

# Estudio de Metabolitos Antibacterianos de la Flora Medicinal Nativa de Uruguay

por Cristina Olivaro

Universidad de la República  
Facultad de Química  
Montevideo 2015







# **ESTUDIO DE METABOLITOS ANTIBACTERIANOS DE ESPECIES DE LA FLORA MEDICINAL NATIVA DE URUGUAY**

por

Cristina Olivaro

Tesis entregada como parte de los requerimientos  
para la obtención del título de

**DOCTOR EN QUÍMICA**

FACULTAD DE QUÍMICA

2015

Dr. Alvaro Vázquez  
Director



*A Eduardo y Juan Manuel*



*"Lo que sabemos es una gota, lo que ignoramos un  
inmenso océano. La admirable disposición y armonía  
del universo, no ha podido sino salir del plan de un Ser  
omnisciente y omnipotente"*

*Isaac Newton  
(1643-1727)*





*Me gustaría expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo.*

*Primero y como más importante, me gustaría agradecer a mi familia que ha sido fuente de apoyo constante e incondicional en toda mi vida, a mis padres, mis hermanos y Eduardo.*

*Un agradecimiento muy especial a mis amigos por el ánimo recibido, en especial a Lourdes con quien he compartido la experiencia de lo que significa escribir una tesis.*

*A mi director de tesis, el Dr. Alvaro Vázquez, por sus conocimientos, su manera de trabajar, sus orientaciones, por su paciencia y motivación que han sido fundamentales para mi formación como investigadora.*

*A mis compañeros del grupo de investigación, Stephanie Barneche, Nicole Paris, Germán Azcune, Romina Delgado, Vanesa Rostán y Daniela Bandera, por su contribución en este trabajo.*

*A todos los integrantes presentes y pasados de la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales de la Facultad de Química y a los integrantes del Espacio de Ciencia y Tecnología Química del Centro Universitario de Tacuarembó gracias por su compañerismo y apoyo.*

*A la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química por permitirme hacer uso de sus instalaciones y a la Prof. María Pía Cerdeiras por sus valiosos aportes.*

*Al Lic. Federico Haretche, por la colecta y clasificación del material vegetal. A Horacio Pezarogglio y al Dr. Guillermo Moyna por los análisis de RMN. A la Dra. Alejandra Rodríguez por los análisis de MS.*

*Al Prof. Norberto P. Lopes por recibirme en su laboratorio de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos perteneciente a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Riberão Preto de la Universidad de San Pablo.*

*También debo agradecer a todos aquellos organismos que ayudaron a financiar este proyecto, Pedeciba Química y la ANNI.*

*A todos ellos, muchas gracias.*

## TABLA DE CONTENIDO

|  |              |
|--|--------------|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b>   | <b>vii</b>   |
| <b>INDICE DE FIGURAS</b>   | <b>xiii</b>  |
| <b>INDICE DE TABLAS</b>  | <b>xviii</b> |
| <b>GLOSARIO</b>  | <b>xviii</b> |
| <b>RESUMEN</b>   | <b>1</b>     |
| <b>CAPÍTULO 1</b>  | <b>4</b>     |
| <b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>  |              |
| <b>1.1.- Necesidad de nuevos antimicrobianos. El problema de la resistencia.</b>               | <b>5</b>     |
| <b>1.2.- Resistencia vs desarrollo de antibacterianos.</b>                                     | <b>8</b>     |
| <b>1.3.- Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos.</b>                              | <b>13</b>    |
| <b>1.4.- Mecanismos de resistencia en bacterias.</b>   | <b>15</b>    |
| <i>Inactivación y modificación de antibióticos.</i>  | <b>15</b>    |
| <i>Alteración del sitio blanco.</i>  | <b>16</b>    |
| <i>Disminución de la permeabilidad.</i>  | <b>17</b>    |
| <i>Aumento de la extrusión del antibiótico por bombas de eflujo.</i>                           | <b>17</b>    |
| <b>1.5.- <i>Staphylococcus aureus</i> y sus principales mecanismos de resistencia.</b>         | <b>18</b>    |
| <i>Resistencia a la penicilina.</i>  | <b>19</b>    |
| <i>Resistencia a la metilina.</i>  | <b>20</b>    |
| <i>Resistencia a la vancomicina.</i>   | <b>22</b>    |
| <i>Resistencia a las fluoroquinolonas.</i>   | <b>23</b>    |
| <i>Resistencia a los nuevos antibióticos activos contra MRSA: linezolid &amp; daptomicina.</i> | <b>23</b>    |
| <b>1.6.- Estrategias para la búsqueda de antimicrobianos.</b>                                  | <b>23</b>    |
| <i>Modificación de fármacos establecidos.</i>  | <b>24</b>    |
| <i>Diseño racional de nuevos fármacos.</i>   | <b>25</b>    |

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Rastreo de actividad de fuentes naturales.</i>  | 26        |
| <i>Reversión de la resistencia.</i>  | 27        |
| <b>1.7.- Los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos.</b>                  | <b>28</b> |
| <b>1.8.- Los productos naturales como fuentes de antibacterianos.</b>                      | <b>34</b> |
| <b>1.9.- Hipótesis de este trabajo</b>   | <b>39</b> |
| <b>1.10.- Estrategia de este trabajo.</b>  | <b>41</b> |
| <b>1.11.- Bibliografía.</b>  | <b>43</b> |
| <b>CAPÍTULO 2</b>  | <b>56</b> |
| <b>PROSPECCIÓN MICROBIOLÓGICA DEL BOSQUE DE GALERÍA DEL RÍO URUGUAY Y DEL RÍO QUEGUAY.</b> |           |
| <b>2.1.- INTRODUCCIÓN</b>  | <b>57</b> |
| <b>2.1.1.- Biodiversidad y Bioprospección.</b>   | <b>57</b> |
| <b>2.1.2.- Estrategias para bioprospectar la biodiversidad.</b>                            | <b>58</b> |
| <i>Colecta al azar.</i>  | 59        |
| <i>Enfoque etnobotánico</i>  | 60        |
| <i>Lógica Evolutiva/Ecológica.</i>   | 61        |
| <i>Lógica Filogenética.</i>  | 61        |
| <i>Análisis de datos.</i>  | 63        |
| <b>2.1.3.- Flora nativa del Uruguay.</b>   | <b>63</b> |
| <b>2.1.4.- El bosque de galería en Uruguay.</b>  | <b>66</b> |
| <b>2.2.- MATERIALES y MÉTODOS</b>  | <b>68</b> |
| <b>2.2.1.- Búsqueda de información bibliográfica.</b>                                      | <b>68</b> |
| <b>2.2.2.- Selección del área de estudio y colecta.</b>                                    | <b>68</b> |
| <b>2.2.3.- Preparación de extractos.</b>   | <b>71</b> |
| <b>2.2.4.- Ensayos de actividad antibacteriana.</b>  | <b>71</b> |
| <i>Screening antibacteriano mediante Bioautografías.</i>                                   | 71        |
| <i>Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).</i>                                       | 72        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>2.3.- RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>   | <b>73</b>  |
| <b>2.3.1.- Información bibliográfica.</b>   | <b>73</b>  |
| <b>2.3.2.- Colecta y preparación de extractos.</b>  | <b>84</b>  |
| <b>2.3.3.- Actividad antibacteriana.</b>  | <b>84</b>  |
| <i>Screening antibacteriano.</i>  | <b>84</b>  |
| <i>Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).</i>  | <b>88</b>  |
| <b>2.3.4.- Selección de especies para aislamiento y elucidación estructural de moléculas activas.</b> | <b>90</b>  |
| <b>2.4.- BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>91</b>  |
| <b>CAPÍTULO 3</b>   | <b>96</b>  |
| <b>SESQUITERPENLACTONAS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL XANTHIUM CAVANILLESII.</b>                   |            |
| <b>3.1.- INTRODUCCIÓN</b>   | <b>97</b>  |
| <b>3.1.1.- Botánica de la familia Asteraceae.</b>   | <b>97</b>  |
| <i>La familia Asteraceae.</i>   | <b>97</b>  |
| <i>El género Xanthium.</i>  | <b>97</b>  |
| <i>Xanthium cavanillesii.</i>   | <b>98</b>  |
| <b>3.1.2.- Sesquiterpenlactonas</b>   | <b>100</b> |
| <i>Generalidades de las sesquiterpenlactonas.</i>   | <b>100</b> |
| <i>Definición y clasificación de sesquiterpenlactonas.</i>  | <b>101</b> |
| <i>Biosíntesis.</i>   | <b>104</b> |
| <i>Xanthanólidos.</i>   | <b>106</b> |
| <i>Actividad antibacteriana de las sesquiterpenlactonas.</i>  | <b>107</b> |
| <b>3.2.- MATERIALES y MÉTODOS</b>   | <b>108</b> |
| <b>3.2.1.- Procedimientos Generales.</b>  | <b>108</b> |
| <b>3.2.2.- Cromatografía en capa fina (TLC).</b>  | <b>108</b> |
| <b>3.2.3.- Cromatografía Gaseosa acoplada a detector de Ionización de Llama (GC-FID).</b>             | <b>108</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3.2.4.- Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).</b>   | <b>109</b> |
| <b>3.2.5.- Espectrometría de Masas exacta (HRMS).</b>  | <b>109</b> |
| <b>3.2.6.- Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS).</b>                              | <b>109</b> |
| <b>3.2.7.- Espectroscopía Infrarroja (IR).</b>   | <b>110</b> |
| <b>3.2.8.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).</b>   | <b>110</b> |
| <b>3.2.9.- Modelado Molecular.</b>   | <b>110</b> |
| <b>3.2.10.- Material vegetal.</b>  | <b>111</b> |
| <b>3.2.11.- Aislamiento de compuestos con actividad antibacteriana del <i>X. cavanillesii</i>.</b>                         | <b>111</b> |
| <i>Aislamiento sesquiterpenlactona 1.</i>  | <b>111</b> |
| <i>Aislamiento sesquiterpenlactona 2 y 3.</i>  | <b>111</b> |
| <i>Aislamiento sesquiterpenlactona 4.</i>  | <b>112</b> |
| <i>Aislamiento sesquiterpenlactona 5.</i>  | <b>112</b> |
| <b>3.2.12.- Actividad antibacteriana.</b>  | <b>113</b> |
| <i>Bioautografías.</i>   | <b>113</b> |
| <i>Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).</i>   | <b>113</b> |
| <b>3.3.- RESULTADOS y DISCUSIÓN</b>  | <b>115</b> |
| <b>3.3.1.- Aislamiento y elucidación estructural de Sesquiterpenlactonas del <i>Xanthium cavanillesii</i>.</b>             | <b>115</b> |
| <i>Sesquiterpenlactona 1.</i>  | <b>115</b> |
| <i>Sesquiterpenlactona 2 y 3.</i>  | <b>130</b> |
| <i>Sesquiterpenlactona 2.</i>  | <b>132</b> |
| <i>Sesquiterpenlactona 3.</i>  | <b>141</b> |
| <i>Sesquiterpenlactona 4.</i>  | <b>152</b> |
| <i>Sesquiterpenlactona 5.</i>  | <b>166</b> |
| <b>3.3.2.- Identificación de Sesquiterpenlactona 1 en extracto <i>Xanthium cavanillesii</i> utilizando UPLC/ESI-MS/MS.</b> | <b>179</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <i>Introducción.</i>   | <b>179</b> |
| <i>Optimización condiciones (ESI) MS/MS.</i>                             | <b>179</b> |
| <i>Optimización condiciones LC.</i>                                      | <b>181</b> |
| <i>Análisis del extracto.</i>  | <b>182</b> |
| <i>Conclusiones.</i>   | <b>183</b> |
| <b>3.3.3.- Actividad antibacteriana del <i>Xanthium cavanillesii</i></b> | <b>184</b> |
| <i>Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).</i>                     | <b>184</b> |
| <b>3.4.- BIBLIOGRAFÍA</b>  | <b>186</b> |
| <b>CAPÍTULO 4</b>  | <b>195</b> |
| <b>CONCLUSIONES</b>  |            |
| <b>4.1.- Conclusiones.</b>   | <b>196</b> |
| <b>4.2.- Bibliografía.</b>   | <b>197</b> |

## INDICE DE FIGURAS

|                   |   |           |
|-------------------|---|-----------|
| <b>Figura 1.1</b> | Línea del tiempo del descubrimiento de nuevas clases de antibacterianos y su introducción en la clínica.              | <b>9</b>  |
| <b>Figura 1.2</b> | Número total de agentes antibacterianos que alcanzan el mercado.  | <b>11</b> |
| <b>Figura 1.3</b> | Comparación del aumento de cepas resistentes, nuevos antimicrobianos y compañías de investigación en antimicrobianos. | <b>12</b> |
| <b>Figura 1.4</b> | Estructura de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.  | <b>18</b> |
| <b>Figura 1.5</b> | Modificaciones químicas sobre la molécula de carbapenem.  | <b>25</b> |
| <b>Figura 1.6</b> | Modificación química sobre la glicilciclina.  | <b>25</b> |
| <b>Figura 1.7</b> | Fuente de moléculas activas aprobadas (1981-2010).  | <b>29</b> |
| <b>Figura 1.8</b> | Número total de moléculas activas aprobadas por año, 1981-  | <b>29</b> |



2010.

|                    |  |            |
|--------------------|--|------------|
| <b>Figura 1.9</b>  | Porcentaje N/NB/ND por año, 1981-2010.   | <b>30</b>  |
| <b>Figura 1.10</b> | Estructura química de algunas drogas derivadas de plantas superiores.  | <b>32</b>  |
| <b>Figura 1.11</b> | Fuente de moléculas antibacterianas aprobadas (1981-2010).   | <b>35</b>  |
| <b>Figura 1.12</b> | Algunos antibacterianos de origen natural.   | <b>37</b>  |
| <b>Figura 1.13</b> | Estructura de los stellatazoles.   | <b>37</b>  |
| <b>Figura 1.14</b> | Algunos antibacterianos de plantas.  | <b>39</b>  |
| <b>Figura 1.15</b> | Esquema de la estrategia del trabajo.  | <b>42</b>  |
| <b>Figura 2.1</b>  | Diferentes enfoques de la bioprospección.  | <b>59</b>  |
| <b>Figura 2.2</b>  | Superficie forestada del país.   | <b>66</b>  |
| <b>Figura 2.3</b>  | Ubicación del departamento de Paysandú en el Uruguay y de Uruguay en América del Sur.  | <b>68</b>  |
| <b>Figura 2.4</b>  | Sitios de colecta.   | <b>69</b>  |
| <b>Figura 2.5</b>  | Bioautografías sobre placas de TLC sin cromatografiar.   | <b>71</b>  |
| <b>Figura 2.6</b>  | Información etnobotánica reportada de las especies identificadas.  | <b>73</b>  |
| <b>Figura 3.1</b>  | Planta <i>Xanthium cavanillesii</i> .  | <b>99</b>  |
| <b>Figura 3.2</b>  | Flores del <i>Xanthium cavanillesii</i> .  | <b>99</b>  |
| <b>Figura 3.3</b>  | Frutos del <i>Xanthium cavanillesii</i> .  | <b>100</b> |
| <b>Figura 3.4</b>  | Principales esqueletos de sesquiterpenlactonas mostrando la forma 12,6 lactonizada (en forma arbitraria) y la numeración de los átomos de carbono del núcleo base. | <b>102</b> |
| <b>Figura 3.5</b>  | Estructura de algunos esqueletos carbocíclicos.  | <b>103</b> |
| <b>Figura 3.6</b>  | Anillo lactónico ( $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona ) fusionado cis o trans.   | <b>103</b> |
| <b>Figura 3.7</b>  | Biogénesis del anillo $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona y del esqueleto del germacranólido.   | <b>105</b> |
| <b>Figura 3.8</b>  | Relación biogenética de guaiano, xanthano y xanthanólidos.   | <b>107</b> |
| <b>Figura 3.9</b>  | Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenlactona 1.  | <b>116</b> |
| <b>Figura 3.10</b> | Bioautografía de las fracciones de la VLC.   | <b>116</b> |

|                    |  |            |
|--------------------|--|------------|
| <b>Figura 3.11</b> | TLC de las fracciones obtenidas de cromatografía en columna.   | <b>117</b> |
| <b>Figura 3.12</b> | Estructura química sesquiterpenlactona 1.  | <b>117</b> |
| <b>Figura 3.13</b> | Espectro ESI-HRMS de sesquiterpenlactona 1 en modo positivo.   | <b>118</b> |
| <b>Figura 3.14</b> | Espectro EI-MS de sesquiterpenlactona 1.   | <b>118</b> |
| <b>Figura 3.15</b> | Espectro FTIR de sesquiterpenlactona 1.  | <b>118</b> |
| <b>Figura 3.16</b> | Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de sesquiterpenlactona 1 en $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.                                      | <b>120</b> |
| <b>Figura 3.17</b> | Espectro DEPT 135 RMN de sesquiterpenlactona 1.  | <b>121</b> |
| <b>Figura 3.18</b> | Espectro $^1\text{H}$ RMN de sesquiterpenlactona 1 en $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.   | <b>122</b> |
| <b>Figura 3.19</b> | Estructura base de sesquiterpenlactona 1.  | <b>123</b> |
| <b>Figura 3.20</b> | Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 1.  | <b>124</b> |
| <b>Figura 3.21</b> | Espectro HSQC de sesquiterpenlactona 1.  | <b>125</b> |
| <b>Figura 3.22</b> | Espectro HMBC de sesquiterpenlactona 1.  | <b>126</b> |
| <b>Figura 3.23</b> | Correlaciones $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 1.   | <b>127</b> |
| <b>Figura 3.24</b> | Algunas correlaciones importantes HMBC de sesquiterpenlactona 1.   | <b>128</b> |
| <b>Figura 3.25</b> | Algunas correlaciones NOE de sesquiterpenlactona 1.  | <b>128</b> |
| <b>Figura 3.26</b> | Espectros NOE de sesquiterpenlactona 1.  | <b>129</b> |
| <b>Figura 3.27</b> | Conformación más estable obtenida por el programa de modelado molecular que corresponde con la estereoquímica propuesta. | <b>130</b> |
| <b>Figura 3.28</b> | Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenlactona 2 y 3.  | <b>131</b> |
| <b>Figura 3.29</b> | Estructura química sesquiterpenlactona 2.  | <b>132</b> |
| <b>Figura 3.30</b> | Estructura química sesquiterpenlactona 3.  | <b>132</b> |
| <b>Figura 3.31</b> | ESI-HRMS de sesquiterpenlactona 2 en modo positivo por infusión directa.   | <b>133</b> |
| <b>Figura 3.32</b> | Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de sesquiterpenlactona 2 en $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.                                      | <b>134</b> |

|                    |   |            |
|--------------------|---|------------|
| <b>Figura 3.33</b> | Espectro $^1\text{H}$ RMN de sesquiterpenlactona 2 en $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.    | <b>135</b> |
| <b>Figura 3.34</b> | Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 2.                 | <b>137</b> |
| <b>Figura 3.35</b> | Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC de sesquiterpenlactona 2.              | <b>138</b> |
| <b>Figura 3.36</b> | Espectro HMBC de sesquiterpenlactona 2.   | <b>139</b> |
| <b>Figura 3.37</b> | Correlaciones $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 2.            | <b>140</b> |
| <b>Figura 3.38</b> | Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenlactona 2.                                | <b>141</b> |
| <b>Figura 3.39</b> | Espectro de masas EI-MS de sesquiterpenlactona 3.                                   | <b>141</b> |
| <b>Figura 3.40</b> | Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de sesquiterpenlactona 3 en $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz. | <b>143</b> |
| <b>Figura 3.41</b> | Espectro $^1\text{H}$ RMN de sesquiterpenlactona 3 en $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.    | <b>144</b> |
| <b>Figura 3.42</b> | Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 3.                 | <b>146</b> |
| <b>Figura 3.43</b> | Espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC de sesquiterpenlactona 3.              | <b>147</b> |
| <b>Figura 3.44</b> | Espectro HMBC de sesquiterpenlactona 3.   | <b>148</b> |
| <b>Figura 3.45</b> | Correlaciones $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 3.            | <b>149</b> |
| <b>Figura 3.46</b> | Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenlactona 3.                                | <b>150</b> |
| <b>Figura 3.47</b> | Espectro NOESY de sesquiterpenlactona 3.  | <b>151</b> |
| <b>Figura 3.48</b> | Algunas correlaciones NOESY de sesquiterpenlactona 3.                               | <b>152</b> |
| <b>Figura 3.49</b> | Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenlactona 4.                     | <b>153</b> |
| <b>Figura 3.50</b> | Estructura química de sesquiterpenlactona 4.  | <b>154</b> |
| <b>Figura 3.51</b> | Espectro ESI-HRMS de sesquiterpenlactona 4.   | <b>154</b> |
| <b>Figura 3.52</b> | Espectro EI-MS de sesquiterpenlactona 4.  | <b>155</b> |
| <b>Figura 3.53</b> | Espectro $^{13}\text{C}$ de sesquiterpenlactona 4 en $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.     | <b>156</b> |
| <b>Figura 3.54</b> | Espectro DEPT 135 RMN de sesquiterpenlactona 4.                                     | <b>157</b> |
| <b>Figura 3.55</b> | Espectro $^1\text{H}$ RMN de sesquiterpenlactona 4 en $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.    | <b>158</b> |

|                    |  |            |
|--------------------|--|------------|
| <b>Figura 3.56</b> | Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 4.  | <b>160</b> |
| <b>Figura 3.57</b> | Espectro HSQC de sesquiterpenlactona 4.  | <b>161</b> |
| <b>Figura 3.58</b> | Espectro HMBC de sesquiterpenlactona 4.  | <b>162</b> |
| <b>Figura 3.59</b> | Correlaciones COSY de la sesquiterpenlactona 4.  | <b>163</b> |
| <b>Fogura 3.60</b> | Espectro HSQC-TOCSY de sesquiterpenlactona 4.  | <b>164</b> |
| <b>Figura 3.61</b> | Ampliaciones del Espectro HSQC-TOCSY de sesquiterpenlactona 4.   | <b>165</b> |
| <b>Figura 3.62</b> | Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenalctona 4.   | <b>166</b> |
| <b>Figura 3.63</b> | Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenlactonas 5 y 6.   | <b>167</b> |
| <b>Figura 3.64</b> | Estructura química de sesquiterpenlactona 5.   | <b>167</b> |
| <b>Figura 3.65</b> | Espectro EI-MS de sesquiterpenlacona 5.  | <b>168</b> |
| <b>Figura 3.66</b> | Espectro $^{13}\text{C}$ RMN de sesquiterpenlactona 5 en $\text{CDCl}_3$ a 100 MHz.  | <b>169</b> |
| <b>Figura 3.67</b> | Espectro $^1\text{H}$ RMN de sesquiterpenlactona 5 en $\text{CDCl}_3$ a 400 MHz.   | <b>170</b> |
| <b>Figura 3.68</b> | Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de sesquiterpenlactona 5.  | <b>172</b> |
| <b>Figura 3.69</b> | Espectro HSQC de sesquiterpenlactona 5.  | <b>173</b> |
| <b>Figura 3.70</b> | Espectro HMBC de sesquiterpenlactona 5.  | <b>174</b> |
| <b>Figura 3.71</b> | Algunas correlaciones COSY de sesquiterpenlactona 5.   | <b>175</b> |
| <b>Figura 3.72</b> | Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenlactona 5.   | <b>176</b> |
| <b>Figura 3.73</b> | Espectro NOESY de sesquiterpenlactona 5.   | <b>177</b> |
| <b>Figura 3.74</b> | Algunas correlaciones NOESY de sesquiterpenlactona 5.  | <b>178</b> |
| <b>Figura 3.75</b> | Optimización de la energía de colisión ( $m/z$ 249,04 $\rightarrow$ 231,03 y $m/z$ 249.04 $\rightarrow$ 203.05).Espectros <i>daughter scan</i> para $m/z$ 249.04 con energía de colisión 5 eV y 10 eV. | <b>180</b> |
| <b>Figura 3.76</b> | Cromatogramas extractos <i>X.cavanillesii</i> : Arreglo de Diodos y  | <b>181</b> |

|                    |   |            |
|--------------------|---|------------|
|                    | Corriente Iónica Total.   |            |
| <b>Figura 3.77</b> | Cromatogramas se sesquiterpenlactona 1: Arreglo de Diodos y Corriente Iónica Total. | <b>182</b> |
| <b>Figura 3.78</b> | Análisis UPLC-MS/MS en modo MRM del extracto <i>X.cavanillesii</i> .                | <b>183</b> |

## INDICE DE TABLAS

|                  |   |            |
|------------------|---|------------|
| <b>Tabla 1.1</b> | Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos.                                | <b>14</b>  |
| <b>Tabla 2.1</b> | Datos etnobotánicos de las especies identificadas en el relevamiento.               | <b>74</b>  |
| <b>Tabla 2.2</b> | Resultados del screening antibacteriano.  | <b>84</b>  |
| <b>Tabla 2.3</b> | Resultados de la Actividad Anti-Staphylococcus.                                     | <b>89</b>  |
| <b>Tabla 3.1</b> | Desplazamientos químicos $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para sesquiterpenlactona 1. | <b>123</b> |
| <b>Tabla 3.2</b> | Desplazamientos químicos $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para sesquiterpenlacotna 2. | <b>136</b> |
| <b>Tabla 3.3</b> | Desplazamientos químicos $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para sesquiterpenlactona 3. | <b>145</b> |
| <b>Tabla 3.4</b> | Desplazamientos químicos $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para sesquiterpenlactona 4. | <b>159</b> |
| <b>Tabla 3.5</b> | Desplazamientos químicos $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para sesquiterpenlactona 5. | <b>171</b> |
| <b>Tabla 3.6</b> | Correlaciones NOESY (H-H) de sesquiterpenlactona 5.                                 | <b>178</b> |
| <b>Tabla 3.7</b> | CIM's de muestras contra cepas de <i>S.aureus</i> .                                 | <b>185</b> |

## GLOSARIO

|             |   |
|-------------|---|
| <b>COSY</b> | Correlation Spectroscopy                            |
| <b>DEPT</b> | Distortionless Enhancement by Polarization Transfer |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>EI-MS</b>          | Electron Ionization -Mass Spectroscopy  |
| <b>ESI</b>            | Electrospray Ionization   |
| <b>ESI-HRMS</b>       | Electrospray Ionization - High Resolution Mass Spectroscopy   |
| <b>FTIR</b>           | Fourier Transform Infrared Spectroscopy   |
| <b>GC</b>             | Gas Chromatography  |
| <b>GC-FID</b>         | Gas Chromatography coupled with Flame Ionization Detector   |
| <b>GC-MS</b>          | Gas Chromatography coupled with Mass Spectroscopy   |
| <b>HMBC</b>           | Heteronuclear Multiple Bond Correlation   |
| <b>HMQC</b>           | Heteronuclear Multiple Quantum Correlation  |
| <b>HPLC</b>           | High performance Liquid Chromatography  |
| <b>HSQC</b>           | Heteronuclear Single Quantum Correlation  |
| <b>HSQC-TOCSY</b>     | Heteronuclear Single Quantum Correlation - Total Correlation Spectroscopy                           |
| <b>LC</b>             | Liquid Chromatography   |
| <b>LC-MS/MS</b>       | Liquid Chromatography coupled with Tandem Mass Spectrometry   |
| <b>MRM</b>            | Multiple Reaction Monitoring  |
| <b>MS</b>             | Mass spectrum   |
| <b>MS/MS</b>          | Tandem Mass Spectrometry  |
| <b>NOE</b>            | Nuclear Overhauser Effect   |
| <b>TLC</b>            | Thin Layer Chromatography   |
| <b>TMS</b>            | Tetramethylsilane   |
| <b>TOCSY</b>          | Total Correlation Spectroscopy  |
| <b>UPLC</b>           | Ultrapformance Liquid Chromatography  |
| <b>UPLC/ESI-MS/MS</b> | Ultrapformance Liquid Chromatography coupled with Electrospray Ionization tandem mass spectroscopy. |



## RESUMEN

A pesar de los grandes avances en la quimioterapia de las enfermedades infecciosas estas están lejos de ser controladas y más aún erradicadas y son aún una de las principales causas de muerte en el mundo. Esto se debe, entre otros motivos, a la falta de una terapéutica adecuada, tanto sea por la falta de fármacos efectivos (para infecciones fúngicas o virales) como a la rápida aparición de resistencia que vuelve inefectivas las drogas existentes.

Los agentes infecciosos resistentes, o sea aquellos que no son destruidos o inhibidos por los compuestos antimicrobianos son una creciente causa de preocupación en los organismos de salud pública. La tuberculosis, la gonorrea, la malaria y las otitis infecciosas en niños pequeños son sólo algunas de las enfermedades que se han convertido en difíciles de tratar debido a la aparición de cepas resistentes y multiresistentes (NIAID, 1998; Fauci & Marston, 2014).

Esto ha llevado a numerosas iniciativas para desarrollar programas colaborativos para enfrentar la situación como el programa ESKAPE. Los microorganismos ESKAPE, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y varias especies de *Enterobacter* son los patógenos que en la actualidad causan la mayoría de las infecciones hospitalarias de Estados Unidos y de manera efectiva "se escapan" de los efectos de los fármacos antibacterianos. Datos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) muestran un rápido aumento de las tasas de infección debido a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) , *E. faecium* resistente a la vancomicina (VRE) y *P. aeruginosa* resistentes a las fluoroquinolonas. Las opciones terapéuticas para estos patógenos son extremadamente limitadas de forma que en la clínica obliga a utilizar los medicamentos más antiguos, que antes se descartaban , como la colistina, que están asociados con toxicidad importante y para los que existe una falta de datos sólidos para orientar la selección de régimen de dosificación o la duración de la terapia. El creciente número de pacientes de edad avanzada y los pacientes sometidos a cirugía , el trasplante y la quimioterapia y los aumentos dramáticos en la población en unidades de cuidados intensivos neonatales



producen un mayor número de individuos inmunocomprometidos con riesgo de estas infecciones (Boucher et al., 2009).

*Staphylococcus aureus* es un patógeno comunitario y nosocomial importante. Este organismo es causante de una considerable preocupación debido a su gran habilidad de adquirir resistencia hacia los nuevos antibacterianos que alcanzan el mercado. Esta bacteria Gram positiva coloniza la piel en aproximadamente el 40 % de la gente sana. Es una de las bacterias más difíciles de tratar en pacientes y de erradicar del ambiente del hospital. Es particularmente preocupante la velocidad con que la bacteria genera nuevas resistencias.

El problema de la resistencia demanda un renovado esfuerzo en la búsqueda de agentes antibacterianos efectivos contra bacterias patógenas resistentes a los actuales antibióticos.

Las plantas superiores han demostrado ser una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos, tanto por presentar actividad farmacológica per se, como por representar nuevos tipos moleculares para el desarrollo de drogas, incluyendo antihipertensivos, analgésicos, citotóxicos y antiinflamatorios. Esto incluye compuestos que son medicamentos de primera elección o incluso los únicos existentes para el tratamiento de éstas afecciones. Ejemplos son la vincristina y vinblastina, alcaloides aislados de *C.roseus* utilizados clínicamente para el tratamiento de varios tipos de linfomas y leucemias, el taxol extraído de *T.baccata* (Clarck, 1996; Cowan, 1999).

El enfoque etnofarmacológico es un proceso alternativo utilizado para la selección de material para el desarrollo de fármacos y comprende trabajo de campo etnobotánico y etnomédico. Este enfoque combinado involucra el estudio de plantas utilizadas en la medicina folclórica y popular. En las décadas pasadas la etnobotánica médica se ha desarrollado y evolucionado hacia una nueva disciplina que incluye el trabajo en colaboración de diferentes áreas del conocimiento (Cox, 1990, Cox & Balick, 1994).

Este nuevo enfoque ha sido satisfactorio en la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas con propiedades anticancerígenas y antivirales, con rendimientos varias veces superiores al obtenido en búsquedas al azar.

La identificación de los principios activos presentes en estos vegetales brindará nuevos agentes naturales activos. Además de los beneficios directos del descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos, la revalorización de la flora medicinal autóctona propenderá a su conservación, conocimiento y posible explotación económica racional.

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

## CAPITULO 1

### INTRODUCCION GENERAL

#### 1.1.- Necesidad de nuevos antimicrobianos. El problema de la resistencia.

A pesar de los grandes avances en la quimioterapia de las enfermedades infecciosas estas están lejos de ser controladas y más aún erradicadas y son aún una de las principales causas de muerte en el mundo. En el año 2012 las enfermedades infecciosas y parasitarias causaron más de 16 millones de muertes sobre un total de 56 millones (OMS, 2014<sub>a</sub>). Sin embargo éstas no están igualmente distribuidas en el mundo. En la Región de África de la OMS el 70% de las muertes prematuras se deben a enfermedades infecciosas o de carácter materno, neonatal y nutricional, mientras que en los países de ingresos altos estas causas representan sólo el 8% (OMS, 2014<sub>a</sub>). Esto se debe, entre otros motivos, a la falta de una terapéutica adecuada, tanto sea por la falta de fármacos efectivos (para infecciones fúngicas o virales) como a la rápida aparición de resistencia que vuelve inefectivas las drogas existentes.

Los agentes infecciosos resistentes, o sea aquellos que no son destruidos o inhibidos por los compuestos antimicrobianos son una creciente causa de preocupación en los organismos de salud pública. La tuberculosis, la gonorrea, la malaria y las otitis infecciosas en niños pequeños son sólo algunas de las enfermedades que se han convertido en difíciles de tratar debido a la aparición de cepas resistentes y multiresistentes (NIAID, 1998; Fauci & Marston, 2014).

Esto ha llevado a numerosas iniciativas para desarrollar programas colaborativos para enfrentar la situación como el programa ESKAPE. Los microorganismos ESKAPE, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y varias especies de *Enterobacter* son los patógenos que en la actualidad causan la mayoría de las infecciones hospitalarias de Estados Unidos y de manera efectiva "se escapan" de los efectos de los fármacos antibacterianos. Datos de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) muestran un rápido aumento de las tasas de infección debido a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) , *E.*

*faecium* resistente a la vancomicina (VRE) y *P. aeruginosa* resistentes a las fluoroquinolonas. Más personas mueren en la actualidad de la infección por MRSA en los hospitales de Estados Unidos que de VIH / SIDA y la tuberculosis juntos. Además, ahora se producen infecciones multiresistentes. Varias especies de patógenos como *Acinetobacter* altamente resistentes, *P. aeruginosa* resistente a múltiples fármacos (MDR), especies de *Klebsiella* resistentes al carbapenem y *Escherichia coli* están emergiendo como patógenos importantes, tanto en los Estados Unidos como en otras partes del mundo . Las opciones terapéuticas para estos patógenos son extremadamente limitadas de forma que en la clínica obliga a utilizar los medicamentos más antiguos , que antes se descartaban , como la colistina, que están asociados con toxicidad importante y para los que existe una falta de datos sólidos para orientar la selección de régimen de dosificación o la duración de la terapia. El creciente número de pacientes de edad avanzada y los pacientes sometidos a cirugía , el trasplante y la quimioterapia y los aumentos dramáticos en la población en unidades de cuidados intensivos neonatales producen un mayor número de individuos inmunocomprometidos con riesgo de estas infecciones (Boucher et al., 2009).

Asimismo, la tuberculosis (TB) sigue siendo un importante problema sanitario a escala mundial. La cifra estimada de nuevos casos en 2012 fue de 8,6 millones, y 1,3 millones murieron por esta causa (entre ellos 320 000 seropositivos para el VIH) (OMS, 2013). En la década de los 40 se comenzaron los primeros tratamientos contra la tuberculosis y muy pronto se dieron a conocer los primeros casos de cepas resistentes a un tipo de droga concreto. En la década de 1990, debido a una convergencia de factores, emergieron las primeras cepas con multiresistencia MDR-TB ("Multi-Drug Resistance TB") a la actividad de los dos fármacos más efectivos, isoniazida y rifampicina. A partir de 2002, varios países detectaron casos de cepas que acumulaban más resistencias. Estas cepas se conocen como XDR-TB ("extensively Drug Resistant") y además de los medicamentos anteriores muestran resistencia a las fluoroquinolonas y alguna de las drogas conocidas como de segunda línea, por ejemplo, kanamicina, amikacina o capreomicina, entre otras. En Uruguay la tuberculosis que se creyó erradicada está en un lento pero constante aumento desde 2011, con 856 casos reportados en el año 2013, 785 de ellos nuevos (CHLA-EP, 2013).

Otro nicho de gran actualidad lo constituyen las infecciones fúngicas. Aunque se describen con creciente frecuencia infecciones producidas por diversos organismos fúngicos, la mayoría de las infecciones siguen siendo producidas por dermatofitos, *Malassezia*, *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus*. Estos tres últimos agentes están asociados a infecciones invasoras con un pronóstico sombrío, en parte debido a las enfermedades que predisponen a estas micosis -inmunosuprimidos, cancerosos, transplantados - y, en parte, a la mortalidad asociada a estos microorganismos. Otros casos comprometidos son pacientes en unidades de cuidados intensivos con alimentación parenteral, catéteres o sometidos a diálisis.

La mayoría de las candidiasis están producidas por la especie *Candida albicans*, y el origen de la infección es mayoritariamente endógeno. Sin embargo en los últimos tiempos ha cambiado la relación entre las levaduras causantes de infecciones invasoras, con un aumento importante de infecciones por *Candida* no *albicans*. Las aspergilosis invasivas se observan principalmente - pero no únicamente - en personas con una neutropenia o una inmunosupresión severa, principalmente en receptores de trasplantes de órganos, con una mortalidad asociada elevada, tanto por los problemas que plantea el diagnóstico precoz como por el difícil tratamiento antifúngico específico. La mayoría de estas aspergilosis están producidas por *Aspergillus fumigatus* pero otras especies también han sido aisladas en diferentes pacientes con aspergilosis, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* o *Aspergillus flavus*.

Es evidente que se han producido importantes avances en el conocimiento de la patogenia, diagnóstico y tratamiento de las micosis invasoras y en aquellas micosis más frecuentes por dermatofitos. Sin embargo, serios problemas de variabilidad de la respuesta de diferentes pacientes, resistencia fúngica y efectos secundarios adversos, han derivado en consenso general mundial respecto a la necesidad de nuevas drogas antifúngicas (Brandt & Park, 2013). Las infecciones fúngicas como la candidiasis o la neumonía a *Pneumocystis carinii* son comunes entre los enfermos de SIDA y la aparición de brotes de enfermedades fúngicas en pacientes cuyo sistema inmune no está comprometido es cada vez más común.

## 1.2.- Resistencia vs desarrollo de antibacterianos.

La era del antibiótico comenzó con la aplicación terapéutica de las sulfonamidas en la década del 1930 y las penicilinas en la década del 1940, seguido por el descubrimiento de un número diverso de estructuras altamente efectivas, muchos de los cuales derivan de productos naturales, y su "época de oro" va aproximadamente desde el año 1945 al 1970. Sin embargo desde 1980 han entrado al mercado sólo cinco nuevas clases de antibacterianos: el antibiótico tópico mupirocina en 1985, el linezolid en 2000 (oxazolidinona), la daptomicina en 2003 (lipopéptido), la retapamulina en 2007 (pleuromutilina) y la fidaxomicina (macrolactona) en 2011. Cabe destacar que algunos de éstos últimos antibacterianos no son realmente nuevos: la daptomicina fue descubierta en Eli Lilly a principios de la década de 1980, el linezolid fue descubierto en 1979, las pleuromutilinas fueron descubiertas en 1952. En la figura 1.1 se muestran las fechas del descubrimiento de las principales clases de antibacterianos, su introducción en la clínica y su origen.

El mismo período caracterizado por una disminución de nuevos agentes ha sido acompañado por un alarmante incremento de la resistencia a los agentes existentes, resultando en un serio problema para la salud pública mundial. En el pasado fue posible contrarrestar la pérdida de eficacia de los antibacterianos debido a la aparición de cepas resistentes mediante la introducción en el mercado de nuevos agentes. Este equilibrio desafortunadamente se rompió. Los microorganismos se han convertido cada vez más resistentes a múltiples fármacos a tal punto que ya existen bacterias resistentes a todos los antibióticos disponibles y el desarrollo de nuevos antibacterianos no ha seguido el mismo ritmo. La creciente brecha entre la frecuencia de las infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos y la investigación y el desarrollo de nuevos antibacterianos amenaza con llevarnos de vuelta a la era anterior a los antibióticos (Berkowitz, 1995; Shlaes, 2010; Wright, 2014).

Existen tres razones significativas por las cuales es difícil el descubrimiento de nuevos antibacterianos: la normativa que regula la aprobación de medicamentos, las fuerzas del mercado que hacen retirarse a las compañías farmacéuticas del desarrollo de antibacterianos y los retos científicos que implica.

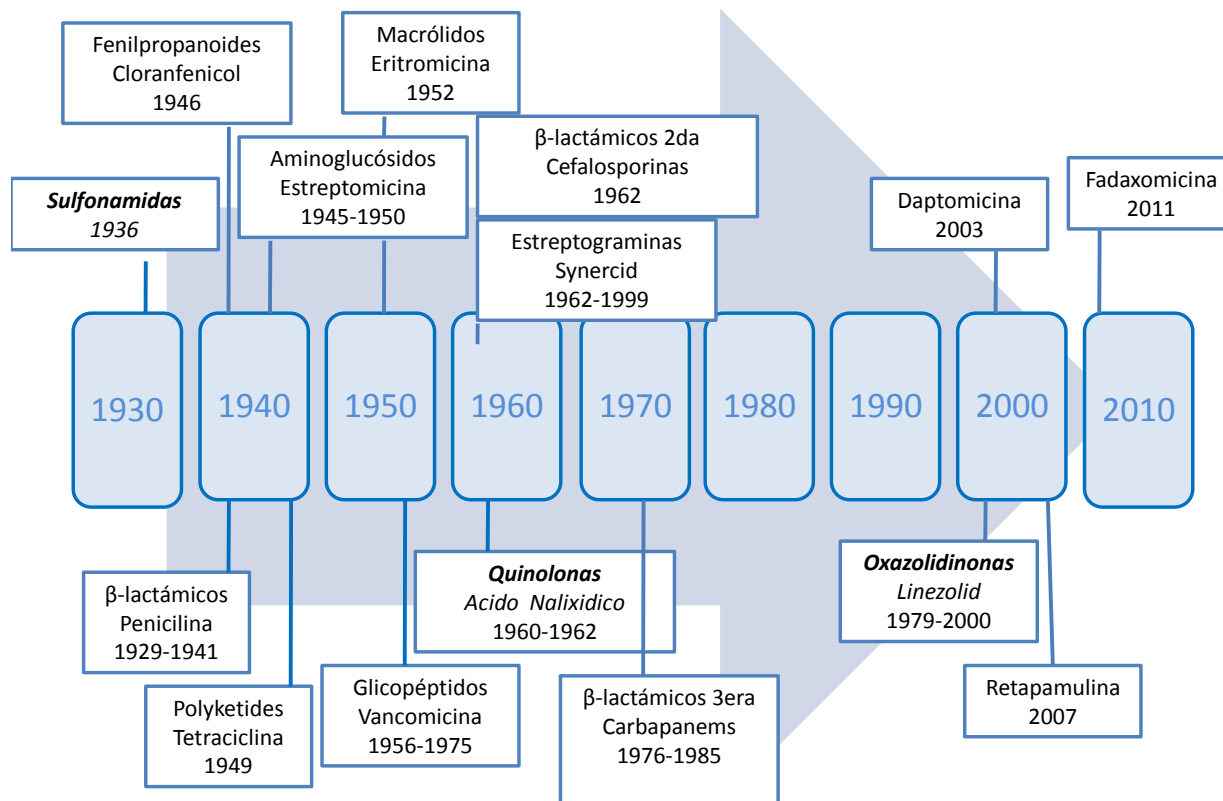


Figura 1.1. Línea del tiempo del descubrimiento de nuevas clases de antibacterianos y su introducción en la clínica. Compuestos escritos en fuente normal son derivados de productos naturales y los escritos en **ítila y negra** son de origen sintético.

La agencia reguladora de Estados Unidos, Food and Drug Administration (FDA) introdujo cambios en el diseño de los ensayos clínicos y en las normas en las últimas dos décadas para la aprobación de medicamentos. Esto trajo como consecuencia ensayos muy difíciles de cumplir, largos y costosos, particularmente para aquellos antibacterianos efectivos contra patógenos resistentes, lo cual desestimula el desarrollo de los mismos en la industria (Shlaes & Spellberg, 2012; Shlaes et al., 2013). Así entre los años 1983-1986, 16 nuevos antibacterianos recibieron aprobación por la FDA, entre los años 2008 y 2012, apenas dos (Fauci & Marston, 2014) (Fig. 1.2).



Durante los últimos 15 años, las farmacéuticas se retiraron en masa del desarrollo de antibacterianos citando altos costos de investigación, retornos pobres y regulaciones onerosas. La estadounidense Pfizer Inc., una de las pioneras de la producción masiva de la penicilina, abandonó su investigación de antibióticos en 2011, al igual que su compatriota Johnson & Johnson. En 2002, Eli Lilly & Co., también de EE.UU., dejó el campo para enfocarse en enfermedades crónicas. La francesa Sanofi SA escindió en 2004 su división de antiinfectivos, que pasó a llamarse Novexel.

La economía del descubrimiento de nuevos antibacterianos también es un reto en comparación con otras áreas terapéuticas. Los antibacterianos curan enfermedades a diferencia de las drogas que tratan enfermedades crónicas como el asma, hipertensión, colesterol, etc. y se toman por un periodo de tiempo corto en comparación con los medicamentos de enfermedades crónicas que se pueden tomar por años y a menudo de por vida. A causa del desarrollo de la resistencia por los patógenos un antibacteriano puede volverse inefectivo, con lo cual la industria farmacéutica tiene menos tiempo para recuperar la inversión. También si existe en el mercado un antibacteriano efectivo contra un patógeno resistente se trata de reservarlo para cuando sea estrictamente necesario, esto es bueno para la salud pública mundial pero va en contra de los ingresos de la industria que quiere venderlo. El retorno de la inversión para la industria farmacéutica, por lo tanto, se convierte en un reto para los antibacterianos, ya que los costos de los diferentes medicamentos en desarrollo varía sólo ligeramente. Una complicación adicional es que los antibacterianos están actualmente sin patentes y son suministrados por empresas que fabrican genéricos. El resultado, que es bueno para el público, que accede a drogas baratas y generalmente efectivas, tiene por desventaja que los usuarios esperan que todos los antibacterianos tengan un precio similar, incluso aquellos nuevos agentes efectivos contra patógenos multiresistentes (Shlaes, 2010; Cooper & Shlaes, 2011; Wright, 2014).

Por otro lado, la ciencia del descubrimiento de nuevos antibacterianos es cada vez más desafiante. La mayoría de las dianas específicas que permiten toxicidad selectiva han sido desarrolladas y todos los antibacterianos obvios parecerían haber sido ya descubiertos. En la década de 1990 la industria farmacéutica abandonó sus

formas clásicas de búsqueda de antibacterianos y en su lugar adoptó una estrategia que combina la genómica con cribado de alto rendimiento de los compuestos existentes en librerías. Se hizo demasiado hincapié en la identificación de blancos y moléculas que se unieran a ellos, y se puso poco énfasis en la capacidad de estas moléculas para permear bacterias, evadir bombas de eflujo y evitar resistencia mutacional. Por otra parte, las bibliotecas de compuestos fueron sistemáticamente sesgadas contra los antibacterianos. El desafortunado resultado es que ningún antibiótico encontrado por esta estrategia ha entrado al mercado y muchas de las principales empresas farmacéuticas han abandonado el descubrimiento de antibióticos.

Estos motivos han llevado a una reducción continua del número de nuevas entidades químicas aprobadas para su uso humano (Fig. 1.3).

