^{-1} el espectro presenta un pico de intensidad media que corresponde a la frecuencia de estiramiento del enlace C-O, este resultado infiere la presencia de un alcohol primario en la molécula. En 1630 cm^{-1} se observa un pico de intensidad débil que se asocia a la frecuencia de estiramiento del enlace C=C conjugado al grupo carbonilo. Al igual que en el espectro de la fracción FM1 en la región que corresponde a las frecuencias de estiramiento de grupos metílicos, metilénicos y metínicos ($2850\text{-}2970\text{ cm}^{-1}$) se observan picos de intensidad fuerte. En 1380 cm^{-1} y 1369 cm^{-1} también al igual que en la fracción FM1 se observan señales de

intensidad fuerte que se asocian a las frecuencias de deformación de un doblete en gem-dimetilos. En 1460 cm^{-1} se observa un pico de intensidad media que corresponde a la frecuencia de deformación de un grupo metilo.

5.2.5. Espectrometría de masas

En el experimento HPLC – MS realizado a la fracción FM1 se comprobó la pureza de la fracción y se logró la confirmación de la estructura del copal-7-en-13,12-ólido al observar que un pico con 31.6 minutos de tiempo de retención, en las condiciones de la corrida, se corresponde con la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_2$. El espectro de masas (figura 15) presenta picos en m/z 249.2, m/z 271.2, m/z 287.1, m/z 497.0 y m/z 519.3 correspondientes con las señales esperadas para $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{K}]^+$, $[2\text{M}+\text{H}]^+$ y $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ respectivamente.

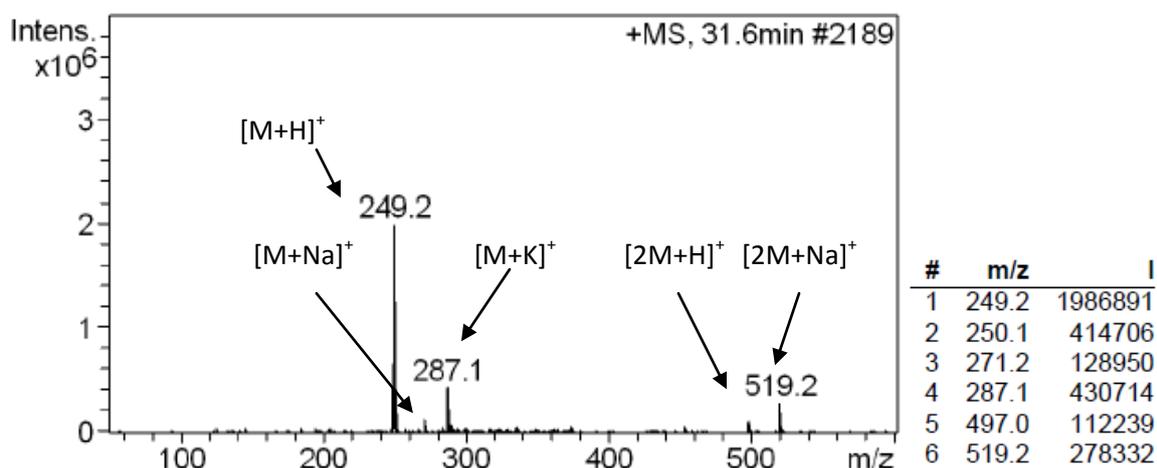


Figura 15 – Espectro de masas obtenido para la fracción metanólica 1.

Para la fracción FM2 el experimento de HPLC muestra la existencia de más de un producto, dado que se trata de un compuesto con grupos funcionales reactivos (aldehído y alcohol) y que se trabaja en condiciones donde potencialmente pueden ocurrir reacciones (muestras disueltas en metanol y desarrolladas cromatográficamente en ácido fórmico/acetonitrilo). Específicamente, fueron identificados tres productos, con tiempos de retención de 18.3 (pico 1), 22.0 (pico 2) y 38.0 minutos (pico 3) (figura 16). El pico 1, en las condiciones de corrida, permite confirmar la estructura del 12-hidroxycopal-7-en-13-al ya que se corresponde con la fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_2$. El espectro de masas presenta picos en m/z 251.1, m/z 273.1 y m/z 289.1 correspondientes con las señales esperadas para $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $[\text{M}+\text{K}]^+$. El MS del pico 2 se puede corresponder al acetal cíclico (entre el alcohol y el aldehído del 12-hidroxycopal-7-en-13-al) y metanol (usado para disolver la muestra a separar por HPLC), producto (Figura 17) que se genera en las condiciones del experimento. En el mismo espectro se puede observar el ión de m/z a 251.2 resultado de la fragmentación al aldehído de partida en el experimento de MS.

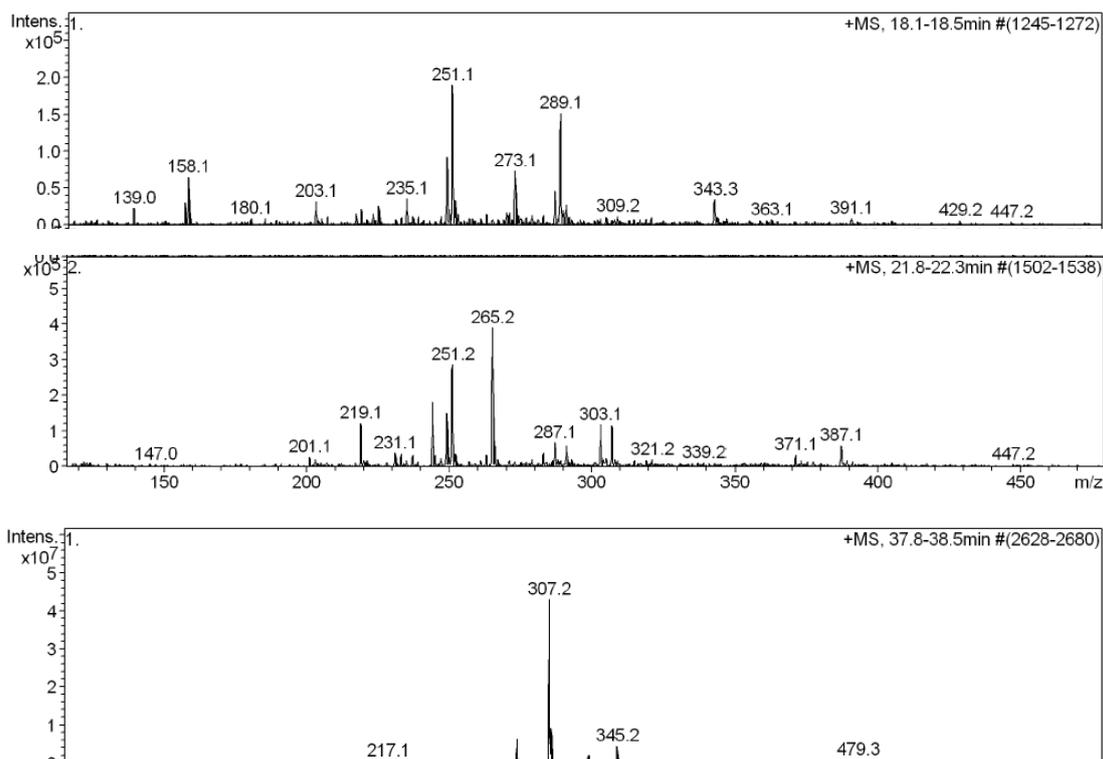


Figura 16 – Espectros de masas de los picos 1, 2 y 3 obtenidos en el experimento HPLC – MS realizado a la fracción metanólica 2.

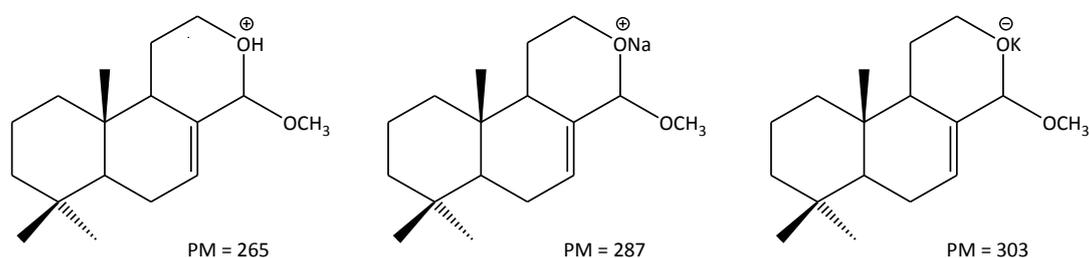


Figura 17 – Estructuras químicas propuestas para las señales que presenta el espectro de masas del pico 2 del experimento HPLC – MS de la fracción FM2.

El tercer pico del HPLC se puede corresponder a un carbonato, producto de condensación del hemiacetal de metanol con ácido fórmico a través de los dos alcoholes libres de la molécula (Figura 18).

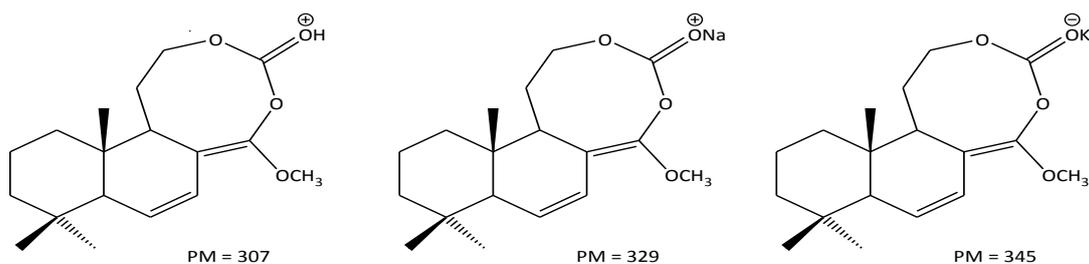


Figura 18 - Estructuras químicas propuestas para las señales que presenta el espectro de masas del pico 3 del experimento HPLC – MS de la fracción FM2.

5.2.6. Actividad óptica de las fracciones aisladas

El poder rotatorio que presentó el copal-7-en-13,12-ólido es $[\alpha]_D^{25} = + 19.1^\circ$, mientras que el 12-hidroxicopal-7-en-13-al presentó un $[\alpha]_D^{25} = + 32.4^\circ$.

Cabe destacar que el copal-7-en-13,12-ólido aislado previamente por Urones y col. de *Halimium viscosum* presentó un $[\alpha]_D = - 17.0^\circ$ (CHCl_3 , 1.1 mg/mL) [33], este resultado nos permite inferir que el compuesto aislado en el presente trabajo de *Aristeguietia glutinosa* es la forma (+)-enantiomérica del compuesto mencionado.

5.3. Diterpenos tipo copalano

Ambos compuestos aislados de Matico en el presente trabajo pertenecen al grupo de productos naturales de los diterpenos tipo copalano. Los compuestos de este grupo suelen presentar actividades biológicas variadas, antibacteriana, antiséptica y antifúngica entre otras [34].