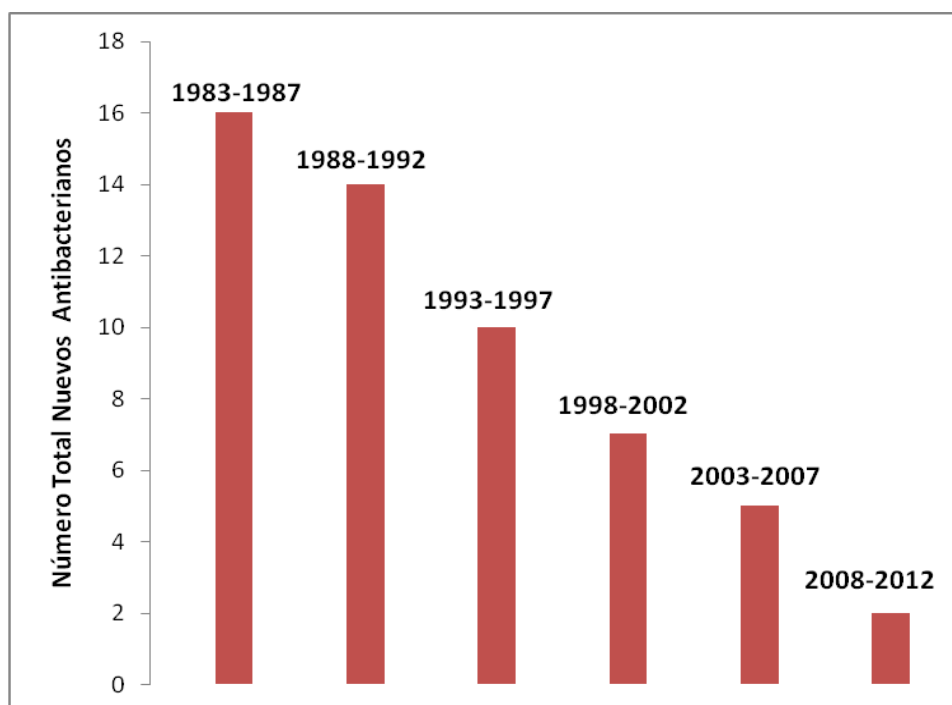


Figura 1.2. Número total de agentes antibacterianos que alcanzan el mercado.  
(aprobados por FDA)

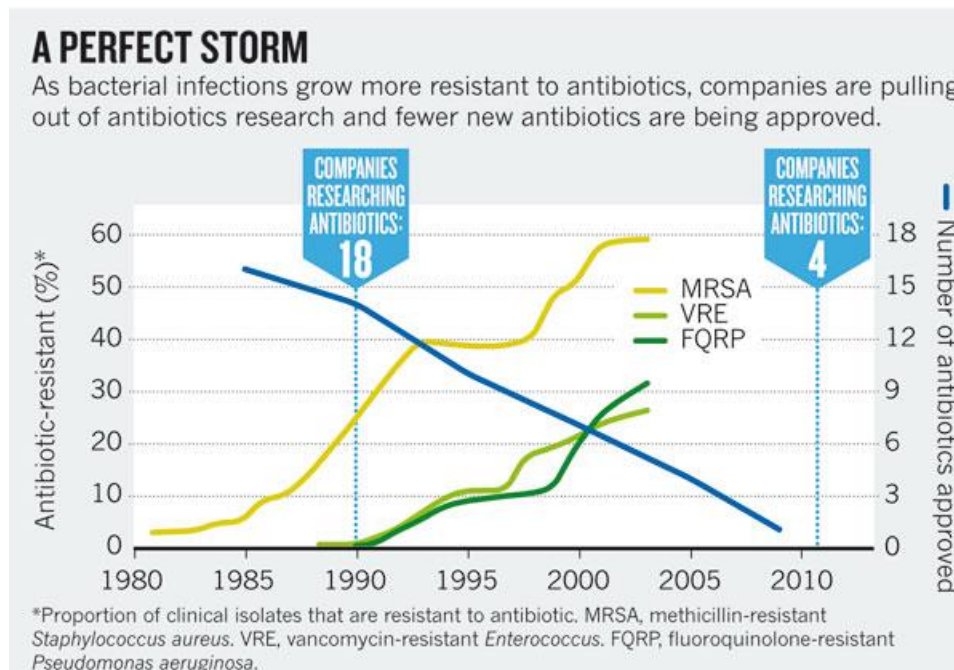


Figura 1.3. Comparación del aumento de cepas resistentes, nuevos antimicrobianos y compañías con investigación en antimicrobianos (Tomado de Cooper & Shlaes, 2011).

Las estrategias para frenar la propagación de bacterias resistentes a múltiples fármacos solo han tenido un éxito limitado. Mientras que la aplicación efectiva de estas estrategias puede reducir la tasa de aumento de las infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos, no es esperable una reducción a corto plazo de los problemas existentes. El desarrollo continuo de antibacterianos eficaces debe ser considerado como un "bien común". Tiene que haber un esfuerzo sostenido por parte de los gobiernos y las industrias para desarrollar nuevos fármacos rápidamente. De lo contrario, los cientos de miles de personas que mueren cada año por infecciones resistentes a los medicamentos pueden llegar a ser millones. La resistencia a los antibacterianos es una crisis de salud global. Se requiere una acción mundial ante uno de los descubrimientos más valiosos del siglo XX y que se está perdiendo en el siglo XXI (Cooper & Shlaes, 2011).

Un análisis de los agentes antibacterianos actualmente en fase de desarrollo y un estudio de los patrones de resistencia y tendencias actuales, demuestran la

urgencia de la discusión de incentivos para el desarrollo de nuevos tratamientos (EARSS, 2007; Payne et al., 2007; NIPHE, 2008, Brown, 2013). Un ejemplo es la iniciativa GAIN (Generating Antibiotic Incentives Now) que fue promulgada en julio del 2012 por el gobierno de los Estados Unidos para hacer frente a algunas de las barreras económicas y regulatorias y facilitar así el descubrimiento y desarrollo de fármacos antibacterianos (Public Law 112-144, Government Printing Office, <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/PLAW-112publ144/pdf/PLAW-112publ144.pdf>).

### **1.3- Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos.**

La mayoría de los antibacterianos usados para el tratamiento de las infecciones bacterianas pueden ser clasificados de acuerdo a su mecanismo de acción. Existen 4 mecanismos principales: 1) interferencia en la síntesis de la pared celular, 2) inhibición de la síntesis de proteínas, 3) interferencia en la síntesis de ácido nucleicos, y 4) inhibición de rutas metabólicas (Tabla 1.1).

Los antibacterianos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular incluyen a los  $\beta$ -lactámicos y a los glicopéptidos. Los  $\beta$ -lactámicos interfieren con las enzimas (PBP=Penicillin-binding proteins) requeridas para la síntesis de la capa de peptidoglucano (McManus, 1997). La vancomicina y la teicoplanina se unen al residuo terminal D-ala-D-ala del precursor del peptidoglucano, impidiendo el entrecruzamiento del mismo requerido para la síntesis de una pared celular estable (McManus, 1997).

Los macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, estreptograminas y oxazolidinonas producen su efecto antibacteriano inhibiendo la síntesis de proteínas (Neu, 1992; McManus, 1997). Los aminoglucósidos y tetraciclinas se unen a la subunidad 30S, mientras que el resto se unen a la subunidad 50S.

Las quinolonas ejercen su efecto antibacteriano inhibiendo las enzimas necesarias para la síntesis de ADN (ADN girasa y ADN topoisomerasa IV) (Drlica & Zhao, 1997), mientras que el rifampin se une a la ARN polimerasa, inhibiendo la síntesis de ARN.

Las sulfonamidas inhiben un paso en la síntesis bacteriana del ácido fólico y el trimetoprim (TMP) inhibe otro paso (Yao & Moellering, 2003; Petri, 2006). Formulaciones que combinan sulfonamida/trimetoprim están inhibiendo dos enzimas secuenciales en la vía del ácido fólico.

La alteración de estructura de la membrana bacteriana puede ser un quinto mecanismo de acción, aunque está menos caracterizado. Se postula que las polimixinas ejercen sus efectos inhibidores mediante el aumento de permeabilidad de la membrana bacteriana, causando fuga de contenidos de la bacteria (Fidai et al., 1997). La daptomicina actúa como una molécula anfipática, insertándose directamente dentro de la membrana citoplasmática de las bacterias grampositivas, mediante un proceso que es dependiente de la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ). Como consecuencia de ello se produce una rápida despolarización de la membrana bacteriana y la salida al exterior de una corriente de iones potasio ( $K^+$ ). Estos cambios determinan una rápida detención de los procesos de síntesis proteica y de ácidos nucleicos (DNA y RNA), que provoca la muerte de la bacteria (Straus & Hancock, 2006).

| <b>Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos</b>  |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interferencia con la síntesis de la pared celular                             <ul style="list-style-type: none"> <li>– <math>\beta</math>-lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams.</li> <li>– Glicopéptidos: vancomicina, teicoplanina.</li> </ul> </li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la síntesis de proteínas                             <ul style="list-style-type: none"> <li>– Unión a la subunidad ribosomal 50S: macrólidos, cloranfenicol, clindamicina, quinupristina-dalfopristina, linezolid.</li> <li>– Unión a la subunidad ribosomal 30S: aminoglucósidos, tetraciclinas.</li> <li>– Unión a isoleucil-tRNA-sintetasa bacteriana: mupirocina.</li> </ul> </li> </ul> |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Interferencia con la síntesis de ácido nucleico                             <ul style="list-style-type: none"> <li>– Inhibe síntesis de ADN: quinolonas</li> <li>– Inhibe síntesis de ARN: rifampin</li> </ul> </li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibición de la vía metabólica: sulfonamidas, análogos de ácido fólico</li> </ul>   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración de la estructura de la membrana bacteriana:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>– Polipéptidos: polimixinas.</li> <li>– Lipopéptidos: daptomicina</li> </ul> </li> </ul>   |

Tabla 1.1. Mecanismos de acción de los agentes antibacterianos.

#### **1.4.- Mecanismos de resistencia en bacterias.**

Desde el punto de vista molecular y bioquímico existen básicamente cuatro mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico : 1) Inactivación y modificación del antibiótico, 2) Alteración del sitio blanco del antibiótico, 3) Disminución de la permeabilidad al antibiótico y 4) Aumento de la extrusión del antibiótico por bombas de eflujo. Cabe resaltar que los cuatro mecanismos pueden ocurrir simultáneamente.

##### *Inactivación y modificación del antibiótico.*

Este mecanismo se lleva a cabo mediante la producción de enzimas que inactivan o modifican el antibiótico volviéndolo inefectivo.

Un ejemplo son las  $\beta$ -lactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico hidrolizando el anillo  $\beta$ -lactámico de la molécula. Se conocen más de 1300  $\beta$ -lactamasas, siendo esta familia de enzimas una de las más detalladamente estudiadas (Bush, 2013). Varias clasificaciones han sido propuestas basadas en las características de las enzimas y/o en sus perfiles de sustrato (Bush et al., 1995; Ambler, 1980). Según la clasificación de Ambler las  $\beta$ -lactamasas se agrupan en 4 clases: A, B, C y D. Cada clase opera por mecanismos catalíticos diferentes. Las clases A, C y D presentan un residuo de serina en el sitio activo y la clase B depende para su función de Zn. La clase A prefiere como sustrato a las penicilinas, la clase C prefiere a las cefalosporinas, la clase D prefiere a los  $\beta$ -lactámicos del tipo de la oxacilina y la clase B puede hidrolizar un amplio espectro de  $\beta$ -lactámicos incluyendo los carbapenems que son resistentes a las otras enzimas. (Thompson & Smith, 2000). Recientemente se han descubierto  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (ESBLs por su sigla en inglés) con afinidad por penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, entre otros sustratos. Estas enzimas han sido clasificadas como clase A, D y B.

La producción de las  $\beta$ -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia en los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

También se conocen casos de resistencia a macrólidos (Matsuoka et al., 1998; Nakamura et al., 2000) y tetraciclinas (Chopra & Roberts, 2001) debido a la inactivación de los mismos por enzimas.

Otro ejemplo de este mecanismo son las enzimas que modifican químicamente a los aminoglucósidos comprometiendo su unión a su blanco molecular (subunidad ribosomal 30S). Tres tipos de modificaciones han sido descritas, catalizadas por O-fosfotransferasas (APH), O-adeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (ACT) (Wright et al., 1998).

La resistencia al cloranfenicol es típicamente otorgada por acetiltransferasas existentes tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Estas enzimas acetilan los dos grupos hidroxilo de la molécula y previenen la unión del cloranfenicol al ribosoma 50S (Murray & Shaw, 1997).

#### *Alteración del sitio blanco.*

Modificaciones en los blancos específicos de las bacterias hacen que se limite o impida la interacción con el antibiótico y así se promueve la resistencia.

El mecanismo más común de resistencia a los macrólidos se da por modificación del sitio blanco, específicamente a través de una metilación en un residuo de adenina en el dominio V del 23S rARN (Schmitz et al., 2000; Monteiro et al., 2012).

La resistencia a los  $\beta$ -lactámicos por expresión de blancos de baja afinidad (PBPs) es también común. Se han descubierto una gran cantidad de estrategias tales como la producción adicional de una PBP de baja afinidad (existen 4 PBP nativas). Este es el caso de la producción de PBP2a por *Staphylococcus aureus* confiriendo resistencia a la meticilina, sobreexpresión de una PBP endógena de baja afinidad y alteración de una PBP endógena por mutaciones puntuales (Zapun et al., 2008).

En el caso de la vancomicina la resistencia resulta de la síntesis anormal del precursor del peptidoglucano el cual posee la terminación alterada (D-ala-D-lac o D-ala-D-ser en lugar de D-ala-D-ala) con baja afinidad por la vancomicina (Cetinkaya et al., 2000).

En forma similar, resistencia a las fluoroquinolonas ha sido atribuido a mutaciones en el blanco, ADN girasa y topoisomerasa (Hooper, 2003). También ocurre resistencia a las tetraciclinas y aminoglucósidos por mutaciones en el sitio blanco (Springer et al., 2001; Thaker et al., 2010).

#### *Disminución de la permeabilidad.*

La membrana externa en bacterias Gram negativas proporciona una formidable barrera que tiene que ser superada. En efecto, esta barrera explica, al menos en parte, la resistencia mejorada de organismos Gram negativos vs Gram positivos a muchos antibacterianos (Poole, 2002). En la figura 1.4 vemos las estructuras de las paredes y membranas celulares de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Los antibióticos presentan esencialmente dos vías para atravesar la membrana externa: una vía mediada por la bicapa lipídica para los antibióticos hidrófobos (ej. macrólidos, aminoglucósidos, rifampicina) y otra vía mediada por porinas, que son proteínas que forman poros de tamaños específicos, para antibióticos hidrofílicos (ej.  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol). Las tetraciclinas y las quinolonas utilizan las dos vías para ingresar a la célula.

Las características de permeabilidad de esta membrana dada por la composición de lípidos y proteínas tiene un alto impacto en la susceptibilidad de los microorganismos a muchos tipos de antibióticos, los cuales esencialmente tienen sus blancos de acción en el interior de la célula. Modificaciones de éstas macromoléculas que provoquen una disminución en la permeabilidad llevan a la aparición de resistencia (Delcour, 2009).

#### *Aumento de la extrusión del antibiótico por medio de bombas de eflujo.*

Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras involucradas en la extrusión de sustratos tóxicos (incluyendo todas las clases de antibióticos clínicamente relevantes) desde el interior celular hacia el ambiente externo. Estas proteínas son encontradas tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas y los genes que las codifican están localizados en cromosomas o plásmidos (Poole, 2007; Piddock, 2006a). Las bombas de eflujo se clasifican en 5 familias de acuerdo a la composición, número de regiones transmembrana que abarca, fuentes de energía y sustratos: MF



(mayor facilitador), MATE (multidrug and toxic efflux), RND (resistance-nodulador-division), SMR (small multidrug resistance) y ABC (ATP binding cassette).

Confieren resistencia a tetraciclinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos, novobiocina, rifampicina, ácido fusídico, ácido nalixídico, antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario (Sun et al., 2014).

Las bombas de la familia RND están asociadas ampliamente con resistencia a los antibióticos, como AcrB en *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* y MexB en *Pseudomonas aeruginosa*. En bacterias Gram-positivas, las bombas de eflujo más significativas son miembros de la familia MFS, por ejemplo NorA en *Staphylococcus aureus* y PmrA en *Streptococcus pneumoniae* (Pidcock, 2006<sub>b</sub>).

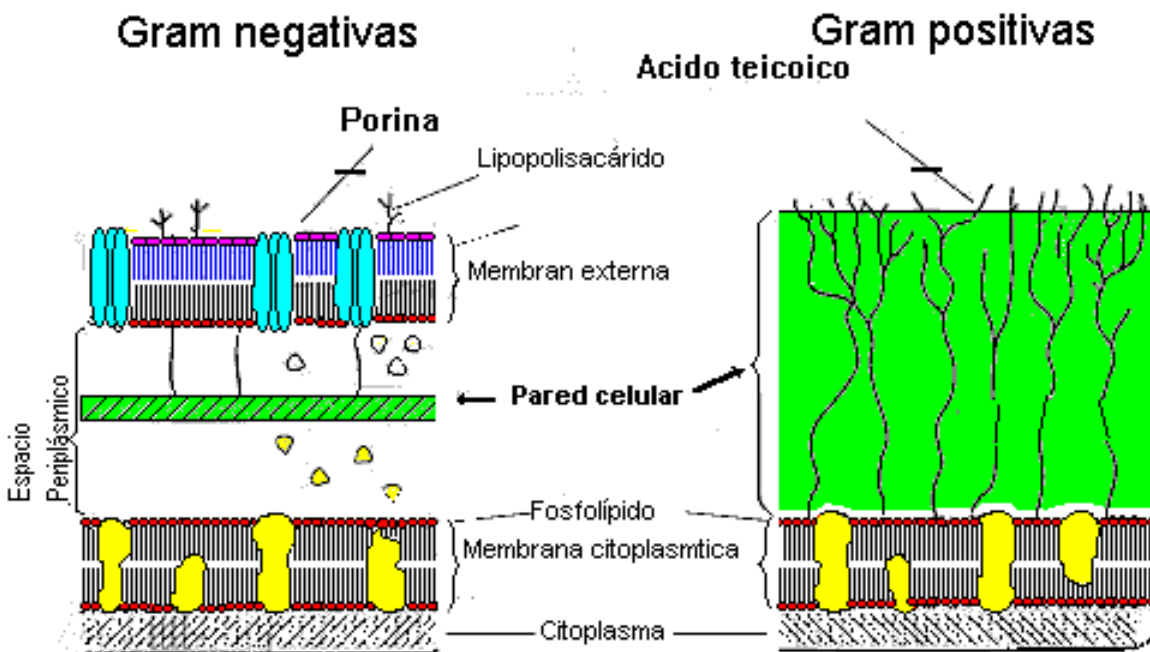


Figura 1.4. Estructuras de las paredes celulares de las bacterias Gram negativas y Gram positivas (Tomado de [www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm](http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm))

### 1.5.- *Staphylococcus aureus* y sus principales mecanismos de resistencia.

*Staphylococcus aureus* es un patógeno comunitario y nosocomial importante. Este organismo es causante de una considerable preocupación debido a su gran

habilidad de adquirir resistencia hacia los nuevos antibacterianos que alcanzan el mercado. Esta bacteria Gram positiva coloniza la piel en aproximadamente el 40 % de de la población sana. Es una de las bacterias más difíciles de tratar en pacientes y de erradicar del ambiente hospitalario. Es particularmente preocupante la velocidad con que la bacteria genera nuevas resistencias según el siguiente esquema:

- **1942:** se reportó resistencia a la penicilina en cepas *S.aureus* luego de sólo meses de uso clínico.
- **1953:** (64-80) % *S.aureus* aislados fueron resistentes a la penicilina, con desarrollo de resistencia a tetraciclina, eritromicina y otras clases de antibióticos emergentes.
- **1960:** estuvo ampliamente distribuida la meticilina, un antibiótico  $\beta$ -lactámico, efectivo contra cepas de *S.aureus* resistentes a la penicilina. Sin embargo luego de 1 año de su introducción, aparecieron cepas resistentes a la meticilina. Acá nace el término *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA).
- **2002:** apareció resistencia a la vancomicina en cepas MRSA, siendo la vancomicina la droga de último recurso para el tratamiento de infecciones por MRSA.

Se ha reportado últimamente resistencia a los nuevos agentes como el linezolid y la daptomicina.

La resistencia adquirida de aparición temprana del *S.aureus* a casi todas las clases de antibióticos es mediada casi exclusivamente por transferencia horizontal de ADN. La transferencia de material genético desde otro organismo permite la adquisición de "paquetes" que codifican resistencia a múltiple antibióticos. Este tipo de transferencia es la responsable de las resistencias más preocupantes en *S.aureus*: resistencia a meticilina y vancomicina. Adicionalmente, la resistencia que es mediada por mutaciones al azar y selección bajo presión del antibiótico, juegan un papel importante en el entorno clínico, produciendo la mayor ruta de resistencia a los antibióticos como fluoroquinolonas, vancomicina (para nivel intermedio de resistencia), daptomicina y linezolid (Pantosti et al., 2007).

### *Resistencia a la penicilina.*

La resistencia a la penicilina es debida a la producción de una enzima extracelular denominada penicilinasas ( $\beta$ -lactamasa de clase A), que hidroliza el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactámico de penicilinas y ampicilinas provocando la inactivación de los mismos. Los genes responsables para la síntesis de penicilinasas y su regulación se encuentran en plásmidos. Los plásmidos aparte de codificar la producción de penicilinasas, tienen otros genes que producen resistencia, como resistencia a distintos desinfectantes (compuestos de amonio cuaternario), y resistencia a otros antibióticos (eritromicina, ácido fusídico y aminoglucósidos) (Lyon & Skurray, 1987; Massidda et al., 2006).

### *Resistencia a la metilina.*

La resistencia a la metilina es debida a la producción de una PBP (protein-binding protein) adicional denominada PBP2a, con afinidad reducida por la metilina y  $\beta$ -lactámicos en general. MRSA indica resistencia a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenems.

Característicamente, las cepas de MRSA presentan más a menudo resistencia a otras clases de antibacterianos (macrólidos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos) que las cepas de *Staphylococcus aureus* metilino sensible (MSSA).

MRSA se puede clasificar de acuerdo al lugar donde se contrajo la infección: adquirida en el hospital (HA-MRSA) o adquirida en la comunidad (CA-MRSA). HA-MRSA ha aumentando durante la última década debido a un número de factores, incluyendo un aumento en el número de pacientes inmunocomprometidos y de edad avanzada; un aumento en el número de procedimientos invasivos, por ejemplo, operaciones quirúrgicas avanzadas y tratamientos de soporte vital; y fallas en las medidas de control de infecciones, tales como el lavado de manos antes del contacto con el paciente y eliminación de catéteres no esenciales. CA-MRSA es causada por cepas de más reciente aparición (a principios de la década de 1990) a diferencia de los responsables de HA-MRSA y puede causar infecciones en personas sanas que no tienen vínculo con los sistemas de salud. Tienden a ocurrir en condiciones donde las personas están en contacto físico cercano, como atletas, soldados o presos que permanecieron en lugares

cerrados, cuando la higiene personal se ve comprometida y cuando la atención médica es limitada. Las cepas aisladas de CA-MRSA generalmente no son multiresistentes, siendo susceptibles a algún antibiótico no  $\beta$ -lactámico y generalmente producen una toxina que contribuye a la severidad de la infección (Labandeira-Rey et al., 2007).

La proteína PBP2a es el producto del gen *mecA* y de los genes regulatorios *mecI* y *mecR1*. Estos genes forman el complejo *mecA* que está incluido en un elemento del cromosoma de 30-60 kb, denominado staphylococcal chromosomal cassette (SCC)*mec* (Katayama et al., 2000). SCC *mec* contiene genes recombinantes (*ccrA* y *ccrB*) involucrados en la integración/escisión del elemento en el cromosoma y puede contener otros genes de resistencia, como Tn554, que provoca resistencia a spectinomicina y eritromicina, pUB110, que codifica resistencia a tobramicina y amikacina. Según la estructura que tenga el elemento SCC*mec* se distinguen 5 tipos (Shore et al., 2005). Los elementos I-III se encuentran típicamente presentes en HA-MRSA e incluyen genes que codifican resistencia a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos y los elementos tipo IV y V no presentan otros genes de resistencia a parte del complejo *mecA*, y se encuentran característicamente en CA-MRSA.

Según datos de la OMS (2014<sub>b</sub>) la proporción de MRSA en los aislados de *S.aureus* a nivel mundial excede en la mayoría de los casos el 20% y aún el 80% en algunas regiones.

En Uruguay existen varios estudios que reportan la proporción de MRSA de las cepas aisladas de *S.aureus* encontrándose las siguientes cifras: 40 % MRSA en 1253 cepas aisladas en el período de 2001-2006 (Telechea et al., 2009) , 76.4 % MRSA en 89 cepas aisladas en el periodo 2003-2006 (Pardo et al., 2013), 47% MRSA en 527 cepas aisladas en el 2003 y 71% MRSA en cepas aisladas en el 2004 (Bazet, 2004).

A finales del 2001 en nuestro país se reporta el primer caso de MRSA adquirido en la comunidad , constituyendo el primer reporte de MRSA comunitario en América Latina (Mejía et al., 2010). Se trató de un hombre joven con forúnculos recurrentes que asistía a una clínica ambulatoria. La cepa de MRSA que se aisló del paciente, era susceptible a otros fármacos. Después de éste evento, se observaron otras cepas similares en infecciones pediátricas (Galiana, 2003). Los casos esporádicos iniciales fueron seguidos por un aumento de las infecciones en la comunidad, hospitales y cárceles.

Existe un reporte de un gran brote de MRSA comunitario en Uruguay (Ma et al., 2005) dónde entre enero de 2002 y octubre de 2003, más de 1000 pacientes de una cárcel y de la comunidad se vieron afectados, resultando en 12 muertes. Además, el número de casos aumentó sustancialmente a lo largo de un periodo posterior a 22 meses. Cepas MRSA ya han sido identificadas como una causa de las infecciones adquiridas en la comunidad en toda América Latina, aunque los datos publicados se limitan a unos pocos países y unos pocos sitios dentro de esos países (Mejía et al., 2010).

#### *Resistencia a la vancomicina.*

Durante la última década han aparecido cepas de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA) y resistencia total a la vancomicina (VRSA). VISA y VRSA han surgido casi exclusivamente a partir de cepas MRSA, pero presentan mecanismos de resistencias totalmente diferentes.

La resistencia intermedia en VISA está asociada con la pared celular engrosada. Esta pared es rica en cadenas de peptidoglucanos no entrecruzados y exhiben el dipéptido terminal D-ala-D-ala, el blanco de la vancomicina. El blanco efectivo de la vancomicina es el residuo terminal D-ala-D-ala en el precursor de peptidoglucano a nivel de la membrana celular, en la capa interna de la pared celular, donde la vancomicina ejerce su efecto inhibiendo la incorporación de los precursores en la cadena naciente de peptidoglucano. Por lo tanto, los residuos de D-ala-D-ala en la pared celular engrosada actúan como un blanco señuelo, bloqueando la vancomicina en la capa externa de la pared y desviando al antibiótico a su verdadero blanco (Lowy, 2003).

Las cepas VRSA han adquirido la maquinaria genética que confiere resistencia a los glicopéptidos de las cepas VRE (vancomycin-resistant enterococci). Dichos genes codifican la síntesis modificada de los precursores de peptidoglucano conteniendo la terminal D-ala-D-lac en lugar de D-ala-D-ala con mucha menor afinidad por la vancomicina. Estudios moleculares indican que hubo transferencia horizontal de ADN desde VRE a MRSA, mediado por plásmido. (Weigel et al., 2007).

### *Resistencia a las fluoroquinolonas.*

Esta resistencia surgió rápidamente en *S.aureus*, especialmente en cepas MRSA, luego de la introducción de la ciprofloxacina (Blumberg et al., 1991). La resistencia es debida a mutaciones espontáneas en una o ambas enzimas que son necesarias para la replicación del ADN, ADN girasa y ADN topoisomerasa IV. En algunas cepas, la sobreexpresión de una bomba de eflujo denominada NorA contribuye al fenotipo de la resistencia (Kaatz et al., 1993).

### *Resistencia a los nuevos antibióticos activos contra MRSA: linezolid & daptomicina.*

El linezolid pertenece a la clase nueva de oxazolidinonas que inhibe la síntesis de proteínas uniéndose al dominio V de la subunidad 23S del ribosoma. Se han descrito cepas resistentes por mutación de un sólo nucleótido en el blanco ribosomal del linezolid (Tsiodras et al., 2001). La daptomicina es un lipopéptido con un mecanismo de acción único, actuando sobre la membrana celular. La resistencia a la daptomicina ha sido asociada con muchos puntos de mutación en al menos tres proteínas (Friedman et al., 2006).

## **1.6.- Estrategias para la búsqueda de antimicrobianos.**

La investigación sobre nuevas sustancias antimicrobianas debe por lo tanto proseguirse y todas las estrategias posibles deben ser exploradas. Además de los compuestos micromoleculares de síntesis los productos naturales siguen siendo las principales fuentes de agentes terapéuticos innovadores para varias enfermedades, incluidas las enfermedades infecciosas (Clardy & Walsh, 2004). Sólo una ínfima parte de la diversidad disponible entre los hongos, la fauna y flora marina, las bacterias y las plantas ha sido explorada, y amplias oportunidades se encuentran teóricamente por delante.

Para abordar este complejo problema existen varias estrategias posibles y todas ellas han sido recorridas en algún grado por los laboratorios de investigación universitarios, por los organismos de salud y las compañías farmacéuticas. Estas estrategias se basan en: 1) la modificación semisintética de fármacos ya conocidos, 2)

el diseño racional de nuevos compuestos, 3) el tamizaje de fuentes naturales y 4) la reversión de los mecanismos de resistencia.

#### *Modificación de fármacos establecidos.*

Este es un abordaje atractivo para las compañías farmacéuticas dado que se trabaja sobre moléculas conocidas que ya han demostrado su actividad. Esto implica un gran conocimiento previo de las propiedades químicas, fisicoquímicas y farmacológicas de la molécula activa y por lo tanto una gran expectativa de éxito. Con este enfoque se logran mejoras en dichas moléculas desde el punto de vista farmacocinético y farmacológico, se aumenta el espectro de acción, se trata de evadir la resistencia existente. Esto produjo el desarrollo de 5 generaciones de penicilinas (más de 15 compuestos), 4 generaciones de cefalosporinas (más de 24 compuestos), 2 generaciones de carbapenems (más de 4 compuestos), aminoglucósidos (más de 12 compuestos), tetraciclinas (más de 8 compuestos), macrólidos (más de 5 compuestos), glicopéptidos (más 3 compuestos), quinolonas (más de 8 compuestos) (Singh & Barret, 2006).

Un ejemplo de este enfoque son las modificaciones realizadas sobre moléculas con el esqueleto del carbapenem: obteniéndose el derivado J-111225 con un espectro ampliado para incluir MRSA y *Ps. aeruginosa* y el L-084 prototipo de carbapenem activo por vía oral (Fig. 1.5).

También es el caso de las glicilciclinas, como la molécula candidato GAR-936 (Fig. 1.6), derivados semisintéticos de la tetraciclina minociclina que se encuentran en estudios preclínicos para infecciones por MRSA, PRSA (*S.aureus* penicilina resistente) y VRE (*Enterococcus vancomicina* resistente).

Sin embargo, no hay que perder de vista que al trabajar sobre moléculas ya utilizadas la probabilidad de la emergencia de resistencia es grande.

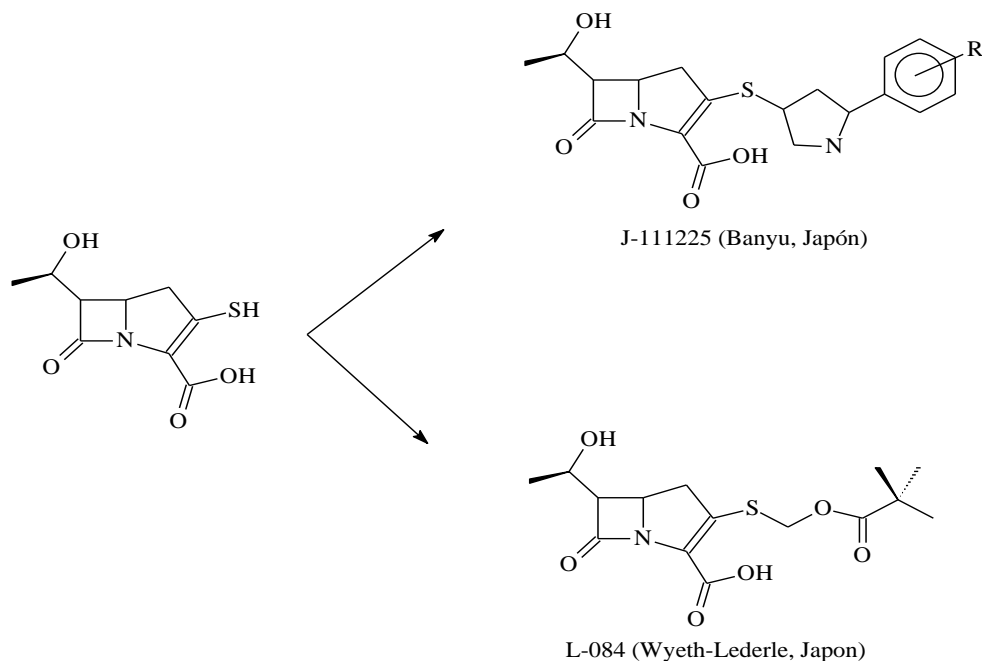


Figura 1.5. Modificaciones químicas sobre la molécula de carbapenem.

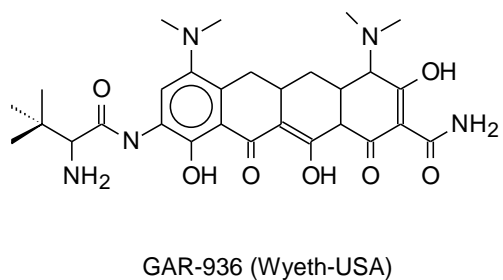


Figura 1.6. Modificación química sobre la gliciliciclina.

### *Diseño racional de nuevos fármacos.*

Es quizás la estrategia más moderna y se basa en el diseño de moléculas que actúan específicamente en blancos del microorganismo. Pero este enfoque tiene como prerrequisito un conocimiento profundo de la biología del microorganismo así como de las características fisicoquímicas del sitio de acción que incluyen habitualmente su conformación tridimensional.



Con el advenimiento de la biología molecular, la expresión y la producción a gran escala de enzimas y receptores, hicieron que fuera posible realizar screenings enzima-receptor in vitro, sin células. El enfoque consiste en secuenciar los genomas de múltiples patógenos, identificar los genes conservados que codifiquen blancos esenciales y que no tengan homólogos en células de mamíferos, expresar esos blancos y luego realizar screenings usando librerías de compuestos químicos existentes que se unan a ese blanco. La adopción de la industria farmacéutica de este enfoque en la década del 1980 tuvo un gran éxito en otras áreas terapéuticas pero ha demostrado ser un fracaso para el caso de los antibióticos (Payne et al., 2007). De hecho no ha llegado al mercado ningún antibiótico usando este enfoque.

El problema radica en parte en haber usado las bibliotecas químicas que posee la industria farmacéutica que no se encuentran optimizadas para la biología microbiana, estando sesgadas en compuestos que favorecen la bioactividad humana. Otro problema es que la búsqueda de un compuesto que se una a un blanco específico no equivale a encontrar un compuesto con actividad antibacteriana. Fármacos que se unen pueden no penetrar las bacterias o pueden ser activamente removidos por las bombas de eflujo (Livermore et al., 2011; Wright, 2014).

#### *Rastreo de actividad de fuentes naturales.*

Ésta es la forma tradicional de trabajo en el área de antimicrobianos y se ha mostrado extraordinariamente exitosa llevando al desarrollo de la quimioterapia antiinfecciosa moderna. Consiste en el crecimiento de los microorganismos del suelo en diversos medios, seguido de ensayos microbiológicos de los metabolitos producidos para identificar compuestos que inhiban el crecimiento de bacterias. Utiliza técnicas sencillas, probadas y normalizadas a lo largo de los años en innumerables laboratorios, pero los nichos habituales, parecen agotados. Si bien se producen aún numerosos nuevos antibióticos a partir de estos nichos, no hay una equivalencia en moléculas novedosas que constituyan a su vez cabezas de futuros desarrollos. Sin embargo esta estrategia puede ser fácilmente adaptada para el tamizaje de actividad de nichos biológicos aún no explotados, incluyendo microorganismos marinos o extremófilos, organismos marinos (celenterados, esponjas) animales y vegetales superiores. El

nuevo antibiótico policetometilénico abyssomicin que bloquea la biosíntesis de folato fue descubierto mediante screening de las cepas aisladas de los sedimentos del océano profundo (Bister et al., 2004; Hughes & Femical, 2010).

Las desventajas de este método es que no permite conocer a priori el mecanismo de acción y no discrimina entre estructuras conocidas o nuevas por lo que la rápida dereplicación de los candidatos es otro desafío importante.

#### *Reversión de la resistencia.*

Es una estrategia alternativa para la búsqueda de nuevos antibacterianos y consiste en identificar y atacar los procesos bacterianos responsables de la resistencia. La inhibición de estos, podría ser capaz de potenciar la actividad de los antibacterianos existentes. En esta aproximación, el antibacteriano es coadministrado con el inhibidor que neutraliza la resistencia y, consecuentemente, el antibacteriano continúa siendo útil, aún en organismos resistentes.

Hasta la fecha, la aplicación más exitosa de este concepto ha sido el desarrollo de inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Se han desarrollado tres compuestos para uso clínico (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) que son coadministrados con antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las combinaciones del ácido clavulánico con penicilinas han sido exitosamente usadas en la clínica por más de 30 años (Drawz & Bonomo, 2010).

Los tres compuestos clínicamente disponibles no inhiben todas las clases de  $\beta$ -lactamasas (A, B, C y D), sólo demuestran eficacia contra organismos que expresan la clase A de  $\beta$ -lactamasas.

Por otra parte, como las  $\beta$ -lactamasas han evolucionado bajo la presión selectiva de los antibióticos, ha surgido resistencia a los inhibidores presentes entre ciertas enzimas de la clase A (Bonney et al., 2004). Se está realizando un gran esfuerzo en la investigación con el objetivo de encontrar inhibidores de  $\beta$ -lactamasas de más amplio espectro y ha surgido un compuesto, ahora conocido como avibactam (NXL 104), que posee actividad frente a las  $\beta$ -lactamasas clase A, C y algunas D. Fue descubierto originalmente por Aventis Pharma y fue desarrollado posteriormente por Novexel. Actualmente se están desarrollando los ensayos clínicos en combinación con ceftazidima y ceftarolina (Drawz & Bonomo, 2010).

Otro modo prometedor de revertir la resistencia es tomando como blanco las bombas de eflujo que producen resistencia en muchas especies de bacterias, incluyendo *S.aureus*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* y muchos otros organismos. En la actualidad, las farmacéuticas MPEX/GSK siguen trabajando en inhibidores de las bombas de eflujo de resistencia a múltiples fármacos en *P. aeruginosa* (Lomovskaya & Bostian, 2006). Aunque los inhibidores desarrollados a la fecha han sido eficaces en la mejora de la actividad de los antibióticos tales como las fluoroquinolonas contra *P. aeruginosa*, su aplicación clínica se ha visto obstaculizada por el hecho de que los organismos tales como *P.aeruginosa* poseen un notable número de bombas de eflujo y tienen la capacidad de regular positivamente estas bombas en presencia de inhibidores específicos (Moellering, 2011).

### **1.7.- Los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos.**

Los productos naturales y sus derivados han sido y continúan siendo fuentes ricas para el descubrimiento de nuevos fármacos (Beutler, 2009; Molinari, 2009; Harvey, 2008; Newman & Cragg, 2012; Cragg & Newman, 2013). En la figura 1.7 vemos el origen de las nuevas moléculas activas aprobadas en el período 1981-2010 que incluyen todas las enfermedades, todos los países y todas las fuentes. Quedan excluidos los compuestos biológicos (péptidos con más de 45 residuos y proteínas) y las vacunas. En definitiva podemos considerar que el 64 % de las moléculas activas derivaron de productos naturales. En la siguiente figura 1.8 vemos el número de las moléculas activas aprobadas por año. El número de las mismas ha oscilado entre cerca de 40 para la mayor parte del período de tiempo entre 1989-2000, cayendo a 20 o menos con la excepción de 2002 y 2005 donde las cifras subieron por encima de 30 (Newman & Cragg, 2012).

En el período 2000-2010 el porcentaje promedio de N/NB/ND es de 36.5%, con un valor mínimo de 20.8% en el 2009 y un valor máximo de 50.0% en el 2010. Aquí no incluyen en la clasificación ninguna de las clases inspiradas en productos naturales (S\*, S\*/NM, S/NM) (Fig. 1.9) (Newman & Cragg, 2012).

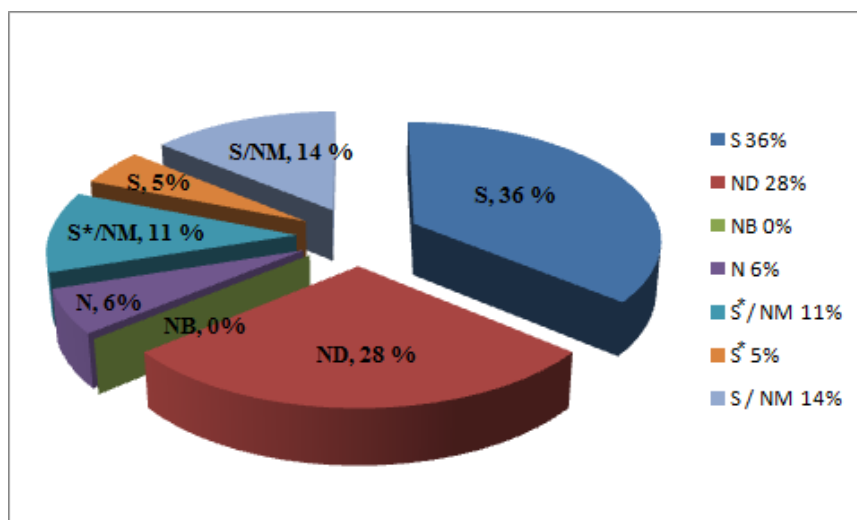


Figura 1.7. Fuente de moléculas activas aprobadas (1981-2010); n=1073. S: producto sintético, a menudo encontrado por screening al azar o por modificación de alguno existente; ND: derivado de producto natural; NB: producto natural botánico (mezcla definida); N: producto natural; S\*/NM: hecho totalmente por síntesis, pero el farmacóforo es un producto natural/desplaza al sustrato natural en forma competitiva "natural product mimic"; S\*: hecho totalmente por síntesis, pero el farmacóforo es un producto natural; S/NM: producto sintético/desplaza al sustrato natural en forma competitiva "natural product mimic".

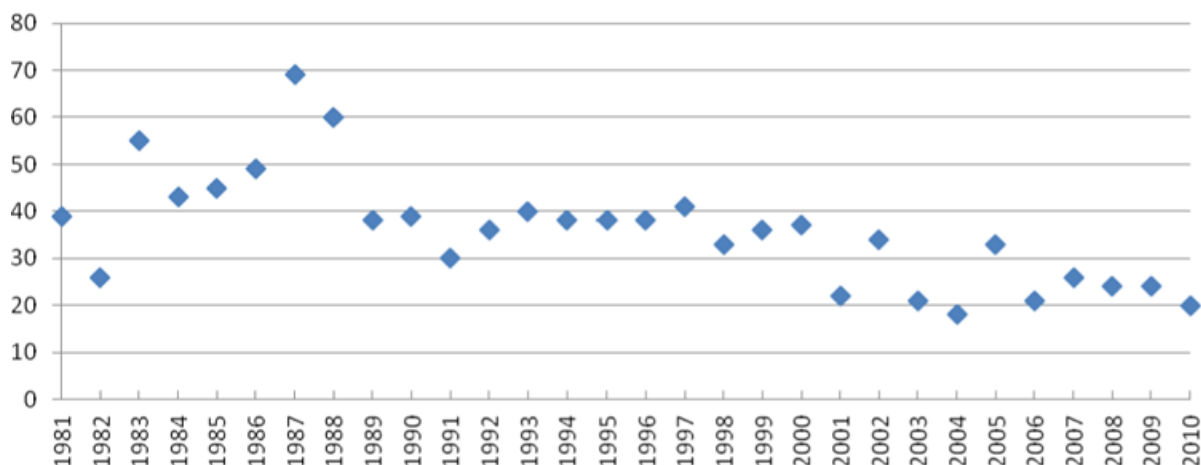


Figura 1.8. Número total de moléculas activas aprobadas por año, 1981-2010. (Tomado de Newman & Cragg, 2012).

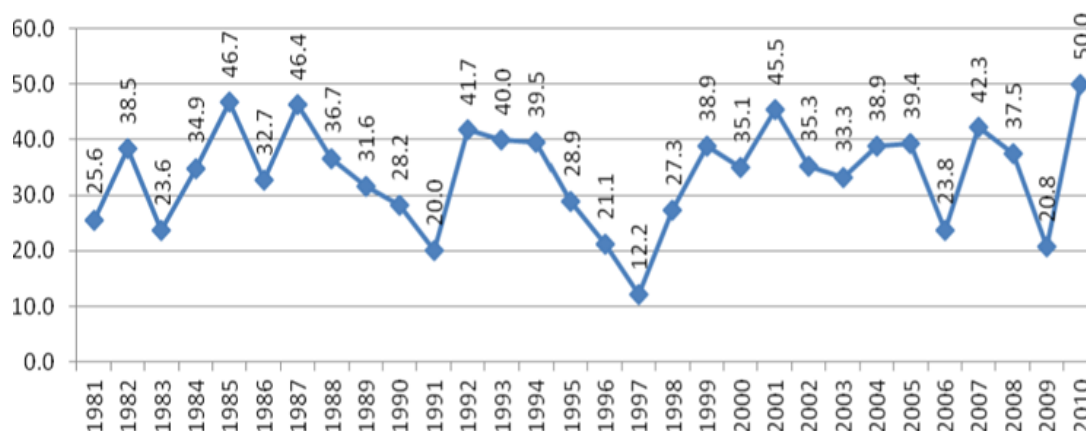


Figura 1.9. Porcentaje N/NB/ND por año, 1981-2010. (Tomado de Newman & Cragg, 2012).

Las plantas superiores han demostrado ser una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos, tanto por presentar actividad farmacológica per se, como por representar nuevos tipos moleculares para el desarrollo de drogas, incluyendo antihipertensivos, analgésicos, citotóxicos y antiinflamatorios. Esto incluye compuestos que son medicamentos de primera elección o incluso los únicos existentes para el tratamiento de estas afecciones. Ejemplos son la vincristina y vinblastina, alcaloides aislados de *Catharanthus roseus* utilizados clínicamente para el tratamiento de varios tipos de linfomas y leucemias, cáncer de vejiga y testículo, el taxol extraído de *Taxus brevifolia*, el etopósido desarrollado a partir de la podofilotoxina encontrada en *Podophyllum peltatum*, la prostratina, aislada de la planta medicinal de Samoa *Homalanthus nutans* y en estudio contra el HIV al igual que el alcaloide michellamina B aislado de una planta del Camerún (Clarck, 1996; Potterat & Hamburguer, 2008) (Fig. 1.10).

Los microorganismos son otra fuente importante de productos naturales, principalmente de los antibióticos. Más recientemente se han estudiado fuentes marinas que han proporcionado nueva química y biología (Blunt et al., 2006). Algunos pocos programas han utilizado los insectos como fuente de nuevas drogas, por ejemplo la colaboración entre en el INBio y Merck en Costa Rica (Sittenfeld et al., 1999), y en el

laboratorio de Eisner en la Universidad de Cornell (Schröder et al., 1998). También es notable el trabajo de Daly utilizando anfibios como una rica fuente de compuestos bioactivos (Daly et al., 2005).

Durante las últimas dos décadas, la investigación dirigida a la explotación de productos naturales como recurso ha disminuido seriamente. Esto es en parte debido al desarrollo de nuevas tecnologías como la química combinatoria, metagenómica y el cribado de alto rendimiento. Sin embargo, los nuevos enfoques de descubrimiento de fármacos no cumplen con las expectativas iniciales. Esto ha llevado a un renovado interés por los productos naturales en compañías farmacéuticas como Bayer, Merck y Xenova, determinado por la necesidad urgente de nuevos medicamentos, en particular contra las infecciones causadas por patógenos multiresistentes (Buss & Butler, 2004; Potterat & Hamburguer, 2008; Molinari, 2009; Beutler, 2009; Li & Vederas, 2009, David et al., 2014).

Porqué siguen siendo atractivos los productos naturales para el desarrollo de fármacos?

1) *Gran biodiversidad.*

Sólo una muy pequeña fracción de todas las especies existentes en el mundo se han investigado químicamente y mucho menos si consideramos un amplio espectro de bioactividades. La naturaleza ha desarrollado una gran diversidad a lo largo de billones de años de evolución. Existen por lo menos 300.000 especies diferentes de plantas, más de 30 millones de especies de insectos, 1,5 millones de especies de hongos y un número similar de especies de algas y procariotas. Todas las especies coexisten en ecosistemas e interactúan entre ellas. Considerando el número de organismos y el número infinito de interacciones posibles, no es sorprendente la enorme variedad de productos secundarios formados (Cordell, 2000).

El programa de cribado de plantas más grande de la década de 1960 se llevó a cabo por Smith Kline & French: cerca de 19.000 especies se examinaban para ver el contenido de alcaloides utilizando una sencilla prueba de color (Raffauf, 1996).