Poseen un esqueleto característico con una estructura bicíclica básica y un esqueleto adicional C-6 que puede estar abierto o contribuir con tres carbonos a la formación de un anillo de 6 miembros que puede o no contener un átomo de oxígeno [35]. Ya han sido descritos una considerable cantidad de compuestos de esta familia presentando gran variabilidad en cuanto a los sustituyentes que poseen. Entre ellos se encuentra el copal-7-en-13,12-ólido (FM1), que fue previamente descrito al ser extraído de *Halimium viscosum* ('Valparaíso') junto a otros diterpenos tipo copalano [33].

Han sido descritos diterpenos tipo copalano que contienen aldehídos α,β -insaturados en su estructura pero que no coinciden con el aislado del extracto hidro-etanólico de Matico, 12-hidroxicopal-7-en-13-al (FM2). Estos otros aldehídos fueron aislados de *Zingiber mioga* ('Myoga') y mostraron varias actividades biológicas: inhibición de la agregación plaquetaria y de la actividad de la 5-lipooxigenasa humana, inducción de apoptosis en las células de linfoma T Jurkat humanas y bloqueo de la función mitocondrial [36,37]. Además otros diterpenos tipo copalano fueron aislados de *Cistus creticus* con actividad antiproliferativa anti-*Leishmania donovani* [38], otro protozooario filogenéticamente relacionado con *Trypanosoma cruzi*.

Además, productos naturales pertenecientes al grupo de los diterpenos tipo copalanos con actividad tripanosomicida han sido aislados de *Aristolochia cymbifera* [39]. Específicamente en este caso el copalano más activo, frente a tripomastigotes de *T. cruzi*, fue el ácido copálico [40] que presenta importantes efectos hemolíticos a altas dosis. Por otro lado, más recientemente se ha descrito que fracciones enriquecidas en sesquiterpenos tipo copalanos obtenidas de las flores de *Anthemis Tinctoria* muestran actividad anti-*T. cruzi* [41]. En este último caso, no se describe

aislamiento de los productos responsables de la actividad biológica, sino que se trabaja con fracciones enriquecidas.

Para *Cistus creticus* se realizaron estudios de la expresión génica de una enzima sintasa diterpeno tipo copalano y mostraron que la expresión es superior en los tricomas en comparación con otras partes de la plantas. Además Falara y colaboradores [35] observaron que la expresión era diferente en distintos estadios de la planta, siendo superior la expresión génica en plantas jóvenes. Para saber más sobre la expresión génica en respuesta al estrés simulaban heridas, que podrían causar insectos, de forma mecánica y obtuvieron mayores concentraciones de todos los compuestos identificados en los tricomas de las hojas con heridas que en hojas sanas. Al parecer este es un ejemplo de porque la planta invierte energía en la síntesis de compuestos especializados en la protección de tejidos vegetativos jóvenes que son aún más susceptibles al ataque de insectos y la invasión de patógenos.

La biosíntesis de diterpenos tipo copalano con átomos de oxígeno en su estructura no está del todo entendida. El conjunto de reacciones específicas y la identificación de las enzimas involucradas en la síntesis de diterpenos tipo copalano siguen aún por resolverse. Aunque Guo y colaboradores [42,43] plantearon la hipótesis de que copal-8-ol pirofosfato (Figura 19) es un intermedio en la biosíntesis, aún no hay descripciones en cuanto a la enzima capaz de sintetizar este compuesto.

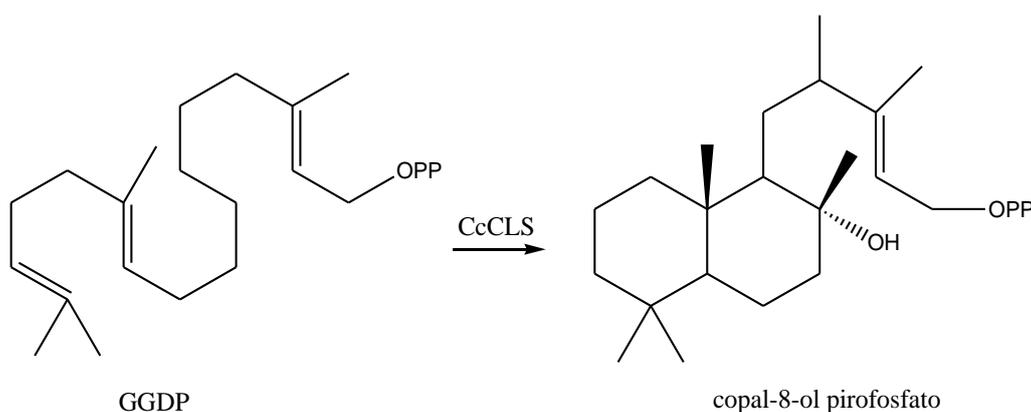


Figura 19 – Formación del copal-8-ol-pirofosfato catalizado por el transcritpo de CcCLS [35].

Falara y colaboradores construyeron una biblioteca de ADNc específico de tricoma de *C. creticus*, aplicando EST secuenciación y los análisis bioinformáticos revelaron un ADNc con similitud significativa a diterpeno sintasas de tipo B [44]. Posteriormente describen el aislamiento del ADNc completo (CcCLS), mostrando que la enzima codificada por CcCLS cataliza la formación de copal-8-ol pirofosfato a partir de GGDP y dejan en evidencia la importancia de la enzima en la biosíntesis de diterpenos tipo copalanos que contienen átomos de oxígeno en la molécula [34].

El isopentenil pirofosfato (IPP; C₅) es el precursor metabólico común de todos los isoprenoides. A la fecha se ha demostrado que existen dos vías para la biosíntesis de IPP en plantas. La vía del ácido mevalónico, también llamada vía clásica, que ocurre en el citoplasma, y la vía de la desoxixilulosa fosfato, vía no clásica, que ocurre en el plastidio [45,46]. Para el caso de los diterpenos ha sido demostrado por marcado con ¹³C que la vía mayoritaria es la desoxixilulosa fosfato [47]. La isomerización (reversible) del IPP produce dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Ambos isómeros se condensan formando el intermediario de 10 carbonos, geranyl pirofosfato (GPP). El GPP se condensa de nuevo con otra molécula adicional de IPP para dar farnesil pirofosfato (FPP). Este compuesto, junto con otra molécula de IPP, produce geranylgeranyl pirofosfato (GGDP), que es el precursor de todos los diterpenos [48].

La protonación del GGDP inicia una secuencia de ciclación concertada (Figura 20), finalizada por la pérdida de un protón de un grupo metilo, resultando en copalil PP. La estereoquímica en este producto es controlada por el plegamiento del sustrato en la superficie de la enzima, un plegamiento alternativo resulta en labdadienil PP, teniendo este producto una configuración opuesta en el nuevo centro quiral generado. La estereoquímica del labdadienil PP se observa en la estructura del ácido abiético, el mayor componente de la fracción rosina de la turpentina de los pinos y otras coníferas. Los diterpenos en las resinas presentan actividad antifúngica e insecticida [49].

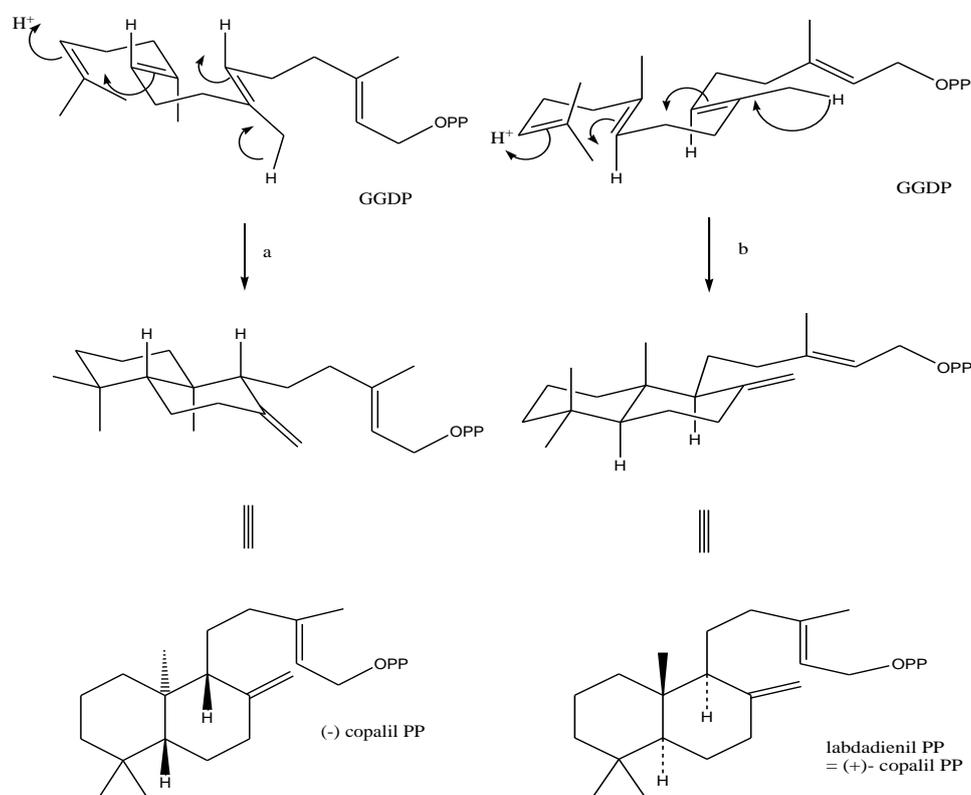


Figura 20 – Formación de copalil PP (a) y labdadienil PP (b) a partir de GGDP [46].

6. Conclusiones

Se realizó el fraccionamiento bioguiado del extracto hidro-etanólico de *Aristeguetia glutinosa* Lam. y se obtuvieron dos compuestos con relevante actividad anti-*Trypanosoma cruzi*. Se aplicaron técnicas espectroscópicas para la elucidación estructural de los mismos determinando que los compuestos aislados son el labd-7-en-13,12-ólido ($CI_{50} = 62.9 \mu M$) y el 12-hidroxi-labd-7-en-13-al ($CI_{50} = 12.0 \mu M$) (Figura 21). Cabe destacar que por primera vez es aislado el 12-hidroxi-labd-7-en-13-al de la naturaleza, y es el compuesto químico con mayor actividad anti-*T. cruzi* purificado de Matico. En base a lo mencionado anteriormente en cuanto a la estereoquímica de los diterpenos tipo copalanos y a los resultados obtenidos en los experimentos de desviación de la luz polarizada de las fracciones metanólicas, dextrógiras, se le adjudica a los compuestos aislados de *Aristeguetia glutinosa* el carácter de labdano. La similitud de sus estructuras químicas y la cuasi equivalencia de las actividades ópticas infieren que seguramente estos compuestos estén metabólicamente relacionados en la planta.