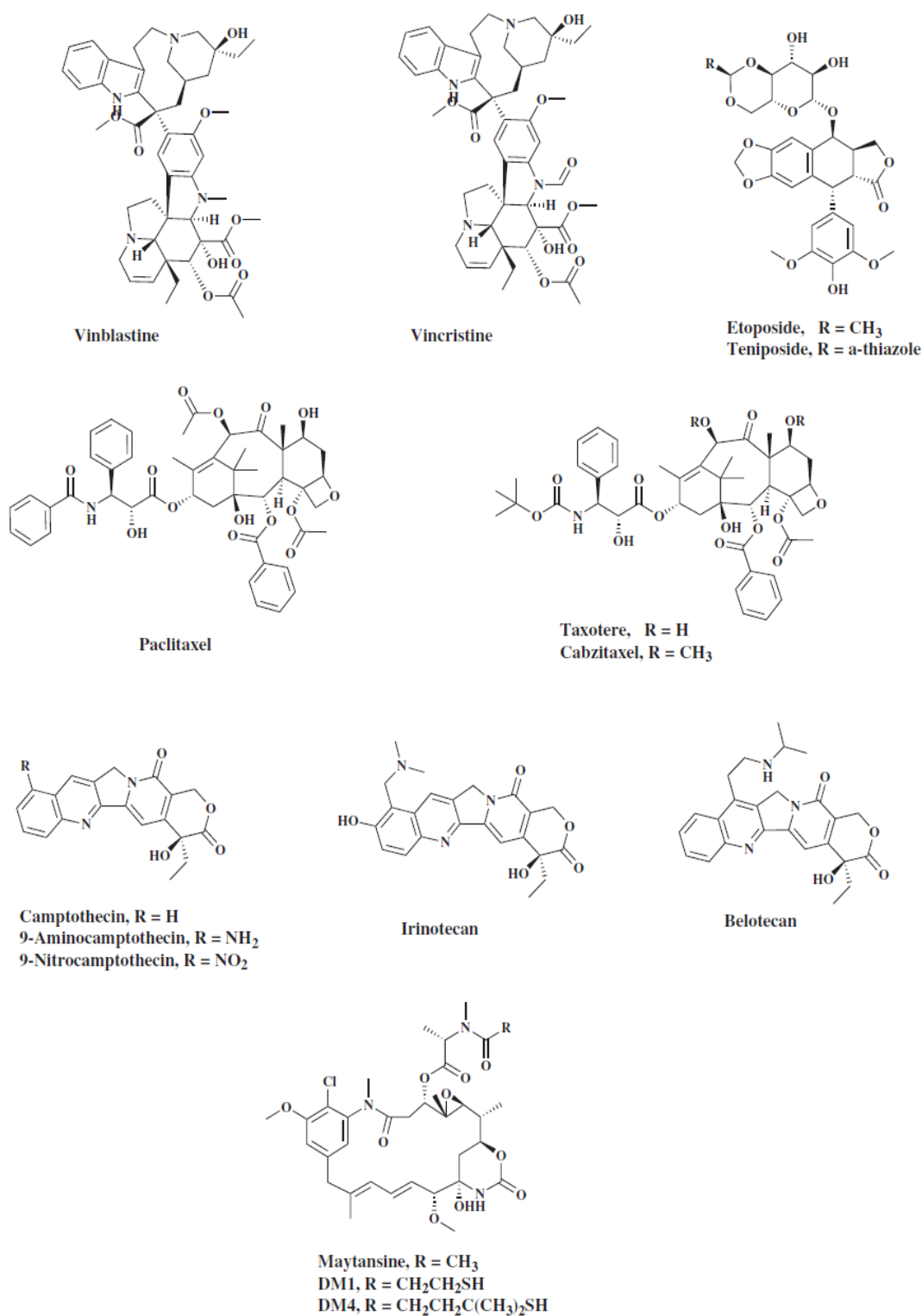


Figura 1.10. Estructura química de algunas drogas derivadas de plantas superiores (Tomado de Cragg & Newman, 2013).

El Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos ha recogido de forma activa plantas superiores para la detección de actividad anticancerígena por más de 20 años y en la actualidad cuenta con una colección que representa alrededor de 30.000 especies de plantas, o sea 10 por ciento de las especies conocidas.

No hay manera fácil de contar el número de muestras microbianas que se han prospectado para actividad biológica, ya que el protocolo típico en la detección microbiana es realizar una identificación mínima de las especies antes de comenzar las pruebas de actividad biológica; sin duda el número de muestras microbianas seleccionados ha sido enorme, pero la diversidad taxonómica de esas muestras estaba limitada por la predilección por los organismos de suelo y la facilidad de cultivarlas. Los avances recientes en la microbiología han demostrado que existe una enorme microbiota no muestreada (Epstein & López-García, 2008).

2) *Los metabolitos secundarios han evolucionado para ser activos.*

La energía metabólica y el costo genético de hacer una pequeña molécula requiere que la molécula proporcione algún beneficio para el organismo, ya sea a través de la defensa contra depredadores, la comunicación dentro de su población, o interferir con organismos competidores. Aunque la mayoría de las funciones de los productos naturales en su organismo productor no son conocidas actualmente, la opinión ha cambiado notablemente desde los días en que los productos naturales se consideraban productos de desecho (Mothes, 1969). Sea cual sea el papel preciso, va quedando claro que muchos productos naturales son capaces de llegar a los sitios del receptor ya sea fuera o dentro de las células, tal como un fármaco debe hacer.

3) *Las estructuras no están limitadas por la imaginación de los químicos.*

El valor más importante y visible de la química de los productos naturales es la introducción de nuevos esqueletos moleculares y funcionalidades que no han sido previamente concebidos por los seres humanos. Usando terminología post-moderna podemos decir que los productos sintéticos y los productos naturales ocupan diferentes espacios químicos. En general estos últimos presentan mayor complejidad estructural, mas funcionalización, mayor número de grupos oxigenados, centros estereogénicos y



ciclos conjugados (Feher & Schmidt, 2003; Graboski et al., 2008; Rosén et al., 2009; Gu et al., 2013).

4) *Las reglas de cinco de Lipinski no se aplican a los productos naturales.*

Se desarrollaron estas reglas para conducir a los químicos sintéticos hacia compuestos que tengan mejores propiedades biofísicas y sean por lo tanto mejores candidatos para ser fármacos activos por vía oral. Por lo tanto, los compuestos deben tener pesos moleculares menores a 500 Da, deben poseer <5 donantes de enlaces de hidrógeno, <10 aceptores de enlace de hidrógeno, y tienen  $\log P < 5$  (Lipinski et al., 1997). Estas reglas excluyen explícitamente los productos naturales, sobre todo por las razones expuestas más arriba (metabolitos secundarios que han evolucionado para ser bioactivos), ya que a menudo utilizan los transportadores transmembrana en lugar de difusión pasiva para entrar células (Lipinski et al., 1997).

### **1.8.- Los productos naturales como fuentes de antibacterianos.**

Los antibacterianos de origen natural desarrollados para uso clínico han sido, sin excepción, derivados de microorganismos, hongos y miembros de actinomycetes, en particular del género *Streptomyces* (Hopwood, 2007).

Comenzando con el descubrimiento de la penicilina en 1929, los productos naturales han sido la principal fuente de nuevos antibacterianos y han revolucionado el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En los últimos 80 años se han descubierto numerosas clases de antibacterianos, entre ellas muchas de origen natural como: fenilpropanoides (cloranfenicol), policétidos (tetraciclina), aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina), macrólidos (eritromicina), glicopéptidos (vancomicina), estreptograminas (quinpristina y darfopristina [Synercid]), segunda generación de  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas), tercera generación de  $\beta$ -lactámicos (carbapenems, ej. imipenem), lipopéptidos (daptomicina), pleuromutilinas (retapamulina) y macrolactonas (fidaxomicina). Las clases de origen sintético son sólo tres: las sulfonamidas, las quinolonas (ácido nalixidico) y las oxazolidinonas (linezolid) (Fig. 1.1).

Los productos naturales y sus análogos siguen desempeñando un papel principal, representando el 75 % de las nuevas moléculas antibacterianas aprobadas entre 1981-2010 (Newman & Cragg, 2012) (Fig. 1.11).

Los antibióticos de fuentes naturales oscilan entre compuestos de peso molecular pequeño (por ejemplo, penicilinas) a grandes péptidos (por ejemplo, teicoplanina). Poseen generalmente estructuras complejas con muchos centros quirales, alta diversidad química con varios grupos funcionales densamente desplegados, proporcionando el máximo número de interacciones con dianas moleculares, conduciendo a menudo a una altísima especificidad (Singh & Barret, 2006; Molinari, 2009) (Fig. 1.12). La eficacia de los productos naturales como antibacterianos probablemente se deba a que han evolucionado para ser activos, dando a los organismos que los producen una ventaja selectiva en el ambiente (Bologa et al., 2013).

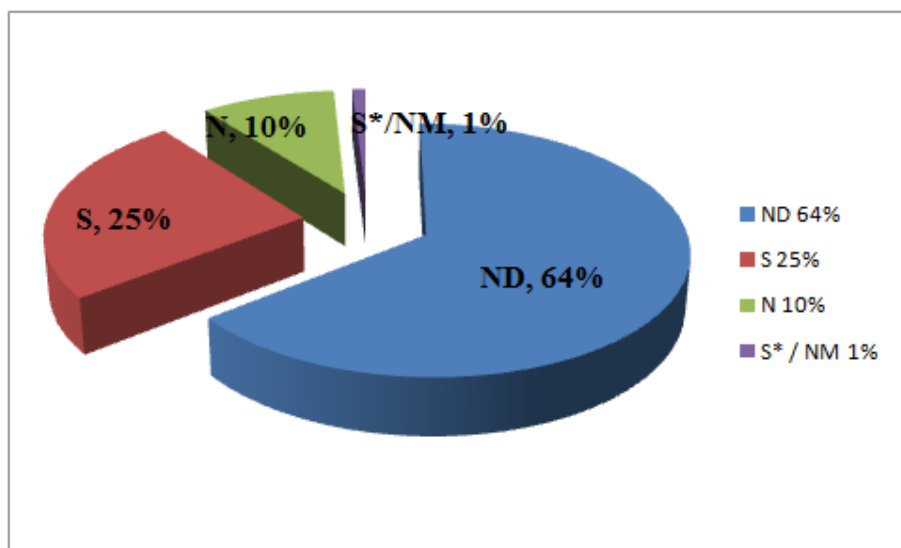


Figura 1.11. Fuente de moléculas antibacterianas aprobadas (1981-2010); n=104. Quedan excluidas las vacunas. S: producto sintético; ND: derivado de producto natural; N: producto natural; S\*/NM: hecho totalmente por síntesis, pero el farmacóforo es un producto natural/desplaza al sustrato natural en forma competitiva "natural product mimic".

Se ha estimado (Watve et al., 2001) que sólo el género bacteriano *Streptomyces* produce aproximadamente 100.000 metabolitos secundarios con al menos alguna actividad antimicrobiana, sugiriendo que si se continúa con el screening tradicional antibacteriano sería posible conseguir nuevas estructuras con mecanismos de acción diferentes a los actuales antibióticos. Sin embargo, los nichos habituales, especialmente los microorganismos del suelo, parecen agotados, si bien se producen aún numerosos nuevos antibióticos a partir de estos nichos, no hay una equivalencia en moléculas novedosas que constituyan a su vez cabezas de futuros desarrollos (Saleem et al., 2010; Bologna et al., 2013; Taylor, 2013).

Sin embargo esta estrategia puede ser fácilmente adaptada para el tamizaje de actividad de nichos biológicos aun no explotados, incluyendo microorganismos marinos o extremófilos, organismos marinos (celenterados, esponjas) animales y vegetales superiores. Ejemplos son la serie de péptidos de origen animal derivados de la magainina, que presentan gran potencial de uso y los stelletazoles (Fig. 1.13) aislados de la esponja *Stelletta* sp (Sheridan, 2006; Nicolaou et al., 2009; Roemer et al., 2011; Wong et al., 2012; Zhu et al., 2012; Kirst, 2013; Singh, 2014).

Dado que los metabolitos conocidos a la fecha representan una pequeña fracción de la diversidad metabólica el estudio de organismos menos estudiados abre grandes posibilidades de encontrar nuevas moléculas de interés.

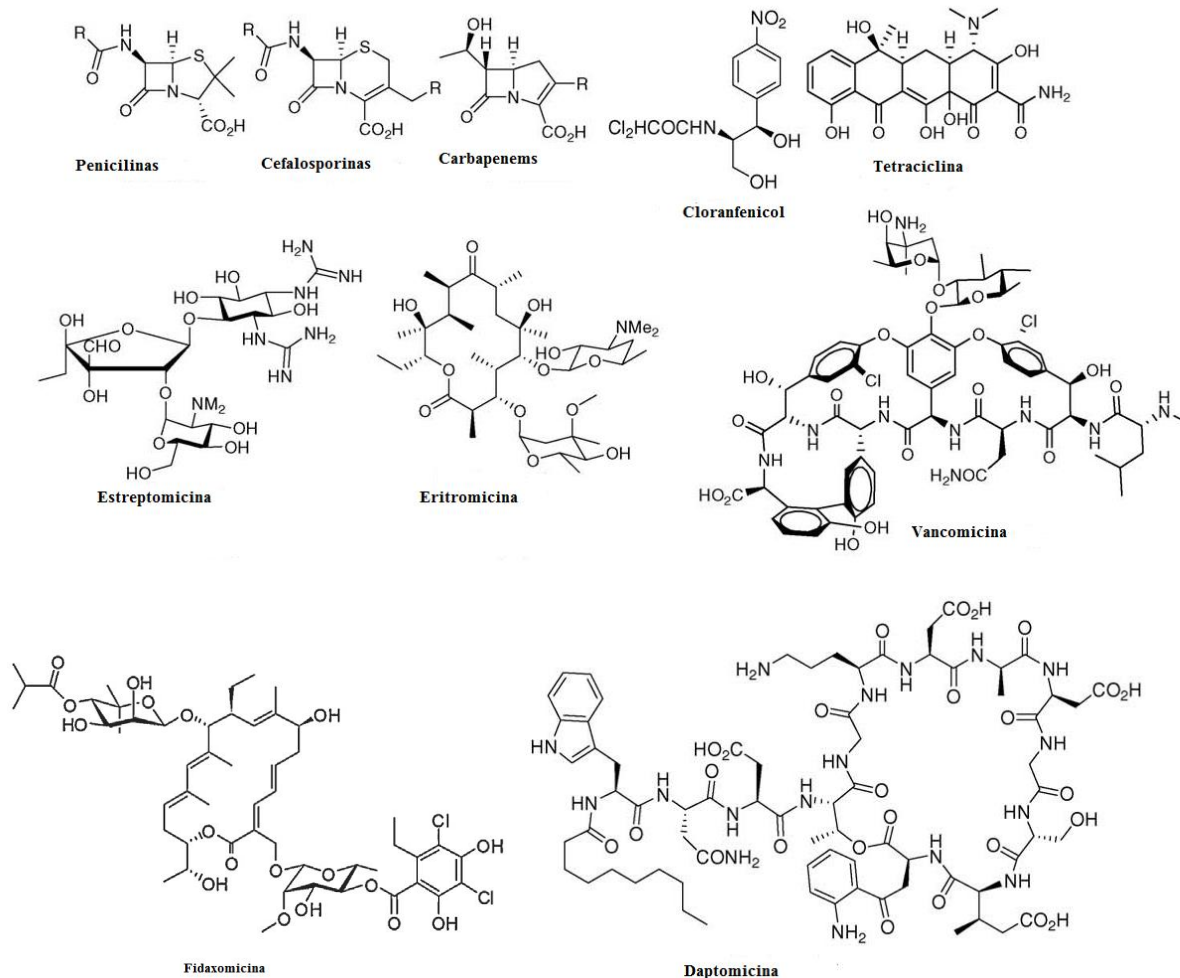
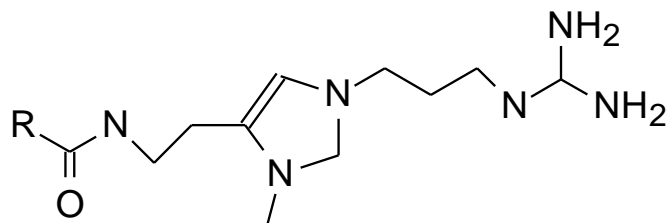


Figura 1.12. Algunos antibacterianos de origen natural.



Stelletazole (n)

Figura 1.13. Estructura de los stelletazoles.

Sin embargo, para ser exitoso, un programa de búsqueda de este tipo debe enfrentar algunos desafíos como la necesidad de desarrollar métodos de pre screening de alta eficiencia para la selección de muestras y evitar el redescubrimiento de compuestos conocidos (Baltz, 2006; Newman & Cragg, 2003, 2005, 2007).

Aunque hasta el día de hoy, ningún derivado de vegetales superiores ha podido competir con los antibióticos usados clínicamente, la búsqueda de compuestos con diferente espectro de actividad y/o estructuras químicas novedosas que sirvan de cabeza de serie para el desarrollo de fármacos es un área de activo interés en todo el mundo. Existen muchos trabajos que han generado un número importante de estructuras activas novedosas (Fig. 1.14) y la posibilidad de encontrar agentes útiles para su uso en humanos a partir de plantas superiores es realista (Cowan, 1999; Gibbons, 2004; Gibbons, 2005; Lewis & Ausubel, 2006; Taylor, 2013).

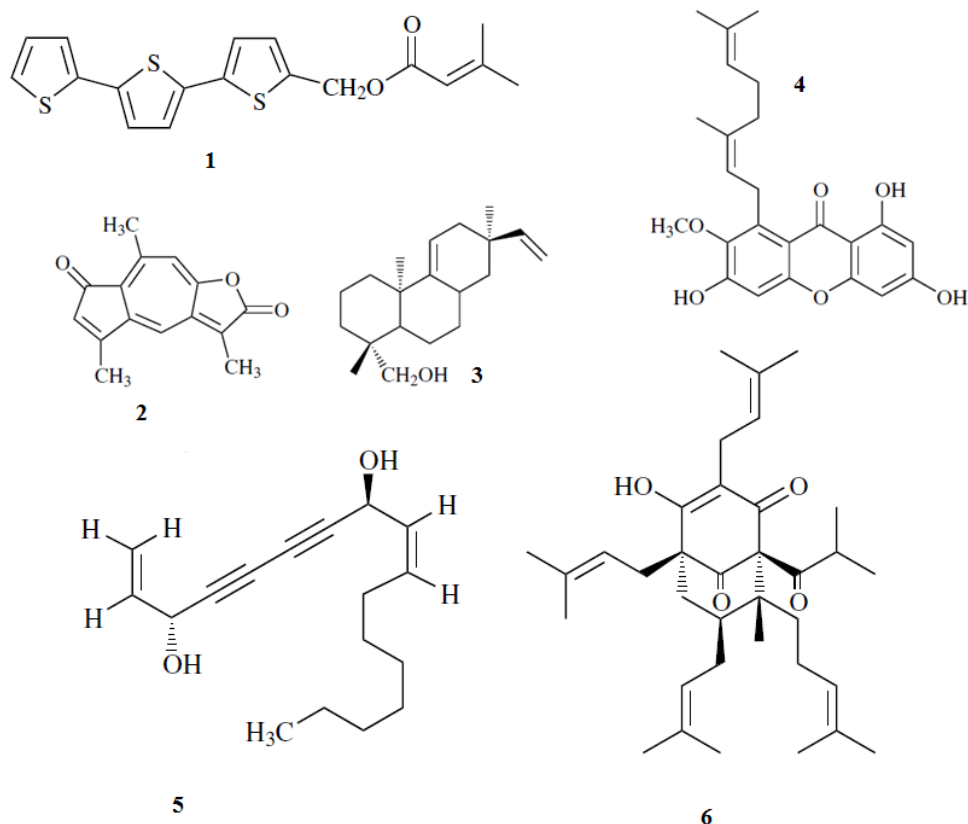


Figura 1.14. Antibacterianos aislados de plantas. 1- compuesto aislado de *Allium sativum*; 2- guaianolido sesquiterpeno (*Artemisia gilvescens*), MIC: 1.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra MRSA aislado clínic; 3- isopimarano diterpeno, MIC: 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra MSSA y MRSA; 4- rubraxanthone (*Garcinia dioica*), MICs: 0.313-1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra MRSA y MSSA; 5- falcarindiol (*Angelica dahurica*), MIC: 8-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra MRSA y MDRSA; 6- hyperforina (*Hypericum perforatum*), MIC: 0.1-1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra PRSA y MSSA.

### 1.9- Hipótesis de este trabajo.

Los productos naturales han sido la principal fuente de medicamentos a lo largo de toda la historia humana. A lo largo de ella su importancia cambió de ser la única fuente de medicamentos disponible, a mantener una posición hegemónica frente a los productos puramente sintéticos hasta el siglo XX y finalmente tener una participación menor en el desarrollo de nuevos fármacos, llegando incluso a cuestionarse su utilidad (Cragg & Newman, 2013).

Sin embargo esta visión es engañosa y los productos naturales continúan siendo una fuente importante de nuevos productos activos y estructuras base para desarrollo de nuevos medicamentos, particularmente en el campo de los antimicrobianos (Pandey & Kumar, 2013). Como reportan Butler y colaboradores en la edición de noviembre de 2014 de NPR (Butler et al., 2014) existen a esta fecha más de 100 productos naturales y derivados en estudios clínicos avanzados, siendo un cuarto de ellos antimicrobianos. De hecho en febrero de 2014 la FDA autorizó el uso del antibiótico oritavancina y a mediados del mismo año la dalbavancina, lipoglicopéptidos semisintéticos derivados de *Amycolatopsis orientalis*, para el tratamiento de *Staphylococcus* resistentes a  $\beta$ -lactámicos, carbapenems y vancomicina siendo los primeros productos desarrollados dentro de la iniciativa GAIN (<http://www.themedicinescompany.com/page/orbactiv>, <http://www.duratatherapeutics.com/products/dalvance>).

El aumento de la resistencia microbiana y el peligro de la expansión de cepas MDR (Multi Drug Resistant) y aparición de cepas TDR (Total Drug Resistant) convierten a la búsqueda de nuevos antimicrobianos, provenientes de nichos ecológicos no estudiados o completamente desarrollados y con nuevos mecanismos de acción en una tarea urgente (Butler et al., 2013).

En este desafío los productos naturales, particularmente los provenientes de plantas superiores, macro-hongos, organismos marinos, extremófilos, etc., pueden jugar un rol preponderante.

Por lo tanto las hipótesis que se plantean en este trabajo son las siguientes:

- las plantas superiores presentan moléculas novedosas y activas.
- la búsqueda dirigida usando el enfoque etnomédico es un método adecuado para encontrar las moléculas activas.
- las moléculas que encontramos con ese método pueden ser desarrolladas para uso clínico.

### **1.10- Estrategia de este trabajo.**

La estrategia de este trabajo consiste en la búsqueda de metabolitos secundarios de la flora nativa con actividad antibacteriana. Los objetivos generales y específicos propuestos son los siguientes:

#### ***Objetivos generales***

- Revalorización de la flora autóctona como recurso medicinal y fuente de principios bioactivos.
- Búsqueda de nuevos metabolitos biológicamente activos a partir de la flora medicinal nativa.

#### ***Objetivos específicos***

- Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios antibacterianos.
- Estudio de espectro y potencia antibacteriana de esos metabolitos contra cepas de referencia y resistentes.

El plan de actividades seguido es el que se muestra en la figura 1.15 y se detalla a continuación:

#### ***Actividades específicas***

- Realización del relevamiento bibliográfico de la información etnobotánica existente sobre plantas medicinales con actividad antimicrobiana.
- Colecta y acondicionamiento del material vegetal, identificación y conservación del material de herbario.
- Preparación de extractos representativos.
- Realización de ensayos de screening antibacterianos primarios.
- Estudio de la actividad antibacteriana mediante la realización de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).
- Selección de especies.



- Fraccionamiento bioguiado y aislamiento de los principios activos.
- Purificación y elucidación estructural mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos.
- Actividad antibacteriana de los compuestos aislados.

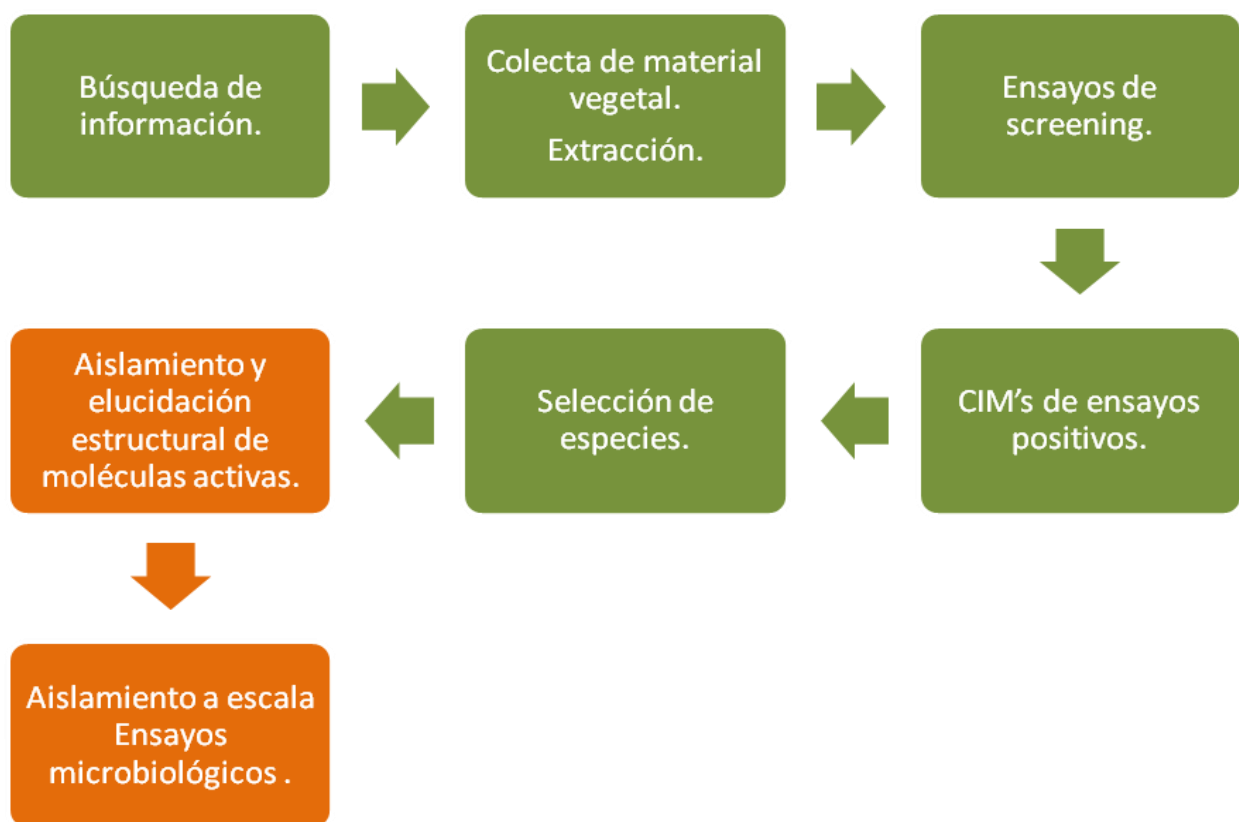


Figura 1.15. Esquema de la estrategia del trabajo.

### 1.11.- Bibliografía.

- Ambler, R. P. (1980) The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of The Royal Society B. Biological Science*, 289 (1036), 321-331.
- Baltz, R. H. (2006) Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation, or lack of inspiration? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 507-513.
- Bazet, C. (2004) *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente de perfil comunitario. En: Organización Panamericana de la Salud, (Ed.), *Staphylococcus aureus Meticilino Resistente. Informe Ateneo General*, Montevideo, Uruguay, 24-35.
- Berkowitz, F. (1995) Antibiotic resistance to bacteria. *Southern Medical Journal*, 88, 797-804.
- Beutler, J. A. (2009) Natural products as a foundation for drug discovery. *Current Protocols in Pharmacology*, 9-11.
- Bister, B., Bischoff, D., Stroebel, M., Riedlinger, J., Reicke, A., Wolter, F., Suessmuth, R. D. (2004) Abyssomicin C-A polycyclic antibiotic from a marine verrucospora strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angewandte Chemie International Edition*, 43 (19), 2574-2576.
- Blumberg, H., Rimland, D., Carroll, D., Terry, P., Wachsmuth, I. (1991) Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases*, 163, 1279-1285.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.G.H., Northcote, P.T. Prinsep, M.R. (2006) Marine natural products. *Natural Product Reports*, 23, 26-78.
- Bologna, C.G., Ursu, O., Oprea, T.I., Melancon, C.E., Tegos, G.P. (2013) Emerging trends in the discovery of natural products antibacterials. *Current Opinion in Pharmacology*, 13, 678-687.

- Bonnefoy, A., Dupuis-Hamelin, C., Steier, V., Delachaume, C., Seys, C., Stachyra, T. (2004) In vitro activity of AVE1330A, an innovative broad-spectrum non- $\beta$ -lactam-lactamase inhibitor. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 410-417.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009) Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 48 (1), 1-12.
- Brown, E.D. (2013) Is the GAIN Act a turning point in new antibiotic discovery? *Canadian Journal of Microbiology*, 59, 153-156.
- Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A. (1995) A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (6), 1211-1233.
- Bush K. (2013) Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1277, 84-90.
- Buss, A. & Butler, M.S. (2004) A new model for utilising chemical diversity from natural sources. *Drug Development Research*, 62, 362-370.
- Butler, M.S. & Cooper, M.A. (2011) Antibiotics in the clinical pipeline in 2011. *Journal of Antibiotics*, 64, 413-425.
- Butler, M.S., Blaskovich, M.A., Cooper, M.A. (2013) Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *Journal of Antibiotics*, 66, 571-591.
- Butler, M.S, Robertson, A.A.B., Cooper, M.A. (2014) Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Natural Products Reports*, 31, 1612-1661.
- Brandt, M.E. & Park, B.J. (2013) Think fungus-prevention and control of fungal infections. *Emerging Infectious Diseases*, 19 (10), 1688-1689.
- Cetinkaya, Y., Falk, P., Mayhall, C.G. (2000) Vancomycin-resistant enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 686-707.

- CHLA-EP, Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes (2013) Informe Epidemiológico Año 2013 <http://www.chlaep.org.uy/descargas/informe-epidemiologico-2013-cifras-provisorias.pdf>.
- Clardy, J. & Walsh, C. (2004) Lessons from natural molecules. *Nature*, 432, 829-837.
- Clark, A. M (1996) Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*, 13 (8), 1133-1141.
- Cooper, M.A. & Shlaes, D. (2011) Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, 472, 32.
- Cordell, G.A. (2000). Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 55, 463-480.
- Cowan, M.M (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Cox, P.A. (1990) Ethnopharmacology and the search for new drugs . En: D.J. Chadwick, J.Marsh (Eds.), *Bioactive compounds from plants*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd., 40-48.
- Cox, P.A. & Balick, M.J. (1994) The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, 270 (6), 82-87.
- Cragg, G. M. & Newman, D. J. (2013) Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3670-3695.
- Chopra, I. & Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 232-260.
- Daly, J.W., Spande, T.F., Garraffo, H.M. (2005) Alkaloids from amphibian skin: a tabulation of over eighthundred compounds. *Journal of Natural Products*, 68, 1556-1575.

- David, B., Wolfender, J-L., Dias, D. A. (2014) The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, 03/06/2014 DOI 10.1007/s11101-014-9367-z.
- Delcour, A.H. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794 (5), 808-816.
- Drawz, S.M. & Bonomo, R.A. (2010) Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 160-201.
- Drlica, K. & Zhao, X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 377-392.
- EARSS, European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2007). EARSS Annual Report 2007. Bilhoven.
- Epstein, S. & López-García, P. (2008) "Missing" protists: A molecular prospective. *Biodiversity and Conservation*, 17, 261-276.
- Fauci, A.S. & Marston, H.D. (2014) The perpetual challenge of antimicrobial resistance. *Journal of the American Medical Association*, 311 (18), 1853-1854.
- Feher, M. & Schmidt, J.M. (2003) Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal for Chemical Information and Computer Sciences*, 43, 218-227.
- Fidai, S., Farmer, S.W., Hancock, R.E. (1997) Interaction of cationic peptides with bacterial membranes. *Methods in Molecular Biology*, 78, 187-204.
- Friedman, L., Alder, J.D., Silverman, J.A. (2006) Genetic changes that correlate with reduced susceptibility to daptomicin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 2137-2145.
- Galiana, A. (2003) Infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 74 (1), 26-29.

- Gibbons, S. (2004) Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Products Reports*, 21, 263-277.
- Gibbons, S. (2005) Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochemistry Reviews*, 4, 63-78.
- Grabowski, K., Baringhaus, K.H., Schneider, G. (2008) Scaffold diversity of natural products: inspiration for Combinatorial library design. *Natural Product Reports*, 25, 892-904.
- Gu, J., Gui, Y., Chen, L., Yuan, G., Lu, H-Z., Xu, X. (2013) Use of natural products as chemical library for drug discovery and network pharmacology. *PLoS ONE*, 8, e62839.
- Harvey, A.L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13 (19/20), 894-901.
- Hooper, D.C. (2003) Mechanisms of quinolone resistance. En: D.C. Hooper & E. Rubinstein (Eds.), *Quinolone antimicrobial agents*, Washington, American Society for Microbiology Press, 41-67.
- Hopwood, D. A. (2007) *Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers*. New York, Oxford University Press, 38.
- Hughes, C. C., & Fenical, W. (2010) Antibacterials from the sea. *Chemistry-A European Journal*, 16(42), 12512-12525.
- Kaatz, G.W., Seo, S.M., Ruble, C.A. (1993) Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37, 1086-1094.
- Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44, 1549-1555.
- Kirst, H. A. (2013). Developing new antibacterials through natural product research. *Expert opinion on drug discovery*, 8 (5), 479-493.

- Labandeira-Rey, M., Couzon, F., Boisset, S., Brown, E.L., Bes, M., Benito, Y., Barbu, E.M., Vazquez, V., Höök, M., Etienne, J., Vandenesch, F., Bowden, M.G. (2007) *Staphylococcus aureus* Panton Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science*, 315, 1130-1133.
- Lewis, K., & Ausubel, F. M. (2006) Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*, 24 (12), 1504-1507.
- Li, J. W. H. & Vederas, J. C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier?. *Science*, 325 (5937), 161-165.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25.
- Livermore, D.M., Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., White, T. (2011) Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkr262.
- Lomovskaya, O. & Bostian, K.A. (2006) Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - a vision for applied use. *Biochemical Pharmacology*, 71, 910-918.
- Lowy, F. (2003) Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111, 1265-1273.
- Lyon, B. & Skurray, R. (1987) Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiology Reviews*, 51, 88-134.
- Ma, X.X., Galiana, A, Pedreira, W., Mowszowicz, M., Christophersen, I., Machiavello, S., Lope, L., Benaderet, S., Buella, F., Vicentino, W., Albibi, M., Bertaux, O., Constenla, I., Bagnulo, H., Llisa, L., Ito, T., Hiramatsu, K. (2005) Community-acquired Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, 11(6), 973-976.

- Massidda, O., Mingoia, M., Fadda, D., Whalen, M., Montanari, M., Varaldo, P. (2006) Analysis of the  $\beta$ -lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: focus on *bla* complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. *Plasmid*, 55, 114-127.
- Matsuoka, M., Endou, K., Kobayashi, H., Inoue, M., Nakajima, Y. (1998) A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 167, 221-227.
- McManus, M.C. (1997) Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health- System Pharmacy*, 54, 1420-1433.
- Mejía, C., Zurita, J., Guzmán-Blanco, M. (2010) Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14 (2), 79-86.
- Moellering Jr., R.C. (2011) Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 2-9.
- Molinari, G. (2009) Natural products in drug discovery: present status and perspectives. En: C.A.Guzmán & G.Z.Feuerstein (Eds.), *Pharmaceutical Biotechnology*, 655, 13-27, Nueva York, Springer.
- Monteiro, R., Vitorino, R., Domingues, P., Radhouani, H., Carvalho, C., Poeta, P., Torres, C., Igrejas, G. (2012) Proteome of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain of sequence type ST398. *Journal of Proteomics*, 75, 2892-2915.
- Mothes, K. (1969) Die Alkaloide im Stoffwechsel der Pflanze. *Experientia*, 25, 225-239.
- Murray, I.A. & Shaw, W.V. (1997) O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 1- 6.
- Nakamura, A., Nakazawa, K., Miyakozawa, I., Mizukoshi, S., Tsurubuchi, K., Nakagawa, M., O'Hara, K., Sawai, T. (2000) Macrolide esterase-producing *Escherichia coli* clinically isolated in Japan. *Journal of Antibiotics*, 53, 516-524.



- Neu, H.C. (1992) The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257,1064-1073.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M. (2003) Plants as a source of anti-cancer and anti-HIV agents. *Annals of Applied Biology*, 143 (2), 127-133.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M., (2005) Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1-2), 72-79.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*,70, 461-477.
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75 (3) , 311-335.
- NIAID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases (1998) Fact Sheet, 3/98.
- Nicolaou, K.C., Chen, J.S., Edmonds, D.J., Estrada, A.A. (2009) Recent advances in the chemistry and biology of naturally occurring antibiotics. *Angewandte Chemie International Edition* , 48, 660-719.
- NIPHE, National Institute for Public Health and the Environment (2008) Available from: [http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007\\_FINAL\\_tcm61-55933.pdf](http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf).
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2013) Informe Mundial sobre la Tuberculosis [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/103227/1/WHO\\_HTM\\_TB\\_2013.15\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/103227/1/WHO_HTM_TB_2013.15_spa.pdf).
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2014<sub>a</sub>) Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014: Una mina de información sobre salud pública mundial. [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2014/es/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/es/).
- OMS, Organización Mundial de la Salud (2014<sub>b</sub>) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf).
- Pandey, A.K. & Kumar, S. (2013) Perspective on plant product as antimicrobial agents: a review., *Pharmacologia*, 4, 469-480.

- Pantosti, A., Sanchini, A., Monaco, M. (2007) Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2(3), 323-334.
- Pardo, L., Vola, M., Macedo-Vinas, M., Machado, V., Cuello, D., Mollerach, M., Castro, M., Pérez, G., Varela, G., Algorta, G. (2013) Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children treated in Uruguay. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(1), 10-16.
- Payne, D.J., Gwynn, M.N., Holmes, D.J., Pompliano, D.L. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6, 29-40.
- Petri, W.A.J. (2006). Antimicrobial agents: sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, quinolones, and agents for urinary tract infections. En: L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker (Eds.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th ed., Nueva York, McGraw-Hill, 1111–1126.
- Piddock, L.J. (2006a) Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 629-636.
- Piddock, L.J. (2006b) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 382-402.
- Poole, H. (2002) Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 55-64.
- Poole, K. (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine*, 39, 162-176.
- Potterat, O. & Hamburger, M. (2008) Drug discovery and development with plant-derived compounds. En: F. Petersen & R. Amstutz (Eds.), *Progress in Drug Research*, Birkhäuser Basel, 65, 45-118.
- Raffauf, RF. (1996) *Plant Alkaloids: A Guide to their Discovery and Distribution*, Binghamton, Food Products Press, 298 p.

- Roemer, T., Xu, D., Singh, S.B., Parish, C.A., Harris, G., Wang, H. (2011) Confronting the challenges of natural product-based antifungal discovery. *Chemical Biology*, 18, 148-164.
- Rosén, J., Gottfries, J., Muresan, S., Backlund, A., Oprea, T.I. (2009) Novel Chemical Space Exploration via Natural Products. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(7), 1953-1962.
- Saleem, M., Nazir, M., Ali, M. S., Hussain, H., Lee, Y. S., Riaz, N., Jabbar, A. (2010) Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. *Natural product reports*, 27(2), 238-254.
- Sheridan, C. (2006) Antibiotics au naturel. *Nature Biotechnology*, 24, 1494-1496.
- Shlaes, D. M. (2010). The Perfect Storm. En: *Antibiotics: The perfect storm*. Springer, 1-7.
- Shlaes, D.M. & Spellberg, B. (2012) Overcoming the challenges to developing new antibiotics. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(5), 522-526.
- Shlaes, D.M., Sahm, D., Opiela, C., Spellberg, B. (2013) The FDA reboot of antibiotic development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4605 - 4607.
- Shore, A., Rossney, A., Keane, C., Enright, M., Coleman, D. (2005) Seven novel variants of the staphylococcal chromosomal cassette *mec* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from Ireland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 2070-2083.
- Singh, S.B. (2014) Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24, 3683-3689.
- Singh, S.B. & Barret, J.F. (2006) Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, 71, 1006-1015.
- Sittenfeld, A., Tamayo, G., Nielsen, V., Jiménez, A., Hurtado, P., Chinchilla, M., Guerrero, O., Mora, M.A., Rojas, M., Blanco, R., Alvarado, E., Gutiérrez, J.M., Janzen, D.H. (1999) Costa Rican International Cooperative Biodiversity Group:

- Using insects and other arthropods in biodiversity prospecting. *Pharmaceutical Biology*, 37, 55-68.
- Schmitz, F.J., Sadurski, R., Kray, A., Boos, M., Geisel, R., Kohrer, K., Verhoef, J., Fluit, A.C. (2000) Prevalence of macrolide resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European University hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 891-894.
- Springer, B., Kidan, Y.G., Prammananan, T., Ellrott, K., Bottger, E.C., Sander, P. (2001) Mechanisms of streptomycin resistance: selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2877-2884.
- Schröder, F.C., Farndon, J.R., Attygalle, A.B., Smedley, S.R., Eisner, T., Meinwald, J. (1998) Combinatorial chemistry in insects: A library of defensive macrocyclic polyamines. *Science*, 281, 428-431.
- Straus, S.K. & Hancock, R.E. (2006) Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 1215-1223.
- Sun, J., Deng, Z., Yan, A. (2014) Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Article in Press.
- Taylor, P.W. (2013) Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42, 195-201.
- Telechea, H., Speranza, N., Lucas, L., Santurio, A., Giachetto, G., Algorta, G., Nanni, L., Pérez, C. (2009) Antibiotic consumption and antimicrobial susceptibility evolution in the Centro Hospitalario Pereira Rossell in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* era. *Revista Chilena Infectología*, 26(5), 413-419.
- Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., Wright, G. D. (2010). The tetracycline resistome. *Cellular and molecular life sciences*, 67(3), 419-431.

- Thomson, K.S. & Smith, M.E. (2000) Version 2000: the new  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. *Microbes and Infection*, 2, 1225-1235.
- Tsiodoras, S., Gold, H., Sakoulas, G., Eliopoulos, G.M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R.C., Ferraro, M.J. (2001) Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 358, 207-208.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., Bhole, B. D. (2001) How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Archives of microbiology*, 176 (5), 386-390.
- Weigel, L., Donlan, R., Shin, D., Jensen, B., Clark, N., McDougal, L., Zhu, W., Musser, K., Thompson, J., Kohlerschmidt, D., Dumas, N. (2007) High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 231-238.
- Wong, W.R., Oliver, A.G., Linington, R.G. (2012) Development of antibiotic activity profile screening for the classification and discovery of natural product antibiotics. *Chemical Biology*, 19, 1483-1489.
- Wright, G.D. (2014) Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Canadian Journal of Microbiology*, 60, 147-154.
- Wright, G.D., Berghuis, A.M., Mobashery, S. (1998) Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 456, 27- 69.
- Yao, J. & Moellering, R.J. (2003) Antibacterial agents. En: P.R. Murray, E.J. Baron , J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, R.H. Tenover, R.M. Tenover (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed., Washington, ASM Press, 1039-1073.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and  $\beta$ -lactam resistance. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 361-385.

Zhu, F., Ma, X.H., Qin, C., Tao, L., Liu, X., Shi, Z. (2012) Drug discovery prospect from untapped species: indications from approved natural product drugs. *PLoS One*, 7, e39782.

## **CAPITULO 2**

### **PROSPECCIÓN MICROBIOLÓGICA DEL BOSQUE DE GALERÍA DEL RÍO URUGUAY Y DEL RÍO QUEGUAY.**

---

## CAPITULO 2

### PROSPECCIÓN MICROBIOLÓGICA DEL BOSQUE DE GALERÍA DEL RÍO URUGUAY Y DEL RÍO QUEGUAY.

#### 2.1.- INTRODUCCIÓN

##### 2.1.1.- Biodiversidad y Bioprospección.

La expresión diversidad biológica o biodiversidad se emplea para describir la cantidad y variabilidad de los organismos vivos que existen en el planeta, definida en términos de genes, especies y ecosistemas. Así la diversidad incluye la variabilidad dentro de las especies (diversidad genética), entre las especies (diversidad de especies) y entre los ecosistemas (diversidad de ecosistemas). Un ecosistema es un complejo dinámico de comunidades vegetales, animales y microorganismos y su medio ambiente asociado no viviente que interactúan como una unidad funcional. Ejemplos de ecosistemas incluyen desiertos, bosques tropicales, coral de arrecifes, praderas, etc.

La conservación de la diversidad biológica ha dejado de significar la simple protección de especies y ecosistemas, para convertirse en parte fundamental de las propuestas hacia el desarrollo sustentable.

Los requerimientos de sostenibilidad en las prácticas agropecuarias, aunados a la necesidad de vincular estas prácticas con la actividad económica global, imponen nuevos retos sobre el sector. Una de las estrategias indispensables para enfrentar este reto es la diversificación de productos y actividades del sector, y dentro de estos se ha hecho resaltar recientemente la llamada bioprospección.

En términos amplios, la bioprospección es la búsqueda de información a partir de especies biológicas para su uso posterior en procesos de producción en diversos sectores. Ejemplos de esa información es la contenida en el material genético de todos los seres vivos, en los compuestos químicos que producen, en sus interacciones o en el conocimiento de las personas que de una manera u otra han estudiado a esos seres vivos (Bell, 1993; Iwu et al., 1999; Garrity & Hunter-Cervera, 1999). Dicha información,



que es imposible valorar, puede algún día llevar a la cura de enfermedades devastadoras, a formas naturales de cultivar alimentos o a productos nutracéuticos. La bioprospección es el vínculo clave entre tener recursos, utilizar los recursos y generar beneficios económicos para las comunidades.

Uno de los mecanismos de bioprospección es la búsqueda de información química. Esta información está contenida en los compuestos producidos por los seres vivos como medios de comunicación, defensa, e intercambio de información, y se les conoce como metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios de cada especie son extraordinariamente diversos, y la información contenida en sus estructuras es de especial interés para la industria farmacéutica, pues dichos compuestos han sido hasta ahora la fuente principal de innovación en el descubrimiento de nuevas medicinas. Se ha propuesto que el mercado lucrativo de los medicamentos podría ser un nuevo recurso para la diversificación del uso de los bosques y de otros ecosistemas ricos en diversidad biológica (Seidl, 1994; Baker et al., 1995, Grifo, 1996; Balik & Mendelsohn, 2000).

En los últimos años, la pérdida de especies y hábitats enteros ha ocurrido a un ritmo sin precedentes. La extinción de cada especie adicional lleva a la pérdida irreversible de genes únicos, que podrían relacionarse con el desarrollo de alimentos o medicamentos. Al mismo tiempo el auge del uso de los productos naturales en el área de la salud como productos farmacéuticos, nutracéuticos o cosméticos abre una esperanza para su uso. La bioprospección hace posible la conservación y el desarrollo económico a través de la explotación sustentable de la biodiversidad (Albuquerque & Hanazaki, 2006; Artuso, 2002; Chapela, 1994; Bell, 1993).

### **2.1.2.- Estrategias para bioprospectar la biodiversidad.**

Uno de los mayores inconvenientes en la bioprospección química es la baja probabilidad de encontrar nuevas moléculas exitosas (Jones et al., 1991, Verpoorte, 1998, Fabricant & Farnsworth, 2001). El ejemplo que se cita más a menudo es la búsqueda realizada por el Instituto Nacional del Cáncer (NIH por su sigla en inglés) en Estados Unidos. De las 350000 extractos de plantas seleccionadas por el NIH, sólo

alrededor del 4.3 % tenía alguna actividad anticancerígena y sólo el 0.07% de las plantas produjo compuestos con una buena actividad (Suffness & Douros, 1982), aunque uno de éstos éxitos condujo al descubrimiento del taxol a partir de *Taxus brevifolia* (Wall & Wani, 1996; Fabricant & Farnsworth, 2001) y actualmente en uso clínico como droga de primera línea. Se han seleccionado para estudiar alrededor de 10 millones de microorganismos y se han identificado unos 2000 antibióticos (0.002 %) (Baltz, 2006). Sin embargo, la baja probabilidad de éxito no es una característica exclusiva de la bioprospección. Los esfuerzos de la química combinatoria que generan compuestos al azar también tienen un bajo porcentaje de éxito e inclusive hay ejemplos con dos órdenes de magnitud más abajo que el descubrimiento a partir de productos naturales (Service, 2004; Li & Vederas, 2009). Esto último ha sido reconocido por la industria farmacéutica y algunas grandes compañías como Novartis todavía se aferran a sus programas de productos naturales. No obstante, para que un programa de bioprospección sea exitoso debe enfrentar algunos desafíos como la selección adecuada de muestras.

Existen dos estrategias para la colecta de muestras, la primera es aleatoria o al azar y la segunda es dirigida, la cual se clasifica en cuatro clases (Fig. 2.1).

#### *Colecta al azar.*

Generalmente es un proceso tedioso y poco rentable. En el caso de las plantas implica la colecta completa de todas las plantas encontradas en el área de estudio. En la mayoría de los casos, solo las especies con flor y fruto son colectadas, ya que las identificaciones de las especies estériles llevan más tiempo, son difíciles y ocasionalmente son imposibles (Balick, 1990).