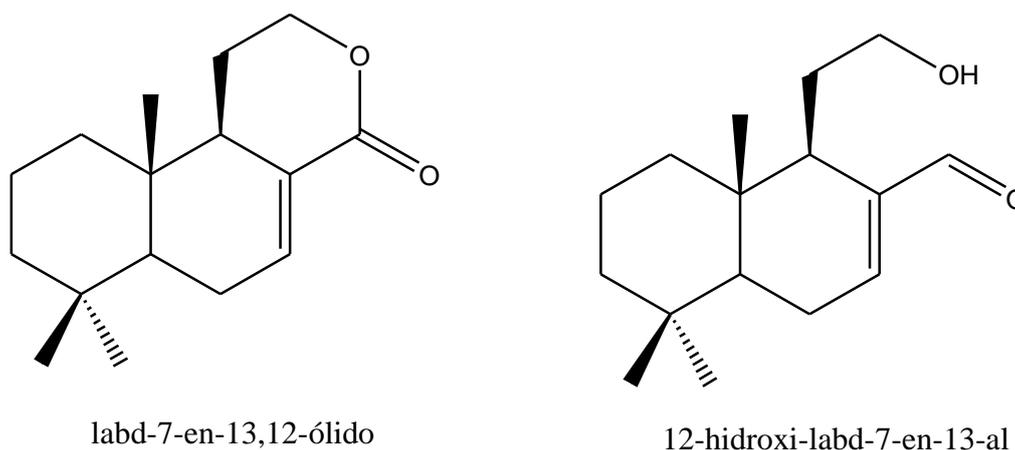


Figura 21 – Estructuras químicas de los compuestos elucidados en la fracción FM1 (izq.) y FM2 (der.).

Estos resultados muestran que las partes aéreas de *Aristeguetia glutinosa* Lam. pueden ser una fuente de nuevos fármacos con actividad antiprotozoaria. Sin embargo, estudios *in vitro* e *in vivo* adicionales son necesarios para validar el uso de Matico en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

También se deberían realizar estudios para cuantificar los compuestos de interés en plantas de Matico que presenten distintos estadios de desarrollo, plantas que sufran estrés (heridas) y además la identificación de la parte de la planta en la cual se encuentran en mayor concentración, con el objetivo de maximizar los rendimientos de extracción.

7. Bibliografía

1. Chiriboga, X; Miño, P. Comunicación personal.
2. El-Seedi, H.R.; Ohara, T.; Sata, N.; Nishiyama, S. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* **2002**, 81, 293 - 296.
3. Abad, M.J.; Bermejo, P.; Sanchez Palomino, S.; Chiriboga, X.; Carrasco, L. Antiviral activity of some South American medicinal plants. *Phytother. Res.* **1999**, 13, 142 - 146.
4. de las Heras, B.; Slowing, K.; Benedí, J.; Carretero, E.; Ortega, T.; Toledo, C.; Bermejo, P.; Iglesias, I.; Abad, M.J.; Gómez-Serranillos, P.; Liso, P.A.; Villar, A.; Chiriboga, X. Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J. Ethnopharmacol.* **1998**, 61, 161 - 166.
5. El-Seedi, H.R.; Sata, N.; Torsell, K.; Nishiyama, S. New labdene diterpene from *Eupatorium glutinosum*. *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 728 - 729.
6. Olivieri, B.P.; Molina, J.T.; de Castro, S.L.; Pereira, M.C.; Calvet, C.M.; Urbina, J.A.; Araújo-Jorge, T.C. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, 36, 79 - 83.
7. Cerecetto, H.; Benitez, D.; Croce, F.; Gonzalez, M.; Miño, P.; Chiriboga, X. Evaluación de la actividad anti-*T. cruzi* del extracto etanólico de *Aristeguieta glutinosa* ecuatoriana (Matico). En: III Congreso Norte-Nordeste de Multirresistencia Bacteriana-II Workshop Sul-Americano de Ciencia e Tecnologia Farmaceuticas, Recife, Brasil. **2008**.
8. Maya, J.D.; Orellana, M.; Ferreira, J.; Kemmerling, U.; López-Muñoz, R.; Morello, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol. Res.* **2010**, 43, 323 - 331.
9. de Castro, S.L.; Pinto, M.C.F.R.; Pinto, A.V. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. *Microbios* **1994**, 78, 83 - 90.
10. Álvarez, G.; Aguirre-López, B.; Varela, J.; Cabrera, M.; Merlino, A.; López, G.V.; Lavaggi, M.L.; Porcal, W.; Di Maio, R.; González, M.; Cerecetto, H.; Cabrera, N.; Pérez-Montfort, R.; Gómez Puyou, A. Massive screening yields novel and selective *T. cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5767 - 5772.

11. Tekiel, V.; Alba-Soto, C.D.; González Cappa, S.M.; Postan, M.; Sánchez, D.O. Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library. *Vaccine* **2009**, *27*, 1323 - 1332.
12. Cerecetto, H.; González, M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' disease: Compounds at the final stage of "Hit-to-Lead" phase. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 810 - 838.
13. Merlino, A.; González, M., Cerecetto, H. Targets for anti-*T. cruzi* drugs in the post-genomic era. *Curr. Enz. Inhib.* **2010**, *6* (4), 195 - 210.
14. Cerecetto, H.; González, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr. Topics Med. Chem.* **2002**, *2* (11), 1187 - 1213.
15. Fournet, A.; Muñoz, V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Curr. Topics Med. Chem.* **2002**, *2* (11), 1215 - 1237.
16. Hernandez Magaña, R.; Gally Jorda, M. Plantas Medicinales. Editorial Árbol, México **1981**, 7 - 8.
17. Salas, C.; Pérez-Vera, P.; Frías, S. Genetic abnormalities in leukemia secondary to treatment in patients with Hodgkin's disease. *Rev. Invest. Clin.* **2011**, *63* (1), 53 - 63.
18. Bussmann, R.W.; Sharon, D. Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, *2*, 2 - 44.
19. Bussmann, R.W.; Sharon, D. Traditional plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, *2*, 47 - 65.
20. Bravo Díaz, L. Farmacognosia. Ed. Elsevier, España **2006**, 1 - 9.
21. Valencia, R.; Pitman, N.; León-Yáñez, S.; Jorgensen, P.M. Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. *Publicaciones del Herbario QCA* **2000**, Pontificia, Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
22. Cruz Ati, P.F. Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla *Matricaria chamomilla*, matico *Aristeguietia glutinosa* y marco *Ambrosia arborescens* para neo-fármaco. Tesis de grado, Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Rio Bamba, Ecuador, **2009**.
23. Lopez, A.; Hudson, J.B.; Towers, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *77*, 189 - 196.

24. Sanchez Palomino, S.; Abad, M.J.; Bedoya, L.M.; García, J.; Gonzales, E.; Chiriboga, X.; Bermejo, P.; Alcamí, J. Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, *25*, 1147 - 1150.
25. Castillo, D.; Arevalo, J.; Herrera, F.; Ruiz, C.; Rojas, R.; Rengifo, E.; Vaisberg, A.; Lock, O.; Lemesre, J.L.; Gornitzka, H.; Sauvain, M. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *112*, 410 - 414.
26. Ancizu, S.; Moreno, E.; Torres, E.; Burguete, A.; Pérez-Silanes S.; Benítez, D.; Villar, R.; Solano B.; Marín, A.; Aldana, I.; Cerecetto, H.; González, M.; Monge, A. Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-N-oxide quinoxalin- 2-yl) amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. *Molecules* **2009**, *14*, 2256 - 2272.
27. Rubbo, H.; Denicola, A.; Radi, R. Peroxynitrite inactivates thiol-containing enzymes of *T. cruzi* energetic metabolism and inhibits cell respiration. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *308*(1), 96 - 102.
28. Hinojosa Valdez, R.; Düsman Tonin, L.T.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B. P.; Morgado-Diaz, J.A.; Sarragiotto, M.; Vataru Nakamura, C. Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro-b-carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* **2009**, *110*, 7 - 14.
29. Fernandez, L.; Calderón, M.; Martinelli, M.; Strumia, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Silber, J.J.; Santo, M. Evaluation of a new dendrimeric structure as prospective drugs carrier for intravenous administration of antichagasic active compounds. *J. Phys. Org. Chem.* **2008**, *21*, 1079 - 1085.
30. Seoane, G.; Onetto, S.; Risso, M.; Umpiérrez, E. Tablas espectroscópicas para elucidación estructural. *Comisión Sectorial de Educación Permanente, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay*, **2009**, 23 - 24.
31. MestReC 4.5.6.0, <http://www.mestrelab.com>
32. Shriner, R.; Fuson, R.; Curtin, D. Identificación sistemática de compuestos orgánicos. *Ed. Limusa, México*, **1979**, 24 - 60.
33. Urones, J.G.; Marcos, I.S.; Basabe, P.; Diez, D.; Garrido, N.M.; Alonso, C.; Oliva, I.M.; Lithgow, A.M.; Moro, R.F.; Sexmero, M.J.; Lopez, C. Compounds with the labdane skeleton from *Halimium viscosum*. *Phytochem.* **1994**, *35*, 713 - 719.

34. Chinou, I. Labdanes of natural origin: biological activities (1981– 2004). *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 1295 - 1317.
35. Falara, V.; Pichersky, E.; Kanellis, A.K. A copal-8-ol diphosphate synthase from the angiosperm *Cistus creticus* subsp. *creticus* is a putative key enzyme for the formation of pharmacologically active, oxygen-containing labdane-type diterpenes. *Plant Physiol.* **2010**, *154*, 301 - 310.
36. Abe, M.; Ozawa, Y.; Uda, Y.; Morimitsu, Y. A novel labdane-type trialdehyde from Myoga (*Zingiber mioga* Roscoe) that potently inhibits human platelet aggregation and human 5-lipoxygenase. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2008**, *70*, 2494 - 2500.
37. Abe, M.; Ozawa, Y.; Morimitsu, Y.; Kubota, K. Mioganal, a novel pungent in Myoga (*Zingiber mioga* Roscoe) and a quantitative evaluation of its pungency. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2008**, *72*, 2681 - 2686.
38. Fokialakis, N.; Kalpoutzakis, E.; Tekwani, B.L.; Skaltsounis, A.L.; Duke, S.O. Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus* sp. and semisynthetic derivatives thereof. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1775 - 1778.
39. Sartorelli, P.; Carvalho, C.S.; Reimao, J.Q.; Lorenzi, H.; Tempone, A.G. Antitrypanosomal activity of a diterpene and lignans isolated from *Aristolochia cymbifera*. *Planta Med.* **2010**, *76*, 1454 - 1456.
40. Hugel, G.; Oehlschlager, A.C.; Ourisson, G. The structure and stereochemistry of diterpenes from *Trachylobium verrucosum* Oliv. – V. *Tetrahedron* **1966**, Sup. 8, 203 – 216.
41. de Lucas, N.; Ueda-Nakamura, T.; Prado, B.; Nakamura, C. Antitrypanosomal activity of a semi-purified subfraction rich in labdane sesquiterpenes, obtained from flowers of *Anthemis tinctoria*, against *Trypanosoma cruzi*. *Pharmacol. Pharm.* **2011**, *2*, 47 - 55.
42. Guo, Z.; Severson, R.F.; Wagner, G.J. Biosynthesis of the diterpene cisabienol in cell-free extracts of tobacco trichomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, *308*, 103 - 108.
43. Guo, Z.; Wagner, G. Biosynthesis of labdenediol and sclareol in cell free extracts from trichomes of *Nicotiana glutinosa*. *Planta* **2005**, *197*, 627 - 632.
44. Falara, V.; Fotopoulos, V.; Margaritis, T.; Anastasaki, T.; Pateraki, I.; Bosabalidis, A.M.; Kafetzopoulos, D.; Demetzos, C.; Pichersky, E.; Kanellis, A.K. Transcriptome analysis approaches for the isolation of trichome-specific genes from the medicinal plant *Cistus creticus* subsp. *creticus*. *Plant Mol. Biol.* **2008**, *68*, 633 - 651.