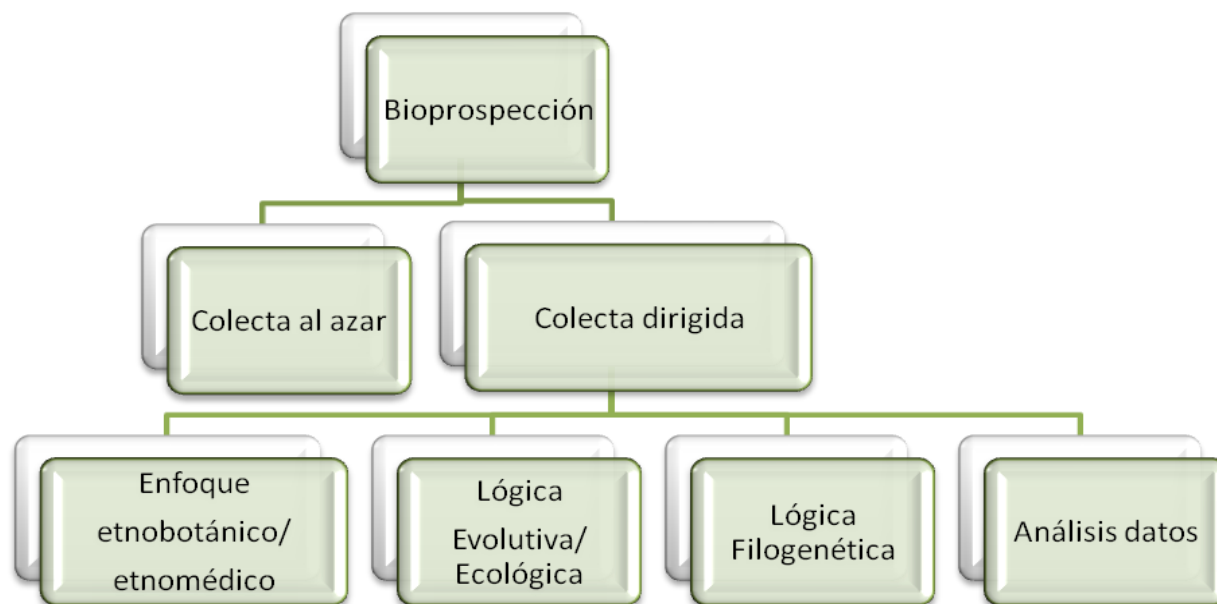


Figura 2.1. Diferentes enfoques de la bioprospección.

### *Enfoque etnomédico.*

La bioprospección basada en los conocimientos tradicionales de las poblaciones locales sobre los usos medicinales de las plantas ha sido uno de los primeros enfoques no aleatorios para explorar los compuestos bioactivos de las plantas (Farnsworth, 1994; Fabricant & Farnsworth, 2001; Patwardhan et al., 2004). Uno de los primeros ejemplos de este enfoque condujo al aislamiento de los alcaloides del opio, incluyendo la morfina (Hamilton & Baskett, 2000). Más tarde se continuó con la identificación de la quinina (a partir de *Cinchona*), de la colchicina (de *Colchicum autumnale*), salicina (de *Salix alba*), etc.

Este enfoque presenta una buena correlación entre los resultados obtenidos y la información etnomédica proyectada presentando un porcentaje que se encuentra entre el 65 y el 90% (Fabricant & Farnsworth, 2001) demostrándose que la selección de plantas basadas en este enfoque resultó ser más eficiente que la selección realizada al azar. Por ejemplo la búsqueda de vasodilatadores en plantas seleccionadas basándose en información indígena y tradicional tuvo mayor probabilidad de éxito (10-22%)

comparada con ningún éxito con plantas seleccionadas al azar (sin información previa) (Slish et al., 1999). Diferencias similares se encontraron en la búsqueda de plantas con actividad antimalarica, las plantas tradicionalmente usadas por la etnia Aguaruna fueron más efectivas que las elegidas al azar (Carvalho & Kettli, 1991). Otro ejemplo es el de los extractos crudos de las plantas utilizadas por curanderos en Belice que producen 4 veces más resultados positivos en las pruebas de laboratorio para la actividad anti-VIH que las especies colectadas al azar (Cox & Balick, 1994).

### *Lógica Evolutiva/ Ecológica.*

El significado funcional de la mayoría de los compuestos bioactivos de las plantas sigue siendo enigmático (Uma Shaanker et al., 1997; Douwes et al., 2008). Comprender el significado evolutivo de estos compuestos puede facilitar la bioprospección de una manera más inteligente y por tanto dirigida. Últimamente han existido algunos intentos por utilizar la lógica evolutiva para hacer predicciones acerca de los procesos que puedan contribuir a determinadas moléculas potenciales. Por ejemplo es conocido que en algunos vegetales están presentes mucopolisacáridos y antraquinonas que son los responsables de sus propiedades laxantes (Uma Shaanker et al., 1997; Ebadi, 2002). Pero por qué las plantas contienen laxantes? Una hipótesis (Uma Shaanker et al., 1997) es que las plantas poseen laxantes para asegurar un tiempo de permanencia óptimo de las semillas en el intestino de los animales que causan la dispersión de las mismas. En consecuencia, se predijo que las especies cuyas semillas son dispersadas por animales deben presentar laxantes con más frecuencia que aquellas especies cuyas semillas se dispersan por otros medios (viento, agua, etc) (Uma Shaanker et al., 1997). Esta predicción fue evaluada usando 114 especies con propiedades laxantes reportadas y se encontró que el 60% de las mismas dispersaban sus semillas por animales. Entonces orientando la bioprospección para la búsqueda de laxantes en especies con dispersión de semillas por animales se logrará mayor eficiencia y rapidez. Otro ejemplo se presenta en el trabajo de Lokesha y colaboradores (Lokesha et al., 1992), que postularon que en la prospección de semillas con alto contenido de aceite se obtendría mayor éxito si se buscan las especies que dispersan sus semillas por el viento. Las semillas requieren un poder

calorífico constante y acumulando la energía en forma de grasa en lugar de almidón se ahorraría espacio logrando un mayor grado de flotabilidad para la dispersión. El análisis del contenido de aceite en semillas de una gran base de datos de plantas confirmaron las predicciones efectuadas: las semillas dispersadas por el viento tienden a tener un contenido significativamente más alto de aceite en comparación con las semillas dispersadas por otros medios.

Estos estudios son algunos de los primeros en demostrar exhaustivamente la eficacia de la bioprospección usando una lógica evolutiva.

### *Lógica filogenética.*

Se basa en el hecho de que la filogenia (relación entre las especies a través de la descendencia genética) establece un vínculo evolutivo entre los diferentes grupos taxonómicos y por lo tanto proporciona la base para el descubrimiento de una vía metabólica en común, de fuentes alternativas de metabolitos secundarios existentes o nuevas moléculas activas (Wink, 2003). Un ejemplo comúnmente citado del valor predictivo del enfoque filogenético se refiere al taxol (Kingston, 2000), el cual se extrajo de *Taxus brevifolia*. La elevada demanda del mismo requirió una fuente alternativa que se encontró de forma rápida y eficiente mediante la búsqueda del compuesto en *T. baccata*, un pariente cercano de *T. brevifolia* (Kingston, 2000).

Se ha determinado el patrón de distribución de algunos metabolitos secundarios muy conocidos de las plantas. Por ejemplo, la ocurrencia de alcaloides quinolizidínicos, restringe al género *Papilionoidae* de *Fabaceae*; los alcaloides esteroideos, son predominantes en los géneros *Solanum* y *Lycopersicon*, iridoides en *Lamioidae*, monoterpenos volátiles y sesquiterpenos en *Nepetoideae*; en otras palabras la mayoría de los metabolitos secundarios de las plantas eran filogenéticamente conservados en su distribución.

Así, si se ha encontrado una molécula nueva bioactiva en determinado taxón, vale mucho más la pena intensificar la búsqueda de bioprospección en la vecindad taxonómica que en otros lugares.

### *Análisis de datos.*

El estudio o análisis de datos tiene como objetivo la obtención de alguna información útil o el descubrimiento de algún patrón que sirva para dirigir la bioprospección. Sin embargo su uso en el proceso de bioprospección en sí no es aún muy generalizado. Recién en los últimos tiempos se han abierto oportunidades para el uso de este enfoque gracias al desarrollo de un gran número de bases de datos. Entre unas pocas bases importantes con datos mundiales se encuentra "NAPRALERT", "NCI discovery resources", "Plants for Future", "Plant derived drugs database", "Rainforest database", etc. Por ejemplo NAPRALET, proporciona información etnomédica, química y farmacológica de cerca de 45.000 especies de plantas. Así, se ha utilizado esta base de datos para la investigación de especies de plantas que contengan compuestos de sabor dulce (Fabricant & Farnsworth, 2001), de alcaloides en las plantas y con la información obtenida se observaron algunos patrones muy interesantes que tienen el potencial de acelerar el ritmo de los descubrimientos (Cordell et. al., 2001). Otro estudio examinó la relación existente entre las plantas que presentan formación de agallas (síntoma de infección bacteriana) y la actividad anticancerígena. Se demostró que las plantas con actividad anticancerígena presentan una mayor proporción de especies resistentes a la formación de agallas que las especies seleccionadas al azar. Estos resultados tienen un gran potencial exploratorio para la búsqueda de nuevas plantas con actividad anticancerígena (Srirama et al., 2008).

Un requisito previo para este enfoque, es la necesidad de plantear una hipótesis para que pueda obtener de los datos una información útil. Por último, hay que tener en cuenta que la información obtenida sólo puede ser sugerente y requiere de más estudios para confirmarla.

### **2.1.3.- Flora nativa de Uruguay.**

La flora del Uruguay cuenta con aproximadamente 2600 especies de plantas, distribuidas en 150 familias.

El tipo de vegetación dominante es la pradera natural, que ocupa aproximadamente 14 millones de hectáreas, o sea un 80% del total del país. Uno de los caracteres más importantes de la pradera es el alto número de especies, casi 2000, y la diversidad de

caracteres vegetativos representados. Aquí predominan las gramíneas, con 400 especies. La diferencia del ciclo anual determina que siempre habrá especies en distintas etapas del desarrollo, lo que permite una cobertura continua durante todo el año.

El Uruguay pertenece a la provincia fitogeográfica Pampeana (matriz pradera) pero en las fronteras presenta intrusiones de la Provincia Paranaense y Provincia Chaqueña al oeste, la Provincia Paranaense al este y la Mata atlántica al sureste (Grela, 2004). Resulta claro que el Uruguay se ubica en una zona de transición entre áreas climáticamente diferentes, más cálidas y húmedas hacia el norte, y más secas y frías hacia el sur (Del Puerto, 1987). Esto explica que el país se encuentre en el límite del área de distribución geográfica de muchas especies.

Nuestros suelos presentan déficit hídrico lo que explicaría la ausencia de vegetales de gran porte, salvo en zonas determinadas como ser: quebradas, serranías, riberas de ríos y zonas bajas linderas a los mismos (Chebataroff, 1942; Grela, 2004).

Según su fisonomía y características fisiográficas del área definimos como **bosque de galería, fluvial o ribereño** a la vegetación arbórea que se desarrolla en los márgenes de los cursos de agua. La composición florística de estos montes varía entre una línea inmediata al agua con especies netamente hidrófitas, un sector intermedio con alta diversidad específica y una línea de contacto de especies mesoxerófitas y la pradera. La mayor vía de entrada de especies tropicales y subtropicales se lleva a cabo a través del río Uruguay.

El **bosque de parque** se desarrolla entre el monte ribereño y la pradera, presentando una vegetación compuesta por árboles de copa abierta, distanciados entre sí bajo los cuales existe un tapiz de vegetación herbácea. Las características de esta región son similares a la Provincia del Espinal en la República Argentina. Los árboles corresponden a comunidades subxerófitas en las que predominan especies de algarrobo (*Prosopis* sp.) y espinillos, y que se extiende sobre terrenos alcalinos próximos al río Uruguay. Los espinillares han sido alterados por la actividad frecuente de deforestación de campos para la instalación de cultivos, provocando una exagerada

multiplicación en algunos lugares, ya que cuando éstos son cortados rebrotan por las raíces gemíferas.

El **bosque de quebrada** se desarrolla al abrigo de accidentes topográficos, donde las condiciones son de alta humedad, suelos sueltos, húmidos, bien drenados, con ausencia de vientos y temperatura constante lo que permite el crecimiento de vegetación típicamente subtropical, restringida a esos microclimas. Se pueden encontrar más de dos estratos de vegetación, con gran cantidad de plantas trepadoras y epífitas.

El **bosque serrano** se desarrolla en sierras y serranías del este del país. Los suelos son de textura gruesa con buen drenaje, con numerosos microambientes, donde es posible la instalación de arbustos, lo que determina la acumulación de depósitos coluviales y formación de tierra orgánica. La estructura actual del monte serrano está determinada más por actividades antrópicas que por características climáticas o de suelo. Son frecuentes en estos montes las especies espinosas con características xeromorfas.

Los **palmares** constituyen comunidades muy características desarrollándose en el noroeste y este del país. En el primer caso corresponde a la palmera *Butia yatay* ocupando un área aproximada a las 2500 hás., que se continúa hacia la Provincia de Entre Ríos en la República Argentina, ocupando una extensión mucho mayor. En el segundo caso encontramos la palmera *Butia capitata*, cubriendo una superficie de 68.000 hás., llegando hasta el Estado de Rio Grande do Sul, en el Brasil. En estos momentos estas comunidades corren peligro de extinción, pues están compuestas solamente por individuos adultos, sin estadios intermedios de desarrollo, debido al pastoreo.

La vegetación de los **arenales** se encuentra a lo largo de toda la costa marítima. Las plantas adaptadas a este tipo de hábitat presentan modificaciones morfológicas particulares tales como: sistemas radicales profundos, abundancia de estolones, cutícula serosa, rizomas fuertes, presencia de pelos.



Debido a la extensa red hidrográfica también encontramos una vegetación **acuática** abundante. Es posible distinguir un gradiente de humedad creciente desde la tierra hasta el agua libre, lo que determina una secuencia de vegetación. Cuando la inundación es temporaria hay un pasaje paulatino a la pradera o pajonal, con inundación permanente se desarrollan pajonales o totorales. Cuando la profundidad y la luz lo permiten se instalarán plantas acuáticas sumergidas o flotantes.

En zonas costeras, con entrada de agua salada, encontramos la vegetación **halófitas**, que presenta modificaciones ecológicas y fisiológicas muy particulares. Poseen una elevada presión osmótica, de tres a siete veces superior a las plantas mesófitas.

En sitios pedregosos o rocosos, en suelos superficiales con pendientes pronunciadas y poca disponibilidad de agua encontramos las especies **xerófitas**. Estas plantas generalmente presentan tallos fotosintéticos, denominados filocladios o cladodios, las hojas modificadas en espinas y sistema radicular muy extendido.

#### **2.1.4.- El bosque de galería en Uruguay.**

Las especies arbóreas que forman parte de las comunidades nativas del Uruguay son alrededor de 170 ascendiendo a unas 250 si se consideran también las especies arbustivas y caméfitas sobre un total algo mayor a las 2600 especies de plantas vasculares que crecen en el país. La vegetación leñosa , arbóreo arborescente del Uruguay incluyendo a los palmares, según la carta forestal (MGAP, 2004) cubre el 4.3 % de la superficie del territorio nacional, totalizando 752.157 hás. Esto representa más de la mitad de toda el área forestada del país, incluso luego de años de auge de la forestación para madera y pulpa de celulosa (Fig. 2.2). Dichas agrupaciones boscosas ocupan diferentes ambientes que determinan situaciones en la mayoría de los casos perfectamente diferenciables entre sí, desde un punto de vista ecológico geográfico, lo que no ocurre si sólo se tiene en cuenta la localización geográfica de las especies leñosas.

En las costas e islas del río Uruguay (departamentos de Artigas, Salto y Paysandú) y en los afluentes (ríos Arapey, Queguay, etc.) la vegetación de bosque de galería adquiere un "aspecto selvático" con especies propias de regiones subtropicales. Especies de la Provincia Paranaense se desplazan hacia el sur por los ríos Uruguay y Paraná aprovechando el microclima ribereño, llegando hasta Punta Lara (Provincia de Buenos Aires) (*Selva marginal subclimática*). En estos tipos de bosques se encuentran 70 especies de árboles y 57 de arbustos (50% de la flora arbórea y arbustiva del Uruguay) y 78 de enredaderas (88% del total).

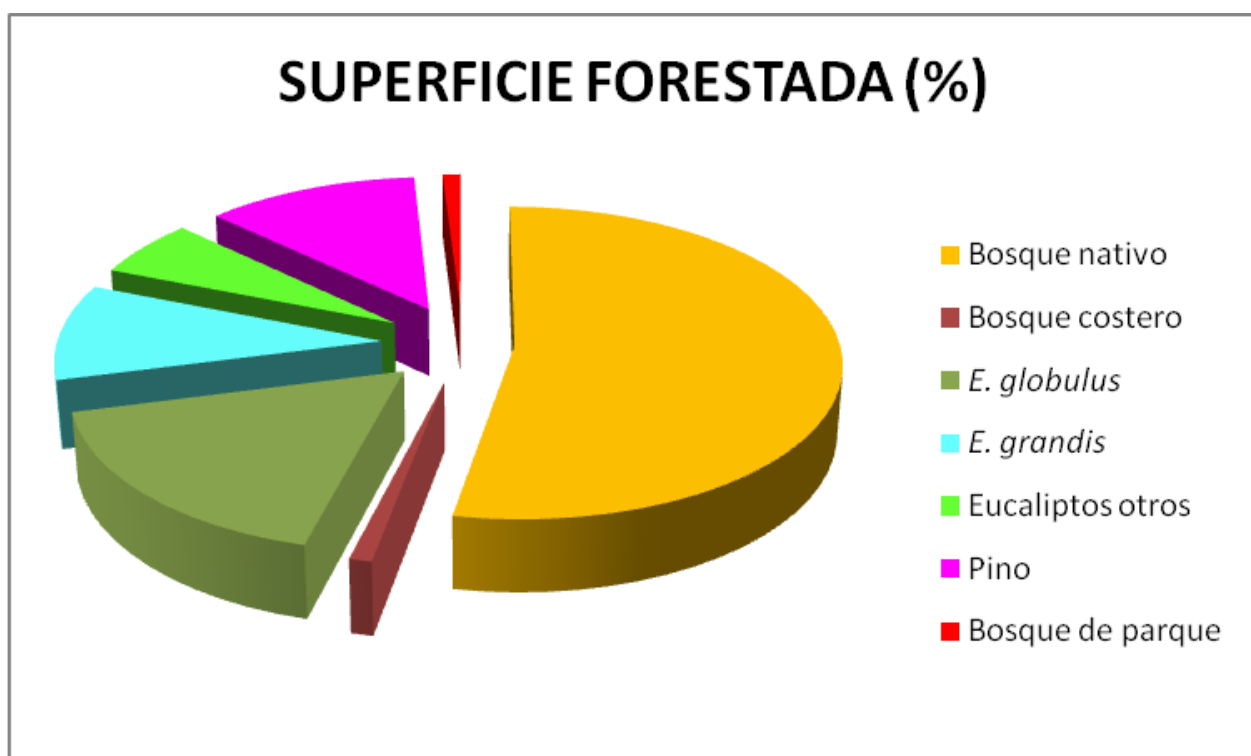


Figura 2.2. Superficie forestada del país (Tomado de Carta Forestal 2004 del MGAP).

Los ecosistemas seleccionados para este estudio abarcan una de las zonas de mayor biodiversidad del país. Se sitúan en el departamento de Paysandú, en el monte ribereño o de galería del Río Uruguay (en la zona delimitada por el río Guaviyú al norte y el río Queguay al sur) y el monte ribereño del río Queguay.

## 2.2 - MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1.- Búsqueda de información bibliográfica.

Se realizó una búsqueda bibliográfica sobre las posibles especies presentes en el ecosistema seleccionado, recopilando información etnobotánica, etnofarmacológica y quimiotaxonómica en artículos de investigación, en bases de datos on line y compendios locales de medicina tradicional.

### 2.2.2.- Selección del área de estudio y colecta.

El relevamiento de especies se realizó eligiendo parcelas representativas dentro de las zonas de estudio en el departamento de Paysandú (Fig. 2.3), áreas linderas al río Uruguay (sitio 1 y 2) y áreas sobre el cauce medio de los ríos Queguay Grande (sitio 3), Queguay Chico (sitio 4) y en la desembocadura del mismo en el río Uruguay (sitio 5). La ubicación precisa de los sitios de colecta se muestran en la figura 2.4.

**Sitio 1 :** Paraje Las Barrancas en la costa del Río Uruguay frente al extremo norte de la Isla Guaviyú. Antes de alcanzar la costa del río Uruguay, se atraviesa un área de lomadas y planicies elevadas aledañas al bosque ribereño, en las que se desarrolla un bosque de parque o "espinillar" de densidad variable, y con predominio de *Acacia caven*. El bosque ribereño propiamente dicho se desarrolla entre la costa del río y la base de las lomadas y tiene unos 250 m de ancho. Toda el área se encuentra bajo pastoreo de ganado vacuno.

**Sitio 2:** se encuentra sobre el Arroyo Guaviyú.

**Sitio 3:** se ubica en el cruce de la Ruta Nacional N°4 y el río Queguay Grande (Paso Andrés Pérez). El bosque es mayormente secundario, con sotobosque de densidad bastante variable.

**Sitio 4:** se ubica en el cruce de la Ruta Nacional N°4 y el río Queguay Chico (Paso de Haedo). El bosque es mayormente secundario, aunque con algunos sectores de vegetación primaria, con sotobosque de densidad bastante variable. .

**Sitio 5:** se encuentra en la confluencia del río Queguay en el río Uruguay. Bosque mayormente primario con sotobosque denso.



Figura 2.3. Ubicación del departamento de Paysandú en el Uruguay y ubicación de Uruguay en América del sur.

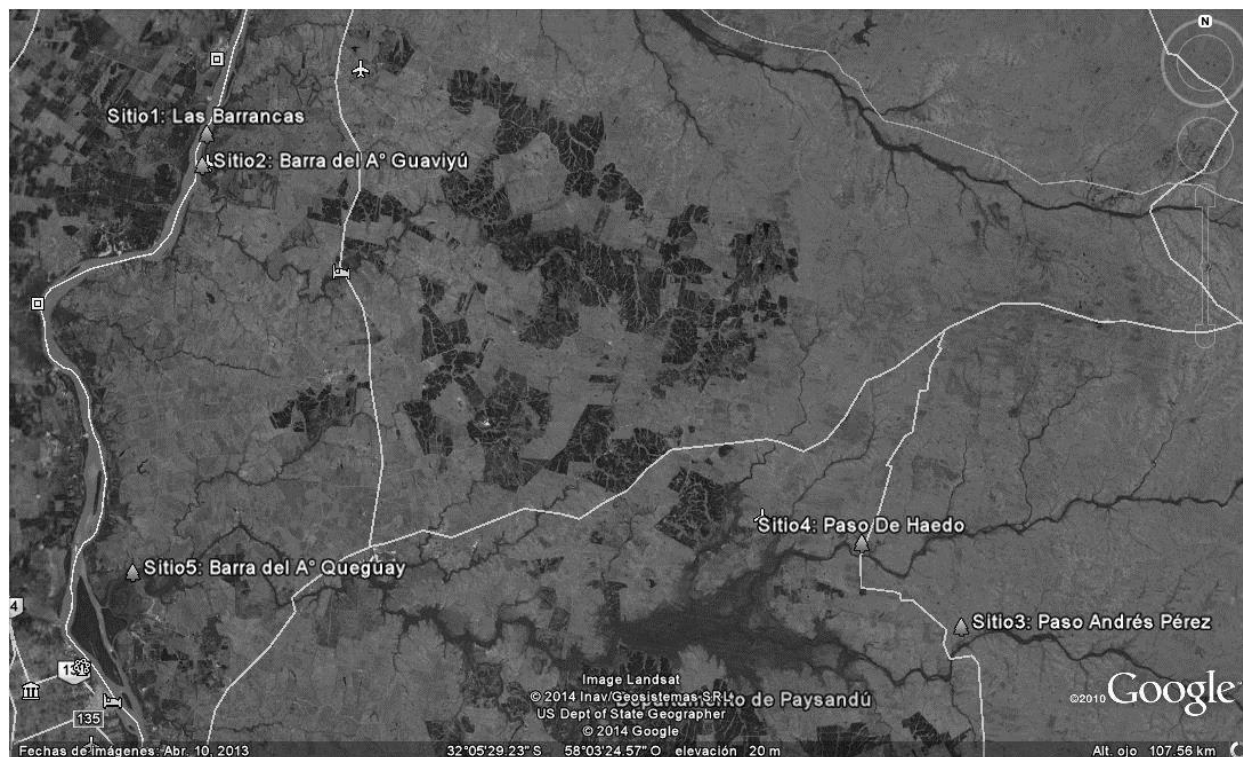


Figura 2.4. Sitios de colecta.

El relevamiento de las especies presentes se desarrolló a través de transectas imaginarias perpendiculares al cauce principal de los ríos que abarcaron toda la profundidad del monte ribereño hasta la zona de transición y herbácea posterior. Se tomaron puntos sobre esas transectas cada 10 m y fueron relevados todos los ejemplares comprendidos en un radio de 4 m del punto de selección. Los ejemplares fueron identificados y especímenes de herbario fueron depositados en el Jardín Botánico "Atilio Lombardo", Montevideo (MVJB).

Las plantas colectadas fueron seleccionadas de acuerdo a sus usos etnofarmacológicos reportados y tratando de abarcar la mayor diversidad posible.

### **2.2.3.- Preparación de extractos.**

Las plantas colectadas fueron secadas en secadero a 25°C y se pulverizaron en forma manual o con molino dependiendo de la especie o parte utilizada de la planta (hojas, partes aéreas, frutos, cortezas). Por cada muestra (si la cantidad fue suficiente) se prepararon 3 extractos usando diferentes solventes (EtOH/H<sub>2</sub>O 70:30, acetona, diclorometano). Las muestras separadamente (20 g) se extrajeron dos veces por maceración con 100 mL de EtOH/H<sub>2</sub>O 70:30, acetona o diclorometano según correspondiera durante 48 hs. Los extractos combinados se evaporaron a vacío o fueron liofilizados según la necesidad y luego se prepararon soluciones (en los respectivos solventes) de concentración igual a 10 mg/mL. Se utilizaron tres solventes diferentes de modo de abarcar un amplio rango de polaridades.

### **2.2.4.- Ensayos de actividad antibacteriana.**

#### *Screening antibacteriano mediante Bioautografías.*

El screening antibacteriano de los extractos fue determinado usando placas de TLC secas de acuerdo al método agar overlay (Rahalison et al., 1991). Los extractos se siembran en la TLC en forma de "banditas" y no se desarrolla la cromatografía como en la bioautografías tradicionales. Se utilizaron las siguientes cepas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p), *Listeria innocua* (CCM-FQ 56), *Bacillus subtilis* (ATCC 25369), *Escherichia coli* (ATCC 26). Se incluyeron controles negativo (solventes) y positivo (gentamicina).

Los microorganismos fueron cultivados toda la noche a 35 °C en agar Mueller-Hinton (Difco). Las colonias fueron suspendidas en una solución salina (0.9 % NaCl) hasta lograr una turbidez comparada con la escala 0.5 Mac Farland (10<sup>8</sup> ufc/mL) y 2.5 mL de ésta suspensión fue agregada a 100 mL agar Mueller-Hinton fundido y termostatizado previamente a 45 °C. La placa de TLC sembrada con extractos y seca fue introducida en una placa de Petri estéril y fue volcado el medio de cultivo inoculado sobre su superficie utilizando una pipeta Pasteur estéril de manera que quede un delgado film sobre la TLC.

Luego fue incubada 24 hs a  $35 \pm 2$  °C y revelada con una solución acuosa al 0.1 % de violeta de p-yodo-nitrotetrazolium (INT) (Sigma) que es un revelador de la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Se observan halos de inhibición (amarillos) no cuantitativos sobre los compuestos activos y el crecimiento bacteriano es indicado por el desarrollo de color rojo (Fig. 2.5)

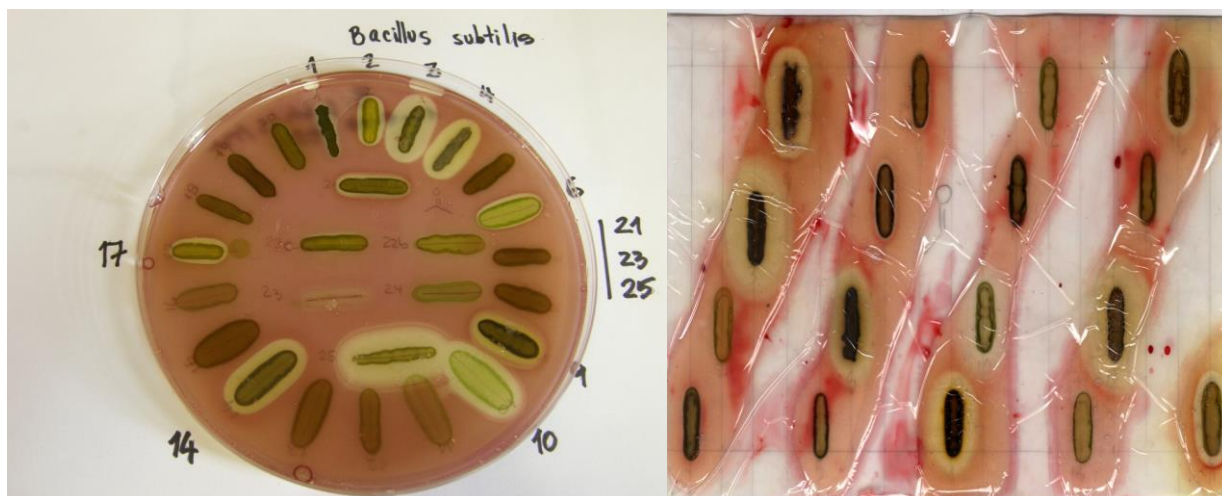


Figura 2.5. Bioautografías sobre placas de TLC sin cromatografiar.

#### *Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).*

Fueron realizadas a los extractos que dieron actividad antibacteriana contra *S. aureus* (ATCC 6538 p) en el screening efectuado con las bioautografías.

Fue determinada por el método de microdilución de acuerdo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) usando cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (ATCC 6538 p) y meticilino resistentes (ATCC 43300, ATCC 700699 y USA 100).

Los diferentes extractos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Los microorganismos fueron cultivados toda la noche a 35 °C en agar Mueller - Hinton (Difco). Las colonias fueron suspendidas en caldo Mueller-Hinton (Difco) hasta lograr una turbidez comparada con la escala 0.5 Mac Farland.

Se utilizaron microplacas estériles (96 pocillos, 0.2 mL volumen, Fisher Scientific). En el primer pocillo se agregan 20  $\mu$ L de la solución stock y 180  $\mu$ L de caldo Muller Hinton (MH). En el segundo pocillo se agregan 20  $\mu$ L del primer pocillo y 180  $\mu$ L de caldo MH. En todos los siguientes pocillos (3-8) se agregan 100  $\mu$ L de caldo MH. En el tercer pocillo se agregan 100  $\mu$ L del pocillo 2 y cada siguiente pocillo contiene 100  $\mu$ L de la dilución del pocillo anterior. Se inoculan todos los pocillos (2-8) con 20  $\mu$ L de suspensión bacteriana de concentración igual a  $10^8$  UFC/mL (escala 0.5 Mc.Farland). Una solución de DMSO (1 %, v/v) en caldo Muller Hinton fue ensayada como control de esterilidad y una solución de DMSO (1 %, v/v) en caldo Muller Hinton inoculada con 20  $\mu$ L de suspensión bacteriana ( $10^8$  UFC/mL) fue ensayada como control negativo. Todas las muestras fueron ensayadas por triplicado. Las microplacas fueron incubadas a 37° C durante 24 hs. Luego fueron agregados 40  $\mu$ L de una solución 0.2 mg/mL de violeta de p-iodonitrotetrazolium (p-INT) (Sigma-Aldrich) en cada pocillo y se incubó durante 30 minutos. La CIM fue determinada como la mínima concentración en la que no aparece color rojo por detección visual.

## **2.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.3.1.- Información bibliográfica.**

La información etnobotánica de las especies relevadas en este estudio se presenta en la tabla 2.1. Fueron identificadas 97 especies, 53 de las cuales (54 %) tenían reportado uso etnobotánico. De éstas, 43 (44 %) son utilizadas con fines medicinales mientras que las otras 10 (10 %) tienen uso principalmente como alimenticias o melíferas (Fig. 2.6).



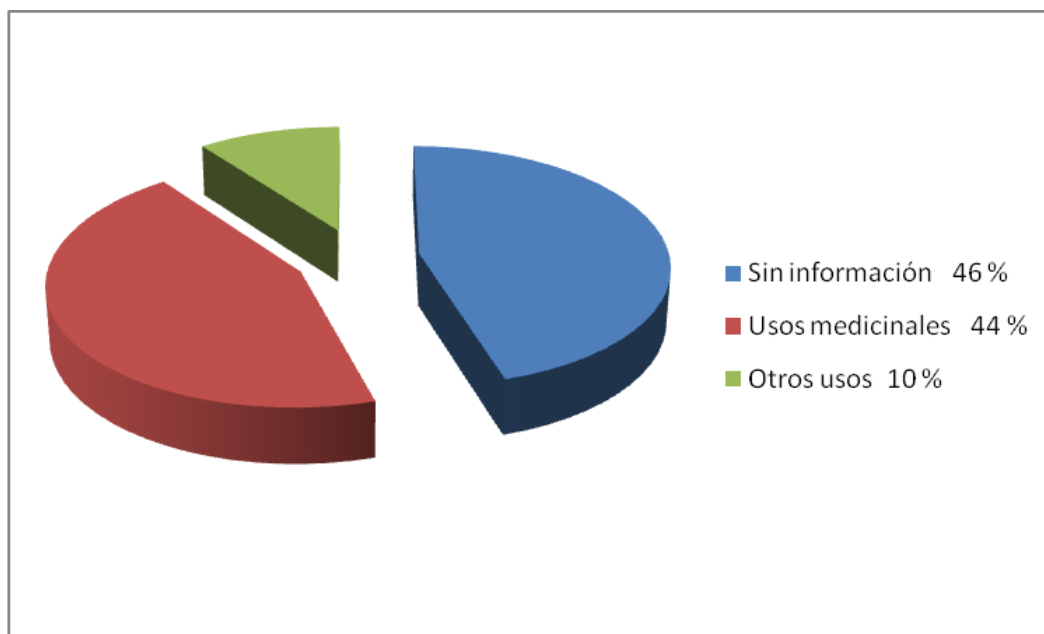


Figura 2.6. Información etnobotánica reportada de las especies identificadas.

Tabla 2.1. Datos etnobotánicos de las especies identificadas en el relevamiento.

| <b>Especie</b>                                 | <b>Nombre vulgar</b>            | <b>Familia</b>       | <b>Uso popular</b>   |
|--|---------------------------------|----------------------|--|
| <i>Acacia bonariensis</i> Gillies.             | Espinillo, Uña de gato, Ñapinda | <i>Fabaceae</i>      | Infusión de hojas como astringente y para el tratamiento de quemaduras. Infusión de corteza como cicatrizante.   |
| <i>Acalypha gracilis</i> Spreng.               | Flor de espiga chica            | <i>Euphorbiaceae</i> | Sin datos.   |
| <i>Acalypha multicaulis</i> Müll. Arg.         |                                 | <i>Euphorbiaceae</i> | Infusión de corteza como astringente.  |
| <i>Acanthosyris spinescens</i> Griseb.         |                                 | <i>Santalaceae</i>   | Sin datos.   |
| <i>Adiantum raddianum</i> C.Presl              |                                 | <i>Pteridaceae</i>   | Sin datos.   |
| <i>Allophylus edulis</i> (A.St.Hil. ) Niederl. | Chal-Chal, picazú, rembiu       | <i>Sapindaceae</i>   | Decocción de raíz o corteza como febrífugo y diaforético. Infusión de hojas como amargo y astringente. Fermentado de frutos como laxante y depurativo. |
| <i>Anemia phyllitidis</i> (L.) Sw.             |                                 | <i>Schizaeaceae</i>  | Sin datos.   |

| <b>Especie</b>                                    | <b>Nombre vulgar</b>    | <b>Familia</b>        | <b>Uso popular</b>   |
|---|-------------------------|-----------------------|--|
| <i>Arrabidaea selloi</i> (Spreng.) Sandwith       | Cipó-camarao            | <i>Bignoniaceae</i>   | Ornamental. Decocciones de hojas como antiinflamatorio y antiséptico.  |
| <i>Asplenium ulbrichtii</i> Rosenst.              |                         | <i>Aspleniaceae</i>   | Sin datos.   |
| <i>Blainvillea biaristata</i> DC.                 | Picao                   | <i>Asteraceae</i>     | Sin datos.   |
| <i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O.Berg  | Arrayán                 | <i>Myrtaceae</i>      | Cocimiento de hojas como antiséptico y balsámico de vías respiratorias altas. Como cicatrizante y antiséptico cutáneo. También astringente y antidiarreico. Maceración alcohólica de frutos como tónico.   |
| <i>Casearia sylvestris</i> Sw.                    | Guazatunga, Guazatonga. | <i>Flacourtiaceae</i> | El extracto alcohólico de hojas se usa contra la picadura de insectos y como antídoto para la mordida de víboras. Infusión o cataplasma con las hojas machacadas también contra el veneno de las víboras. Internamente antidiarreico, depurativo y antirreumático. Externamente como cicatrizante. |
| <i>Calyptocarpus biaristatus</i> (DC.) H. Rob.    |                         | <i>Asteraceae</i>     | Sin datos.   |
| <i>Camptosema rubicundum</i> Hook. & Arn.         |                         | <i>Fabaceae</i>       | Sin datos.   |
| <i>Celtis</i> sp.L.                               |                         | <i>Ulmaceae</i>       | Sin datos.   |
| <i>Cephalanthus glabratus</i> (Spreng.) K. Schum. | Sarandí Colorado        | <i>Rubiaceae</i>      | Cocimiento de corteza como antiséptico y anti-inflamatorio para heridas y contusiones. La infusión de ramas como diurético y depurativo.   |

| <b>Especie</b>  | <b>Nombre vulgar</b> | <b>Familia</b>       | <b>Uso popular</b>   |
|---|----------------------|----------------------|--|
| <i>Clytostoma callistegioides</i> (Chaim.) Baill.     |                      | <i>Bignoniaceae</i>  | Sin datos.   |
| <i>Conyza notobellidiastrum</i> Griseb.               |                      | <i>Asteraceae</i>    | Sin datos.   |
| <i>Heliotropium elongatum</i> (Lehm.) Gurke           | Borraja de campo     | <i>Boraginaceae</i>  | Infusión de hojas de otras plantas del género como sudorífico, diurético y antigotoso.   |
| <i>Heliotropium procumbens</i> Mill.                  | Borraja de campo     | <i>Boraginaceae</i>  | Infusión de hojas de otras plantas del género como sudorífico, diurético y antigotoso.   |
| <i>Chiropetalum tricoccum</i> (Vell.) Chodat & Hassl. | Ventosa              | <i>Euphorbiaceae</i> | Infusión como carminativo.   |
| <i>Combretum fruticosum</i> (Loefl.) Stuntz           | Flor de cepillos     | <i>Combretaceae</i>  | Ornamental   |
| <i>Croton tenuissimus</i> Baill.                      |                      | <i>Euphorbiaceae</i> | El látex de otras plantas del género se emplea como cicatrizante, para aliviar picaduras de insectos y en casos de aftas y llagas bucales. |
| <i>Cuphea fruticosa</i> Spreng.                       | Siete sangrías       | <i>Lythraceae</i>    | Infusión de hojas como diurético, purgante e hipotensor.   |
| <i>Dolichandra cynanchoides</i> Cham.                 | Uña de gato          | <i>Bignoniaceae</i>  | Antiemético, antidiarreico   |
| <i>Doryopteris concolor</i> (Langsd. & Fisch.) Kuhn   |                      | <i>Pteridaceae</i>   | Sin datos.   |
| <i>Erythrina crista-galli</i> L.                      | Ceibo                | <i>Fabaceae</i>      | Decocción de corteza como cicatrizante, infusión de hojas como astringente, brotes y flores como narcótico y calmante.                     |
| <i>Eugenia mansonii</i> O.Berg                        |                      | <i>Myrtaceae</i>     | Idem <i>Eugenia uniflora</i> .   |

| <b>Especie</b>   | <b>Nombre vulgar</b>  | <b>Familia</b>      | <b>Uso popular</b>   |
|--|-----------------------|---------------------|--|
| <i>Eugenia repanda</i><br>O.Berg                                       |                       | <i>Myrtaceae</i>    | Idem <i>Eugenia uniflora</i> .   |
| <i>Eugenia uniflora</i><br>O.Berg                                      | Pitanga,<br>Ñangapiré | <i>Myrtaceae</i>    | Cocimiento de frutos como tónico.<br><br>Infusión de hojas como febrífugo. Infusión de las hojas al 1% se emplea como estomacal y antidiarreica. El licor producido por la maceración de frutos maduros en caña con azúcar es estomacal. |
| <i>Eugenia uruguayensis</i><br>O.Berg                                  | Guayabo blanco        | <i>Myrtaceae</i>    | Cocimiento de frutos como tónico.<br><br>Infusión de hojas como febrífugo. Infusión de las hojas al 1% se emplea como estomacal y antidiarreica. El licor producido por la maceración de frutos maduros en caña con azúcar es estomacal. |
| <i>Galianthe brasiliensis</i><br>(Spreng.)<br>ELCabral &<br>Bacigalupo | Poaia-do-campo        | <i>Rubiaceae</i>    | Emético  |
| <i>Guettarda uruguayensis</i> Cham.<br>& Schtdl.                       | Jazmín del Uruguay    | <i>Rubiaceae</i>    | Madera, ornamental   |
| <i>Gleditsia amorphoides</i><br>Taub.                                  | Espina corona         | <i>Leguminoseae</i> | Detergente vegetal. Madera dura, útil en carpintería aunque se apolilla al aire libre.   |
| <i>Gouania ulmifolia</i><br>Hook. & Arn.                               |                       | <i>Rhamnaceae</i>   | Sin datos.   |
| <i>Heliotropium elongatum</i><br>(Lehm.) Gurke                         | Borraja de campo      | <i>Boraginaceae</i> | Infusión de hojas de otras plantas del género como sudorífico, diurético y antigotoso.   |

| <b>Especie</b>  | <b>Nombre vulgar</b>              | <b>Familia</b>                      | <b>Uso popular</b>  |
|---|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| <i>Heliotropium procumbens</i> Mill.                    | Borraja de campo                  | <i>Boraginaceae</i>                 | Infusión de hojas de otras plantas del género como sudorífico, diurético y antigotoso.  |
| <i>Hexachlamys edulis</i> (O. Berg) Kausel & D.Legrand  | Ubajay                            | <i>Myrtaceae</i>                    | Dulces de frutos  |
| <i>Ingá uruguensis</i> Hook. & Arn.                     | Ingá                              | <i>Fabaceae</i>                     | Cocimiento de corteza como colorante. También como hemostático. La resina del fruto se aplica como anti odontálgica.  |
| <i>Lippia alba</i> (Mill.) NeBr. ex Britton & P. Wilson | Hierba buena, salvia              | <i>Verbenaceae</i>                  | Infusión de hojas como antiespasmódico, expectorante, antiséptico y febrífugo.  |
| <i>Lonchocarpus nitidus</i> (Vogel) Benth               | Lapachillo o Yerba de bugre.      | <i>Fabaceae</i>                     | Uso ornamental.   |
| <i>Luehea divaricata</i> Mart.                          | Francisco Alvarez, Azota caballo. | <i>Malvaceae</i> o <i>Tiliaceae</i> | Infusión de flores como sedante y la decocción de la corteza como antidiarreico y estomacal.  |
| <i>Macfadyena dentata</i> K. Schum.                     | Uña de gato                       | <i>Bignoniaceae</i>                 | Melífera.   |
| <i>Manettia cordifolia</i> Mart.                        | Guiraquiyo                        | <i>Rubiaceae</i>                    | Antidiarreica. Las raíces como emético  |
| <i>Manihot grahamii</i> Hook.                           |                                   | <i>Euphorbiaceae</i>                | Sin datos.  |
| <i>Maytenus illicifolia</i> Reissek ex Mart.            | Congorosa                         | <i>Celastraceae</i>                 | Infusión o decocción de hojas y tallos, como eupéptico, antiespasmódico, antiasmático, anticonceptivo; antiséptico y vulnerario de uso tópico. La planta se considera remedio indígena para tratamiento de tumores. |

| <b>Especie</b>  | <b>Nombre vulgar</b> | <b>Familia</b>        | <b>Uso popular</b>   |
|---|----------------------|-----------------------|--|
| <i>Melanthera latifolia</i> (Gardner) Cabrera                 | Agostiño             | <i>Asteraceae</i>     | Sin datos.   |
| <i>Microtea scabrida</i> Urb.                                 |                      | <i>Phytolaccaceae</i> | Sin datos.   |
| <i>Mimosa uraguensis</i> Hook. & Arn.                         | Mimosa               | <i>Fabaceae</i>       | Sin datos.   |
| <i>Mitracarpus megapotamicus</i> (Spreng.) Kuntze             | Peladilla            | <i>Rubiaceae</i>      | Antimálarico.  |
| <i>Morus sp.</i> L.   | Morera               | <i>Moraceae</i>       | Infusión de raíz como purgante, cocimiento de frutos en gargarismos. Infusión de hojas como antidiarreico. |
| <i>Myrceugenia glaucescens</i> (Cambess.) D. Legrand & Kausel | Murta                | <i>Myrtaceae</i>      | Sin datos.   |
| <i>Myrcia selloi</i> (Spreng.) N. Silveira                    | Cambuy               | <i>Myrtaceae</i>      | Sin datos.   |
| <i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O. Berg            | Guayabo colorado     | <i>Myrtaceae</i>      | Madera.  |
| <i>Myrcianthes pungens</i> (O.Berg) D.Legrand                 |                      | <i>Myrtaceae</i>      | Sin datos.   |
| <i>Myrrhinium atropurpureum</i> Schott                        |                      | <i>Myrtaceae</i>      | Sin datos.   |
| <i>Myrsine laetevirens</i> (Mez) Arechav.                     | Canelón              | <i>Myrcinaceae</i>    | Sin datos.   |
| <i>Myrsine venosa</i> DC.                                     | Canelon              | <i>Myrcinaceae</i>    | Sin datos.   |
| <i>Nectandra angustifolia</i> (Schrad.) Nees & Mart.          | Laurel mini          | <i>Lauraceae</i>      | Tratamiento de reumatismo, artritis y dolor.   |

| <b>Especie</b>                                       | <b>Nombre vulgar</b> | <b>Familia</b>        | <b>Uso popular</b>  |
|--|----------------------|-----------------------|---|
| <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez          |                      | <i>Lauraceae</i>      | Sin datos.  |
| <i>Ocimum selloi</i> Benth.                          | Albahaca de campo    | <i>Lamiaceae</i>      | Infusión como carminativo.<br>Emplasto como antiséptico   |
| <i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez                  |                      | <i>Lauraceae</i>      | Sin datos.  |
| <i>Panicum sp.L.</i>                                 |                      | <i>Poaceae</i>        | Sin datos.  |
| <i>Paspalum inaequivalve</i> Raddi                   |                      | <i>Poaceae</i>        |   |
| <i>Paulinia elegans</i> Cambess                      | Cipó-timbó           | <i>Sapindaceae</i>    | Infusión como antiinflamatorio.   |
| <i>Pavonia sepium</i> A. St.-Hil.                    |                      | <i>Malvaceae</i>      | Sin datos   |
| <i>Petunia sp.</i> Juss                              |                      | <i>Solanaceae</i>     | Sin datos.  |
| <i>Phyllanthus sellowianus</i> (Klotzsch) Müll. Arg. | Sarandí Blanco       | <i>Phyllanthaceae</i> | Se emplea la infusión o decocción de partes de la planta como hipoglicemiante, purgante, diurético, antiasmático. Uso externo como antiséptico. |
| <i>Poikilacanthus glandulosus</i> (Nees) Ariza       |                      | <i>Acanthaceae</i>    | Sin datos.  |
| <i>Polygonum punctatum</i> Elliot                    | Yerba del bicho      | <i>Polygonaceae</i>   | Antiséptico, antiartrítico  |
| <i>Poecilanthus parviflora</i> Benth.                | Lapachillo           | <i>Fabaceae</i>       | Sin datos   |
| <i>Pouteria gardneriana</i> (A.DC.) Radlk.           | Aguay                | <i>Sapotaceae</i>     | Sin datos   |
| <i>Pouteria salicifolia</i> (Spreng.) Radlk.         | Mataojo              | <i>Sapotaceae</i>     | Extracto de hojas como vulnerario. Madera.  |
| <i>Prunus subcoriacea</i> (Chodat & Hassl.) Koehne   |                      | <i>Rosaceae</i>       | Sin datos.  |

| <b>Especie</b>   | <b>Nombre vulgar</b>               | <b>Familia</b>       | <b>Uso popular</b>  |
|--|------------------------------------|----------------------|---|
| <i>Psychotria carthagenensis</i> Jacq.                     | Naranjillo, chachal de la gallina. | <i>Rubiaceae</i>     | Usada en la ayahuasca.  |
| <i>Ruprechtia laxiflora</i> Meins.                         | Viraró cresco                      | <i>Polygonaceae</i>  | Carpintería   |
| <i>Ruprechtia salicifolia</i> (Cham. & Schtdl.) C.A. Mey.  | Viraró                             | <i>Polygonaceae</i>  | Madera  |
| <i>Salix humboldtiana</i> Willd.                           | Sauce colorado, sauce criollo      | <i>Salicaceae</i>    | La decocción de la corteza se aplica en fiebres intermitentes, siendo febrífuga y analgésica, también tiene propiedades sedantes, tónicas, astringentes y antiespasmódicas. Las hojas hervidas, mezcladas con shampoo, dan brillo al cabello. |
| <i>Sapium haematospermum</i> Müll. Arg.                    | Curupí                             | <i>Euphorbiaceae</i> | El látex se utiliza para curar el dolor de muelas, la decocción de las hojas es febrífuga, y la corteza es cicatrizante, en aplicaciones externas.  |
| <i>Scutia buxifolia</i> Reissek                            | Coronilla                          | Rhamnaceae           | Medicinal: depurativo de la sangre en caso de acné, calmante al comienzo de las menstruaciones.   |
| <i>Shinus longifolia</i> (Lindl.) Speg.                    |                                    | <i>Ancardiaceae</i>  | Sin datos.  |
| <i>Sebastiania brasiliensis</i> Spreng.                    |                                    | <i>Euphorbiaceae</i> | Sin datos.  |
| <i>Sebastiania commersoniana</i> (Baill.) L.B. Sm. & Downs | Blanquillo.                        | <i>Euphorbiaceae</i> | Látex para el tratamiento de verrugas y de caries.  |
| <i>Sebastiania schottiana</i> Müll. Arg.                   |                                    | <i>Euphorbiaceae</i> | Sin datos.  |



| <b>Especie</b>                                     | <b>Nombre vulgar</b> | <b>Familia</b>      | <b>Uso popular</b>  |
|--|----------------------|---------------------|---|
| <i>Senna corymbosa</i> (Lam.) H.S. Irwin & Barneby |                      | <i>Fabaceae</i>     | Sin datos.  |
| <i>Serjania herteri</i> Ferrucci                   |                      | <i>Sapindaceae</i>  | Sin datos.  |
| <i>Serjania meridionalis</i> Cambess.              |                      | <i>Sapindaceae</i>  | Sin datos.  |
| <i>Smilax campestris</i> Griseb.                   | Zarzaparrilla blanca | <i>Smilacaceae</i>  | Alcoholaturas de parte aérea como digestivo, amargo y tónico. Infusiones de hojas como diuréticos y diaforéticos. También para el tratamiento de afecciones cutáneas. |
| <i>Solanum boerhaviifolium</i> Sendtn.             |                      | <i>Solanaceae</i>   | Sin datos   |
| <i>Terminalia australis</i> Cambess.               | Palo amarillo        | <i>Combretaceae</i> | Madera. Cocimiento de hojas como astringente.   |
| <i>Teucrium vesicarium</i> Mill.                   |                      | <i>Lamiaceae</i>    | Sin datos.  |
| <i>Trixis praestans</i> (Vell.) Cabrera            |                      | <i>Asteraceae</i>   | Sin datos.  |
| <i>Urbillea uniloba</i> Radlk.                     | Cipó                 | <i>Sapindaceae</i>  | Las ramas en infusión como calmantes en gastralgias y en afecciones hepáticas y del bazo.   |
| <i>Vernolia scorpioides</i> (Lam.) Pers.           |                      | <i>Asteraceae</i>   | Sin datos.  |
| <i>Xanthium cavanillesii</i> Schouw                | Abrojo grande        | <i>Asteraceae</i>   | Antiséptico de piel.  |
| <i>Xanthium spinosum</i> L.                        | Cepa de caballo      | <i>Asteraceae</i>   | Antiulcerativo. Descongestivo y diurético.  |
| <i>Xylosma</i> sp. G. Forst.                       |                      | <i>Salicaceae</i>   | Sin datos.  |

#### **Bibliografía consultada**

Alonso, J. & Desmarchelier, C. (2005) Plantas autóctonas medicinales de la Argentina, Ed.