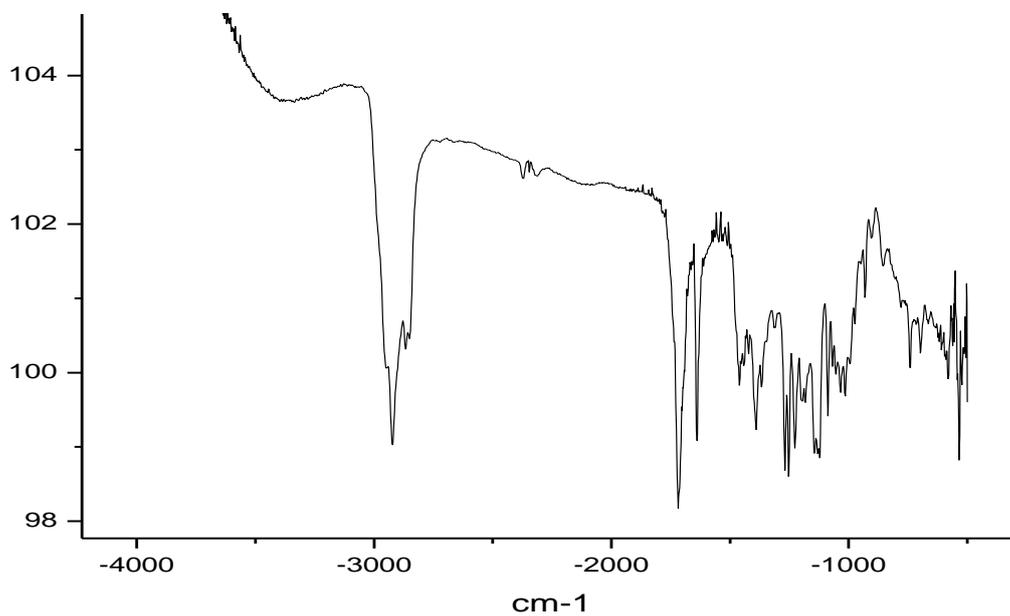
45. Engprasert, S.; Taura, F.; Shoyama, Y. Molecular cloning, expression and characterization of recombinant 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Coleus forskohlii* Briq. *Plant Science* **2005**, 169, 287 - 294.
46. Eisenreich, W.; Schwarz, M.; Cartayrade, A.; Arigoni, D.; Zenk, M.; Bacher, A. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chemistry and Biology* **1998**, 5 (9), 221 - 233.
47. Srivastava, N.; Akhila, A. Biosynthesis of andrographolide in *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry* **2010**, 71, 1298 - 1304.
48. Azcon-Bieto, J.; Talon, M. Fisiología y bioquímica vegetal. Ed. *Interamericana*, España, **1993**, 304 - 305.
49. Dewick, P.M. Medicinal Natural Products (A Biosynthetic Approach). Ed. *Wiley*, Inglaterra, **2002**, 207 - 209.

8. Agradecimientos

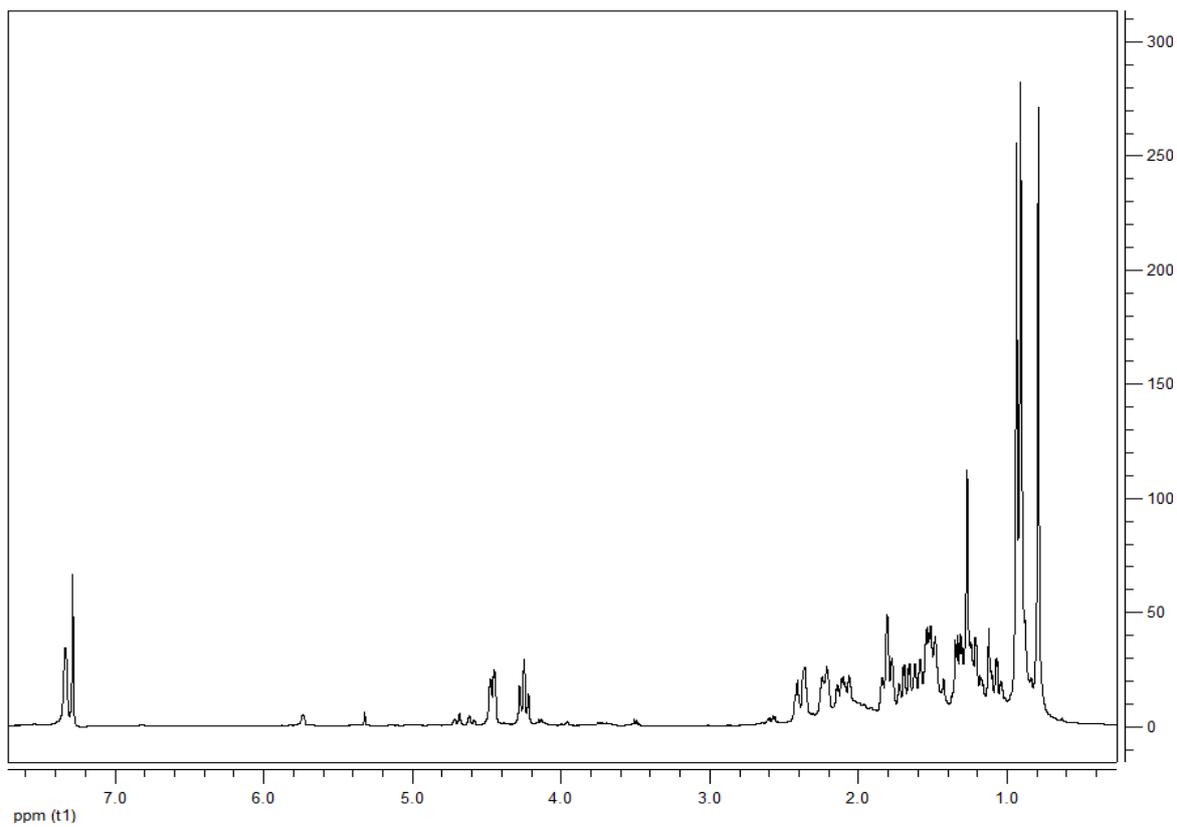
A la Dra. Alejandra Rodriguez por la realización de los espectros de masas, a Horacio Pezaroglo y Verónica Martinez por la realización de los espectros de RMN y al Dr. Eduardo Méndez por permitirme utilizar el equipo para la realización de los espectros IR.

9.1. Anexo I

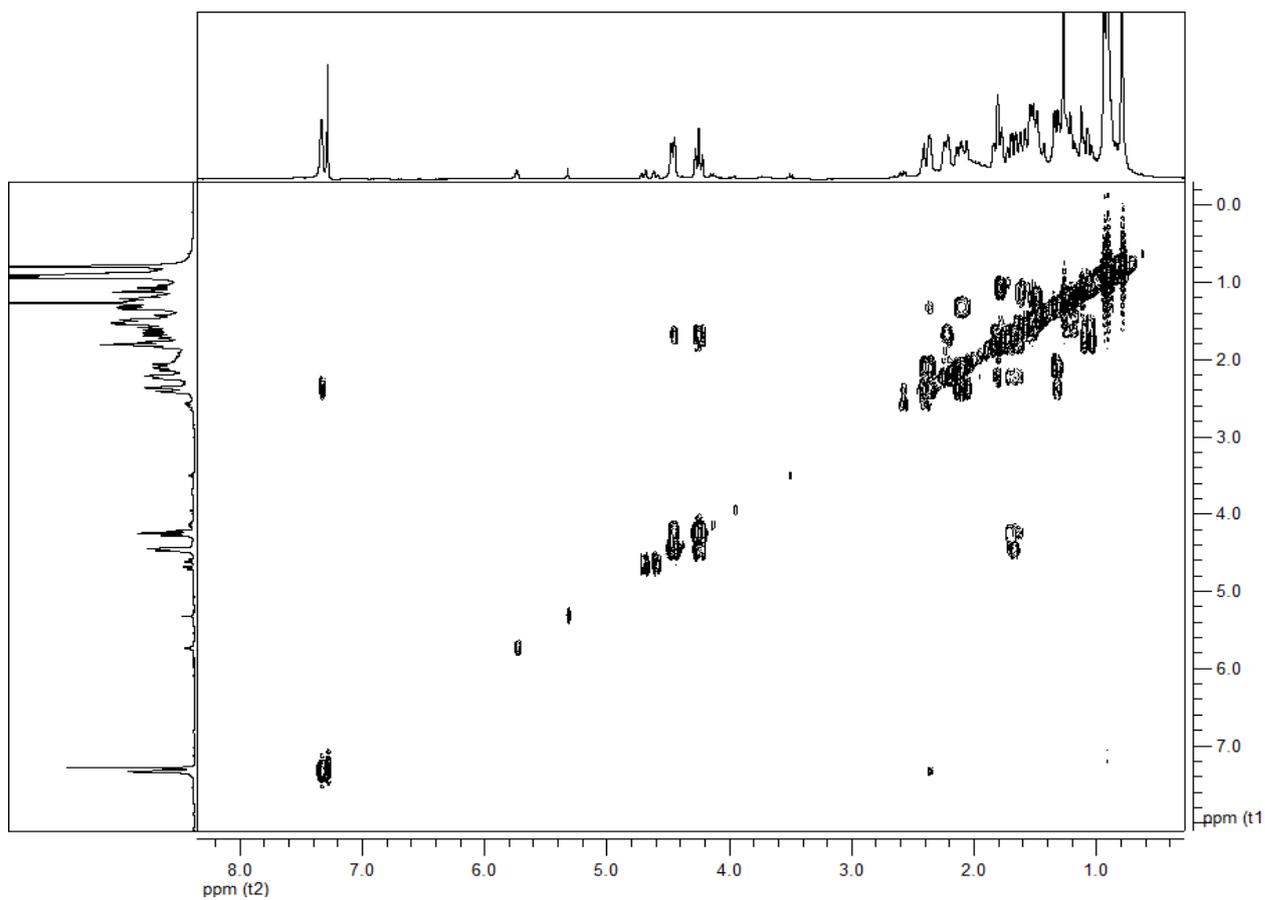
A continuación se muestran los espectros IR y RMN obtenidos del (\pm)-copal-7-en-13,12-ólido.