LOLA.

Alonso Paz, E. et al. (1992) Yuyos Uso racional de las plantas medicinales, Ed. Fin de Siglo, Montevideo.

Arrillaga de Maffei, B. (1969) Plantas medicinales. Montevideo: Nuestra Tierra, 60 p.

Arrillaga de Maffei, B. (1997) Plantas usadas en medicina natural. Montevideo: Hemisferio Sur, 152 p.

Cabrera, A. L. & Zardini, E.M. (1978) Manual de la Flora de los Alrededores de Buenos Aires, 2a ed. Acme, Buenos Aires, 755 p.

Chifa, C. & Ricciardi, A. (2001) Plantas de uso en Medicina Vernácula del centro del Chaco Argentino, Fundación Miguel Lillo, Tucumán.

Copetti, V. (1918) Tratado teórico-práctico de Farmacognosia, con una relación circunstanciada sobre las plantas medicinales comunes del Uruguay, Monteverde, Montevideo.

De Lucca, D.M. & Zalles, A.J. (1992) Flora medicinal Boliviana, Ed. Los amigos del libro, Bolivia.

Flora de la región de Salto Grande [http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/entre\\_rios/un-gran-salto/paginas/todoslosframes.htm](http://www.oni.escuelas.edu.ar/2002/entre_rios/un-gran-salto/paginas/todoslosframes.htm)

Goyeneche, B. (1906) Diccionario de medicina rural ó sea, propiedades medicinales de las plantas del país, Ed. Vázquez - Gómez, Paysandú , 86 p.

Gupta, M. (1995) 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas, CYTED, Subprograma X, Colombia.

Jozami, J. M. & Muñoz, J. (1983) Árboles y Arbustos Indígenas de Entre Ríos, 3a. ed. IPNAYS CONICET, Santa Fe.

Lombardo, A., González, M, Coppetti, V. (1928) *Plantae Diaphoricae: Florae Uruguayensis* (Tomo I), Montevideo.

Lombardo, A., Copetti, V., González, M., Vallarino A. (1937) *Plantas de la Medicina Popular del Uruguay*, Tall. Graf. Cerrito, Montevideo.

Lahitte, H. B., Hurrell, M. J. B., Jankowski, L., Haloua, P., Mehlreter, K. (1998) *Plantas Medicinales Rioplatenses*, Ed. L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires, Argentina, 240 p.

Ratera, L. & Ratera M. (1980) *Plantas de la flora Argentina empleadas en la medicina popular*, Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires.

Toursarkissian, M. (1980) *Plantas medicinales de la Argentina : Sus nombres botánicos*,

vulgares, usos y distribución geográfica, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 178 p.

### 2.3.2.- Colecta y preparación de extractos.

Del total de especies identificadas (97) en nuestros ecosistemas se seleccionaron 59 para trabajar, representando a 25 familias botánicas. De esta manera se abarcó una amplia biodiversidad dentro de las especies presentes en los bosques de galería. A partir de estas especies se prepararon 154 extractos.

### 2.3.3.- Actividad antibacteriana.

#### Screening antibacteriano.

Los resultados de actividad antibacteriana se presentan en la Tabla 2.2. El 67 % de los extractos fueron activos frente a por lo menos una de las cepas bacterianas testeadas. Este resultado es coherente con el método de colecta utilizado basado en la información etnobotánica tradicional (Cox, 1990) y quimiosistemática.

Numerosos extractos fueron activos frente a todas las cepas del panel representativo utilizado y es particularmente interesante que 54 extractos (35%) fueran positivos contra *S. aureus*.

Tabla 2.2. Resultados del screening antibacteriano.

| Especies                  | Parte usada | Ext. | <i>S. aureus</i> | <i>L. innocua</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>Ps. aeruginosa</i> |
|---------------------------|-------------|------|------------------|-------------------|--------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Acacia bonariensis</i> | H           | 1    | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
|                           |             | 2    | -                | -                 | +                  | -              | -                     |
|                           |             | 3    | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
| <i>Acalypha gracilis</i>  | H           | 2    | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
| <i>Allophylus edulis</i>  | H           | 1    | -                | +                 | -                  | -              | -                     |
|                           |             | 2    | -                | -                 | +                  | -              | -                     |
|                           |             | 3    | +                | -                 | -                  | -              | -                     |
|                           | C           | 1    | -                | +                 | +                  | -              | -                     |
|                           |             | 2    | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
|                           |             | 3    | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
| <i>Arrabidaea selloi</i>  | H           | 1    | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
|                           |             | 2    | -                | -                 | -                  | +              | +                     |
|                           |             | 3    | -                | -                 | -                  | +              | -                     |

| Especies                                   | Parte usada | Ext.        | S. aureus   | L. inocua   | B. subtilis | E. coli     | Ps. aeruginosa |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|
| <i>Blainvillea biaristata</i>              | PA          | 2           | -           | -           | -           | -           | +              |
| <i>Chiropetalum tricoccum</i>              | H           | 2           | -           | -           | -           | -           | -              |
| <i>Combretum fruticosum</i>                | H           | 1<br>2<br>3 | +<br>+<br>- | -<br>-<br>- |             | +<br>+      | +<br>+<br>-    |
| <i>Croton tenuissimus</i><br><i>fem</i>    | H           | 1<br>2<br>3 | -<br>-<br>- | -<br>-<br>- |             | -<br>-<br>- | -<br>-<br>-    |
| <i>mas</i>                                 |             | 1<br>2<br>3 | -<br>+<br>- | -<br>+<br>+ |             | -<br>-<br>- | -<br>-<br>-    |
| <i>Cuphea fruticosa</i>                    | PA          | 2           | -           | -           | -           | -           | -              |
| <i>Dolichandra cynanchoides</i>            | H           | 1<br>2<br>3 | +<br>-<br>- | +<br>-<br>- | -<br>-<br>- | -<br>-<br>- | -<br>-<br>-    |
| <i>Doryopteris concolor</i>                | H           | 2           | -           | -           | -           | -           | +              |
| <i>Eritrina cristagalli</i>                | C           | 1<br>2<br>3 | -<br>-<br>+ | +<br>-<br>- | -<br>+<br>+ | -<br>-<br>- | +<br>+<br>+    |
| <i>Eugenia masoni</i>                      | H           | 1<br>2<br>3 | +<br>+<br>+ | +<br>+<br>+ |             | -<br>-<br>- | -<br>-<br>-    |
| <i>Eugenia repanda</i>                     | H           | 1<br>2<br>3 | -<br>-<br>- | +<br>+<br>- |             | -<br>-<br>- | -<br>-<br>-    |
| <i>Eugenia uniflora</i>                    | H           | 1<br>2<br>3 | +<br>+<br>- | -<br>-<br>- |             | +<br>-<br>- | -<br>-<br>-    |
| <i>Eugenia uruguayensis</i>                | H           | 1<br>2<br>3 | -<br>+<br>+ | -<br>-<br>- | -<br>+<br>+ | -<br>-<br>- | -<br>+<br>+    |
| <i>Galianthe brasiliensis</i>              | H           | 2           | -           | -           |             | -           | -              |
| <i>Guettarda uruguayensis</i>              | H           | 1<br>2<br>3 |             | +<br>-<br>- |             | +<br>-<br>- | -<br>-<br>-    |
| <i>Gleditsia amorphoides</i><br><i>fem</i> | H           | 1<br>2<br>3 | -<br>-<br>- | +<br>-<br>- | -<br>-<br>- | -<br>-<br>- | -<br>+<br>-    |
| <i>masc</i>                                |             | 1<br>2<br>3 | -<br>-<br>- | +<br>-<br>- | -<br>-<br>+ | -<br>-<br>+ | -<br>-<br>-    |

| Especies                         | Parte usada | Ext. | S. aureus | L. innocua | B. subtilis | E. coli | Ps. aeruginosa |
|----------------------------------|-------------|------|-----------|------------|-------------|---------|----------------|
| <i>Gouania ulmifolia</i>         | PA          | 1    | +         | -          | +           | -       | -              |
|                                  |             | 2    | -         | -          | -           | -       | -              |
|                                  |             | 3    | +         | -          | -           | -       | -              |
| <i>Heliotropium elongatum</i>    | H           | 2    | -         | -          | -           | -       | -              |
| <i>Hexachlamys edulis</i>        | H           | 1    | +         | +          |             | +       | -              |
|                                  |             | 2    | +         | +          |             | +       | -              |
|                                  |             | 3    | -         | -          |             | -       | -              |
| <i>Ingá uruguensis</i>           | H           | 1    | -         | -          |             | -       | -              |
|                                  |             | 2    | -         | -          |             | -       | -              |
|                                  |             | 3    | -         | -          |             | -       | -              |
| <i>Luehea divaricata</i>         | H           | 1    | -         | +          |             | -       | -              |
|                                  |             | 2    | -         | +/-        |             | -       | -              |
|                                  |             | 3    | -         | +          |             | -       | -              |
| <i>Macfadyena dentata</i>        | H           | 1    | -         | -          | -           | -       | +              |
|                                  |             | 2    | -         | +          | +           | -       | -              |
|                                  |             | 3    | -         | -          | -           | -       | -              |
| <i>Manettia cordifolia</i>       | PA          | 2    | -         | -          | -           | -       | -              |
| <i>Maytenus illicifolia</i>      | H           | 1    | -         | +          | +           | +       | +              |
|                                  |             | 2    | +         | +          | +           | -       | -              |
|                                  |             | 3    | +         | -          | -           | -       | -              |
| <i>Mimosa uraguensis</i>         | H           | 1    | +         | -          | +           | -       | +              |
|                                  |             | 2    | +         | -          | -           | +       | +              |
|                                  |             | 3    | -         | -          | -           | -       | -              |
| <i>Mitracarpus megapotamicus</i> | PA          | 2    | -         | -          |             | -       | -              |
| <i>Myrcianthes cisplatensis</i>  | H           | 1    | +         | +          |             | +       | +              |
|                                  |             | 2    | +         | +          |             | +       | -              |
|                                  |             | 3    | +         | +          |             | -       | -              |
| <i>Myrrhinium atropurpureum</i>  | F           | 2    | -         | -          | -           | +       | -              |
|                                  | H           | 1    | +         | -          | -           | -       | -              |
|                                  |             | 2    | +         | +          | -           | -       | -              |
| 3                                | -           | -    | +         | -          | -           |         |                |
| <i>Myrrhinium atropurpureum</i>  | F           | 2    | -         | -          | -           | +       | -              |
|                                  | H           | 1    | +         | -          | -           | -       | -              |
|                                  |             | 2    | +         | +          | -           | -       | -              |
| 3                                | -           | -    | +         | -          | -           |         |                |
| <i>Myrsine laetevirens</i>       | H           | 1    | -         | +          | -           | -       | +              |
|                                  |             | 2    | -         | +          | -           | -       | -              |
|                                  |             | 3    | -         | -          | -           | -       | +              |
| <i>Myrsine venosa</i>            | H           | 1    | +         | +          | -           | -       | -              |
|                                  |             | 2    | -         | -          | -           | -       | -              |
|                                  |             | 3    | -         | +          | -           | -       | -              |
| <i>Nectandra angustifolia</i>    | H           | 1    | -         | +          |             | -       | -              |
|                                  |             | 2    | -         | +          |             | -       | -              |
|                                  |             | 3    | -         | +          |             | -       | -              |

| <b>Especies</b>                   | <b>Parte usada</b> | <b>Ext.</b> | <b>S. aureus</b> | <b>L. innocua</b> | <b>B. subtilis</b> | <b>E. coli</b> | <b>Ps. aeruginosa</b> |
|-----------------------------------|--------------------|-------------|------------------|-------------------|--------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Nectandra megapotamica</i>     | F                  | 2           | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
|                                   | H                  | 1           | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | -                | -                 | +                  | +              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 | +                  | -              | -                     |
| <i>Ocimum selloi</i>              | PA                 | 2           | -                | +                 | +                  | -              | +                     |
| <i>Ocotea acutifolia</i>          | H                  | 1           | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | +                | -                 | +                  | -              | +                     |
|                                   |                    | 3           | +                | -                 | +                  | -              | -                     |
| <i>Paulinia elegans</i>           | H                  | 1           | -                | +                 |                    | +              | +                     |
|                                   |                    | 2           | -                | +                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | +                 |                    | -              | -                     |
|                                   | F                  | 1           | -                | -                 |                    | +              | -                     |
| <i>Pavonia sepium</i>             | PA                 | 2           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Petunia sp</i>                 | PA                 | 1           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Phyllanthus sellowianus</i>    | H                  | 1           | +                | -                 |                    | +              | -                     |
|                                   |                    | 2           | +                | +                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Poikilacanthus glandulosus</i> | H                  | 2           | -                | -                 | -                  | -              | -                     |
| <i>Polygonum punctatum</i>        | PA                 | 1           | -                | +                 | -                  | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | +                | -                 | +                  | +              | +                     |
|                                   |                    | 3           | +                | -                 | -                  | -              | -                     |
| <i>Pouteria salicifolia</i>       | H                  | 1           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | +                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Psychotria carthagenensis</i>  | H                  | 1           | +                | +                 |                    | +              | +                     |
|                                   |                    | 2           | +                | +                 |                    | +              | +                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Ruprechtia laxiflora</i>       | H                  | 1           | -                | +                 |                    | +              | -                     |
|                                   |                    | 2           | +/-              | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Ruprechtia salicifolia</i>     | H                  | 1           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Scutia buxifolia</i>           | H                  | 1           | +                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | +                | -                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |
| <i>Sebastiania commersoniana</i>  | H                  | 2           | +                | +                 |                    | -              | -                     |
| <i>Smilax campestris</i>          | H                  | 2           | -                | +                 | +                  | -              | +                     |
| <i>Solanum boerhaviifolium</i>    | H                  | 2           | -                | -                 | +                  | -              | -                     |
| <i>Terminalia australis</i>       | H                  | 1           | +                | +                 |                    | -              | -                     |
|                                   |                    | 2           | +                | +                 |                    | +              | -                     |
|                                   |                    | 3           | -                | -                 |                    | -              | -                     |

| Especies                     | Parte usada | Ext. | <i>S. aureus</i> | <i>L. inocua</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>Ps. aeruginosa</i> |
|------------------------------|-------------|------|------------------|------------------|--------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Teucrium vesicarium</i>   | H           | 2    | +                | -                |                    | -              | -                     |
| <i>Trixis praestans</i>      | H           | 2    | +                | -                | -                  | -              | -                     |
| <i>Urbillea uniloba</i>      | PA          | 1    | -                | +                | -                  | +              | -                     |
|                              |             | 2    | -                | -                | -                  | -              | -                     |
|                              |             | 3    | -                | -                | -                  | -              | +                     |
| <i>Vernolia scorpioides</i>  | H           | 2    | +                | -                | +                  | -              | -                     |
| <i>Xanthium cavanillesii</i> | H           | 1    | +                | +                | -                  | +              | -                     |
|                              |             | 2    | +                | +                | +                  | -              | -                     |
|                              |             | 3    | +                | +                | +                  | +              | +                     |
| <i>Xanthium spinosum</i>     | H           | 1    | +                | +                | -                  | -              | -                     |
|                              |             | 2    | +                | +                | -                  | -              | -                     |
|                              |             | 3    | +                | +                | +                  | +              | -                     |

Ext.: 1-EtOH-H<sub>2</sub>O 70:30, 2-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, 3-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (solventes de extracción)

Parte usada: C corteza, F fruto, H hoja, PA parte aérea

#### Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).

Los resultados de las CIM's se presentan en la Tabla 2.3. Como se puede ver, 20 de los 38 (53%) extractos muestra CIM's por debajo de 500 µg/mL. Este es un resultado esperado debido a que las muestras pasaron previamente un proceso de screening.

En particular los extractos de *Eugenia masoni*, *Eugenia uruguayensis*, *Myrciantes cisplatensis* y *Myrrhinium atropurpureum*, todos pertenecientes a la familia *Myrtaceae*, muestran CIM's tan bajas como 7.8 µg/mL con varias de las cepas resistentes.

Las cepas elegidas de MRSA no son sólo resistentes a la meticilina, también son resistentes a la oxacilina (ATCC 43300), a la vancomicina (ATCC 700699) y multirresistentes: espectinomycina, clindamicina, eritromicina, resistencia intermedia vancomicina (USA 100) (Thornsberry et al., 1983; Aires de Sousa et al., 2002; Hiramatsu et al., 2002).

Los métodos bioautograficos son sensibles y permiten descartar muestras que no presentan actividad antibacteriana. Sin embargo pueden dar positivos no

interesantes en cuanto a que la muestra tenga una CIM alta. Las actividades interesantes se consideran menores a 100 µg/mL para extractos y menores a 10 µg/mL para compuestos puros (Ríos & Recio, 2005).

Tabla 2.3. Resultados de la Actividad Anti-Staphylococcus.

| Especies                        | Parte usada | Ext. | Cepas / CIM (µg/mL) |             |            |         |
|---------------------------------|-------------|------|---------------------|-------------|------------|---------|
|                                 |             |      | ATCC 6538p          | ATCC 700699 | ATCC 43300 | USA 100 |
| <i>Allophylus edulis</i>        | H           | 3    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Combretum fruticosum</i>     | H           | 2    | 500                 | 500         | 500        | 500     |
| <i>Croton tenuissimus</i>       | H           | 2    | >500                | 500         | 500        | 250     |
| <i>Dolichandra cynanchoides</i> | H           | 1    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Eugenia masoni</i>           | H           | 1    | 250                 | 250         | 250        | >500    |
|                                 |             | 2    | 7.8                 | 7.8         | 7.8        | 7.8     |
|                                 |             | 3    | 7.8                 | 7.8         | 7.8        | 7.8     |
| <i>Eugenia uruguayensis</i>     | H           | 2    | 31.3                | 31.3        | 31.3       | 31.3    |
|                                 |             | 3    | 31.3                | 31.3        | 31.3       | 15.6    |
| <i>Gleditsia amorphoides m</i>  | H           | 1    | >500                | >500        | >500       | 500     |
| <i>Gouania ulmifolia</i>        | H           | 2    | >500                | >500        | >500       | >500    |
|                                 |             | 3    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Guettarda uruguensis</i>     | H           | 2    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Hexachlamys edulis</i>       | H           | 2    | 500                 | 500         | 500        | >500    |
| <i>Maytenus illicifolia</i>     | H           | 2    | >500                | >500        | >500       | 250     |
| <i>Mimosa uraguensis</i>        | H           | 1    | >500                | >500        | >500       | 125     |
|                                 |             | 2    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Myrcianthes cisplatensis</i> | H           | 1    | 62.5                | 31.3        | 31.3       | >500    |
|                                 |             | 2    | 7.8                 | 7.8         | 15.6       | 6.25    |
|                                 |             | 3    | 125                 | 250         | 62.5       | 2.5     |
|                                 | F           | 1    | 250                 | 250         | 250        | 62.5    |
|                                 |             | 2    | 125                 | 62.5        | 125        | 31.3    |
| 3                               | 62.5        | 31.3 | 62.5                | 250         |            |         |
| <i>Myrrhinium atropurpureum</i> | H           | 1    | 125                 | 125         | 250        | 15.6    |
|                                 |             | 2    | 125                 | 125         | 250        | 62.5    |
| <i>Myrsine venosa</i>           | H           | 1    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Ocotea acutifolia</i>        | H           | 2    | >500                | >500        | >500       | >500    |
|                                 |             | 3    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Phyllanthus sellowians</i>   | H           | 2    | >500                | 250         | 250        | >500    |



| Especies                         | Parte usada | Ext. | Cepas / CIM (µg/mL) |             |            |         |
|----------------------------------|-------------|------|---------------------|-------------|------------|---------|
|                                  |             |      | ATCC 6538p          | ATCC 700699 | ATCC 43300 | USA 100 |
| <i>Polygonum punctatum</i>       | PA          | 3    | >500                | 500         | 500        | >500    |
| <i>Pouteria salicifolia</i>      | H           | 2    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Psychotria carthagenensis</i> | H           | 1    | 500                 | >500        | >500       | 250     |
| <i>Ruprechtia laxiflora</i>      | H           | 2    | >500                | >500        | 500        | >500    |
| <i>Scutia buxiflora</i>          | H           | 1    | >500                | >500        | 500        | 250     |
|                                  |             | 2    | >500                | >500        | >500       | >500    |
| <i>Terminalia australis</i>      | H           | 2    | >500                | 250         | 500        | 500     |
| <i>Urvillea uniloba</i>          | PA          | 2    | >500                | >500        | 500        | >500    |
| <i>Xanthium cavanillesii</i>     | PA          | 3    | 125                 | 250         | 250        | 250     |

Ext.: 1-EtOH-H<sub>2</sub>O 70:30, 2-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, 3-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (solventes de extracción)

Parte usada: C corteza, F fruto, H hoja, PA parte aérea

### 2.3.4.- Selección de especies para aislamiento y elucidación estructural de moléculas activas.

Se seleccionaron tres especies para aislamiento y elucidación estructural de las moléculas activas, *Psychotria carthagenensis*, *Hexachlamys edulis* y *Xanthium cavanillesii*. Tanto *Psychotria carthagenensis* como *Hexachlamys edulis* fueron elegidas porque presentaron en el screening antibacteriano actividad en casi todos sus extractos contra las cepas testeadas, siendo además encontradas en abundancia en el monte de galería. El *Xanthium cavanillesii* se usa popularmente como antiséptico en heridas de piel. Dió buena actividad antibacteriana en el screening primario y también es una planta que se encuentra en abundancia tanto en el monte como en otros sitios más accesibles para su colecta.

La especie *Myrcianthes cisplatensis*, que presenta los mejores valores de actividad fué trabajada independientemente por otros integrantes del grupo de investigación (D'Amico et al., 2011).

Luego del trabajo preliminar con las 3 especies seleccionadas se decidió concentrar los esfuerzos en *X.cavanillesii*.

## 2.4.- BIBLIOGRAFÍA

- Aires de Sousa, M., de Lencastre, H., Santos Sanches, L., Kikuchi, K., Totsuka, K., Tomasz, A. (2002) Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates widely spread in hospitals in New York City and in a hospital in Tokyo, Japan, *Microbial Drug Resistance*, 6, 253-258.
- Albuquerque, U.P. & Hanazaki, N. (2006) As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacéutico: fragilidades e perspectivas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (Supl.), 678-689.
- Artuso, A. (2002) Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. *World Development*, 30 (8), 1355-1368.
- Baker, J.T., Borris, R.P., Carte, B., Cordell, G.A., Soejarto, D.D, Gupta, M.P, Iwu, M.M., Madulid, D.R., Tyler, V.E. (1995) Natural Product discovery and development: new perspectives on International collaboration. *Journal of Natural Products*, 58, 1325-1357.
- Balik, M. J. (1990) Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the reforest. En: D.J. Chadwick & J. Marsh (Eds.), *Bioactive compounds from plants*, Chichester, John Wiley & Sons Ltd., 22 - 39.
- Balik, M. J. & Mendelsohn, R. (2000) Assessing the economic value of Traditional Medicines for tropical rainforest. *Conservation Biology*, 6, 128 - 130.
- Baltz, R.H. (2006) Marcel Faber Roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration? *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 507-513.
- Bell, E. A. (1993) Mankind and plants: the need to conserve biodiversity. *Parasitology*, 106 (Suppl.), S47-S53.

- Carvalho, L.H. & Kettli, A.U. (1991) Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 (2), 181-184.
- CLSI (2012) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Cordell, G.A., Quinn-Beattie, M.L., Farnsworth, N.R. (2001) The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, 15 (3), 183-205.
- Cox, P.A. & Balick, M.J. (1994) The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*, 270 (6), 82-87.
- Chapela, I. (1994) Bioprospección, una herramienta para el manejo sostenible de los recursos naturales? *Foro Forestal*, 3, 3-4.
- Chebataroff, J. (1942) La vegetación del Uruguay y sus relaciones fitogeográficas con las del resto de la América del Sur. *Revista Geográfica del Instituto Panamericano de Geografía e Historia*, 50-90.
- D' Amico, E., Barneche, S., Cerdeiras, M.P., Vázquez. A. (2011) Identification of Bioactive Compound from *Myrcianthes cysplatensis*. *Pharmacognosy Journal*, 3, 18-20.
- Del Puerto, O. (1987) La extensión de las comunidades arbóreas primitivas en el Uruguay. Notas Técnicas N°1. Montevideo, Facultad de Agronomía, 12 p.
- Douwes, E., Crouch, N.R., Edwards, T.J., Mulholland, D.A. (2008) Regression analyses of southern African ethnomedicinal plants: informing the targeted selection of bioprospecting and pharmacological screening subjects. *Journal of Ethnopharmacology*, 119 (3), 356-364.
- Ebadi, M.S. (2002) Pharmacodynamic basis of herbal medicine. CRC Press, New York.
- Fabricant, D.S. & Farnsworth, N.R. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109, 69-75.

- Farnsworth, N.R. (1994) Ethnopharmacology and drug development. *Ciba Found Symp*, 185, 42-51.
- Garrity, G. & Hunter-Cervera, J. (1999) Bioprospecting in the developing world. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 236-240.
- Grela, I.A. (2004) Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: Propuesta para la delimitación de dendrofloras. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Opción Botánica. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Ministerio de Educación y Cultura, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Grifo, F. (1996) Chemical Prospecting: an overview of the International Cooperative Biodiversity Group. *Biodiversity, biotechnology and Sustainable Development in Health and Agriculture*. PAHO. Washington DC, PAHO, 12-26.
- Hamilton, G.R. & Baskett, T.F. (2000) In the arms of Morpheus: the development of morphine for post operative pain relief. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 47, 367-374.
- Hiramatsu, K., Hanaki, K., Ino, T., Yabuta, T., Oguri, K., Tenover, F.C. (2002) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40, 135-136.
- Iwu, M., Duncan, A., Okunji, C. (1999) New Antimicrobials of Plant Origin Perspectives on new crops and new uses. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.
- Jones, C.G., Firn, R.D., Malcolm, S.B. (1991) On the evolution of secondary chemical diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London on Biological Sciences*, 333 (1267), 273-280.
- Kingston, D.G.I. (2000) Recent advances in the chemistry of Taxol. *Journal of Natural Products*, 63, 726-734.
- Li, J.W. & Vederas, J.C. (2009) Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, 325 (5937), 161-165.

- Lokesha, R., Hegde, S.G., Uma Shaanker, R., Ganeshaiyah, K.N. (1992) Dispersal mode as a selective force in shaping chemical composition of seeds. *The American Naturalist*, 140 (3), 520-525.
- MGAP, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2004) Actualización de la carta forestal del Uruguay con imágenes del año 2004.
- Patwardhan, B., Vaidya, A.D.B., Chorghade, M. (2004) Ayurveda and natural products drug discovery. *Current Science*, 86 (6), 789-799.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettman, K., Monod, M., Frenck, E. (1991) A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2, 199-203.
- Ríos, J.L & Recio, M.C (2005) Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 80-84
- Seidl, P. R. (1994) The use of Biodiversity for Sustainable development: Investigation of Bioactive Products and their commercial applications. En: P.R. Seidl (Ed.), Associação Brasileira de Química, Río de Janeiro.
- Sligh, D.F., Ueda, H., Arvigo, R., Balick, M.J. (1999) Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 66 (2), 159-165.
- Srirama, R., Ramesha, B.T., Ravikanth, G., Uma Shaanker, R., Ganeshaiyah. K.N. (2008) Are plants with anti-cancer activity resistant to crown gall? : A test of hypothesis. *Current Science*, 95,1407-1408.
- Suffness, M. & Douros, J. (1982) Current status of the NCI plant and animal product program. *Journal of Natural Products*, 45, 1-14.
- Service, R.F. (2004) Surviving the blockbuster syndrome. *Science*, 303 (5665), 1796-1799.
- Thornsberry, C. & Mc Dougal, L. (1983) Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) *staphylococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 18,1684-1691.

Uma Shaanker, R., Ravishankar, K.V., Ganeshiah, K.N. (1997) Why do plants possess laxatives? *Current Science*, 73 (8), 646-647.

Verpoorte, R. (1998) Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3, 232-238.

Wall, M.E. & Wani, M.C. (1996) Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, 51, 239-254.

Wink, M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-19.

### **CAPÍTULO 3**

## **SESQUITERPENLACTONAS ANTIBACTERIANAS DEL XANTHIUM CAVANILLESII**

---

## CAPÍTULO 3

### SESQUITERPENLACTONAS ANTIBACTERIANAS DEL XANTHIUM CAVANILLESII.

#### 3.1.- INTRODUCCIÓN

##### 3.1.1.- Botánica de la familia *Asteraceae*.

*La familia Asteraceae.*

*Asteraceae* es una de las familias más grandes dentro de las angiospermas y comprende alrededor de 1300 géneros y 25000 especies distribuidas en cuatro subfamilias y 17 tribus (Bremer, 1996). Básicamente, las especies de *Asteraceae* biosintetizan poliacetilenos, monoterpenos, sesquiterpenos, sesquiterpenlactonas, flavonoides, benzofuranos y benzopiranos (Seaman, 1982; Zdero & Bohlmann, 1990; Scotti et al., 2012).

*El género Xanthium.*

El género *Xanthium* nativo de América (Love & Dansereau, 1959; Ragonese & Milano, 1984) es representado por un número relativamente limitado de especies (Holm et al., 1977) de distribución cosmopolita (Favier et al., 2005; Han et al., 2007).

Las especies de *Xanthium* son plantas herbáceas anuales monoicas pertenecientes a la familia *Asteraceae*, conocidas como malezas e invasivas. Crecen en lugares desolados, en bordes de carreteras, alrededor de los campos agrícolas y estribaciones de zonas boscosas. Su nombre deriva del griego "Xanthos", el cual significa "amarillo" y alude al color del pigmento obtenido por algunas de sus especies. Semillas y plántulas de algunas especies de *Xanthium* son tóxicas y causan un grave daño al ganado que las ingiere (Masvingwe & Maveyengwa, 1998; Loretti et al., 1999). En Asia especies del género son utilizadas con fines medicinales, particularmente en la medicina tradicional China. En la literatura china, *Xanthium* tiene una larga lista de usos medicinales (Tsankova et al., 1994), a pesar de su naturaleza algo tóxica. Sin embargo en la literatura occidental, *Xanthium* aparece menos como una planta médica y es más



bien considerada como una hierba altamente tóxica para los animales de pastoreo (Seckbach, 2011).

Se han reportado diferentes bioactividades en especies de *Xanthium*, entre ellas actividad antimicrobiana (Ginesta-Peris et al., 1994; Sato et al., 1997; Cerdeiras et al., 2007; Scherer et al., 2009), actividad antioxidante y antidiarreica (Akter et al., 2009; Raushanara et al., 2009), actividad antiulcerogénica (Favier et al., 2005), actividad antitripanosoma (Talakal et al., 1995), actividad antileishmania y antifúngica (Lavault et al., 2005), actividad anticancerígena (Roussakis et al., 1994; Ancuceanu & Istudor, 2004; Ramírez-Erosa et al., 2007; Kovács et al., 2009), actividad antimalaria (Joshi et al., 1977), actividad hipoglucemiante (Hsu et al., 2000).

La química de éste género bien estudiado es muy uniforme. Se han aislado e identificado sesquiterpenos, diterpenos, thiazinediones, esteroides y ácidos cafeoilquínicos como principales metabolitos secundarios (Cumanda et al., 1991; Ma et al., 1998; Han et al., 2006; Quin et al., 2006) y en particular un tipo especial de sesquiterpenolactonas (xanthanólidos) con esqueleto guaiano o pseudoguaiano (Ahmed et al., 1990; Mangel et al., 1992; Sato et al., 1997).

#### *Xanthium cavanillesii*.

Comúnmente conocido como "Abrojo" o "Abrojo grande" (Fig. 3.1). Se encuentra ampliamente distribuido en Sudamérica, siendo muy común en Uruguay. Es una planta ramificada y robusta de 1 a 2 m de altura, con tallos erguidos y sin espinas. Las hojas son ásperas, pecioladas, triangular-ovadas, sin espinas y de 10-14 cm de longitud. Sus flores están dispuestas en capítulos, los masculinos agrupados en racimos multifloros situados en la extremidad de las ramas, los femeninos bifloros y de flores sin corola (Fig. 3.2). Los frutos son cápsulas de 1.5-3.5 cm, verdosos a amarronado-amarillentos y recubiertos de espinas protuberantes que sirven para su fácil dispersión a través de los animales (Fig. 3.3). El abrojo crece en cultivos, en suelos modificados y en estribaciones de montes. La floración ocurre de enero a abril. El abrojo es usado como antiséptico en etnomedicina (Lombardo, 1983) y dicho uso tradicional ya ha sido validado (Cerdeiras et al., 2007).



Figura 3.1. Planta *Xanthium cavanillesii*.



Figura 3.2. Flores del *Xanthium cavanillesii*.





Figura 3.3. Frutos del *Xanthium cavanillesii*.

### 3.1.2.- Sesquiterpenlactonas.

#### *Generalidades de las sesquiterpenlactonas.*

Las sesquiterpenlactonas (SLs) son una clase muy diversa de sustancias con casi 5000 estructuras elucidadas (Harborne et al., 1999; Schmidt, 2006). Están distribuidas esporádicamente, encontrándose en hongos, briofitas, angiospermas y en la familia *Cupressaceae* de las gimnospermas (Fischer et al., 1979).

Son consideradas uno de los grupos más grandes de metabolitos secundarios de las plantas. La gran mayoría han sido aisladas de la familia *Asteraceae*, aunque se han encontrado en otras familias de angiospermas como *Apiaceae*, *Magnoliaceae*, *Lauraceae*, *Rutaceae* (Fischer et al., 1979; Seaman, 1982). La mayor concentración de SLs son encontradas en las hojas y cabezas de flores. También se han encontrado en los tricomas glandulares de la superficie superior de las hojas en algunas especies. Las SLs rara vez se encontraron en tallos y raíces pero los eudesmanólidos han sido informados de las raíces de *Liriodendron tulipifera* (*Magnoliaceae*) y de la corteza de numerosas especies de *Eremanthus* (*Compositae*) (Rodríguez et al., 1976).

SLs exhiben una amplia variedad de actividades biológicas y farmacológicas, tales como antimicrobianas, citotóxicas, antiproliferativas, antiinflamatorias.

Presentan también efectos sobre el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular (Hehner et al., 1999; Zingarelli et al., 2002; Wu et al., 2006; Djeddi et al., 2008; Pagán et al., 2008). Además, algunas de ellas tienen potencia alérgica (Picman, 1986) y presentan interés en el campo de los alimentos debido a su sabor amargo (Rodríguez et al., 1976; Wagner, 1977).

Además de las bioactividades que presentan, este grupo de compuestos se considera un marcador taxonómico para la familia *Asteraceae* (Seaman, 1982; Spring & Buschmann, 1996). Más de 4.000 estructuras de SLs con alrededor de 30 tipos diferentes de esqueletos se han descrito hasta ahora en varias tribus de *Asteraceae* (Seaman, 1982; Emerenciano et al., 1998). Sin embargo, algunos de estos compuestos se acumulan sólo en algunas de estas tribus y subtribus, mientras que otros están más extendidos (Seaman, 1982; Zdero & Bohlmann, 1990; Spring & Buschmann, 1996). Debido a su quimiodiversidad, las SLs son la clase más adecuada de productos naturales para el estudio quimiosistemático dentro de la familia.

#### *Definición y clasificación de sesquiterpenlactonas.*

Son una clase de terpenos de origen natural (sesquiterpenoides C<sub>15</sub>) con un anillo lactónico, que provienen biogénicamente del farnesildifosfato (como los demás sesquiterpenos naturales). Presentan una gran diversidad de estructuras y químicamente pueden clasificarse de acuerdo con sus esqueletos carbocíclicos como: germacranólidos (con un anillo de 10 miembros), eudesmanólidos y eremofilanólidos (compuestos 6/6 bicíclicos), guaianólidos y pseudoguaianólidos (compuestos 5/7 bicíclicos), xanthanolidos, etc. El sufijo "ólido" indica la existencia de un grupo funcional lactona (Fig. 3.4). Así por ejemplo los germacranólidos derivan del esqueleto carbocíclico germacrano, los eudesmanólidos derivan del esqueleto carbocíclico eudesmano y así sucesivamente (Fig. 3.5).

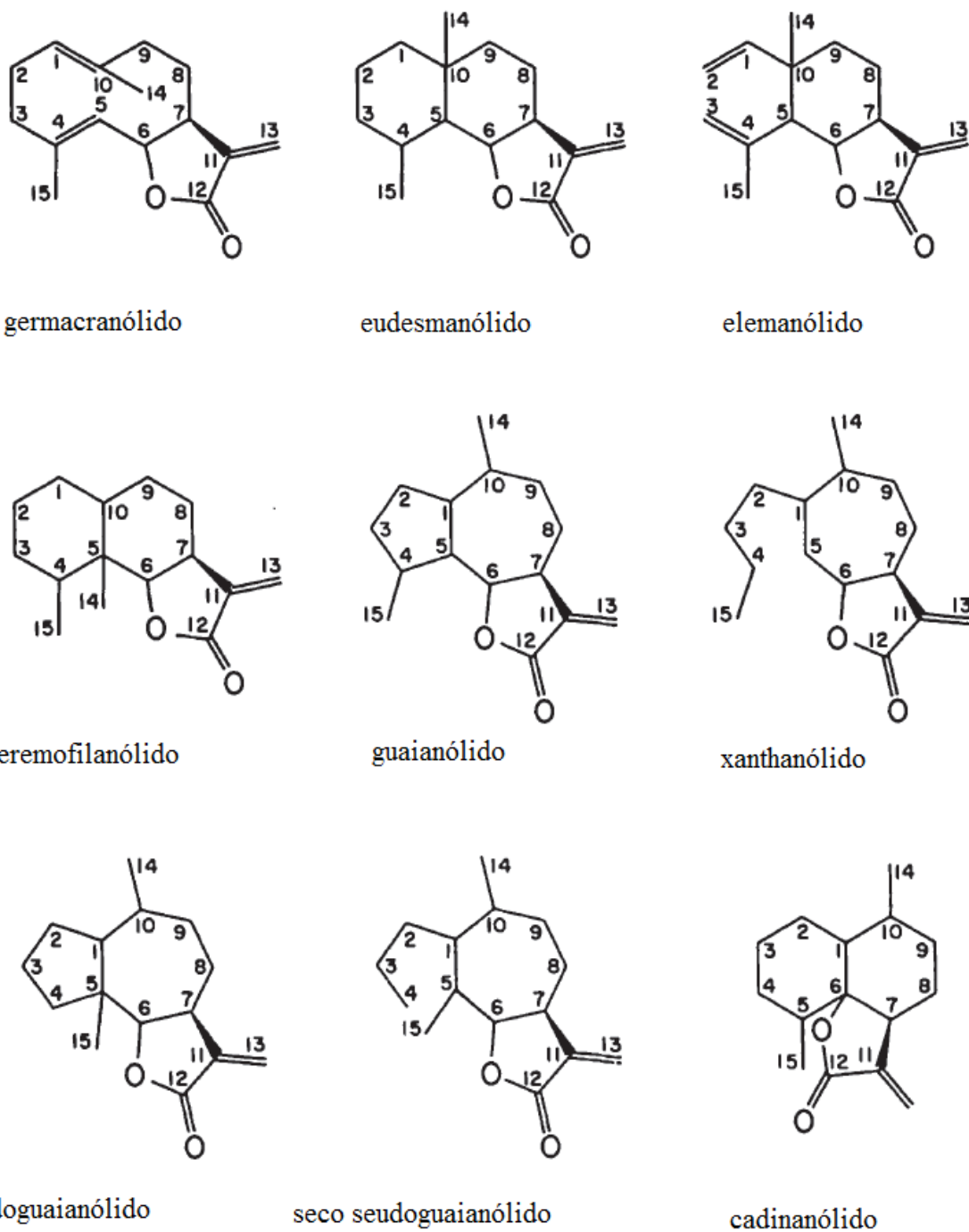


Figura 3.4. Principales esqueletos de sesquiterpenlactonas mostrando la forma 12,6 lactonizada (en forma arbitraria) y la numeración de los átomos de carbono del núcleo base. (Tomado de Fischer, 1990).

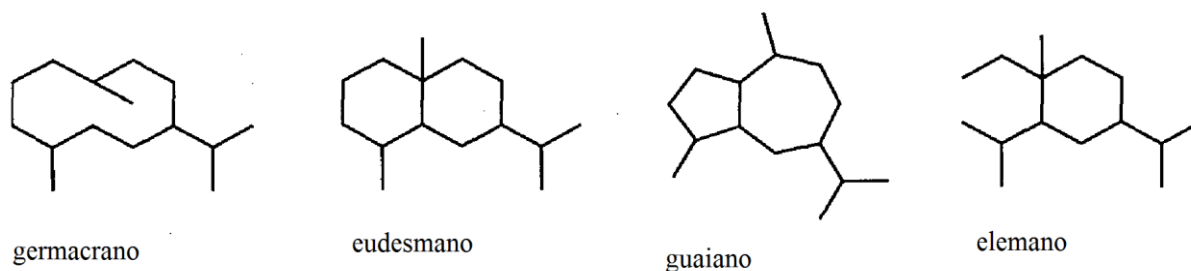


Figura 3.5. Estructura de algunos esqueletos carbocíclicos.

La clasificación de las SLs de acuerdo con su esqueleto carbocíclico haría colocar la mayoría de ellas en uno de los cuatro principales grupos: germacranólidos; eudesmanólidos; guaianólidos y pseudo guaianólidos. Sin embargo, las SLs exhiben una amplia variedad de otros arreglos esqueléticos (Seaman, 1982). Una característica común importante de las SLs es la presencia de un anillo  $\gamma$ -lactónico (fusionado cis o trans y cerrado hacia C-6 o C-8) que contiene, en muchos casos, un grupo  $\alpha$ -metileno (Fig. 3.6). La mayoría de las SLs provenientes de las plantas contienen la función  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona dónde el H-7 presenta siempre orientación  $\alpha$  (Fischer et al., 1979). Entre otras modificaciones, la incorporación de hidroxilos o hidroxilos esterificados y anillos epoxidados son comunes. Algunos SLs se producen en forma glucosídica y algunas contienen halógenos o azufre (Rodríguez et al., 1976; Picman, 1986).

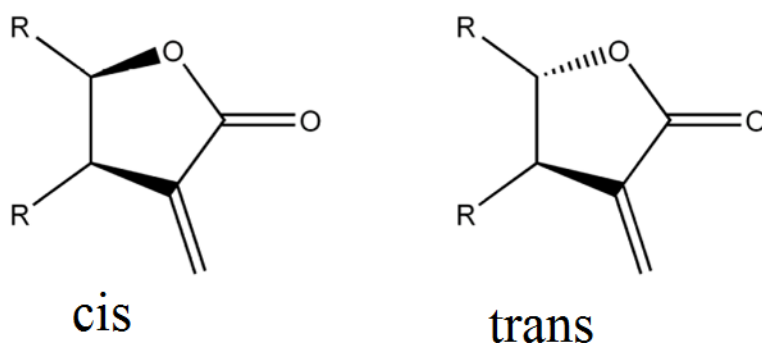


Figura 3.6. Anillo lactónico ( $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona ) fusionado cis o trans.

### *Biosíntesis.*

Los terpenos se clasifican por el número de unidades de cinco carbonos que contienen, aunque debido a las numerosas modificaciones metabólicas se puede hacer difícil reconocer las unidades originales de cinco carbonos. Los terpenos de 10 carbonos que contienen 2 unidades  $C_5$ , se denominan monoterpenos, los terpenos de 15 carbonos (3 unidades de  $C_5$ ) son sesquiterpenos, y los terpenos que contienen 20 carbonos (4 unidades de  $C_5$ ) son diterpenos. Los terpenos más grandes incluyen triterpenos (30 C), tetraterpenos (40 C) y politerpenos ( $[C_5]_n$ , cuando  $n > 8$ ).

Los terpenos son biosintetizados a partir de metabolitos primarios por al menos 2 rutas diferentes que llevan a la formación del isopentil difosfato (IPP) y a su isómero el dimetilalil difosfato (DMAPP). Estos compuestos son los precursores activados de 5 C, que se combinan para dar moléculas mayores. En primer lugar el IPP reacciona con el DMAPP para formar geranyl difosfato (GPP). El GPP puede unirse a otra molécula de IPP y formar el farnesil difosfato (FPP), compuesto de 15 C, el precursor de casi todos los sesquiterpenos.

En la figura 3.7 se representa una hipotética ruta en la biogénesis del anillo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona y del esqueleto germacranólido. El primer paso involucra la ciclación del E-E farnesil difosfato para dar germacrene A. Luego ocurre una modificación oxidativa en el grupo isopropilo en C-12, que puede ocurrir vía la formación inicial de un epóxido o vía una oxigenación seguida de una reducción para dar el alcohol alílico. A continuación siguen la oxidación del alcohol alílico para dar un ácido e hidroxilaciones en C-6 o C-8. Posteriormente ocurre la lactonización en 12,6 o 12,8 para obtener los germacranólidos.

El grupo hidroxilo participante está usualmente situado en el carbono-  $\gamma$  (gamma) , por lo tanto, la lactona cíclica es de 5 miembros, una  $\gamma$ -lactona. Los carbonos del anillo lactónico son nombrados en una secuencia lineal de acuerdo a su posición en relación al carbono del carboxilo. El carbono terminal en la secuencia es el que tenía al grupo hidroxilo formador de la lactona. Entonces, los átomos de carbono serán nombrados así:  $\alpha$  (C-11),  $\beta$  (C-7) y  $\gamma$  (C-6) o  $\alpha$  (C-11),  $\beta$  (C-7) y  $\gamma$  (C-8), dependiendo como haya ocurrido la lactonización en C-6 o C-8 respectivamente.

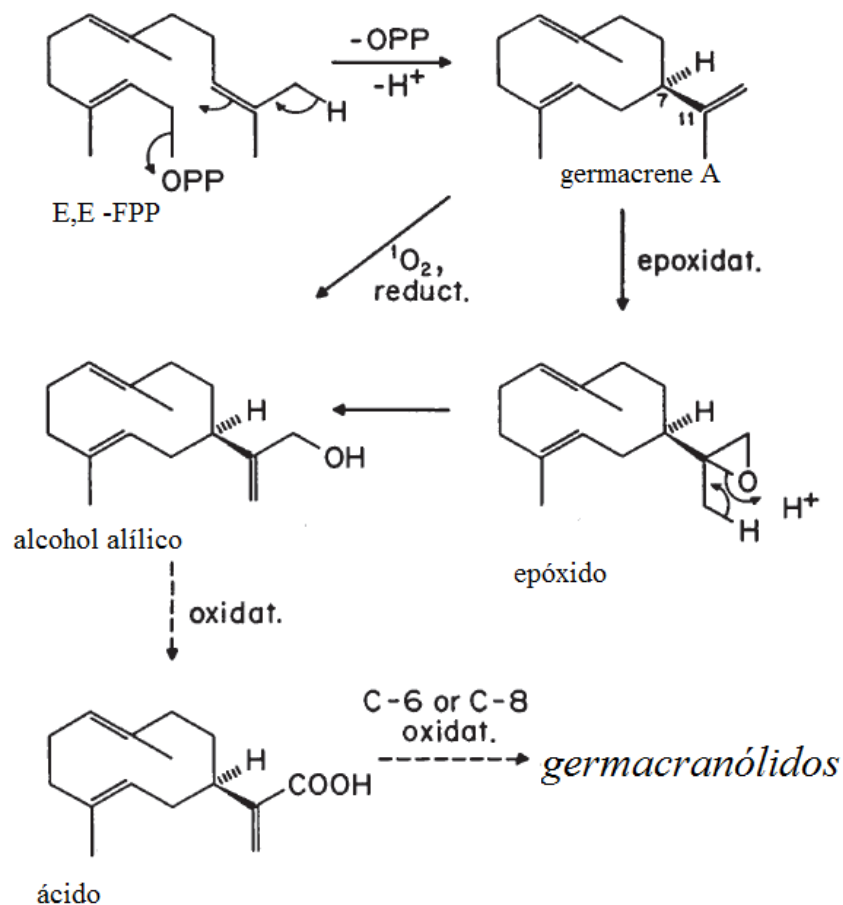


Figura 3.7. Biogénesis del anillo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona y del esqueleto del germacranólido. (Tomado de Fischer, 1990).

Es generalmente aceptado que a partir de los germacranólidos derivan todas las otras sesquiterpenlactonas (Herz, 1973; Fischer, 1990). Ya sea antes o después de la lactonización los precursores de los germacranólidos sufren una variedad de ciclaciones, fisiones de anillos y migraciones de metilos para dar los otros tipos principales de esqueletos de sesquiterpenlactonas (eudesmanólidos, guaianólidos, xanthanolídos, eremofilanólidos, seudoguaianólidos, etc). Las variaciones estructurales secundarias son numerosas y se producen sobre los grupos metilos, a menudo funcionalizados (alcoholes, ácidos carboxílicos), sobre las insaturaciones, que pueden encontrarse reducidas u oxidadas (epóxidos, hidroxilos), cuando existen hidroxilos suelen estar esterificados.



### *Xanthanólidos.*

El esqueleto carbonado de los xanthanólidos es el xanthano, un seco-regular sesquiterpeno, el cual biogénicamente puede ser formado a partir del esqueleto guaiano por ruptura del anillo entre C-4/C-5 (Fig. 3.8). El esqueleto xanthano puede ser descrito como un carbociclo de 7 miembros sustituido en C-1, C-3 y C-4. Los xanthanólidos son sesquiterpenlactonas biciclicas, donde un anillo de 5 miembros ( $\gamma$ -lactona) es fusionado con un carbociclo de 7 miembros. Una hipotética biogénesis es que los germacranólidos y sus derivados epóxidos son los precursores de guaianólidos y xanthanólidos. Los xanthanólidos pueden ser divididos en 2 clases estructurales de acuerdo a la lactonización: 12,6 y 12,8. Los miembros del último grupo ocurren más en las plantas y pueden clasificarse de acuerdo a su estereoquímica en C-8 (xanthanólidos y 8-epi-xanthanólidos).

Su presencia en el reino de las plantas es relativamente limitada, ocurren solamente en 50 especies. La fuente más rica de xanthanólidos es el género *Xanthium*. Las plantas conteniendo este tipo de compuestos han sido usadas en la medicina tradicional para tratamiento de la fiebre, herpes, diferentes tumores, como antiinflamatorios y antimicrobianos (Vasas & Hohmann, 2011).

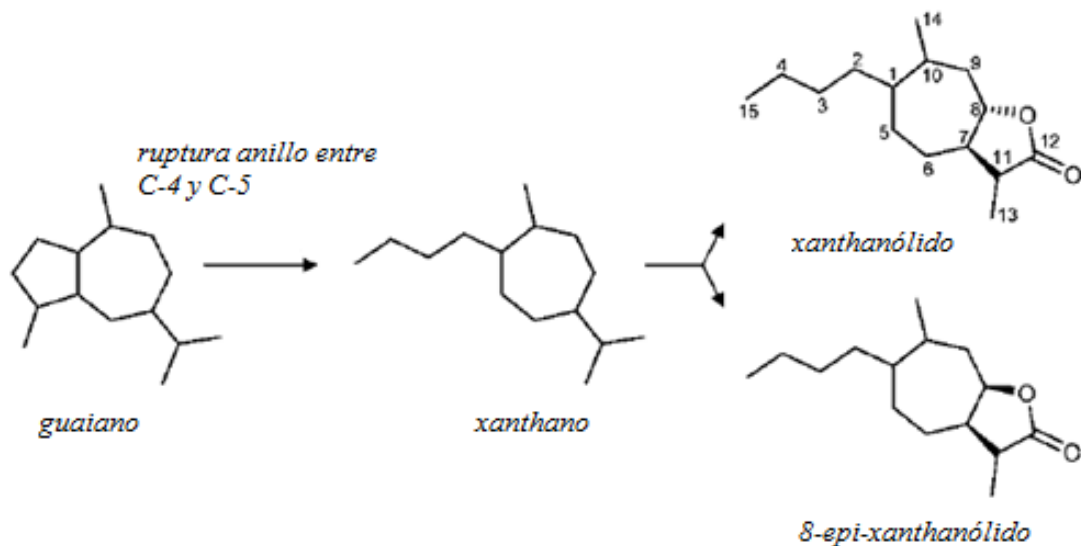


Figura 3.8. Relación biogénica de guaiano, xanthano y xanthanólidos (Tomado de Vasas & Hohmann, 2011).

#### *Actividad antibacteriana de las sesquiterpenlactonas.*

La actividad antibacteriana de SLs es un efecto bien conocido que se ha demostrado para varias SLs y numerosas cepas (Lee et al., 1977; Spring et al., 1982; Tsankova et al., 1994; Sato et al., 1997; Bachelier et al., 2006; Facey et al., 2010). Se destaca la actividad que presentan contra bacterias Gram positivas (De Riscalca et al., 1994; Tsankova et al., 1994; Vasas & Hohmann, 2011).

El mecanismo de acción de las SLs no es conocido. Se ha postulado que las SLs, que contienen grupos funcionales electrofílicos, reaccionan con nucleófilos celulares de ADN o enzimas con grupos OH, SH o NH<sub>2</sub> (Bachelier et al., 2006). Un estudio muestra que una SL inhibe la enzima bacteriana MurA la cual es responsable del primer paso de la biosíntesis citoplasmática del precursor de la molécula de peptidoglucano (Bachelier et al., 2006).

## 3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1.- Procedimientos Generales.

Todas las soluciones fueron evaporadas a presión reducida a temperatura menor de 40°C. Los solventes utilizados fueron puros para análisis o destilados sobre vidrio.

### 3.2.2.- Cromatografía en capa fina (TLC)

Fueron realizadas en placas de silica gel (Macherey Nagel, Durin, Germany) usando como fases móviles CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona (6:1), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona (9:1) y como reactivo revelador CuSO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y p-dimetilaminobenzaldehido seguidos de calentamiento (Picman et al., 1980).

*Preparación reactivos reveladores.*

p-dimetilaminobenzaldehido: Fueron disueltos 0.5 g de p-dimetilaminobenzaldehido en una solución conteniendo 0.9 mL de etanol (95%), 0.5 mL de ácido sulfúrico concentrado y 3 gotas de ácido acético. Este reactivo debe ser preparado antes de su uso.

CuSO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Fueron disueltos 10 g de sulfato de cobre (II) en 100 mL de ácido fosfórico al 10% .

### 3.2.3.- Cromatografía Gaseosa acoplada a detector de Ionización de Llama (GC-FID).

Los análisis de GC-FID fueron realizados en un cromatógrafo Shimadzu GC 14 con una columna capilar HP-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) usando el siguiente método: temperatura inyector: 250°C, temperatura FID: 300°C, gas portador y flujo: N<sub>2</sub> a 1 mL/min, modo splitless, volumen inyección: 1μL, programa de temperatura: temperatura inicial 100 °C, temperatura final 280 °C, rampa 5° min<sup>-1</sup> y finalmente 10 min. a 280°C.

### **3.2.4.- Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).**

Los análisis por GC-MS fueron realizados usando un equipo Shimadzu QP 5050, con columna capilar HP-5ms (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m) y utilizando ionización por impacto electrónico, con una aceleración de 70 eV. El método utilizado fue el siguiente: temperatura inyector: 250°C, temperatura fuente ionización y temperatura interface: 200°C, gas portador y flujo: He a 1.2 mL/min, modo splitless, volumen inyección: 1  $\mu$ L, programa de temperatura: temperatura inicial 100 °C, temperatura final 280 °C, rampa 5° min<sup>-1</sup> y finalmente 10 min. a 280°C, modo de adquisición: SCAN, rango de masas: *m/z* 35.0 a *m/z* 500.0.

### **3.2.5.- Espectrometría de Masas exacta (HRMS).**

Los análisis de espectroscopía de masas (MS) fueron realizados en un equipo Bruker micrOTOF-Q-TOF con fuente ESI en el modo positivo.

### **3.2.6.- Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem (LC-MS/MS).**

Los análisis por LC-MS/MS se realizaron usando un equipo Ultra Performance LC (Acquity, Waters) con espectrómetro de masas triple cuadrupolo (TQD, Waters) con fuente de ionización por electrospray (ESI). La columna analítica utilizada fue Acquity UPLC BECH C18 (1.7 $\mu$ m, 2.1 x 50 mm; Waters). El gas nebulizador fue nitrógeno a un flujo de 1200 L/h. Para operar en el modo MS/MS, el gas de colisión fue argón con una presión aproximada de 4.10<sup>-3</sup> mbar en la celda de colisión. Los experimentos fueron realizados con voltaje del capilar de 3.0 kV. Software MassLynx Versión 4.1 (Waters) fue usado para procesar los datos.

El acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) y el metanol (MeOH) utilizados fueron grado HPLC (J.T.Baker). El diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) ( $\geq$  99.9 %) utilizado fue de alta pureza (J.T.Baker). El CH<sub>3</sub>CN fue filtrado (Millipore, 0.50  $\mu$ m FH; Bedford, MA, USA) y el agua usada para la preparación de la fase móvil fue purificada con un equipo Milli-Q Plus System (Millipore, USA). El ácido fórmico (HCOOH) (> 98%) utilizado fue grado HPLC (Fluka).

La solución estándar stock de sesquiterpenlactona **1** (previamente aislada y elucidada) (1mg/mL) fue preparada en MeOH y las soluciones estándares de trabajo fueron preparadas a partir de diluciones de la solución anterior en MeOH.

El extracto del abrojo fue obtenido por maceración de las hojas secas (20 mg) con 10 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 24 horas a temperatura ambiente y con agitación. Se rotaevapora a sequedad y se prepara una solución de 1mg/mL en MeOH.

### **3.2.7.- Espectroscopia Infrarroja (IR).**

Los espectros fueron realizados en un equipo Nicolet 8700 FT-IR.

### **3.2.8.- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).**

Los espectros de <sup>1</sup>H fueron obtenidos a 400 MHz y los espectros de <sup>13</sup>C fueron obtenidos a 100 MHz en un equipo Bruker Advance DPX 400 utilizando como solventes CD<sub>3</sub>OD o CDCl<sub>3</sub>. Los resultados son expresados en ppm relativos a TMS ( $\delta_H$  0.00) y acetona-*d*6 ( $\delta_C$  31.00).

Los espectros bidimensionales (COSY, HMQC, HMBC, NOESY.) y los espectros tridimensionales (HSQC-TOCSY) fueron realizados utilizando el software Bruker con las secuencias de pulsos estándar.

Todos los experimentos fueron realizados a 30 °C salvo cuando se especifica.

### **3.2.9.- Modelado Molecular.**

Se utilizó el programa Hyperchem 7 (HyperCube, PS) utilizando técnicas de Mecánica Molecular con el campo de fuerza MM2. Se obtuvieron las conformaciones de mínima energía recurriendo a los métodos de *Steepest Descent* (1000 iteraciones) y *gradiente de Polak-Riviere* (gradiente 0.01) consecutivamente.

A partir de los valores de los ángulos de torsión obtenidos se calcularon las constantes de acoplamiento <sup>3</sup>J<sub>H-H</sub> utilizando la aplicación "Generalized 3JHH calculation" disponible en <http://www.stenutz.eu/conf/haasnoot.php>, utilizando las aproximaciones de Haasnoot y colaboradores (Haasnoot et al., 1980).

### **3.2.10.- Material vegetal.**

#### *Xanthium cavanillesii.*

Las partes aéreas y las raíces de *X. cavanillesii* fueron colectadas en Solimar (Canelones) y fueron identificadas por el Lic.F.Haretche, Museo y Jardín Botánico 'Atilio Lombardo', Montevideo. Muestras voucher fueron depositadas en el herbario de MVJB, Jardín Botánico, Montevideo.

### **3.2.11.- Aislamiento de compuestos con actividad antibacteriana del *X.cavanillesii*.**

#### *Aislamiento sesquiterpenlactona 1.*

Las hojas del *Xanthium cavanillesii* fueron extraídas por maceración con  $\text{CHCl}_3$  durante 72 hs. en la oscuridad y a temperatura ambiente. Luego de la evaporación a vacío del solvente el extracto clorofórmico fue sometido a cromatografía al vacío (VLC) usando Silica gel 40 (200-500  $\mu\text{m}$ , Merck, Darmstad). El extracto fue separado en ocho fracciones (hexano, hexano- $\text{CHCl}_3$  4:1, hexano- $\text{CHCl}_3$  1:1,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ -acetato de etilo 1:1, acetato de etilo, acetona, MeOH). Las fracciones fueron analizadas mediante TLC y Bioautografías. La fracción más activa (acetato de etilo) fue fraccionada mediante una cromatografía en columna sobre Silica gel 60 (200-500  $\mu\text{m}$ , Merck, Darmstad) eluyendo con un gradiente de  $\text{CHCl}_3$  y MeOH (100:0, 90:10, 80:20, v/v) y las fracciones obtenidas (45) analizadas mediante TLC y Bioautografías. Las fracciones de la 10 - 27 fueron reunidas y denominadas F2. TLC preparativa de F2 en Silica gel (TLC Plastic Sheets, 60 G F254, Merck) y desarrollada con  $\text{CHCl}_3$ /acetona (6:1) dió la sesquiterpenlactona 1.

#### *Aislamiento sesquiterpenlactona 2 y 3.*

Las hojas del *Xanthium cavanillesii* (240 g) fueron extraídas por maceración con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 72 hs. en la oscuridad y a temperatura ambiente. Luego de la evaporación a vacío del solvente el residuo obtenido fue sometido a cromatografía al vacío (VLC) usando silica gel 40 (0.2 - 0.5 mm, Merck, Darmstad). El extracto fue separado en ocho fracciones (hexano, hexano-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  4:1, hexano-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1,

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-acetato de etilo 1:1, acetato de etilo, acetona, MeOH). Las fracciones fueron analizadas mediante TLC y Bioautografías. La fracción más activa (acetato de etilo, 1.6 g) fue fraccionada mediante cromatografía flash sobre Silica gel con un *cartucho Varian Si 50 SF 15-24 g* con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona 10:1 como eluente. Las fracciones obtenidas (20) fueron analizadas mediante TLC y se juntaron las fracciones desde la 1 a la 6, las que posteriormente fueron fraccionadas usando cromatografía flash sobre Silica gel (*Varian Si 50 SF 15-24 g*) usando como eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona (50:1) y las fracciones obtenidas (35) analizadas por TLC y reunidas desde la 23 a la 27. Las fracciones anteriores (23-27) fueron posteriormente fraccionadas por cromatografía flash en fase reversa (*Varian C18 SF 15-16 g*) eluyendo con un gradiente de H<sub>2</sub>O/MeOH (desde 80:20 a 0:100, v/v) y las fracciones obtenidas (40) analizadas por TLC y reunidas desde la 18 a la 35. Finalmente mediante TLC preparativa de la fracción 18-35 en Silica gel y desarrollada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona (6:1) dió las sesquiterpenlactonas **2** y **3**.

#### *Aislamiento sesquiterpenlactona 4.*

Las raíces del *Xanthium cavanillesii* fueron maceradas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 72 hs en la oscuridad y a temperatura ambiente. Luego de la evaporación a vacío del solvente el extracto diclorometano fue sometido a cromatografía en columna usando silica gel 60 (0.2-0.5 mm, Merck, Darmstad) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluente. Las fracciones obtenidas (35) fueron analizadas mediante TLC y se juntaron las fracciones desde la 5 a la 17, las que posteriormente fueron fraccionadas usando cromatografía en columna usando silica gel 60 (0.04 -0.063 mm, Merck, Darmstad) y eluyendo con un gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> /AcOEt (desde 100:0 a 90:10, v/v). Las fracciones obtenidas (85) fueron analizadas mediante TLC y se juntaron las fracciones desde la 44 a la 65. Finalmente TLC preparativa de la fracción 44-65 desarrollada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona (9:1) dió la sesquiterpenlactona **4**.

#### *Aislamiento de sesquiterpenlactona 5.*

Las flores del *Xanthium cavanillesii* fueron maceradas con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durante 72 hs en la oscuridad y a temperatura ambiente. El extracto diclorometano obtenido fue

sometido a TLC preparativa desarrollada con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetona (9:1) y dió la sesquiterpelactona **5**.

### **3.2.12.- Actividad antibacteriana**

#### *Bioautografías.*

Fueron realizadas sobre placas de TLC corridas y secas de acuerdo al método agar overlay (Rahalison et al., 1991) usando *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538p). Se realizaron dos TLC en forma simultánea. Se incluyeron controles negativo (solventes) y positivo (gentamicina).

Los microorganismos fueron cultivados toda la noche a 35 °C en agar Mueller - Hinton (Difco). Las colonias fueron suspendidas en una solución salina (0.9 % NaCl) hasta lograr una turbidez comparada con la escala 0.5 Mac Farland (10<sup>8</sup> ufc/mL) y 2.5 mL de ésta suspensión fue agregada a 100 mL agar Mueller-Hinton fundido y termostatzado previamente a 45 °C. Una de las placas de TLC (corrida y seca) fue introducida en una placa de Petri estéril y fue volcado el medio de cultivo inoculado sobre su superficie utilizando una pipeta Pasteur estéril de manera que quede un delgado film sobre la TLC.

Luego fue incubada 24 hs a 35 ± 2 °C y revelada con una solución acuosa al 0.1 % de violeta de p-yodo-nitrotetrazolium (INT) (Sigma) que es un revelador de la actividad deshidrogenasa mitocondrial. Se observan halos de inhibición (amarillos) no cuantitativos sobre los compuestos activos y el crecimiento bacteriano es indicado por el desarrollo de color rojo. La otra TLC fue revelada con reveladores químicos de manera de poder identificar los compuestos activos.

#### *Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).*

Fueron realizadas a las Sesquiterpenlactonas puras (1, 2, 3, 4 y 5), a fracciones purificadas del extracto de *X. cavanillesii*, al extracto *X. cavanillesii* y a antibióticos comerciales: oxacilina sódica y gentamicina sulfato.



Fue determinada por el método de microdilución de acuerdo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) usando cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (ATCC 6538 p) y meticilino resistentes (ATCC 43300, ATCC 700699).

Las diferentes muestras derivadas del *X. cavanillesii* fueron disueltas en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), la oxacilina sódica (Sigma) y la gentamicina sulfato (Sigma) fueron disueltas en agua ultrapura estéril para obtener las respectivas soluciones stock.

Los microorganismos fueron cultivados toda la noche a 35 °C en agar Mueller - Hinton (Difco). Las colonias fueron suspendidas en caldo Mueller-Hinton (Difco) hasta lograr una turbidez comparada con la escala 0.5 Mac Farland.

Se utilizaron microplacas estériles (96 pocillos, 0.2 mL volumen, Fisher Scientific).

En el primer pocillo se agregan 20 µL de la solución stock y 180 µL de caldo Muller Hinton (MH). En el segundo pocillo se agregan 20 µL del primer pocillo y 180 µL de caldo MH. En todos los siguientes pocillos (3-8) se agregan 100 µL de caldo MH. En el tercer pocillo se agregan 100 µL del pocillo 2 y cada siguiente pocillo contiene 100 µL de la dilución del pocillo anterior. Se inoculan todos los pocillos (2-8) con 20 µL de suspensión bacteriana de concentración igual a  $10^8$  UFC/mL (escala 0.5 Mc.Farland).

Una solución de DMSO (1 %, v/v) en caldo Muller Hinton fue ensayada como control de esterilidad y una solución de DMSO (1 %, v/v) en caldo Muller Hinton inoculada con 20 µL de suspensión bacteriana ( $10^8$  UFC/mL) fue ensayada como control negativo. Todas las muestras fueron ensayadas por triplicado.

Las microplacas fueron incubadas a 37° C durante 24 hs. Luego fueron agregados 40 µL de una solución 0.2 mg/mL de p-iodonitrotetrazolium violet (p-INT) (Sigma-Aldrich) en cada pocillo y se incubó durante 30 minutos. La CIM fue determinada como la mínima concentración en la que no aparece color rojo.

### 3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1- Aislamiento y elucidación estructural de Sesquiterpenlactonas del *X. cavanillesii*.

##### *Sesquiterpenlactona 1.*

Las hojas de *X. cavanillesii* fueron extraídas por maceración con  $\text{CHCl}_3$  durante 72 hs. en la oscuridad y a temperatura ambiente. El residuo obtenido fué purificado siguiendo el esquema de la figura 3.9. Se realizó una cromatografía a vacío (VLC) usando Silica gel y las fracciones obtenidas analizadas por TLC y Bioautografías (Fig. 3.10). El extracto fue separado en ocho fracciones (hexano, hexano- $\text{CHCl}_3$  4:1, hexano- $\text{CHCl}_3$  1:1,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ -acetato de etilo 1:1, acetato de etilo, acetona, MeOH). La fracción más activa (acetato de etilo) fue fraccionada por cromatografía en columna (Fig. 3.11) sobre Silica gel eluyendo con un gradiente de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (100:0, 90:10, 80:20, v/v) y las fracciones obtenidas (45) analizadas por TLC y Bioautografías. Las fracciones de la 10-27 fueron reunidas y denominadas F2. Se realizó una TLC preparativa de F2 en Silica gel y desarrollada con  $\text{CHCl}_3/\text{acetona}$  (6:1) obteniendo la sesquiterpenlactona 1 (Fig. 3.12).

El análisis mediante espectrometría de masas exactas ESI-HRMS en el modo positivo revela el ion aducto a  $m/z$  271.1422  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (Fig. 3.13) compatible con una sesquiterpenlactona de fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$  y confirmado por análisis de RMN ( $^{13}\text{C}$  y DEPT) y por EI-MS que presentó el ion molecular a  $m/z$  248 y otros iones característicos a  $m/z$  233  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$  y  $m/z$  215  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3]^+$  (Fig. 3.14).

Los espectros IR indican la presencia del grupo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$  lactona ( $1762\text{ cm}^{-1}$ ) y la ausencia de grupos hidroxilos libres (Fig. 3.15).

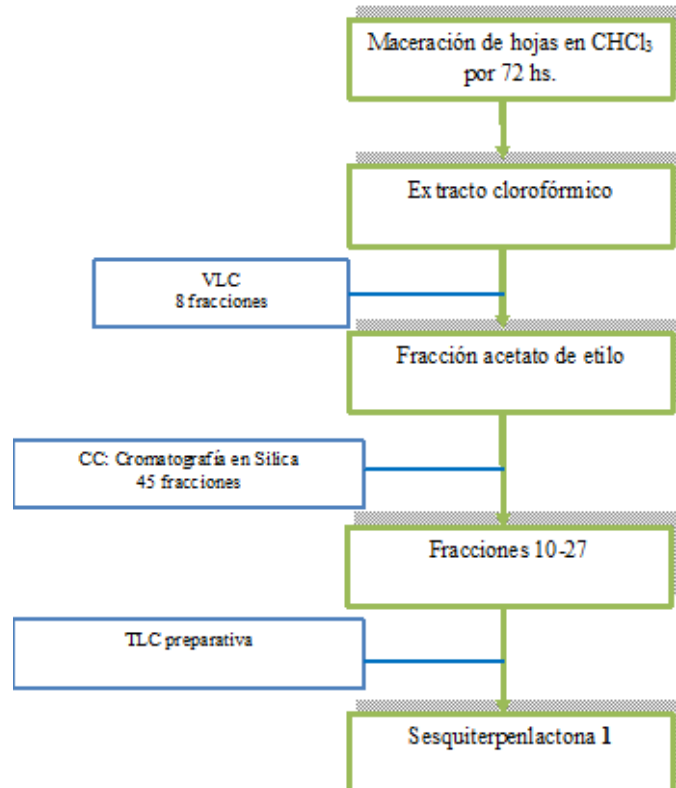


Figura 3.9. Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenolactona 1.

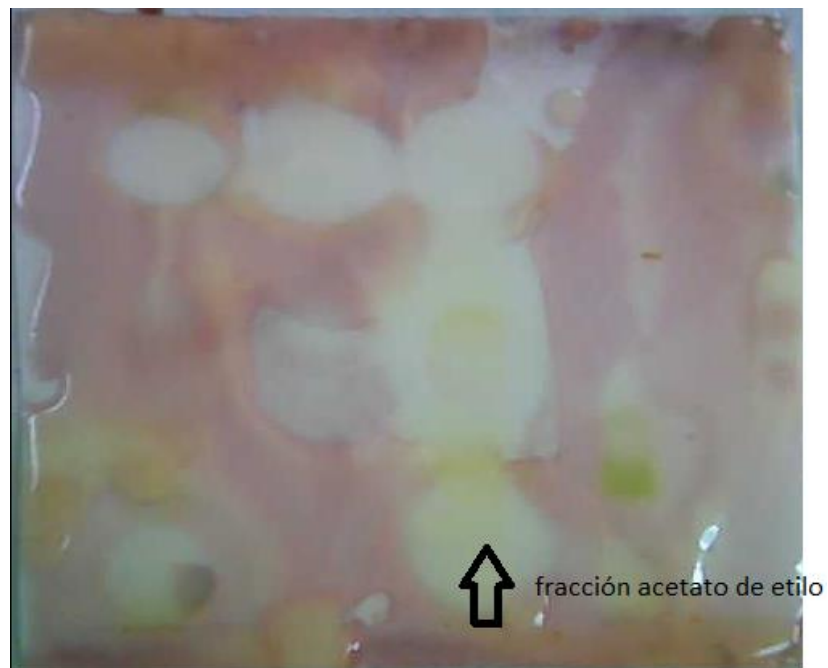


Figura 3.10. Bioautografía de las fracciones (10 mg/mL) de la VLC. En amarillo halos de inhibición.

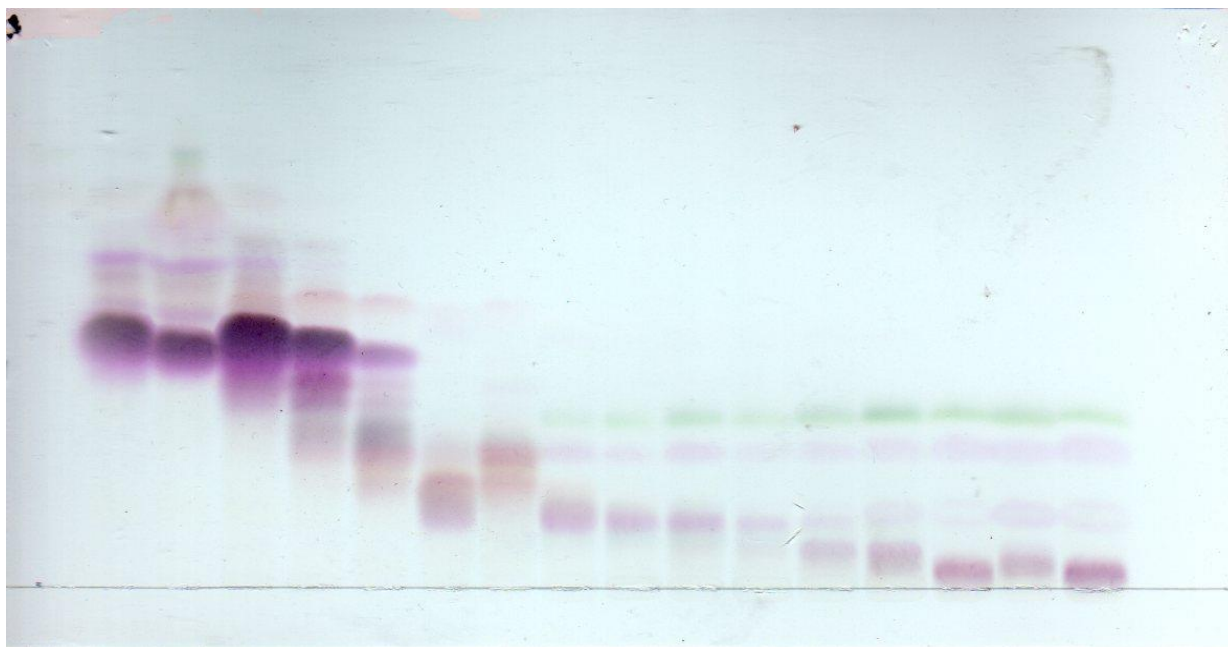


Figura 3.11. TLC de las fracciones obtenidas de cromatografía en columna.  
(FM:  $\text{CHCl}_3$ :acetona (6:1) Revelador: p-(dimetilamino) benzaldehído.

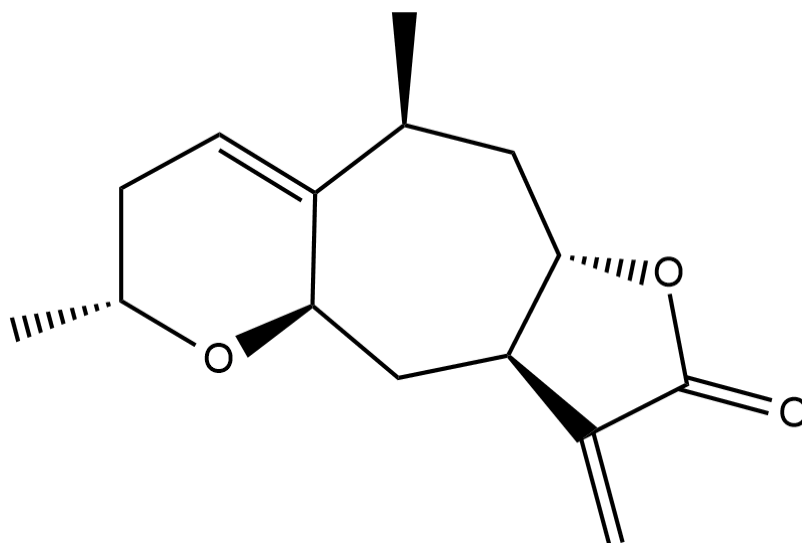


Figura 3.12. Estructura química de la sesquiterpenlactona 1.

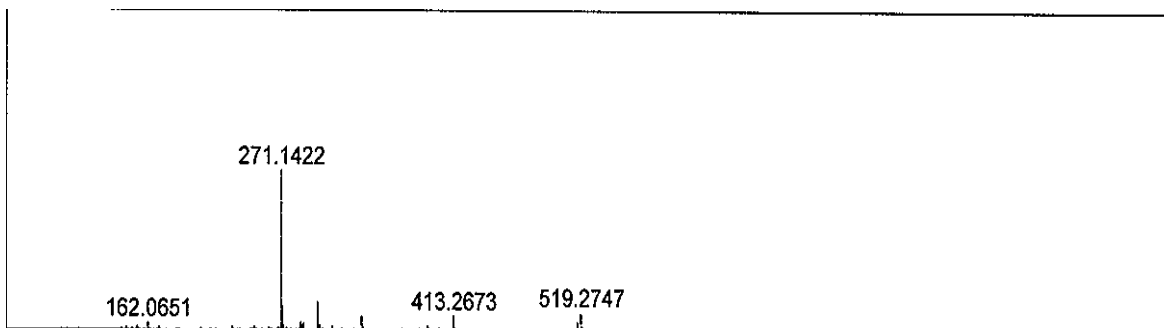


Figura 3.13. Espectro ESI-HRMS de sesquiterpenlactona 1 en modo positivo.

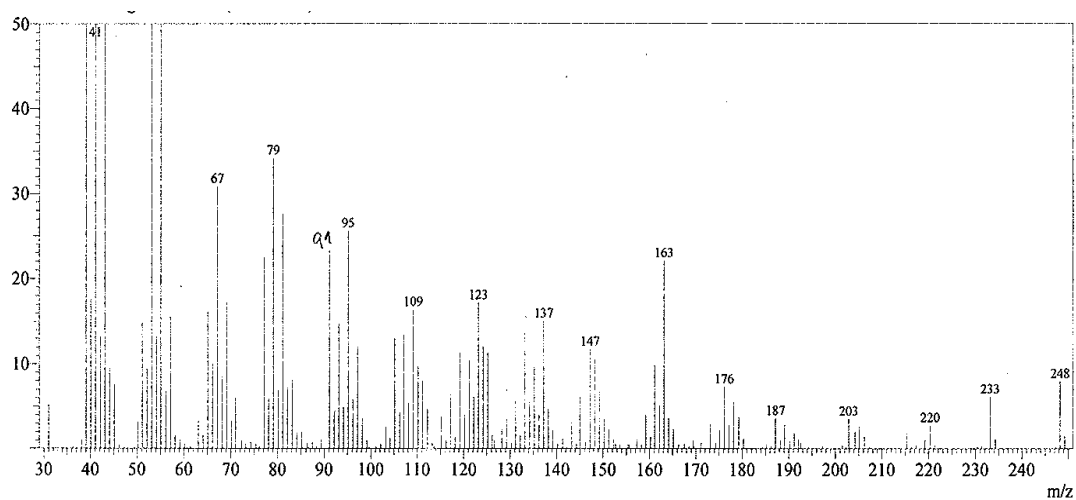


Figura 3.14. Espectro EI-MS de sesquiterpenlactona 1.

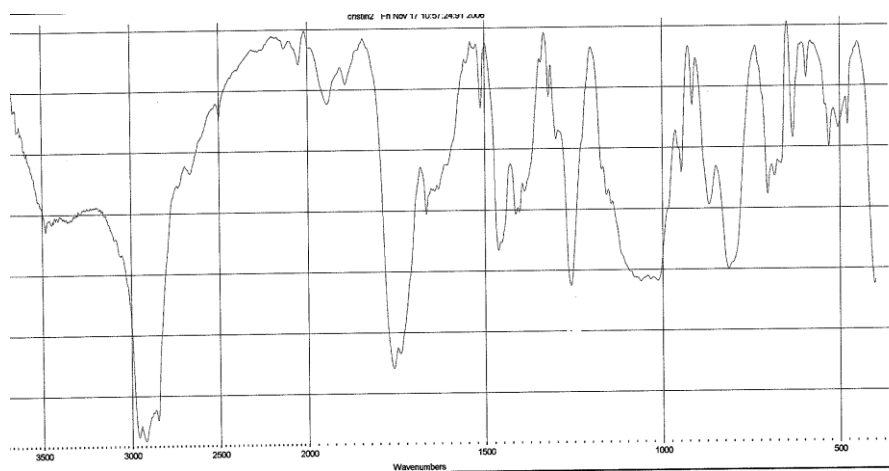


Figura 3.15. Espectro FTIR de sesquiterpenlactona 1.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.16) exhibe quince señales incluyendo dos metilos a 20.2 ppm (C-14) y 21.9 ppm (C-15); cuatro metilenos incluyendo uno olefínico a 121.3 ppm (C-13), 40.5 ppm (C-9), 35.7 ppm (C-6) y 33.3 ppm (C-3); seis metinos a 120.3 ppm (metino olefínico, C-2), 83.4 ppm (metino oxigenado unido a la lactona, C-8), 40.0 ppm (C-7), 76.1 ppm (metino oxigenado, C-5), 64.1 ppm (metino oxigenado, C-4) y 32.1 ppm (C-10); y tres carbonos cuaternarios a 170.4 (carbonilo de la lactona, C-12), 139.8 (C-1) y 141.4 ppm (C-11).

El espectro DEPT 135 (Fig. 3.17) exhibe ocho señales positivas (dos metilos a 20.2 ppm y 21.9 ppm; y seis metinos a 120.3 ppm, 83.4 ppm, 40.0 ppm, 76.1 ppm, 64.1 ppm y 32.1 ppm) y cuatro señales negativas (cuatro metilenos a 121.3 ppm, 40.5 ppm, 35.7 ppm y 33.3 ppm).

El espectro  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.18) muestra dos grupos metilos (dobletes) a  $\delta$  1.21 ppm (3 H, d,  $J=6.8$  Hz, Me-14) y 1.25 ppm (3 H, d,  $J=6.1$  Hz, Me-15), un metileno a  $\delta$  2.05 ppm (2 H, m, H-3), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.43 ppm (H, ddd,  $J=2.9, 6.5, 13.0$  Hz, H-6) y  $\delta$  1.71 ppm (H, m, H-6'), un metileno a  $\delta$  1.96 ppm (2H, m, H-9), un metileno olefínico exocíclico con dos dobletes a  $\delta$  6.28 ppm (1 H, d,  $J=3.5$  Hz, H-13) y  $\delta$  5.57 ppm (1 H, d,  $J=3.1$  Hz, H-13'), dos metinos a  $\delta$  2.88 ppm (1H, m, H-7) y a  $\delta$  2.30 ppm (1H, m, H-10), tres metinos oxigenados a  $\delta$  3.80 ppm (1H, m, H-4),  $\delta$  4.20 ppm (1H, m, H-5) y  $\delta$  4.10 ppm (1H, td,  $J=7.4, 9.5, 9.5$  Hz, H-8) y un metino olefínico a  $\delta$  5.72 ppm (1H, m, H-2).

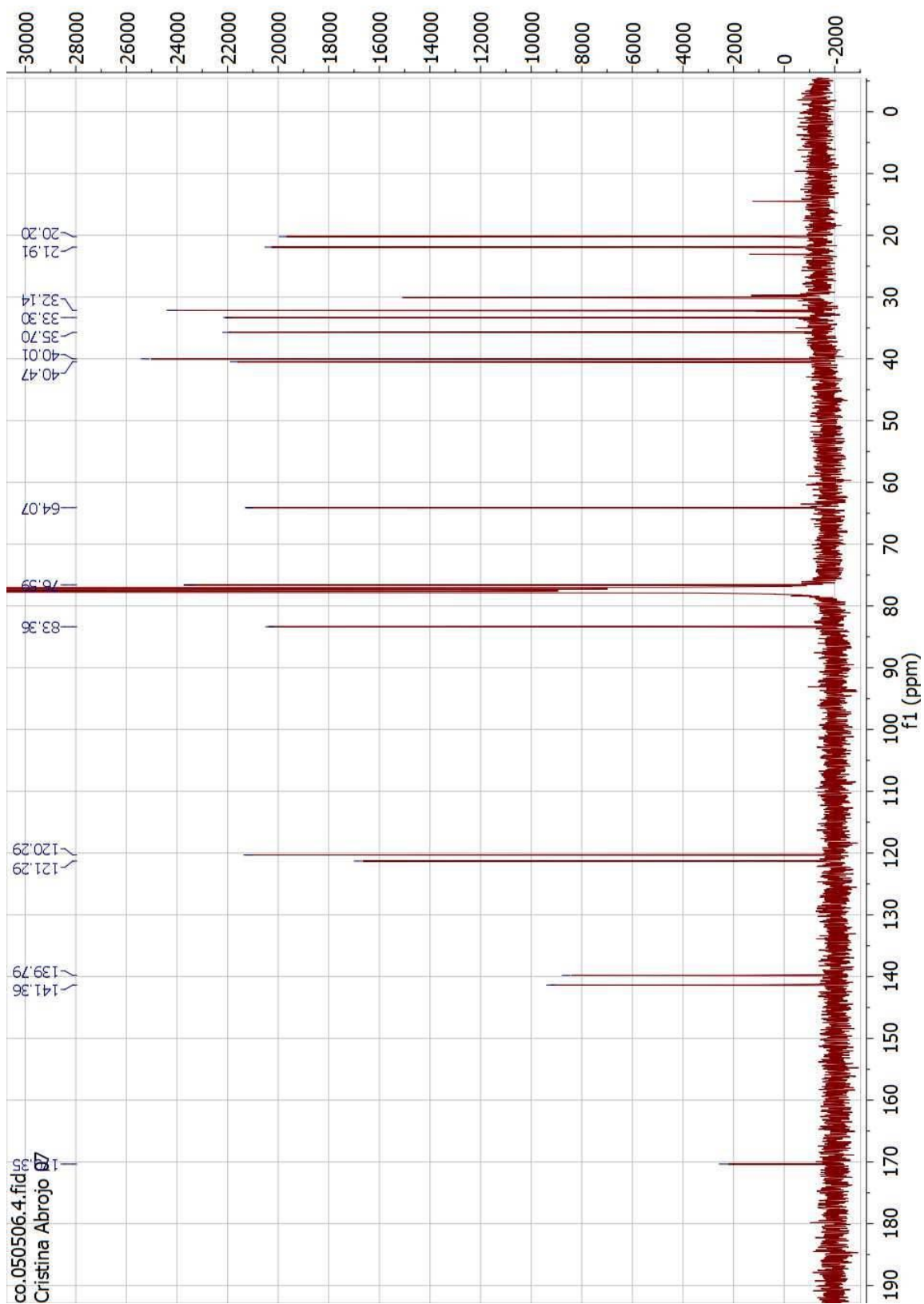


Figura 3.16. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN de sesquiterpenolactona 1 en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.

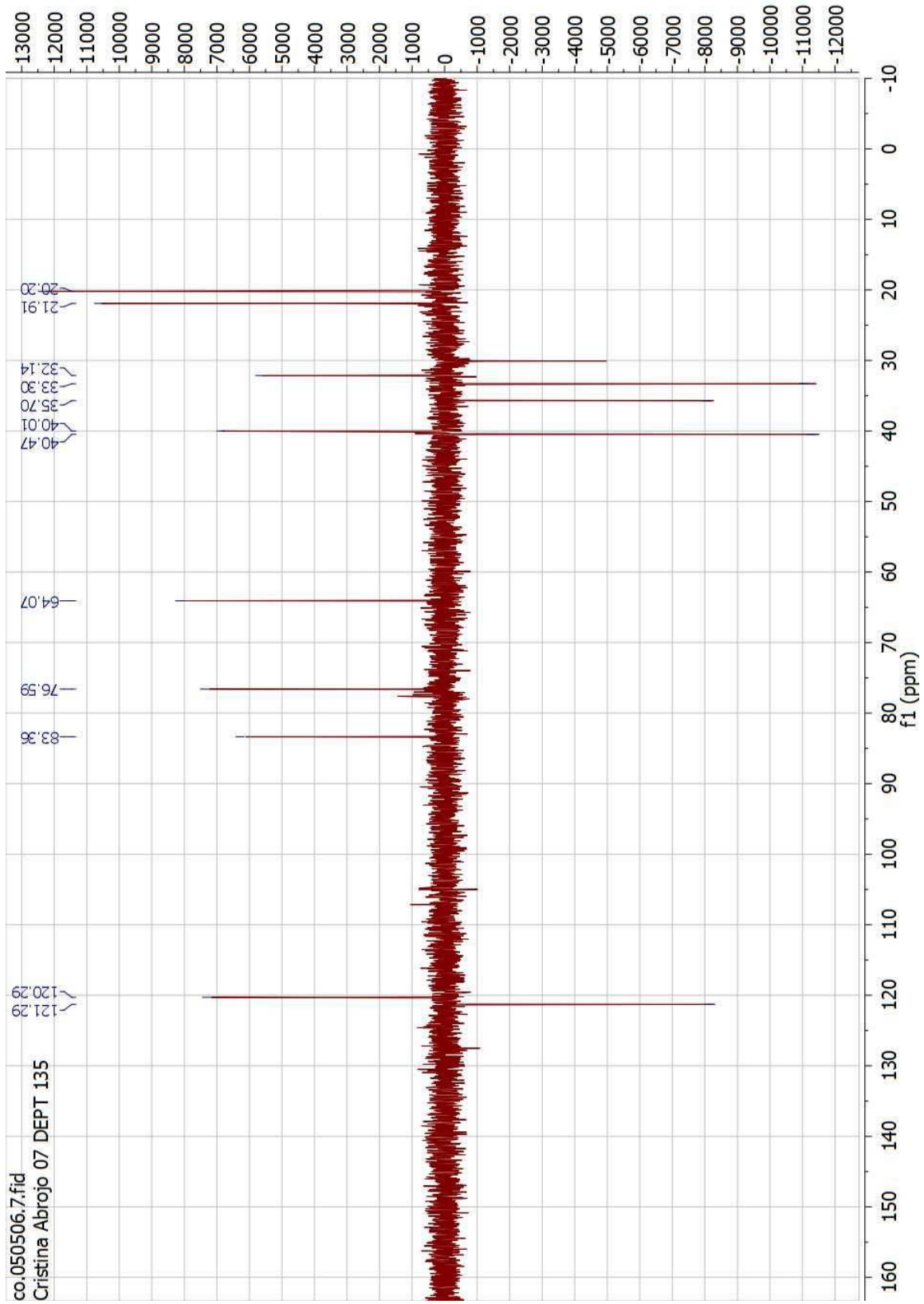


Figura 3.17. Espectro DEPT 135 RMN de sesquiterpenolactona 1.



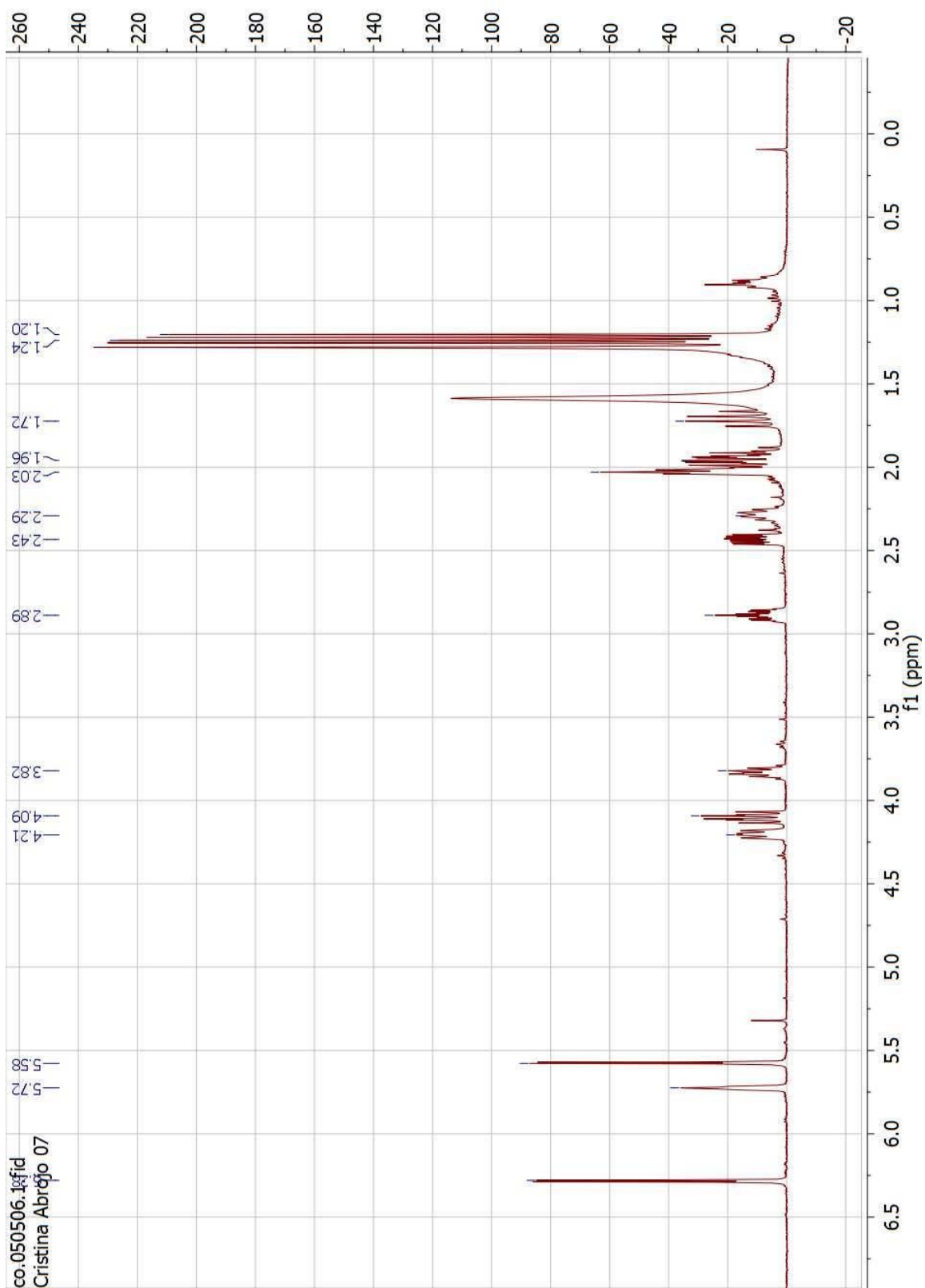


Figura 3.18. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de sesquiterpenolactona 1 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

Usando diferentes métodos 2D de RMN: COSY (Fig. 3.20), HSQC (Fig. 3.21) y HMBC (Fig. 3.22) todas las señales pudieron ser asignadas (Tabla 3.1) y ésto sugiere que la estructura básica de la sesquiterpenlactona **1** fue xanthan-11 (13)-en-12,8-olide (Fig. 3.19).