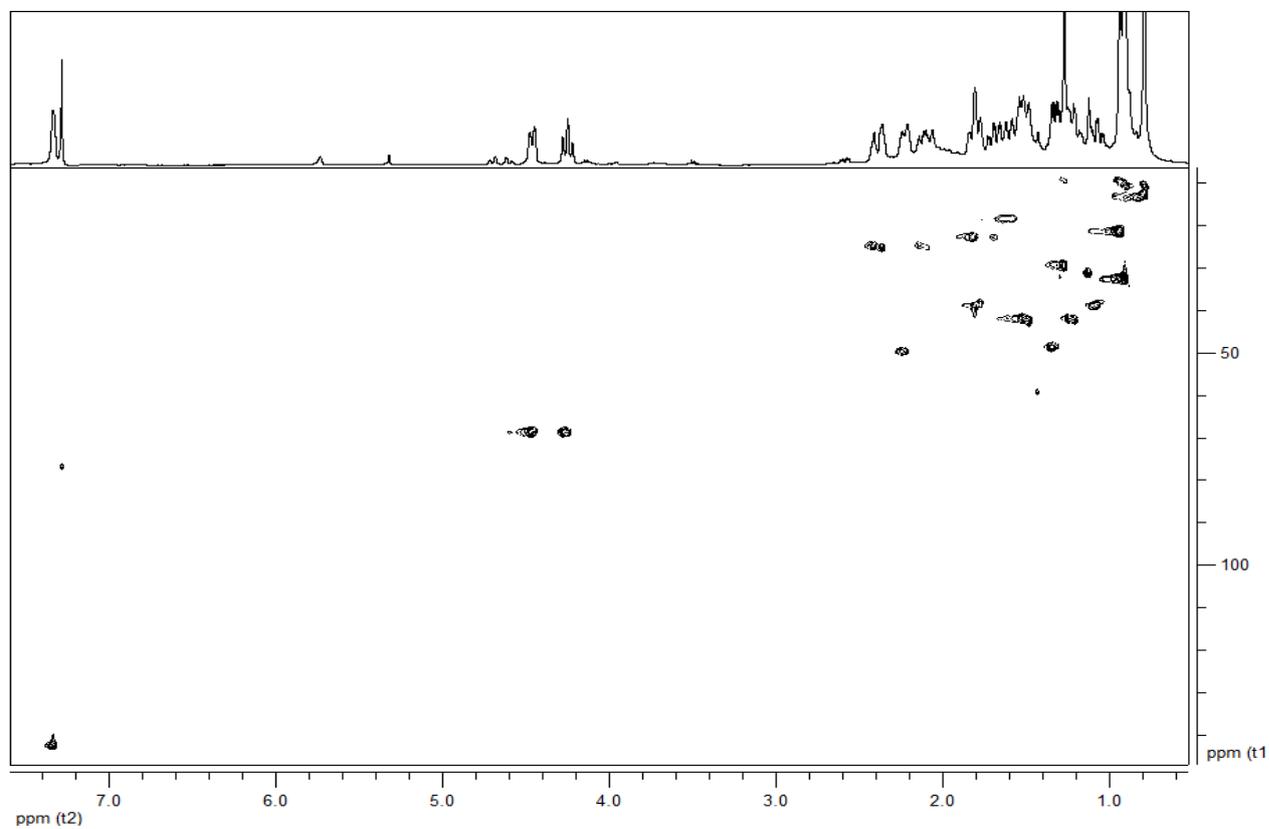
A1 – Espectro IR obtenido para el labd-7-en-13,12-ólido.



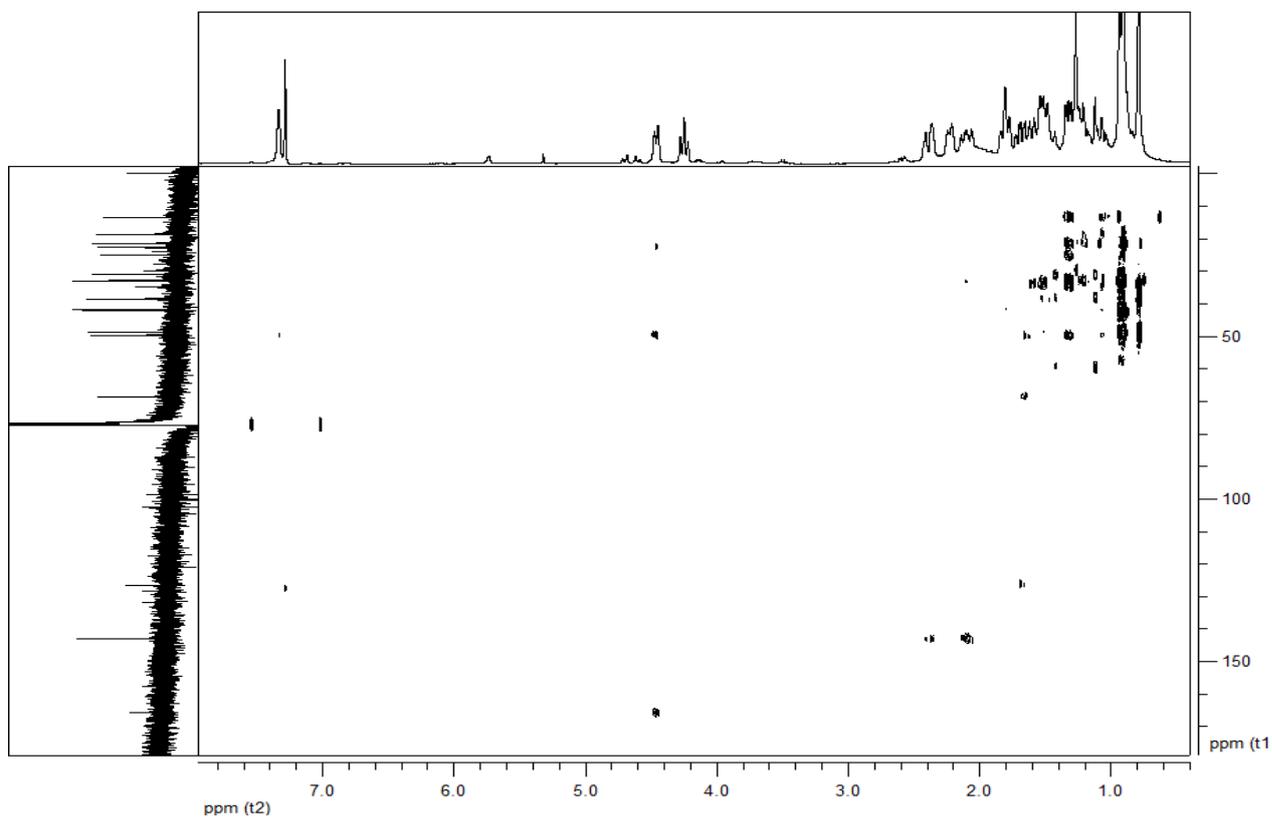
A2 – Espectro ¹H RMN del labd-7-en-13,12-ólido.



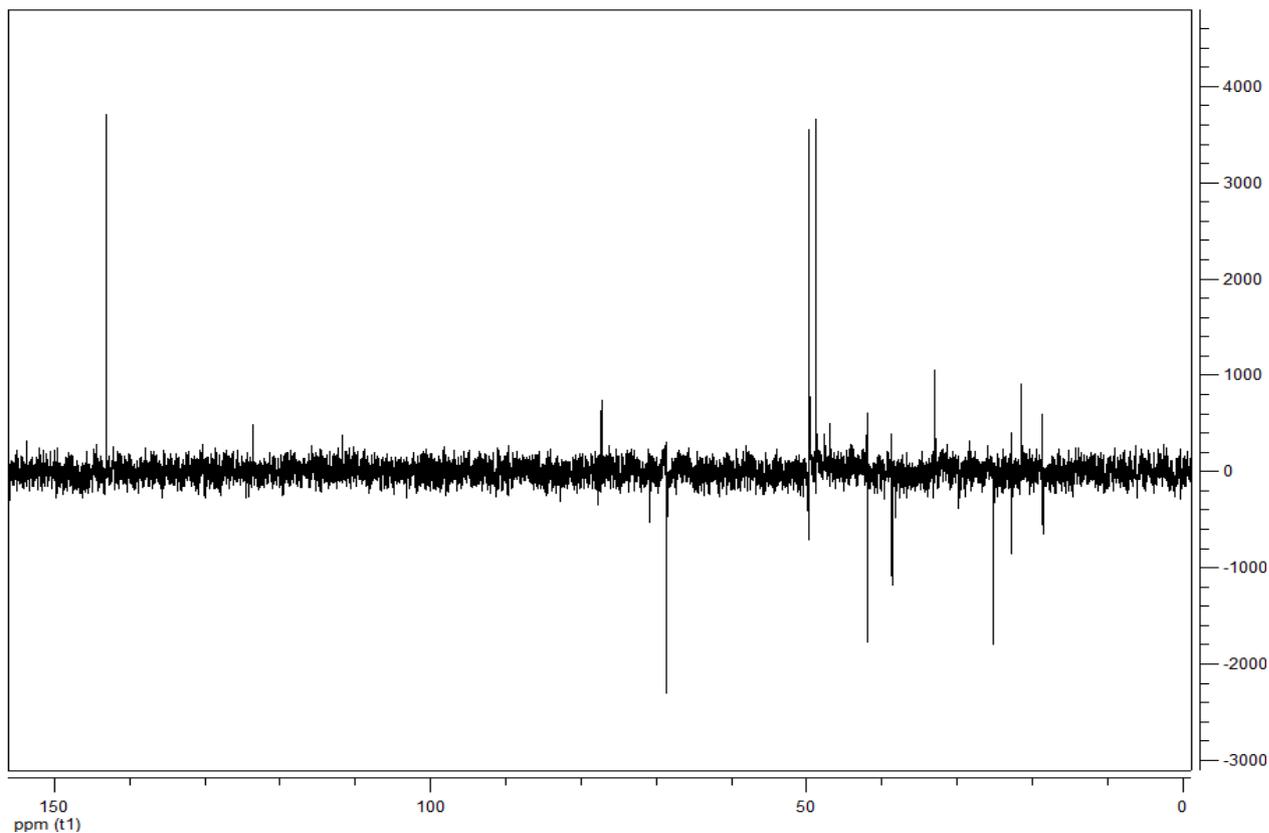
A3 – Espectro obtenido del experimento COSY realizado al labd-7-en-13,12-ólido.



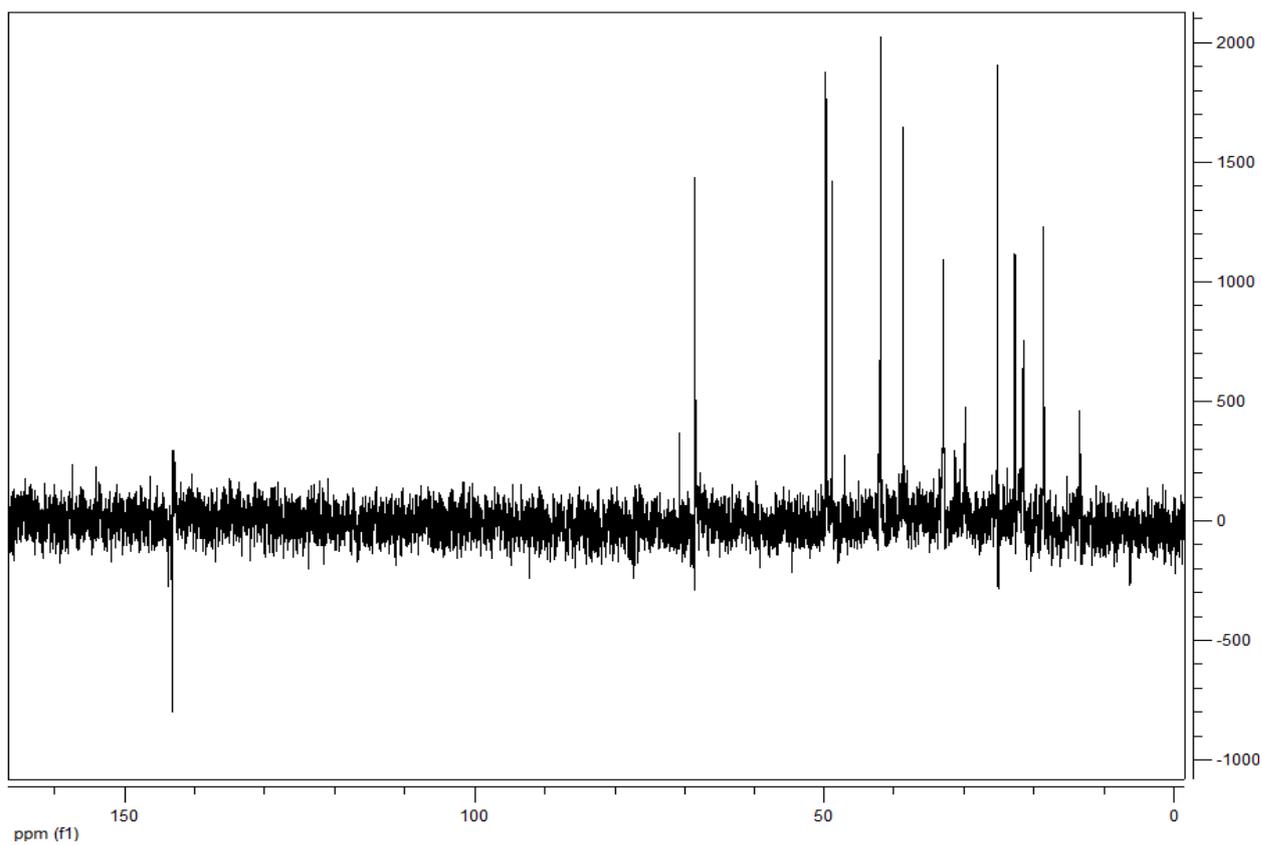
A4 – Espectro obtenido del experimento HSQC realizado al labd-7-en-13,12-ólido.



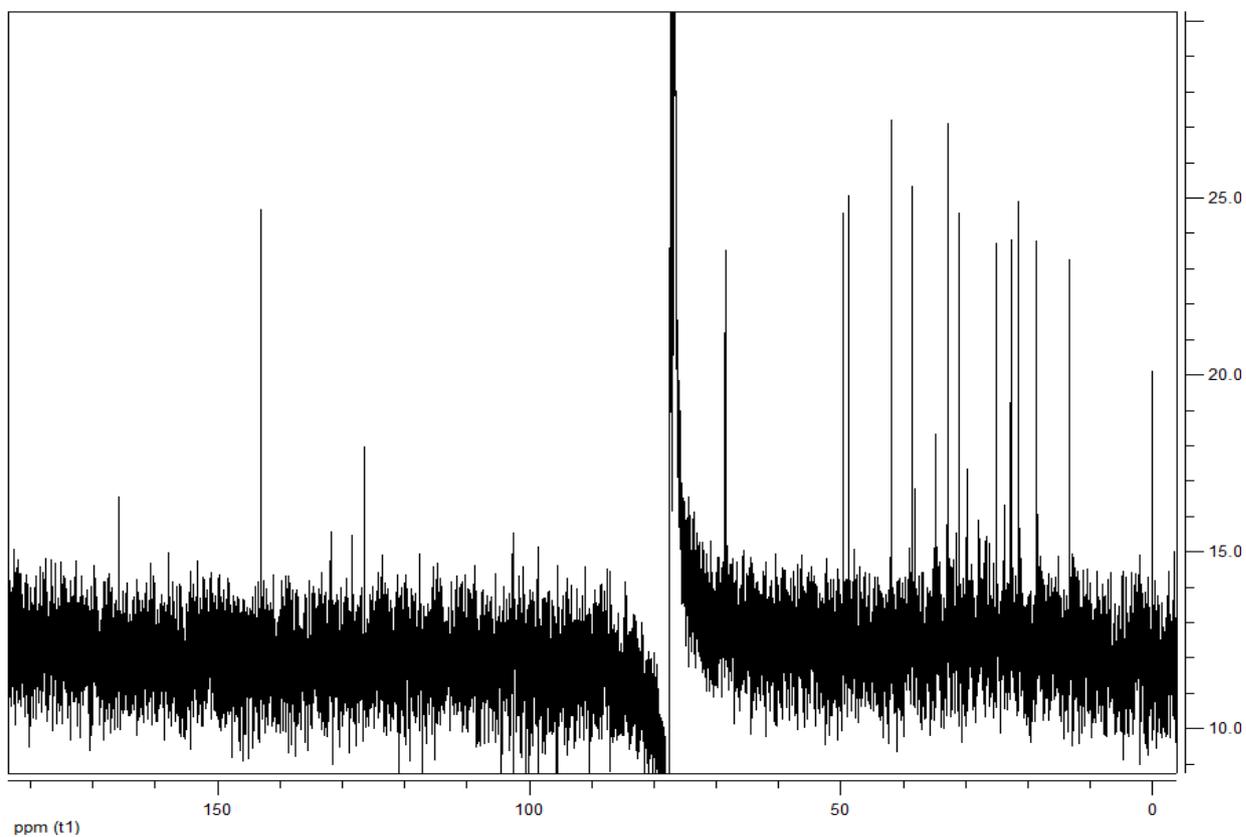
A5 – Espectro obtenido del experimento HMBC realizado al labd-7-en-13,12-ólido.



A6 – Espectro obtenido del experimento DEPT 135 realizado al labd-7-en-13,12-ólido.



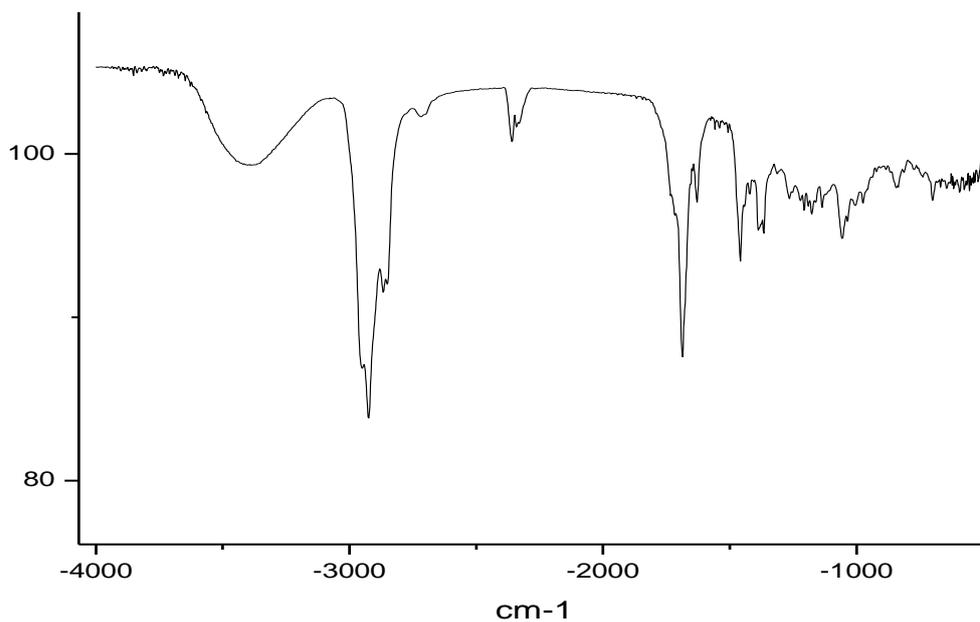
A7 – Espectro obtenido del experimento DEPT90 realizado al labd-7-en-13,12-ólido.



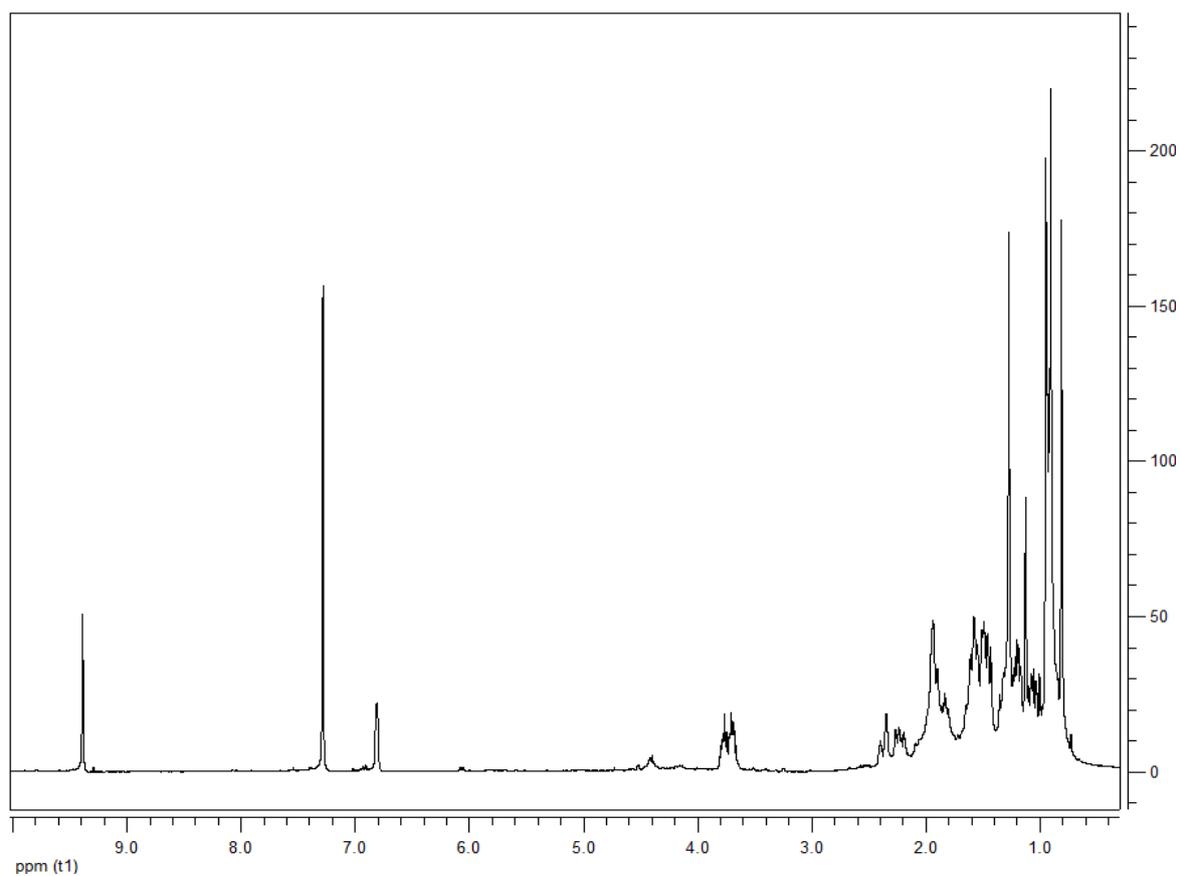
A8 – Espectro ^{13}C obtenido para el labd-7-en-13,12-ólido.