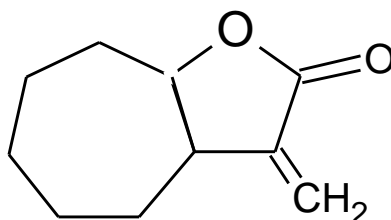


Figura 3.19. Estructura base de sesquiterpenlactona 1.

Tabla 3.1. Desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para sesquiterpenlactona 1.

| N° Carbono | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)        |
|------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 1          | 139.8                     | ---                                  |
| 2          | 120.3                     | 5.72 (m)                             |
| 3          | 33.3                      | 2.05 (m)                             |
| 4          | 64.1                      | 3.80 (m)                             |
| 5          | 76.1                      | 4.20 (m)                             |
| 6          | 35.7                      | 2.43 (ddd 2.9, 6.5, 13.0)<br>1.71(m) |
| 7          | 40.0                      | 2.88 (m)                             |
| 8          | 83.4                      | 4.10 (td 7.4, 9.5, 9.5)              |
| 9          | 40.5                      | 1.96 (m)                             |
| 10         | 32.1                      | 2.30 (m)                             |
| 11         | 141.4                     | ---                                  |
| 12         | 170.4                     | ---                                  |
| 13         | 121.3                     | 6.28 (d 3.5)<br>5.57 (d 3.1)         |
| 14         | 20.2                      | 1.21 (d 6.8)                         |
| 15         | 21.9                      | 1.25 (d 6.1)                         |

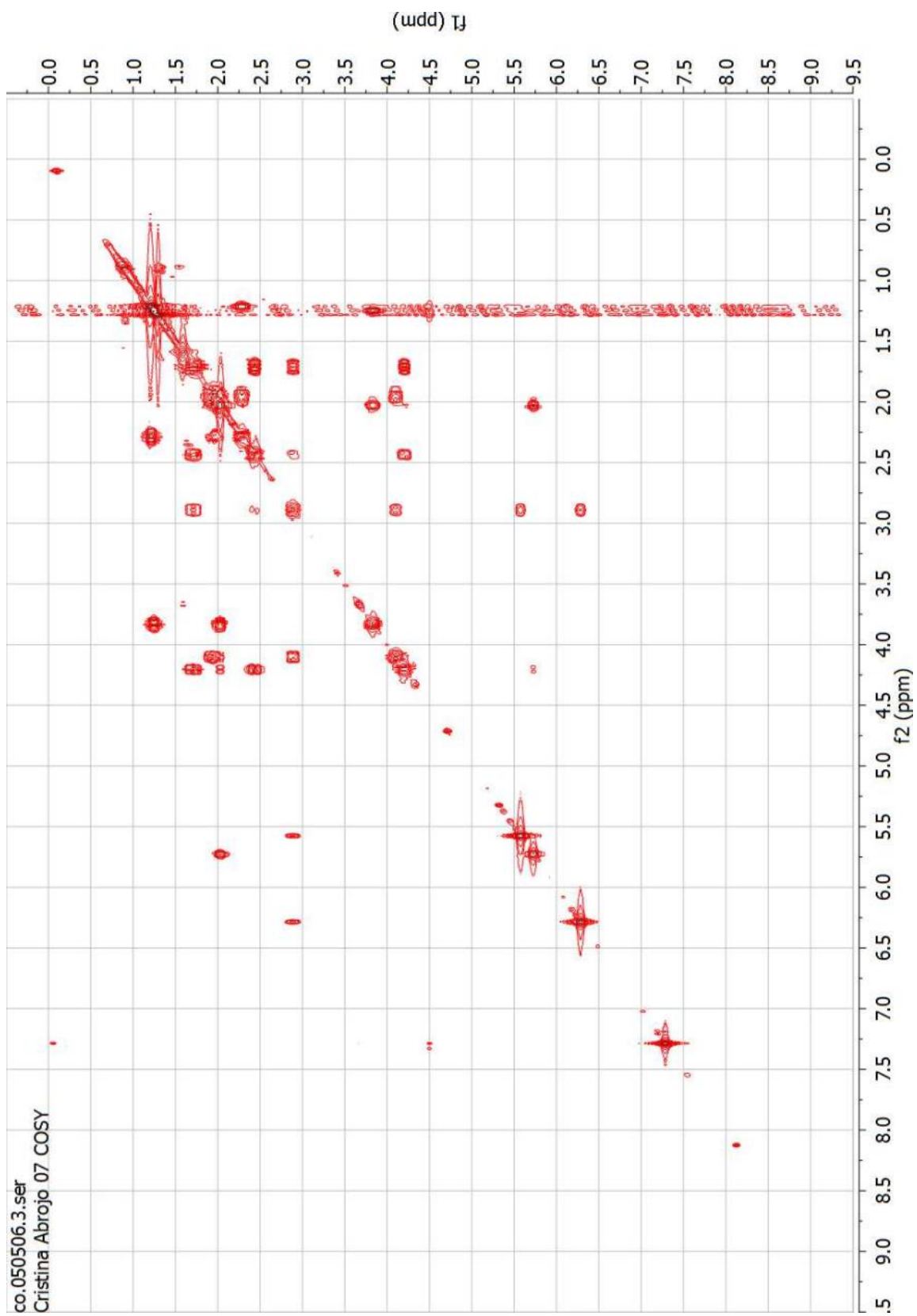


Figura 3.20. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de sesquiterpenolactona 1.

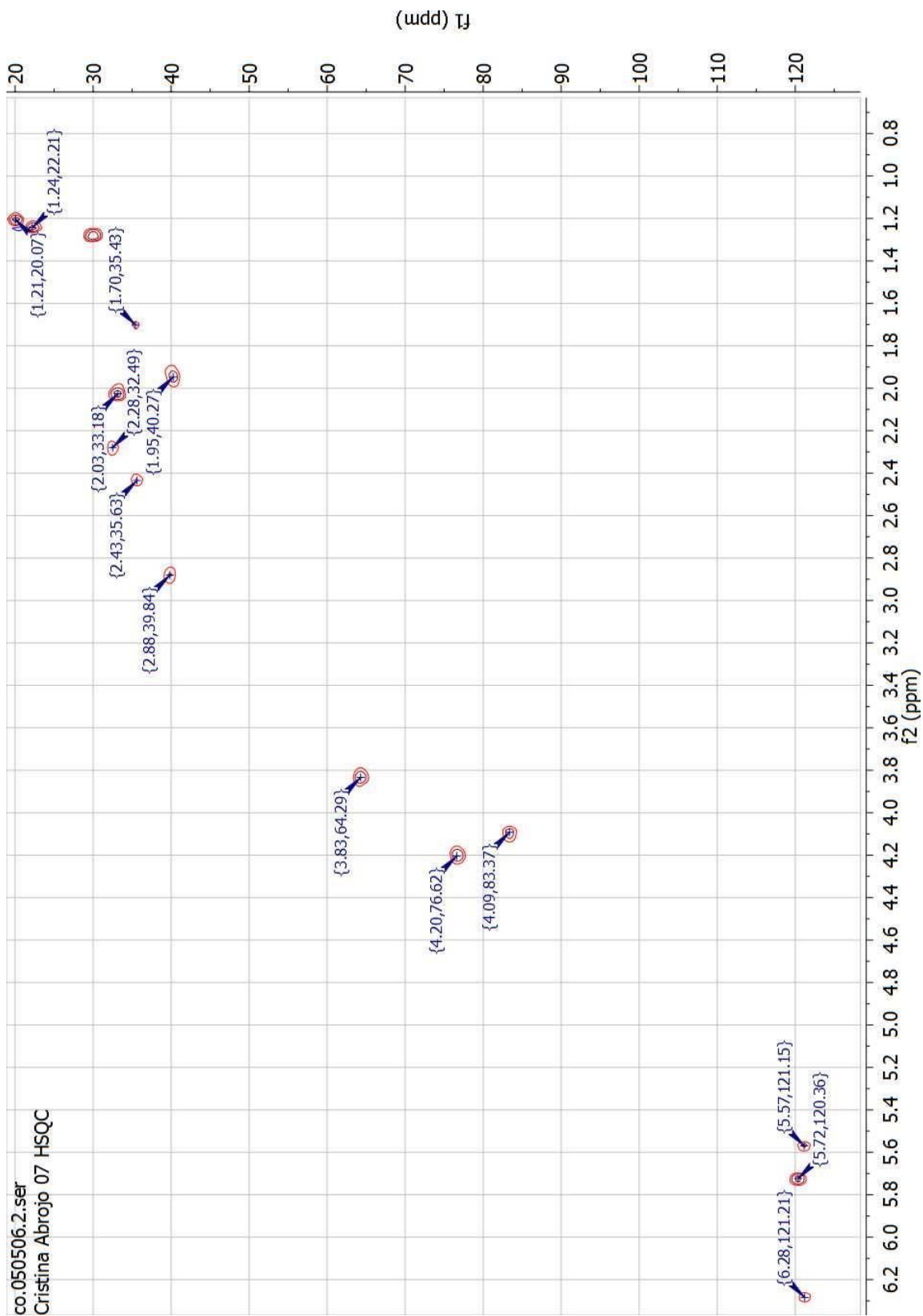


Figura 3.21. Espectro HSQC de sesquiterpenolactona 1.

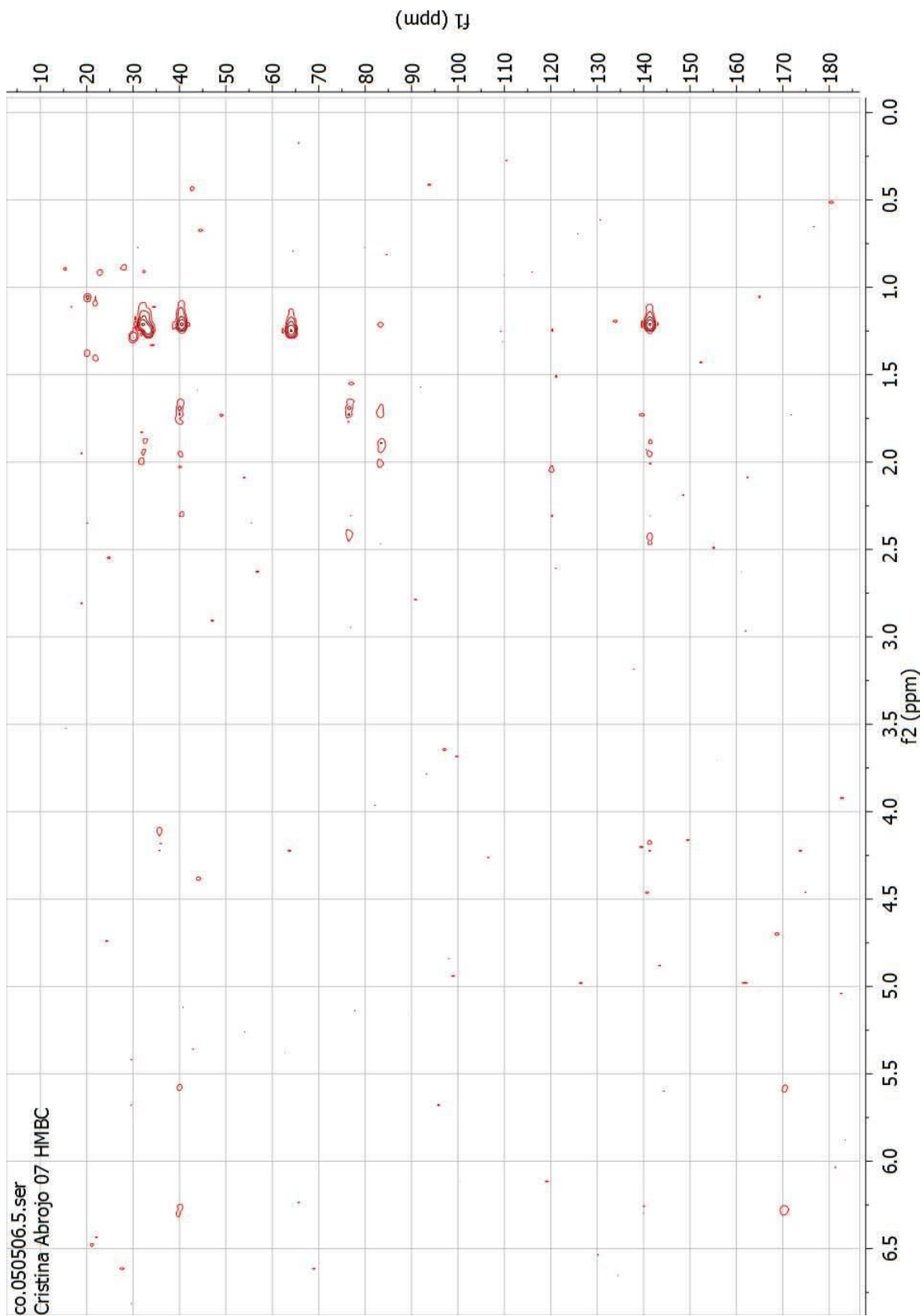


Figura 3.22. Espectro HMBC de sesquiterpenolactona 1.

A través de la correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, dos estructuras parciales fueron reveladas: **CHO(5)-CH<sub>2</sub>(6)-CH(7)-CH(8)-CH<sub>2</sub>(9)-CH(10)-CH<sub>3</sub>(14)** y **CH(2)-CH<sub>2</sub>(3)-CHO(4)-CH<sub>3</sub>(15)** (Fig. 3.23). Se observaron las siguientes correlaciones : H-13 y H-13' con  $\delta_{\text{H}}$  2.88 (H-7), H-7 con  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (H-8), 2.40 (H-6), 1.71(H-6'), 6.28 (H-13), 5.57 (H-13'); H-6 con  $\delta_{\text{H}}$  4.20 (H-5), 2.88 (H-7), 1.71 (H-6'); H-6' con  $\delta_{\text{H}}$  4.20 (H-5), 2.88 (H-7), 2.40 (H-6); H-5 con  $\delta_{\text{H}}$  2.40 (H-6), 1.71 (H-6'), H-8 con  $\delta_{\text{H}}$  2.88 (H-7), 1.96 (H-9), H-9 con  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (H-8), 2.30 (H-10), H-10 con  $\delta_{\text{H}}$  1.96 (H-9), 1.21 (H-14), H-14 con  $\delta_{\text{H}}$  2.30 (H-10), H-2 con  $\delta_{\text{H}}$  2.05 (H-3), H-3 con  $\delta_{\text{H}}$  5.72 (H-2), 3.80 (H-4), H-4 con  $\delta_{\text{H}}$  2.05 (H-3), 1.24 (H-15), H-15 con  $\delta_{\text{H}}$  3.80 (H-4).

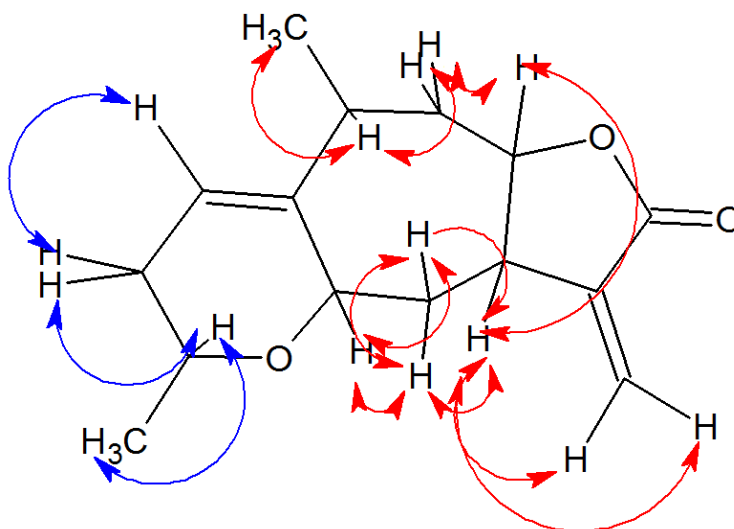


Figura 3.23. Correlaciones  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de sesquiterpenolactona 1.

La interconexión C-C de todos los fragmentos pudo ser establecida a través del espectro HMBC. Las correlaciones entre C<sub>4</sub>HO (64.1, 3.80) y C<sub>5</sub>HO (76.1, 4.20) localizaron el puente de oxígeno (Fig. 3.24). El doble enlace requerido para la fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub> pudo sólo ser localizado en la posición C1-C2, confirmado por la presencia de sólo un protón olefinico (5.72 ppm) y dos protones pertenecientes a los grupos C-CH-O (4.20,3.80 ppm).

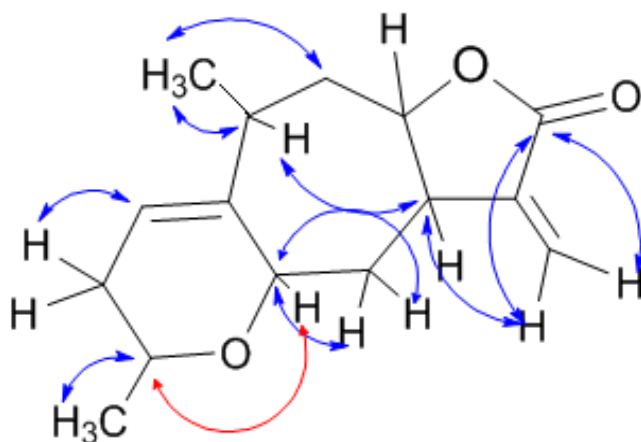


Figura 3.24. Algunas correlaciones importantes HMBC de sesquiterpenlactona 1.

La estereoquímica de **1** fue deducida mediante el estudio cuidadoso de los espectros NOE (Fig. 3.25 y 3.26) y de la inspección de un modelo molecular (Fig.3.27). Dichos datos identifican al compuesto **1** como 4 $\beta$ H,5 $\alpha$ H-epoxide-10 $\alpha$ H-8 $\beta$ H-xanthan-1(2), 11(13)-dien-8,12-olide (Figura 1).

Basados en las correlaciones NOE de H-7/H-10 y H-7/H-15 podemos decir que H-7, H-10 y H-15 se encuentran a un mismo lado de la molécula. La configuración trans de los protones H-7 y H-8 fue confirmada por la ausencia de correlación NOE entre H-7/H-8. Tampoco se observaron correlaciones entre H-4/H-5 y entre H-8/H-10.

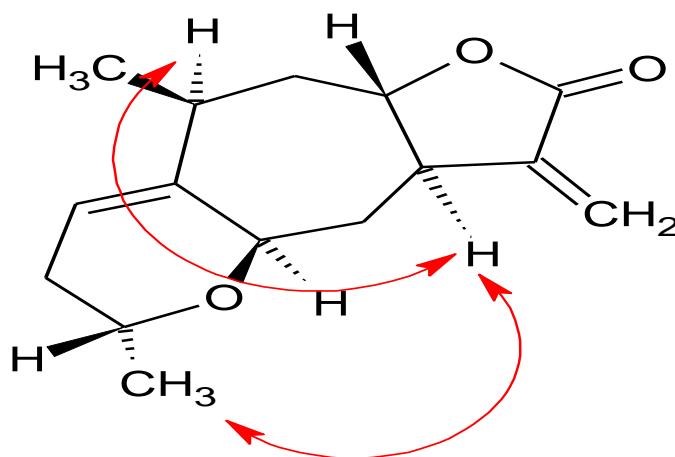


Figura 3.25. Algunas correlaciones NOE de sesquiterpenlactona 1.

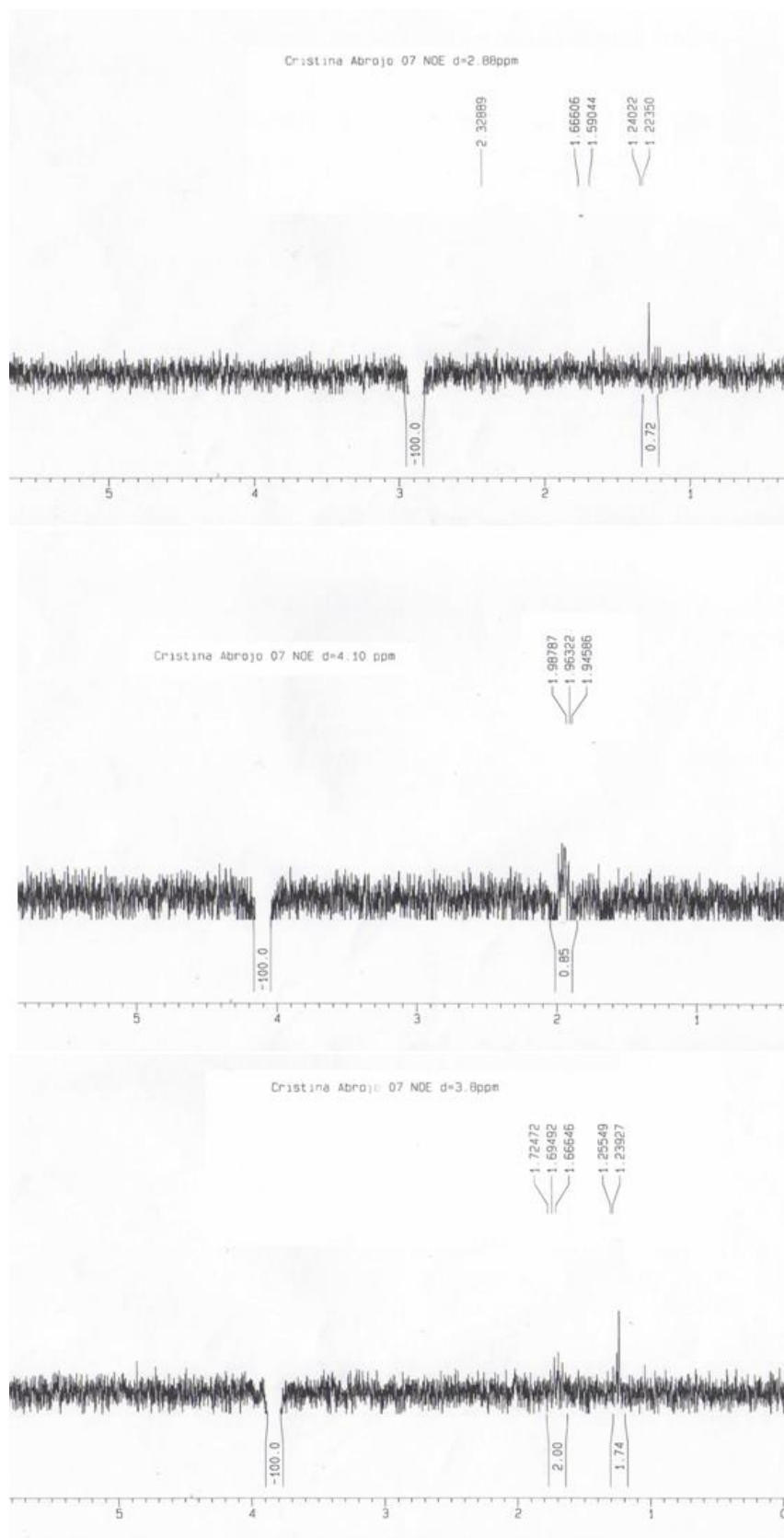


Figura 3.26. Espectros NOE de sesquiterpenolactona 1.



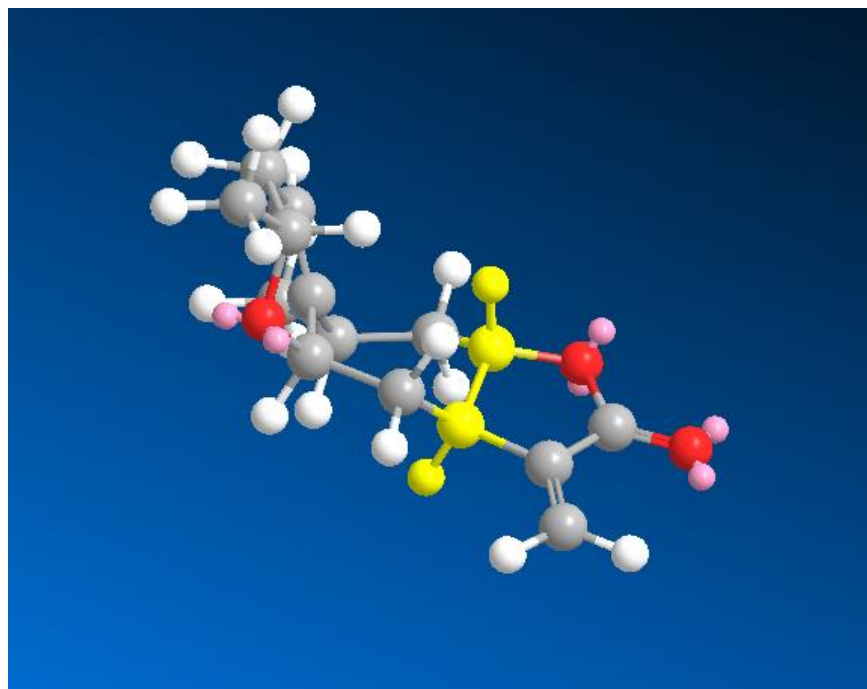


Figura 3.27. Conformación más estable obtenida por el programa de modelado molecular que corresponde a la esteoquímica propuesta.

### *Sesquiterpenlactona 2 y 3.*

Las partes hojas de *X. cavanillesii* (240 g) fueron extraídas por maceración con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 72 hs en la oscuridad y a temperatura ambiente. El residuo obtenido (14 g) fue purificado siguiendo el esquema de la figura 3.28. Se realizó una cromatografía a vacío (VLC) usando Silica gel y las fracciones obtenidas analizadas por TLC y Bioautografías. El extracto fue separado en ocho fracciones (hexano, hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  4:1, hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1:1,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -acetato de etilo 1:1, acetato de etilo, acetona, MeOH). La fracción más activa (acetato de etilo, 1.6 g) fue fraccionada por cromatografía flash sobre Silica gel usando como eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetona (10:1) y las fracciones obtenidas (20) analizadas por TLC y reunidas desde la 1 a la 6, las que posteriormente fueron fraccionadas por cromatografía flash sobre Silica gel usando como eluyente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetona (50:1) y las fracciones obtenidas (35) analizadas por TLC y reunidas desde la 23 a la 27. Las fracciones anteriores (23-27) fueron posteriormente fraccionadas por cromatografía flash en fase reversa (C18) eluyendo con un gradiente de  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  (desde 80:20 a 0:100, v/v) y las fracciones obtenidas (40) analizadas por TLC y reunidas desde la 18 a la 35. Finalmente mediante TLC

preparativa de la fracción 18-35 en Silica gel y desarrollada con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :acetona (6:1) se obtuvo la sesquiterpenlactona **2** (Fig. 3.29) y la sesquiterpenlactona **3** (Fig. 3.30).

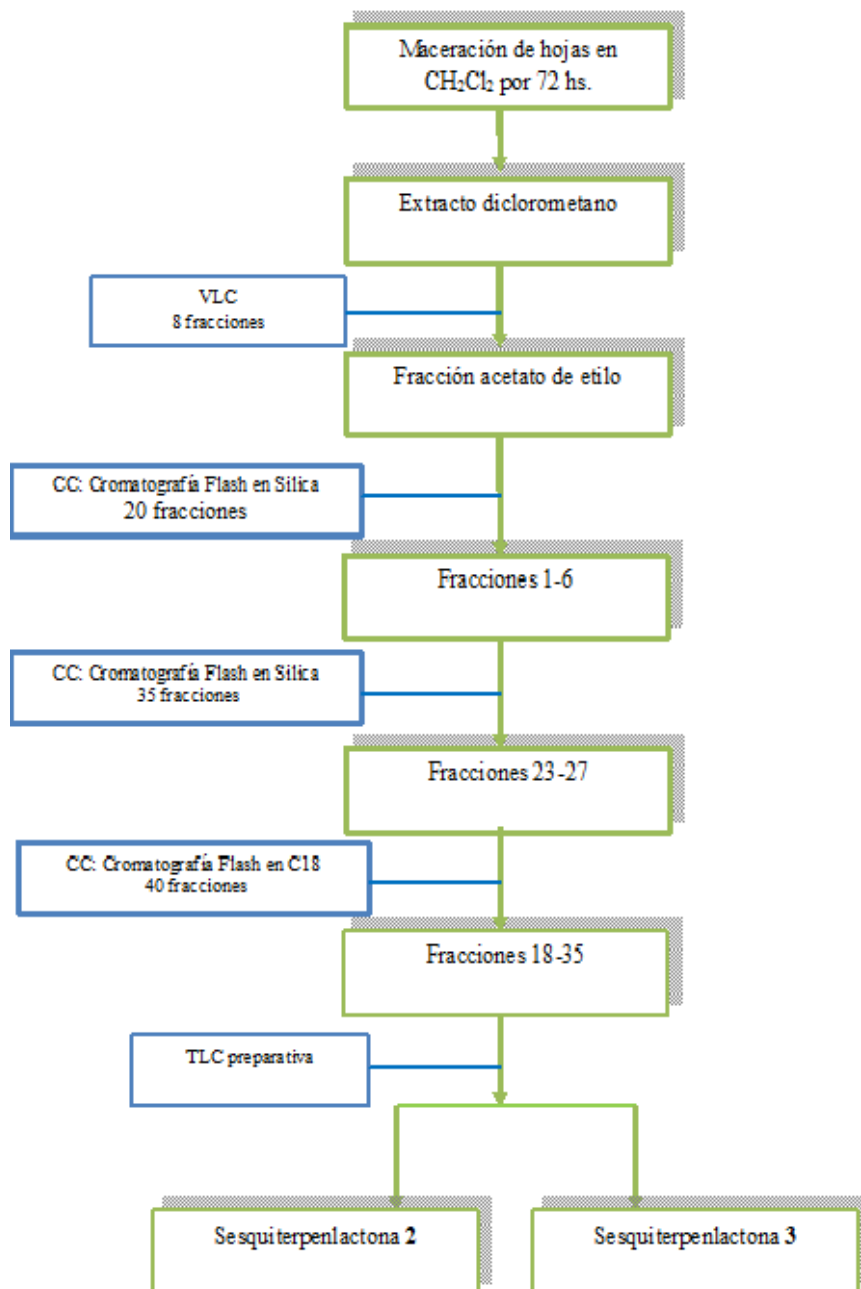


Figura 3.28. Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenlactona 2 y 3.

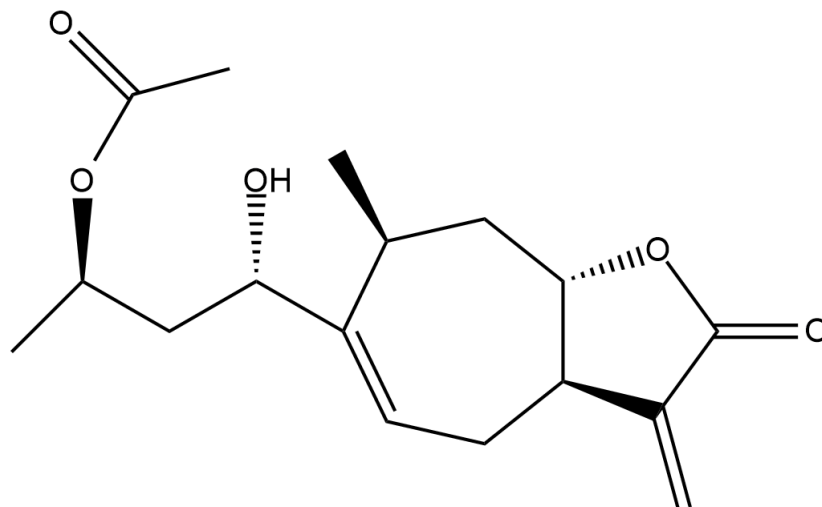


Figura 3.29. Estructura química sesquiterpenlactona 2.

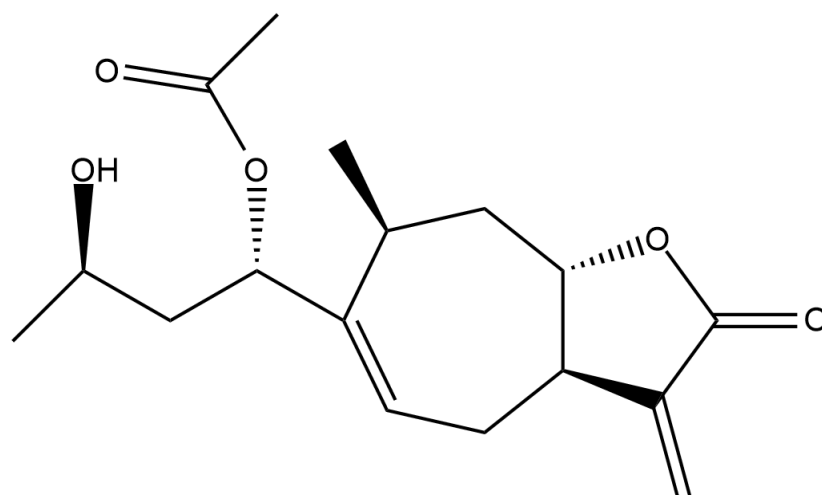


Figura 3.30. Estructura química sesquiterpenlactona 3.

### *Sesquiterpenlactona 2.*

El análisis mediante espectrometría de masas exactas ESI-HRMS en el modo positivo revela el ion aducto a  $m/z$  331.1557  $[M+Na]^+$  (Fig. 31) compatible con una sesquiterpenlactona de fórmula molecular  $C_{17}H_{24}O_5$ , lo que implica 6 grados de insaturación en la molécula.

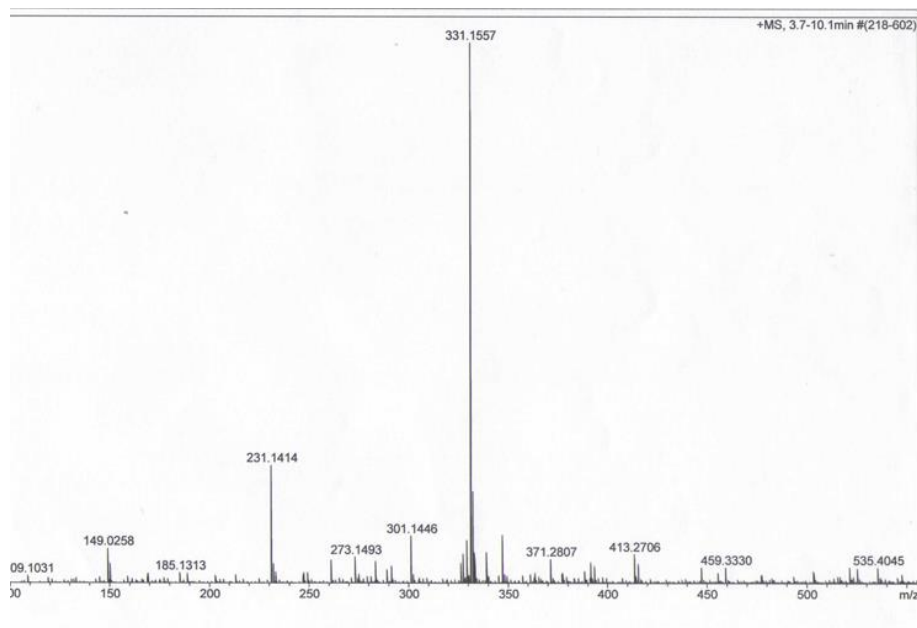


Figura 3.31. ESI-HRMS de sesquiterpenolactona 2 en modo positivo por infusión directa.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.32) exhibe diecisiete señales incluyendo tres metilos a 19.1 ppm (C-14), 19.8 ppm (C-15) y 20.5 ppm (metilo del grupo acetoxi), cuatro metilenos incluyendo uno olefínico a 117.6 ppm (C-13), 36.4 ppm (C-9), 24.6 ppm (C-6) y 41.5 ppm (C-3); seis metinos a 123.3 ppm (metino olefínico, C-5), 68.5 ppm (metino oxigenado unido a un grupo acetoxi, C-4), 74.8 ppm (metino oxigenado unido a un grupo hidroxilo, C-2), 82.9 ppm (metino oxigenado unido a la lactona, C-8), 48.1 ppm (C-7) y 29.1 ppm (C-10); y cuatro carbonos cuaternarios a 171.1 (carbonilo del grupo acetoxi), 170.7 (carbonilo de la lactona, C-12), 149.7 (C-1) y 140.0 ppm (C-11).

El espectro  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.33) muestra dos grupos metilos (dobletes) a  $\delta$  1.22 ppm (3 H, d,  $J=7.4$  Hz, Me-14) y 1.25 ppm (3 H, d,  $J=6.2$  Hz, Me-15), un metilo singulete del grupo acetoxi a  $\delta$  2.04 ppm, un metileno a  $\delta$  1.73 ppm (2 H, m, H-3), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.60 ppm (H, ddd,  $J=2.3, 9.4, 15.7$  Hz, H-6) y  $\delta$  2.16 ppm (H, ddd,  $J=3.4, 11.3, 15.8$  Hz, H-6'), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.30 ppm (H, ddd,  $J=3.0, 4.5, 11.9$  Hz, H-9) y  $\delta$  1.80 ppm (H, m, H-9'), un metileno olefínico exocíclico con dos dobletes a  $\delta$  6.11 ppm (1 H, d,  $J=3.4$  Hz, H-13) y  $\delta$  5.59 ppm (1 H,

d,  $J=3.2$  Hz, H-13'), dos metinos a  $\delta$  2.51 ppm (1H, m, H-7) y a  $\delta$  2.81 ppm (1H, m, H-10), tres metinos oxigenados a  $\delta$  4.03 ppm (1H, dd,  $J=5.3, 7.9$  Hz, H-2),  $\delta$  4.98 ppm (1H, m, H-4) y  $\delta$  4.41 ppm (1H, ddd,  $J=2.9, 10.1, 11.9$  Hz, H-8) y un metino olefínico a  $\delta$  5.85 ppm (1H, dd,  $J=3.4, 6.3$  Hz, H-5).

Usando diferentes métodos 2D de RMN: COSY (Fig. 3.34), HSQC (Fig. 3.35) y HMBC (Fig. 3.36) todas las señales pudieron ser asignadas (Tabla 3.2) y ésto sugiere que la estructura básica de **2** también fue xanthan-11 (13)-en-12,8-olide.

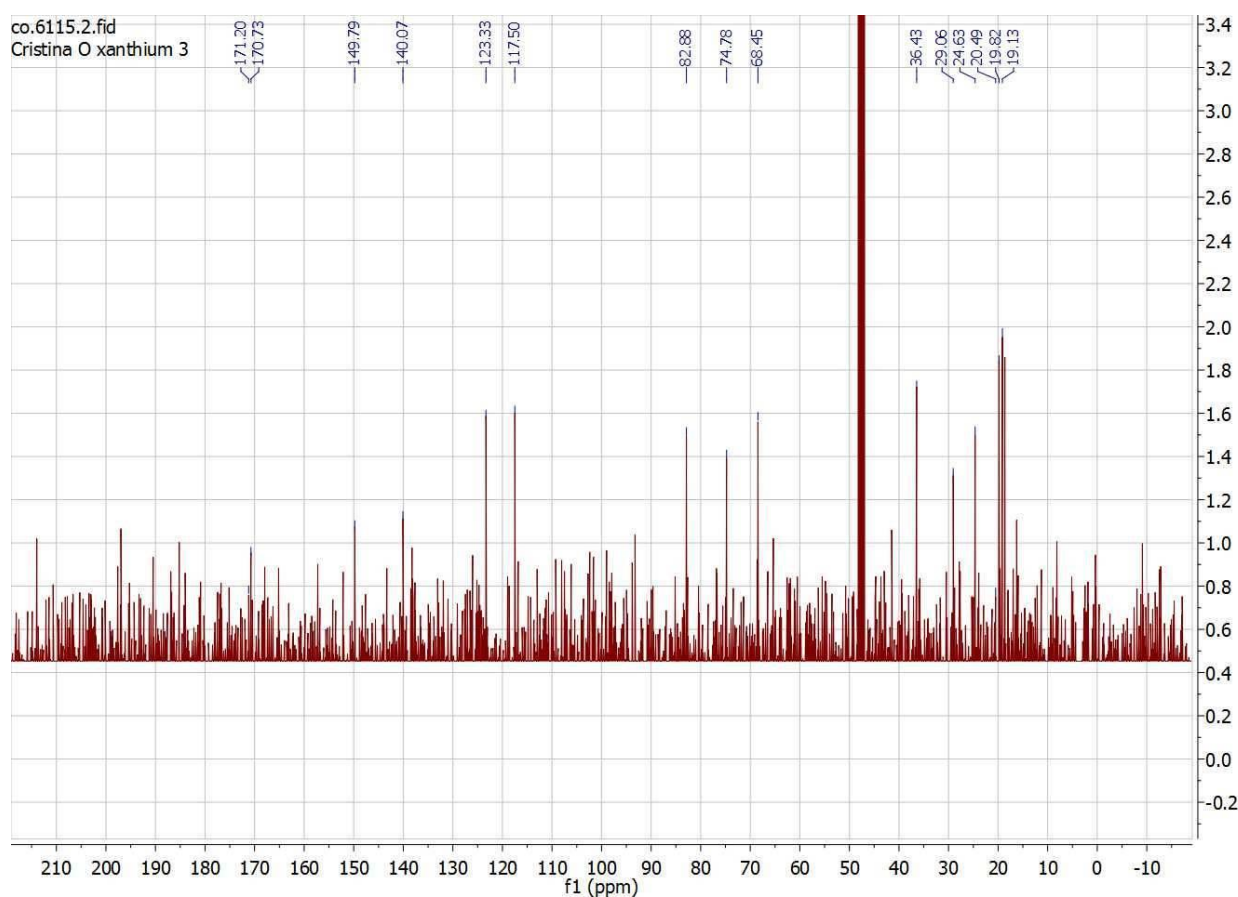


Figura 3.32. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN de sesquiterpenolactona 2 en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.

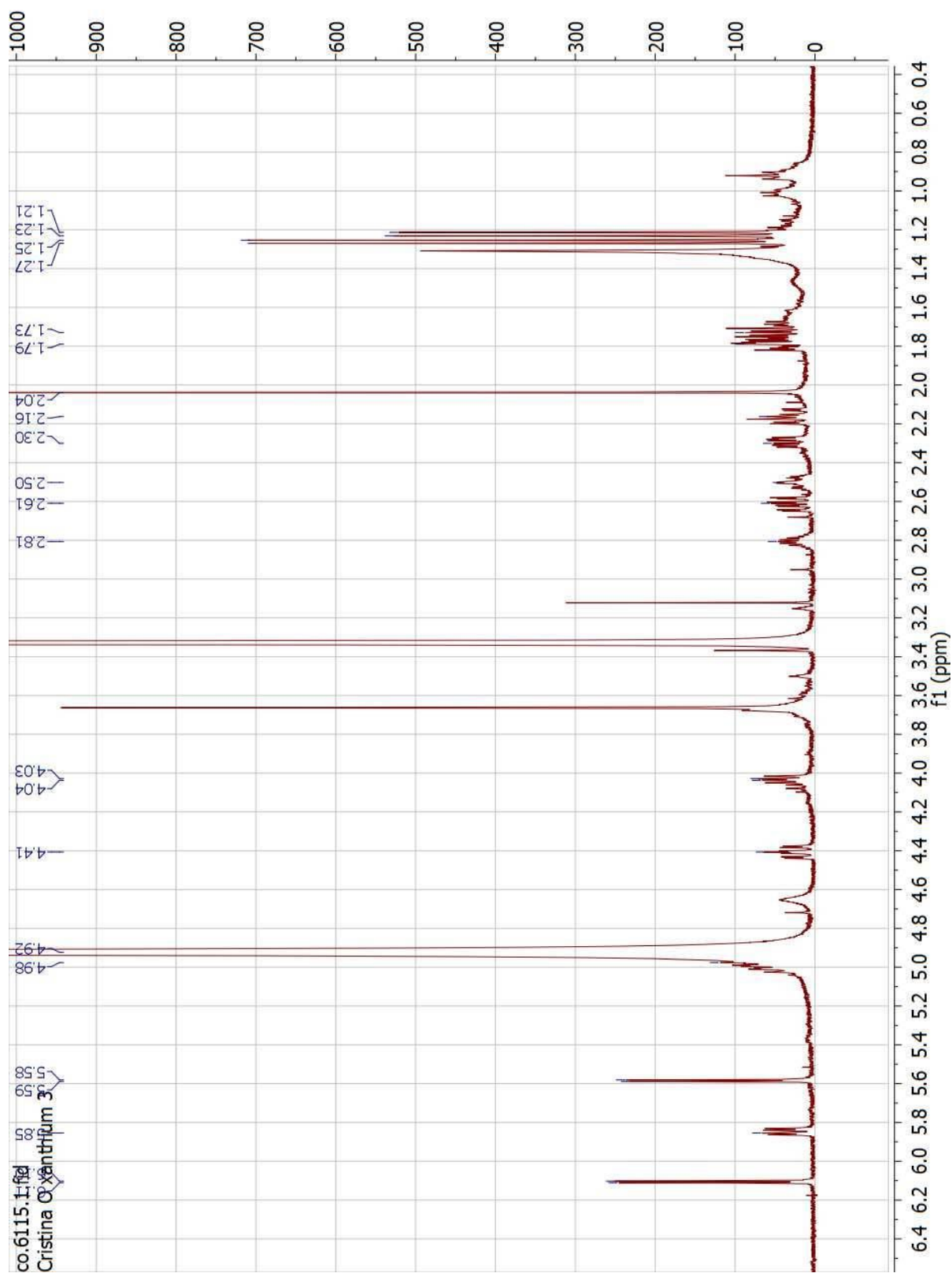
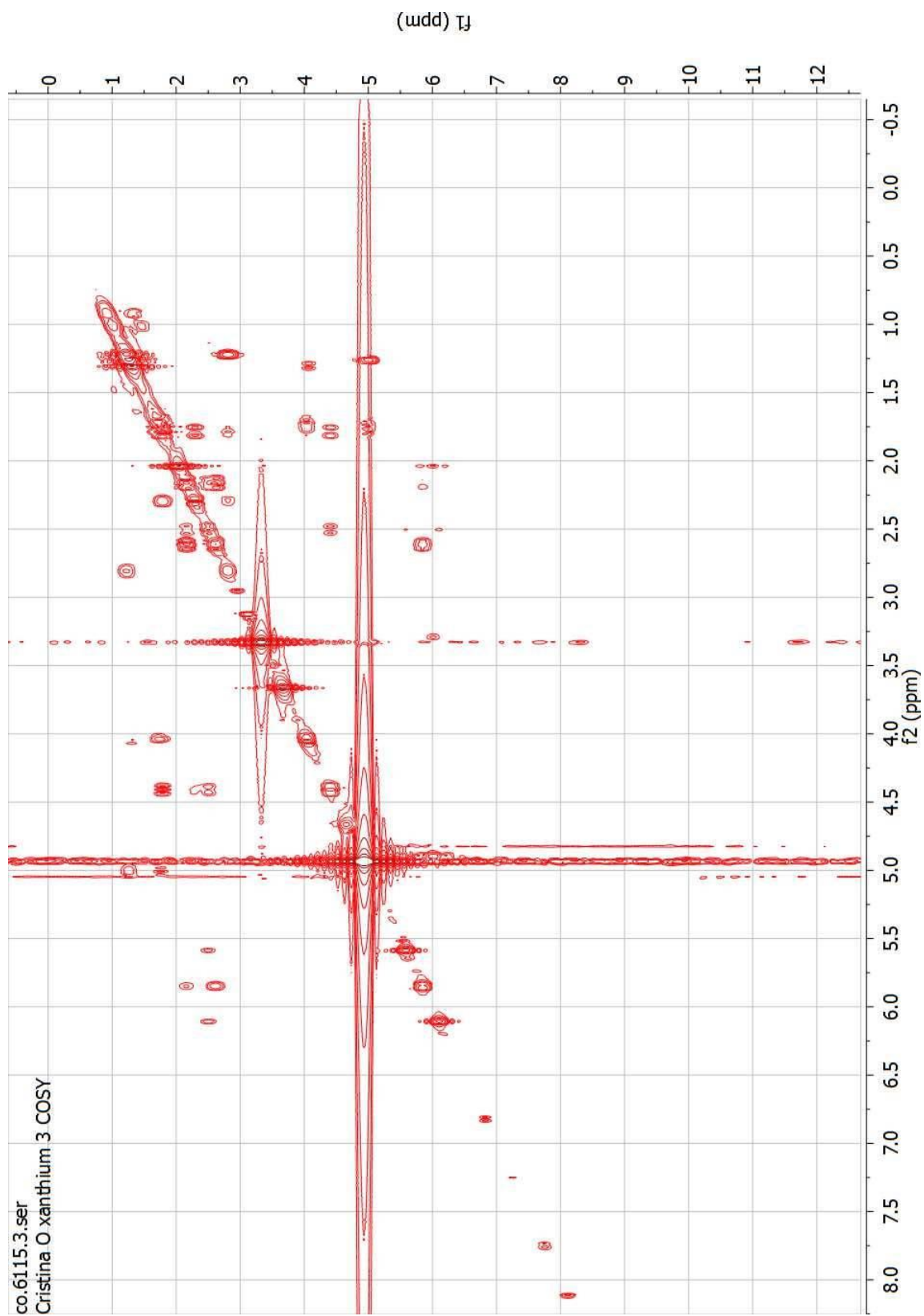


Tabla 3.2. Desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para sesquiterpenlactona 2.

| N° Carbono              | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)                           |
|-------------------------|---------------------------|---|
| 1                       | 149.7                     | ---   |
| 2                       | 74.8                      | 4.03 (dd 5.3, 7.9)                                      |
| 3                       | 41.5                      | 1.73 (m)  |
| 4                       | 68.5                      | 4.98 (m)  |
| 5                       | 123.3                     | 5.85 (dd 3.4, 6.3)                                      |
| 6                       | 24.6                      | 2.60 (ddd 2.3, 9.4, 15.7)<br>2.16 (ddd 3.4, 11.3, 15.8) |
| 7                       | 48.1                      | 2.51(m)   |
| 8                       | 82.9                      | 4.41(ddd 2.9, 10.1, 11.9)                               |
| 9                       | 36.4                      | 1.80 (m)<br>2.30 (ddd 3.0, 4.5, 12.3)                   |
| 10                      | 29.1                      | 2.81(m)   |
| 11                      | 140.0                     | ---   |
| 12                      | 170.7                     | ---   |
| 13                      | 117.6                     | 5.59 (d 3.2)<br>6.11 (d 3.4)                            |
| 14                      | 19.1                      | 1.22 (d 7.4)  |
| 15                      | 19.8                      | 1.25 (d 6.2)  |
| <b>CH<sub>3</sub>CO</b> | 20.5                      | 2.04 (s)  |
| <b>CH<sub>3</sub>CO</b> | 171.1                     | ---   |

Figura 3.34. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de sesquiterpenolactona 2.