9.2. Anexo II

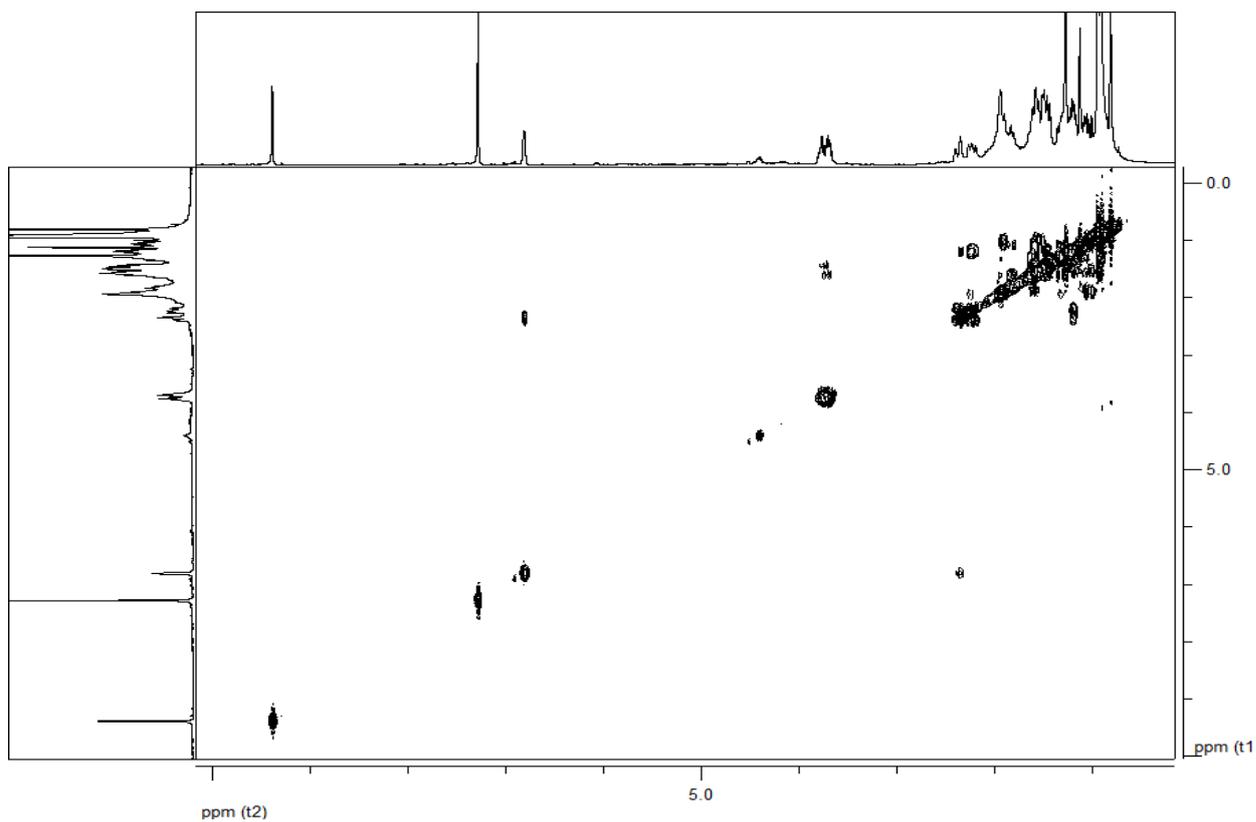
A continuación se presentan los espectros IR y RMN obtenidos del 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



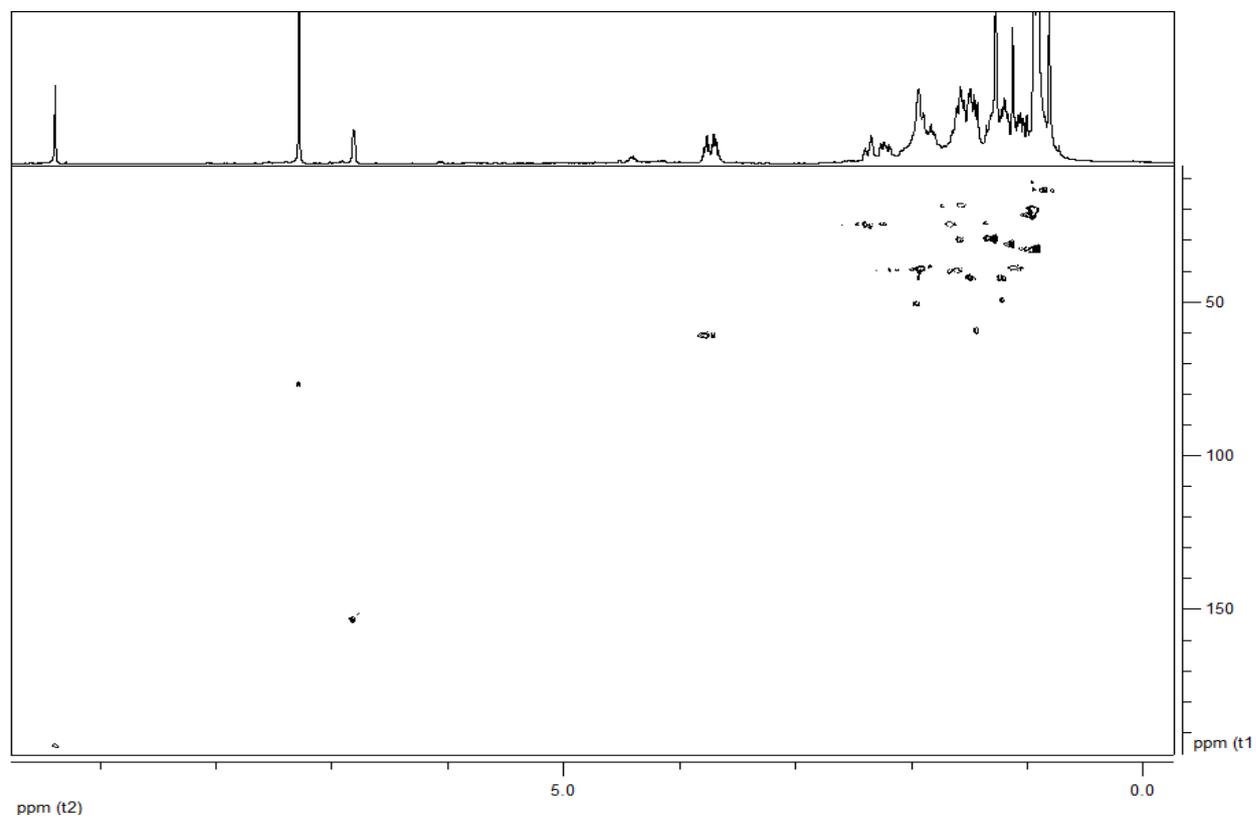
A9 – Espectro IR del 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



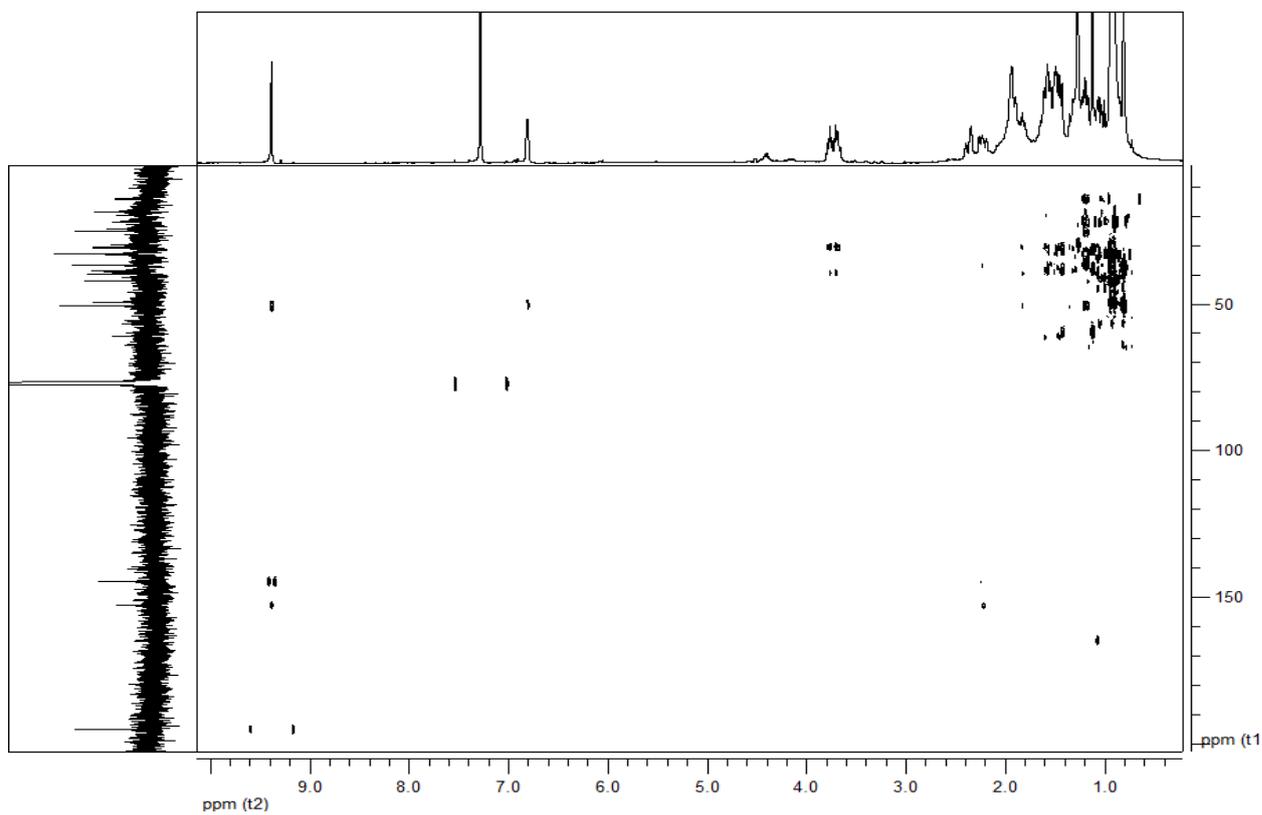
A10 – Espectro ^1H RMN obtenido del 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



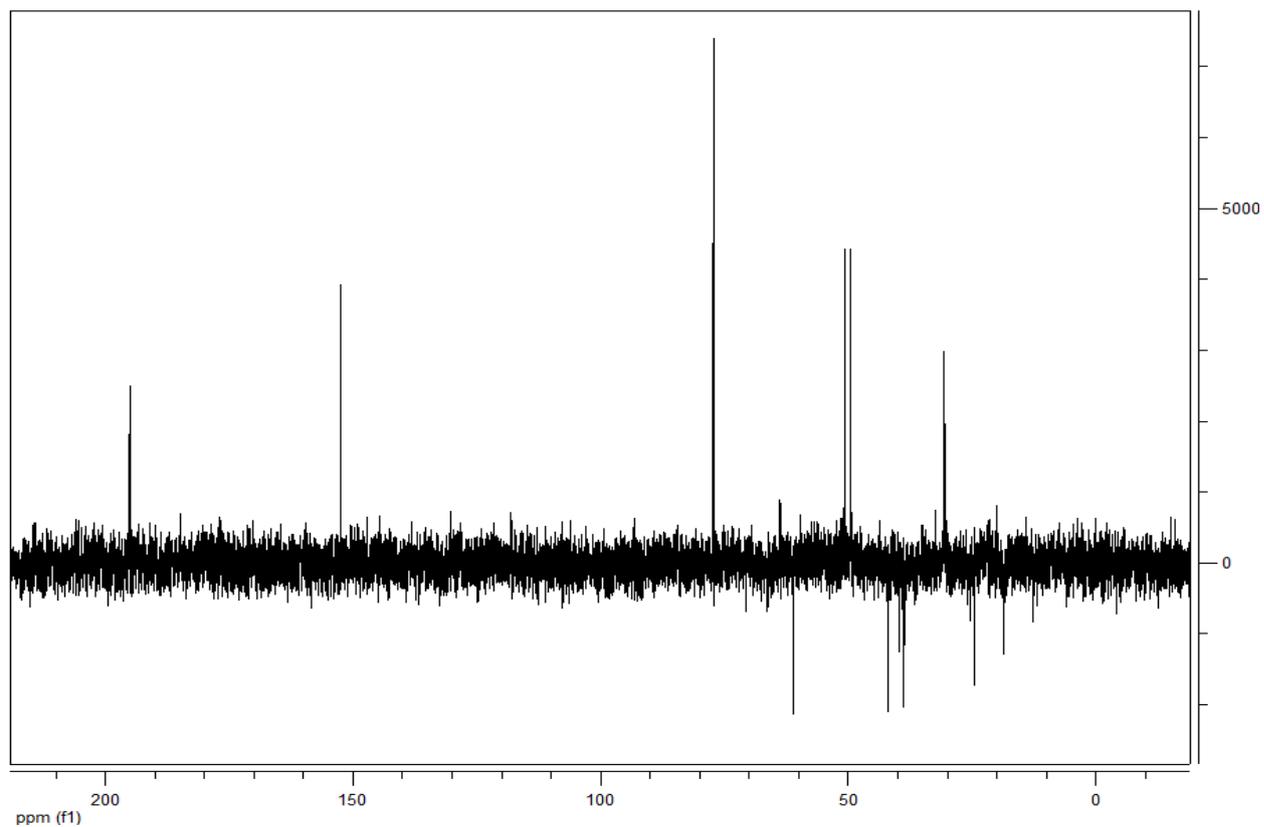
A11 – Espectro obtenido en el experimento COSY para el 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



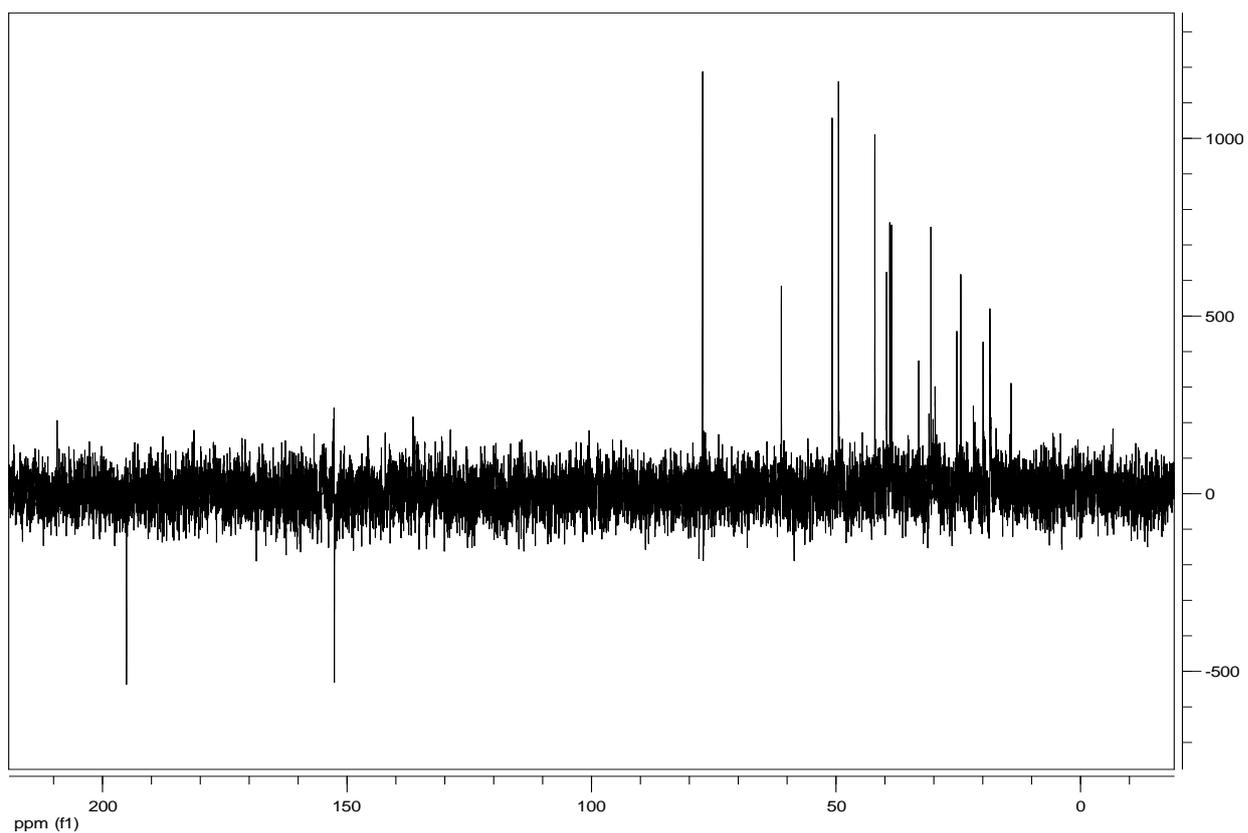
A12 – Espectro obtenido en el experimento HSQC del 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



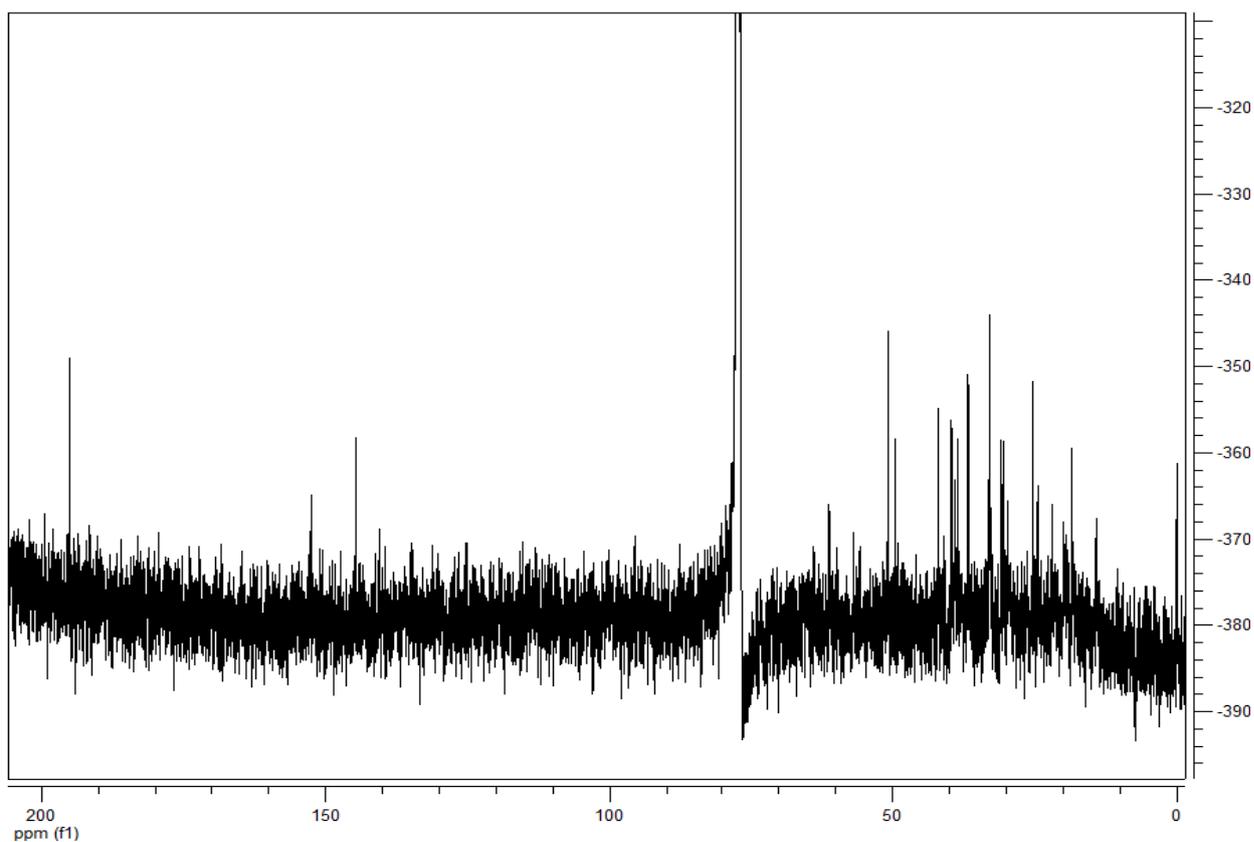
A13 – Espectro obtenido en el experimento HMBC del 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



A14 – Espectro obtenido en el experimento DEPT135 del 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



A15 – Espectro obtenido en el experimento DEPT90 realizado al 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.



A16 – Espectro ^{13}C obtenido para el 12-hidroxi-labd-7-en-13-al.