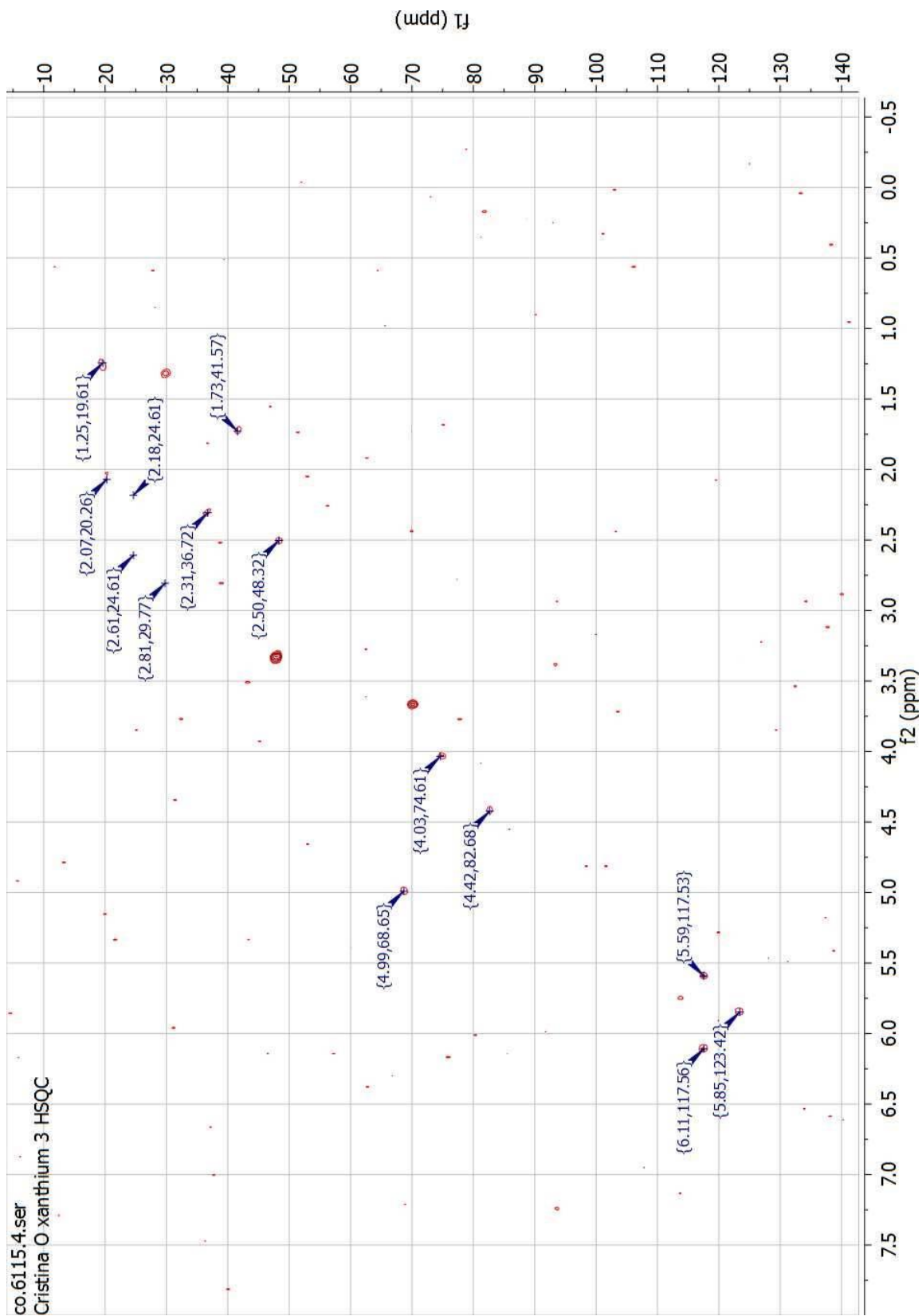


Figura 3.35. Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de sesquiterpenolactona 2.

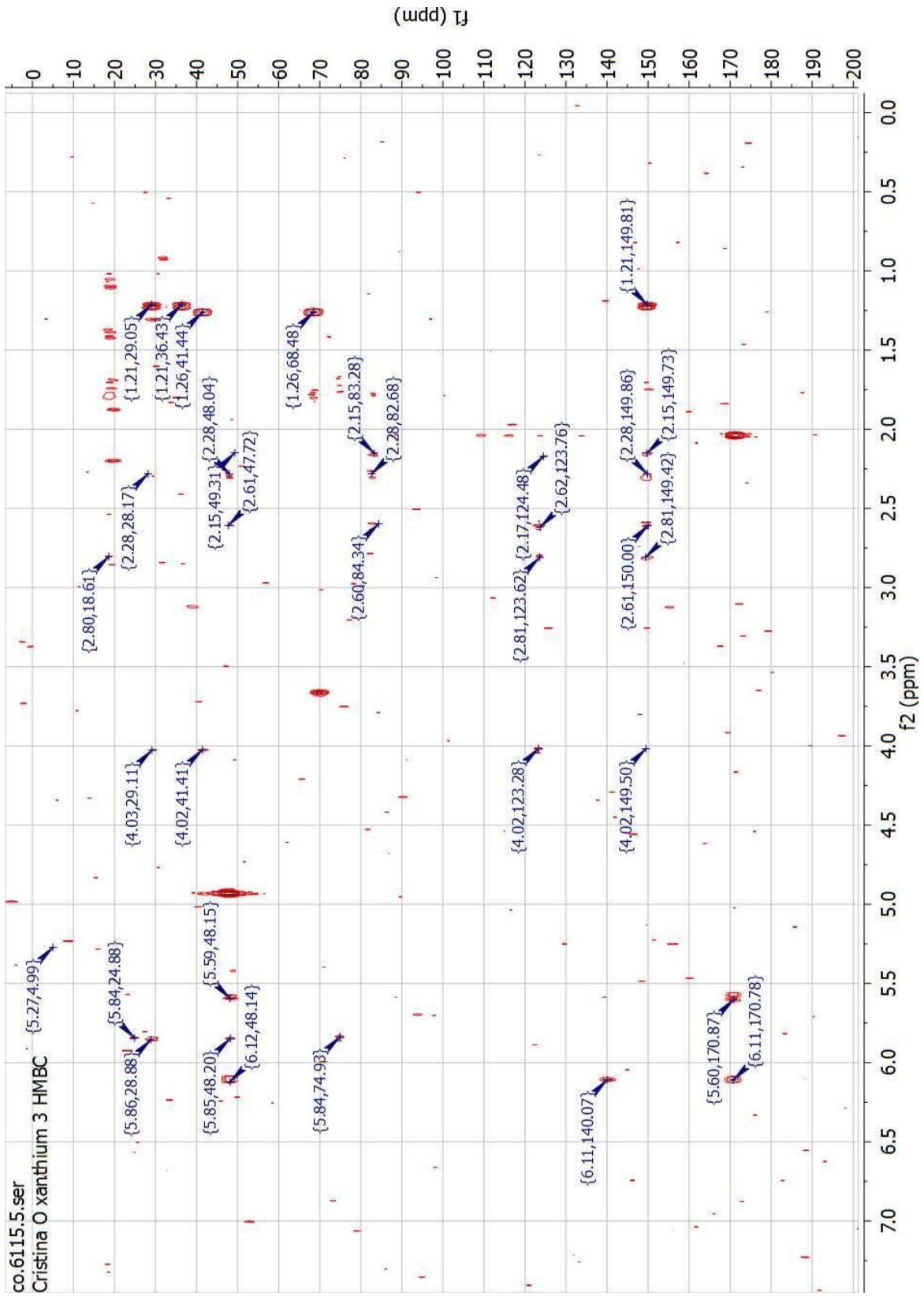


Figura 3.36. Espectro HMBC de sesquiterpenolactona 2.

Las ubicaciones del grupo acetoxi en C-4 (singulete a  $\delta$  2.04 ppm unido a un C de 20.5 ppm) y el grupo hidroxilo en C-2 son confirmadas por los experimentos 2 D de RMN (COSY, HSQC, y HMBC). En el espectro HMBC se observan las correlaciones  $^nJ$  ( $n=2$  o  $3$ ) entre H-15 ( $\delta$  1.25) y C-4 ( $\delta$  68.5) / C-3 ( $\delta$  41.5); la correlación entre H-3 ( $\delta$  1.73) y C-4 ( $\delta$  68.5); y entre H-2 ( $\delta$  4.03) y C-3 ( $\delta$  41.5) / C-5 ( $\delta$  123.3) / C-10 ( $\delta$  29.1). (Fig. 3.38) En el espectro COSY se observa el sistema de spin **CH(OH)(2)-CH<sub>2</sub>(3)-CH(OAc)(4)-CH<sub>3</sub>(15)** (Fig. 3.37).

Un metileno ( $\delta_C$  117.6), un metino ( $\delta_C$  123.3) y dos carbonos cuaternarios ( $\delta_C$  140.0 y  $\delta_C$  149.7), señalan la presencia de dos olefinas en la molécula. El protón olefinico en C-5 y la  $\gamma$ -lactona entre C-12 y C-8 fueron determinadas por los experimentos 2D de RMN (COSY, HSQC y HMBC). En el espectro HMBC se observan las correlaciones  $^nJ$  ( $n=2$  o  $3$ ) entre H-5 ( $\delta$  5.85) y C-10 ( $\delta$  29.1) / C-7 ( $\delta$  48.1) / C-6 ( $\delta$  24.6) / C-2 ( $\delta$  74.8); entre H-6 ( $\delta$  2.60) y C-1 ( $\delta$  149.7) / C-7 ( $\delta$  48.1) / C-8 ( $\delta$  82.9) / C-5 ( $\delta$  123.3); entre H-6' ( $\delta$  2.16) y C-1 ( $\delta$  149.7) / C-7 ( $\delta$  48.1) / C-8 ( $\delta$  82.9); entre H-14 ( $\delta$  1.22) y C-10 ( $\delta$  29.1) / C-1 ( $\delta$  149.7) / C-9 ( $\delta$  36.4); entre H13 ( $\delta$  5.59) y C-12 ( $\delta$  170.7) / C-7 ( $\delta$  48.1); entre H13' ( $\delta$  6.11) y C-11 ( $\delta$  140.0) / C-12 ( $\delta$  170.7) / C-7 ( $\delta$  48.1); entre H-10 ( $\delta$  2.81) y C-14 ( $\delta$  19.1) / C-5 ( $\delta$  123.3) (Fig. 3.38). En el espectro COSY se observa el otro sistema de spin de la molécula **CH(CH<sub>3</sub>)(10)-CH<sub>2</sub>(9)-CH(8)-CH(7)-CH<sub>2</sub>(6)-CH(5)** (Fig. 3.37).

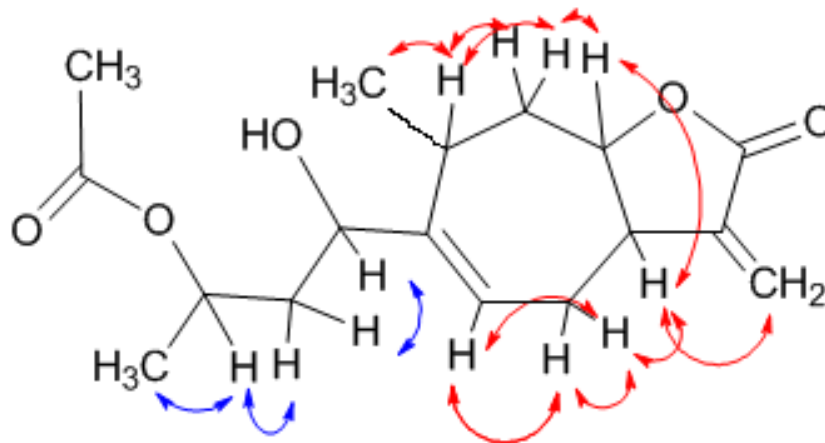


Figura 3.37. Correlaciones  $^1H$ - $^1H$  COSY de sesquiterpenolactona 2.

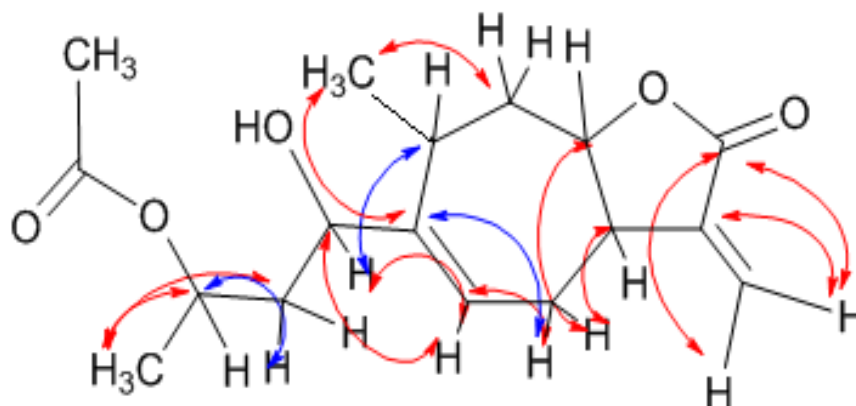


Figura 3.38 . Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenolactona 2.

En bases a sus espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y a comparación con datos bibliográficos (Marco et al., 1993) la sesquiterpenolactona 2 fue identificada como **4-epi-isoxanthanol**. Se descartó que la molécula fuera isoxanthanol debido a que  $J_{2,3}$  difiere de  $J_{2,3'}$  (Bohlmann & Zdero, 1981; Marco et al., 1993). Para isoxanthanol  $J_{2,3} = J_{2,3'} = 7$  Hz (Marco et al., 1993).

### Sesquiterpenolactona 3.

El análisis mediante espectrometría de masas por EI-MS (Fig. 3.39) dió como pico base el ion  $m/z$  43 [ $\text{H}_3\text{CCO}^+$ ] y otros iones abundantes a  $m/z$  204 [ $\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}^+$ ],  $m/z$  189 [ $204-\text{CH}_3^+$ ],  $m/z$  176 [ $204-\text{CO}$ ].

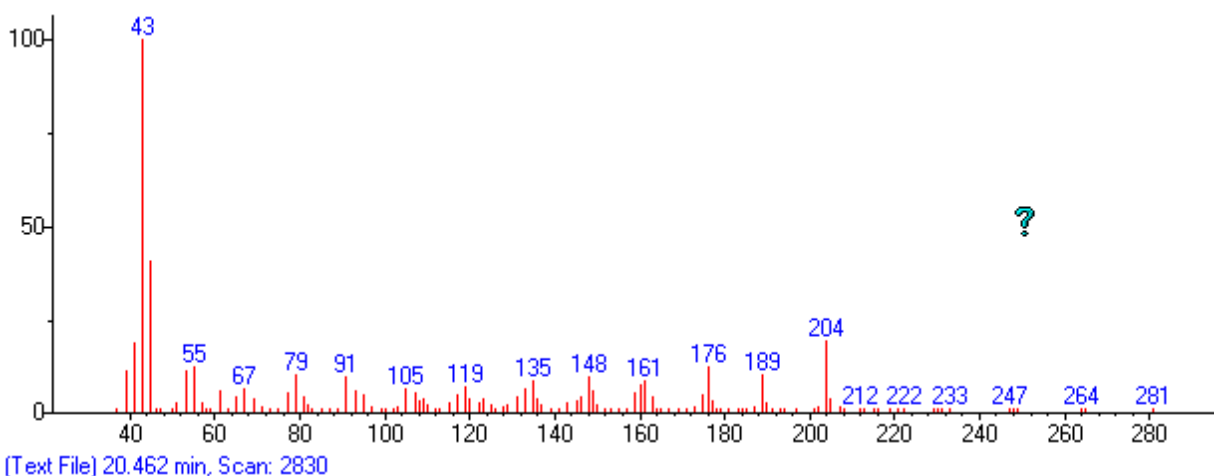
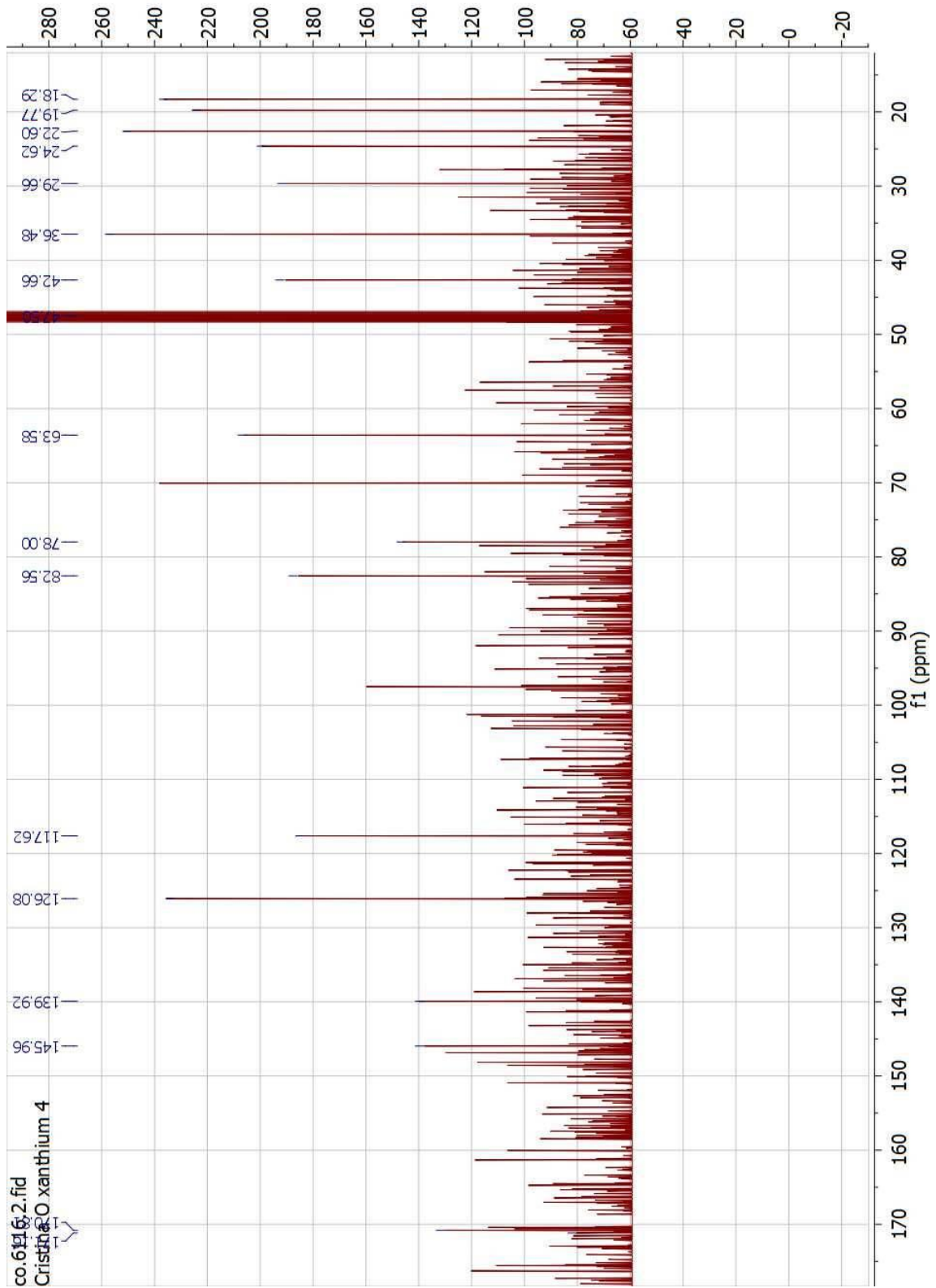


Figura 3.39: Espectro de masas EI-MS de sesquiterpenolactona 3.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.40) exhibe diecisiete señales incluyendo tres metilos a 18.3 ppm (C-14), 22.6 ppm (C-15) y 19.8 ppm (metilo del grupo acetoxi), cuatro metilenos incluyendo uno olefínico a 117.6 ppm (C-13), 36.5 ppm (C-9), 24.6 ppm (C-6) y 42.7 ppm (C-3); seis metinos a 126.1 ppm (metino olefínico, C-5), 63.6 ppm (metino oxigenado unido a un grupo hidroxilo, C-4), 78.0 ppm (metino oxigenado unido a un grupo acetoxi, C-2), 82.6 ppm (metino oxigenado unido a la lactona, C-8), 47.3 ppm (C-7) y 29.7 ppm (C-10); y cuatro carbonos cuaternarios a 170.8 (carbonilo del grupo acetoxi), 170.8 (carbonilo de la lactona, C-12), 146.0 (C-1) y 139.9 ppm (C-11).

El espectro  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.41) muestra dos grupos metilos (dobletes) a  $\delta$  1.16 ppm (3 H, d,  $J=7.4$  Hz, Me-14) y 1.21 ppm (3 H, d,  $J=6.2$  Hz, Me-15), un metilo singulete del grupo acetoxi a  $\delta$  2.04 ppm, un metileno con dos señales a  $\delta$  1.83 ppm (H, m, H-3) y a  $\delta$  1.64 ppm (H, m, H-3'), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.63 ppm (H, ddd,  $J=2.3, 9.7, 16.2$  Hz, H-6) y  $\delta$  2.15 ppm (H, ddd,  $J=3.7, 11.0, 16.1$  Hz, H-6'), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.28 ppm (H, ddd,  $J=3.0, 4.5, 12.5$  Hz, H-9) y  $\delta$  1.77 ppm (H, td,  $J=3.7, 12.4, 12.4$  Hz, H-9'), un metileno olefínico exocíclico con dos dobletes a  $\delta$  6.11 ppm (1 H, d,  $J=3.3$  Hz, H-13) y  $\delta$  5.59 ppm (1 H, d,  $J=3.2$  Hz, H-13'), dos metinos a  $\delta$  2.49 ppm (1H, m, H-7) y a  $\delta$  2.84 ppm (1H, m, H-10), tres metinos oxigenados a  $\delta$  5.31 ppm (1H, dd,  $J=4.3, 9.8$  Hz, H-2),  $\delta$  3.76 ppm (1H, m, H-4) y  $\delta$  4.39 ppm (1H, ddd,  $J=2.8, 10.0, 11.8$  Hz, H-8) y un metino olefínico a  $\delta$  5.96 ppm (1H, dd,  $J=3.6, 9.4$  Hz, H-5).

Figura 3.40. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN de sesquiterpenolactona 3 en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.

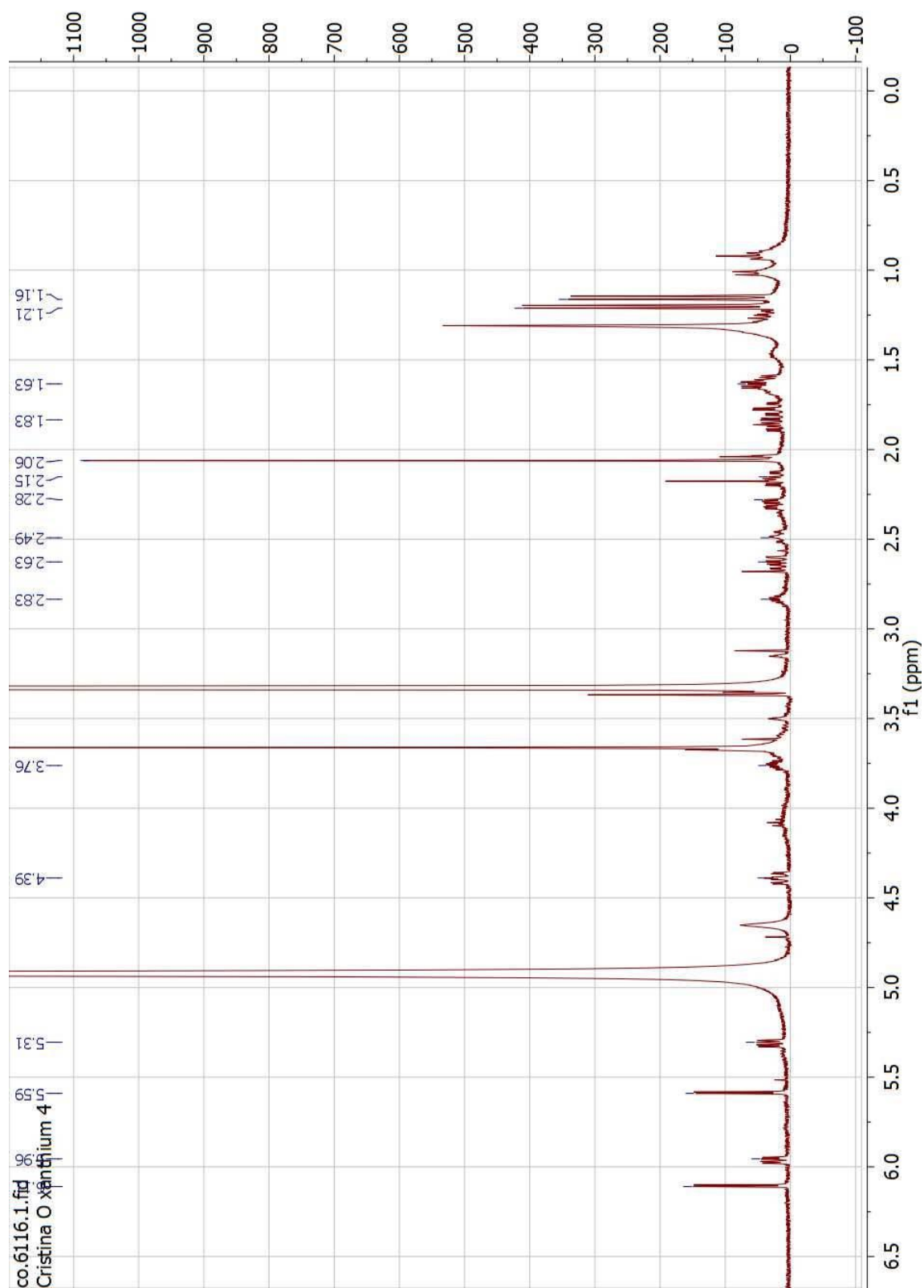


Figura 3.41. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de sesquiterpenolactona 3 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

Usando diferentes métodos 2D de RMN: COSY (Fig. 3.42), HSQC (Fig. 3.43) y HMBC (Fig. 3.44) todas las señales pudieron ser asignadas (Tabla 3.3) y ésto sugiere que la estructura básica de **2** también fue xanthan-11 (13)-en-12,8-olide.

Tabla 3.3. Desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para sesquiterpenlactona 3.

| N° Carbono              | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)                           |
|-------------------------|---------------------------|---|
| 1                       | 146.0                     | ---   |
| 2                       | 78.0                      | 5.31 (dd 4.3, 9.8)                                      |
| 3                       | 42.7                      | 1.83 (m)<br>1.64 (m)                                    |
| 4                       | 63.6                      | 3.76 (m)  |
| 5                       | 126.1                     | 5.96 (dd 3.6, 9.4)                                      |
| 6                       | 24.6                      | 2.63 (ddd 2.3, 9.7, 16.2)<br>2.15 (ddd 3.7, 11.0, 16.1) |
| 7                       | 47.3                      | 2.49 (m)  |
| 8                       | 82.6                      | 4.39 (ddd 2.8, 10.0, 11.8)                              |
| 9                       | 36.5                      | 2.28 (ddd 3.0, 4.5, 12.5)<br>1.77 (td 3.7, 12.4, 12.4)  |
| 10                      | 29.7                      | 2.84 (m)  |
| 11                      | 139.9                     | ---   |
| 12                      | 170.6                     | ---   |
| 13                      | 117.6                     | 5.59 (d 3.2)<br>6.11 (d 3.3)                            |
| 14                      | 18.3                      | 1.16 (d 7.4)  |
| 15                      | 22.6                      | 1.21 (d 6.2)  |
| <b>CH<sub>3</sub>CO</b> | 19.8                      | 2.06 (s)  |
| <b>CH<sub>3</sub>CO</b> | 170.8                     | ---   |



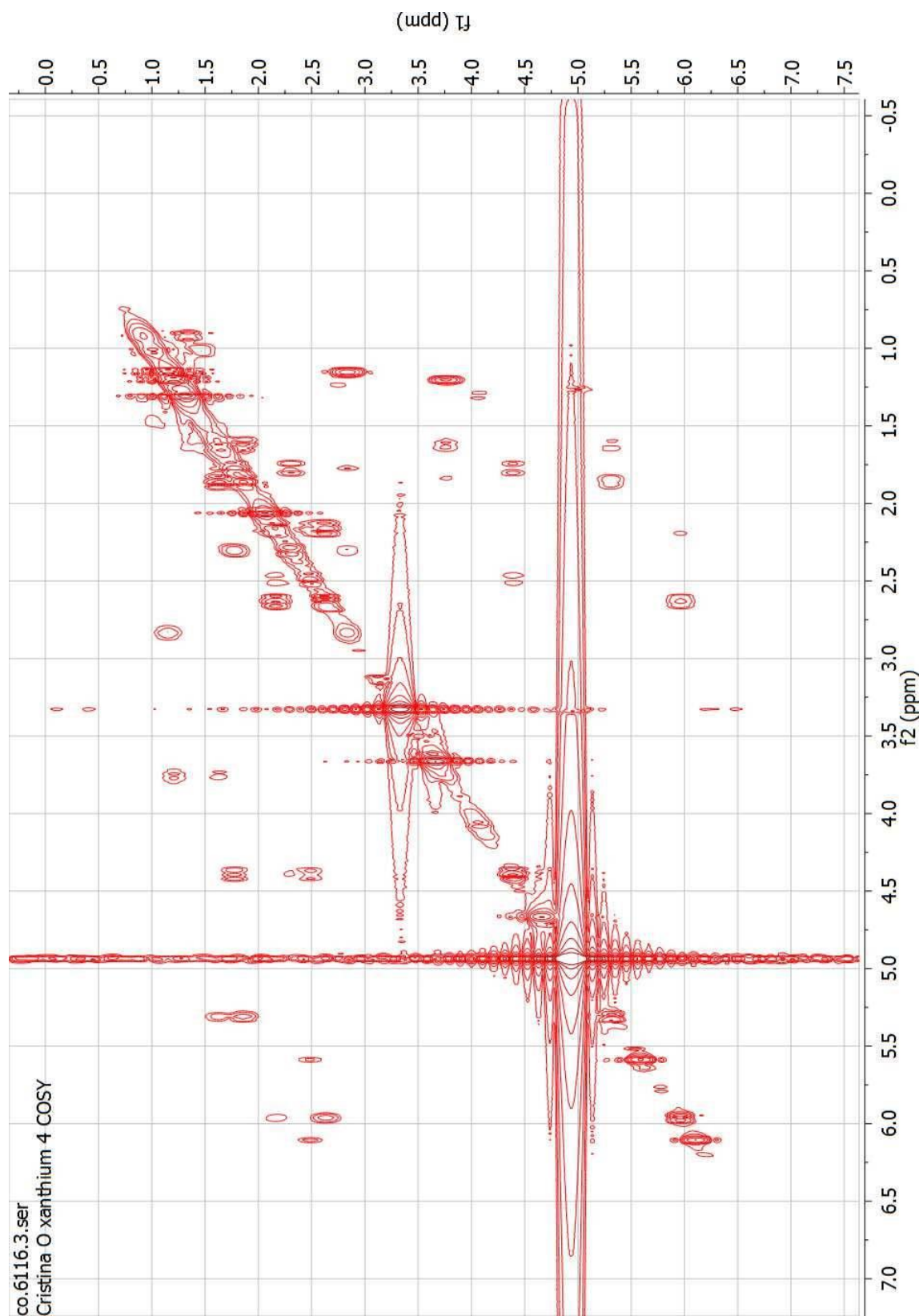


Figura 3.42. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de sesquiterpenolactona 3.

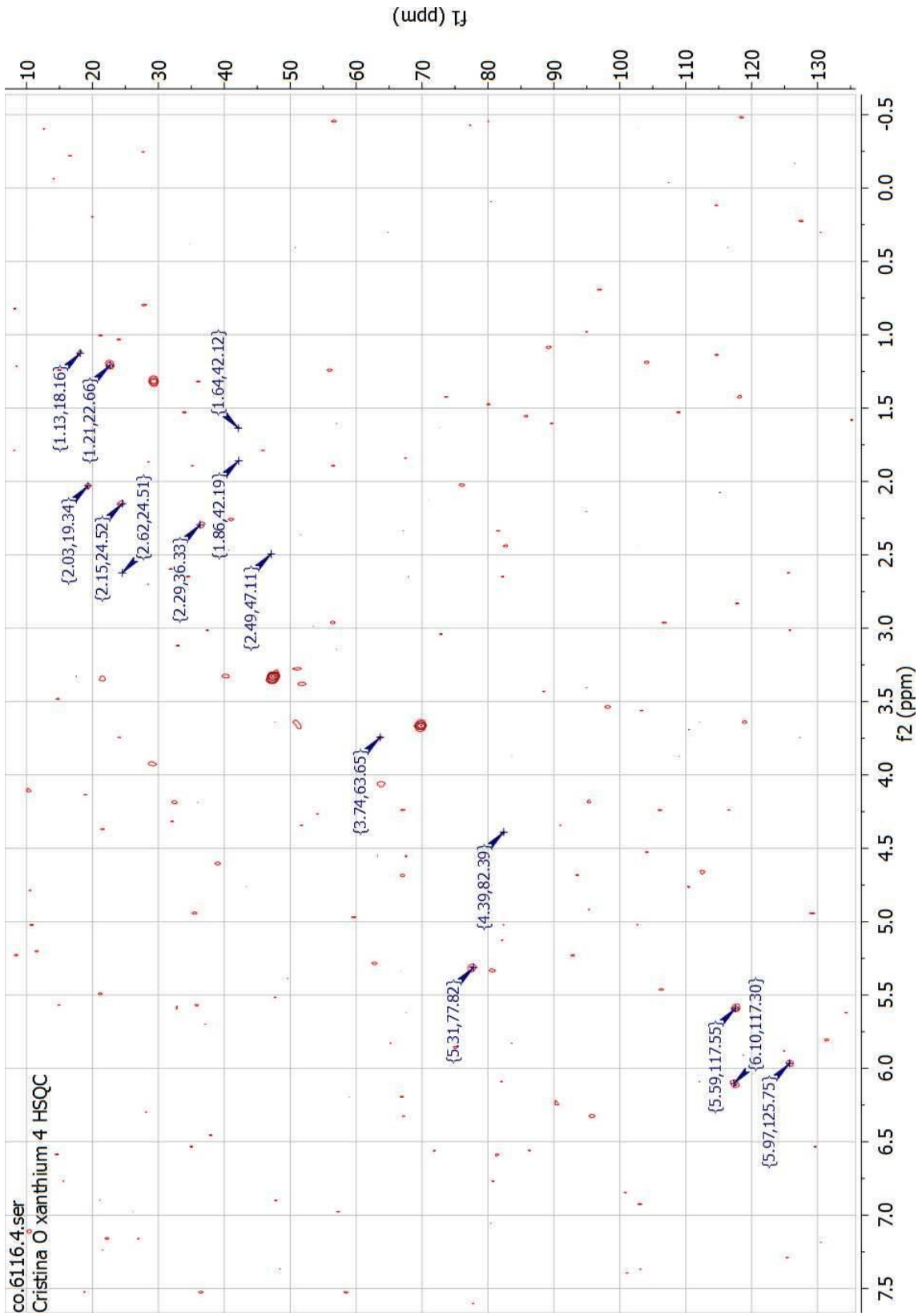


Figura 3.43. Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de sesquiterpenolactona 3.

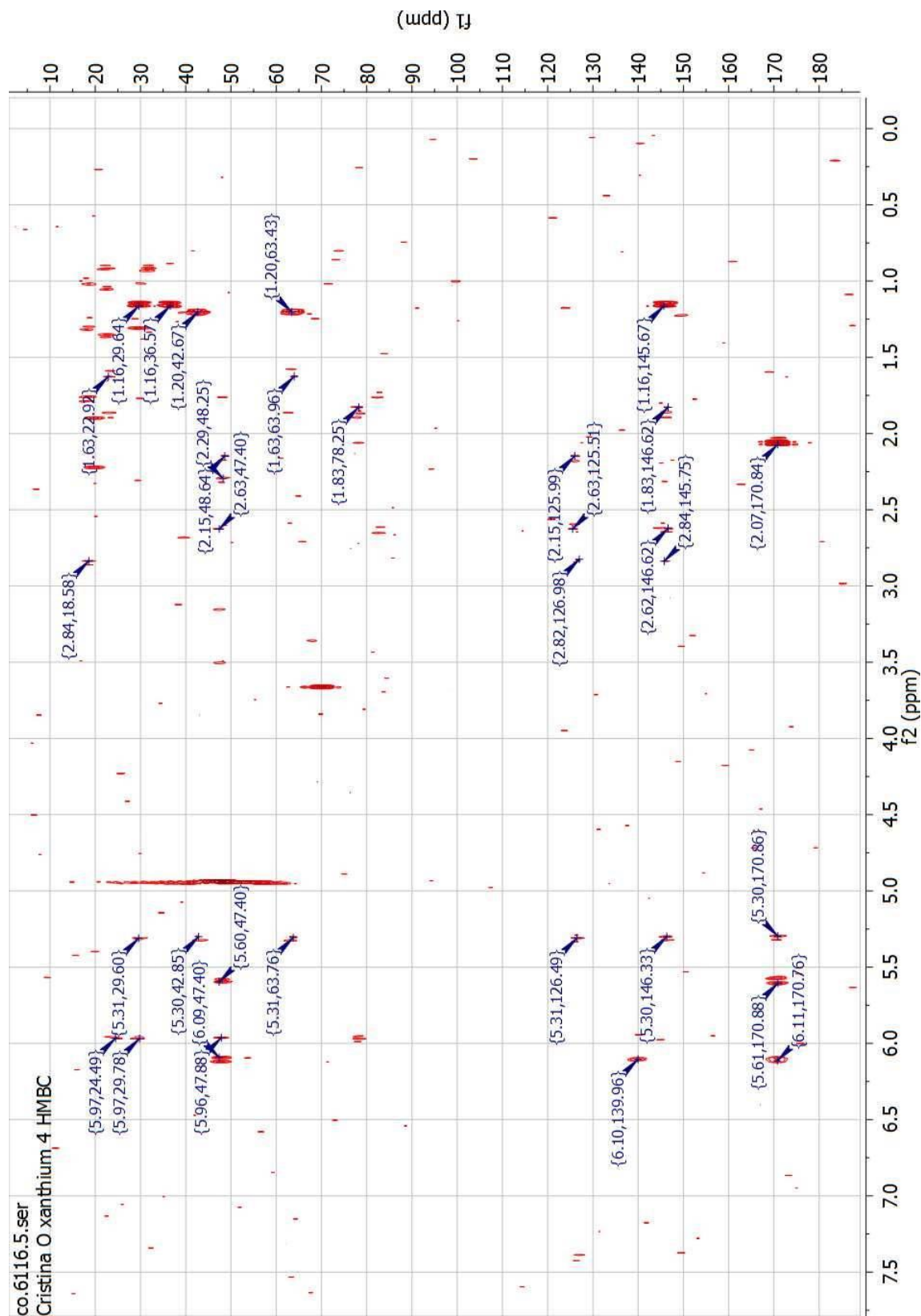


Figura 3.44. Espectro HMBC de sesquiterpenolactona 3.

Las ubicaciones del grupo acetoxi en C-2 (singulete a  $\delta$  2.06 ppm unido a un C de 19.8 ppm) y el grupo hidroxilo en C-4 son confirmadas por los experimentos 2 D de RMN (COSY, HSQC, y HMBC). En el espectro HMBC se observan las correlaciones  $^nJ$  ( $n=2$  o  $3$ ) entre H-15 ( $\delta$  1.21) y C-4 ( $\delta$  63.6) / C-3 ( $\delta$  42.7); la correlación entre H-3 ( $\delta$  1.83) y C-4 ( $\delta$  63.6) / C-2 ( $\delta$  78.0); la correlación entre H-3' ( $\delta$  1.64) y C-4 ( $\delta$  63.6) / C-15 ( $\delta$  22.6); y la correlación entre H-2 ( $\delta$  5.31) y el carbono carbonílico del grupo acetoxi  $\text{CH}_3\text{CO}$  ( $\delta$  170.8) / C-1 ( $\delta$  146.0) / C-3 ( $\delta$  42.7) / C-4 ( $\delta$  63.6) / C-5 ( $\delta$  126.1) / C-10 ( $\delta$  29.7) (Fig. 3.46). En el espectro COSY se observa el sistema de spin  $\text{CH}(\text{OAc})(2)\text{-CH}_2(3)\text{-CH}(\text{OH})(4)\text{-CH}_3(15)$  (Fig. 3.45).

Un metileno ( $\delta_c$  117.6), un metino ( $\delta_c$  126.1) y dos carbonos cuaternarios ( $\delta_c$  139.9 y  $\delta_c$  146.0), señalan la presencia de dos olefinas en la molécula. El protón olefinico en C-5 y la  $\gamma$ -lactona entre C-12 y C-8 fueron determinadas por los experimentos 2D de RMN (COSY, HSQC y HMBC). En el espectro HMBC se observan las correlaciones  $^nJ$  ( $n=2$  o  $3$ ) entre H-5 ( $\delta$  5.96) y C-10 ( $\delta$  29.7) / C-7 ( $\delta$  47.3) / C-6 ( $\delta$  24.6) / C-2 ( $\delta$  78.0); entre H-6 ( $\delta$  2.63) y C-1 ( $\delta$  146.0) / C-7 ( $\delta$  47.3) / C-5 ( $\delta$  126.1); entre H-6' (2.15) y C-7 ( $\delta$  47.3) / C-5 ( $\delta$  126.1); entre H-14 ( $\delta$  1.16) y C-10 ( $\delta$  29.7) / C-1 ( $\delta$  146.0) ; entre H13 ( $\delta$  5.59) y C-12 ( $\delta$  170.6) / C-7 ( $\delta$  47.3); entre H13' ( $\delta$  6.11) y C-11 ( $\delta$  139.9) / C-12 ( $\delta$  170.8) / C-7 ( $\delta$  47.3); entre H-10 ( $\delta$  2.84) y C-14 ( $\delta$  18.3) / C-5 ( $\delta$  126.1) / C-1 ( $\delta$  146.0); entre H-9 ( $\delta$  2.28) y C-7 ( $\delta$  47.3) (Fig. 3.46). En el espectro COSY se observa el otro sistema de spin de la molécula  $\text{CH}(\text{CH}_3)(10)\text{-CH}_2(9)\text{-CH}(8)\text{-CH}(7)\text{-CH}_2(6)\text{-CH}(5)$  (Fig. 3.45).

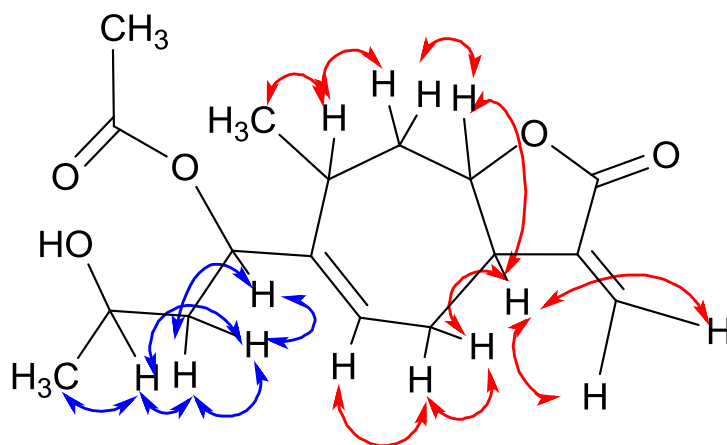


Figura 3.45. Correlaciones  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  COSY de sesquiterpenolactona 3.

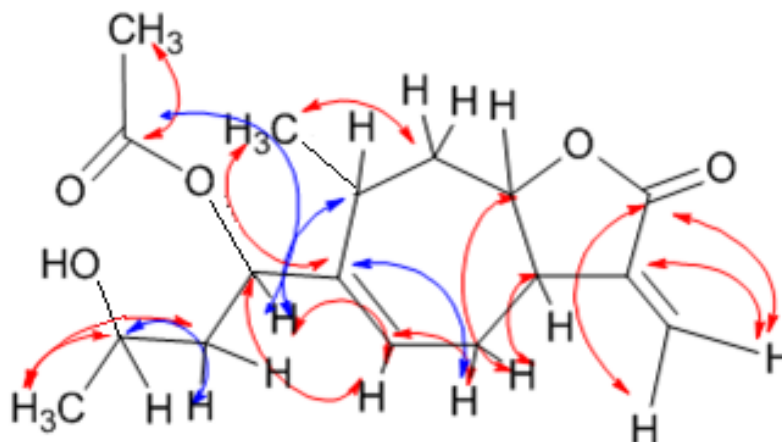


Figura 3.46. Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenlactona 3.

La estereoquímica relativa de la sesquiterpenlactona 3 fue confirmada mediante análisis de las constantes de acoplamiento y el espectro NOESY (Fig. 3.47). En el espectro NOESY, de acuerdo a las correlaciones entre H-8/CH<sub>3</sub>-14, H-8/H-9 (2.28), H-8/H-6 (2.15), H-7/H-9' (1.77) y a la ausencia de correlaciones entre H-8/H-10 y entre H-8/H-7 se determina que CH<sub>3</sub>-14, H-9 (2.28), H-8 y H-6 (2.15) están a un mismo lado de la estructura, mientras que H-10, H-7 y H-9' (1.77) están en la cara opuesta (Fig. 3.48). Por lo dicho anteriormente se deduce la fusión trans del anillo lactónico (H-7  $\alpha$  y H-8  $\beta$ ) y el CH<sub>3</sub>-14  $\beta$ . Los protones H-2 y H-4 se encuentran trans debido a la ausencia de correlación en el espectro NOESY entre H-2/H-4 y a la diferencia entre las constantes de acoplamiento entre H-2/H-3 y entre H-2/H-3' ( $J_{2,3} \neq J_{2,3'}$ ) (Bohlmann & Zdero, 1981; Marco et al., 1993). Para xanthanol  $J_{2,3} = J_{2,3'} = 7.1$  Hz (Marco et al., 1993). Tampoco existe correlación entre H-2/H-10 con lo cual se determina que H-2 es  $\beta$  y por consiguiente H-4 es  $\alpha$ .

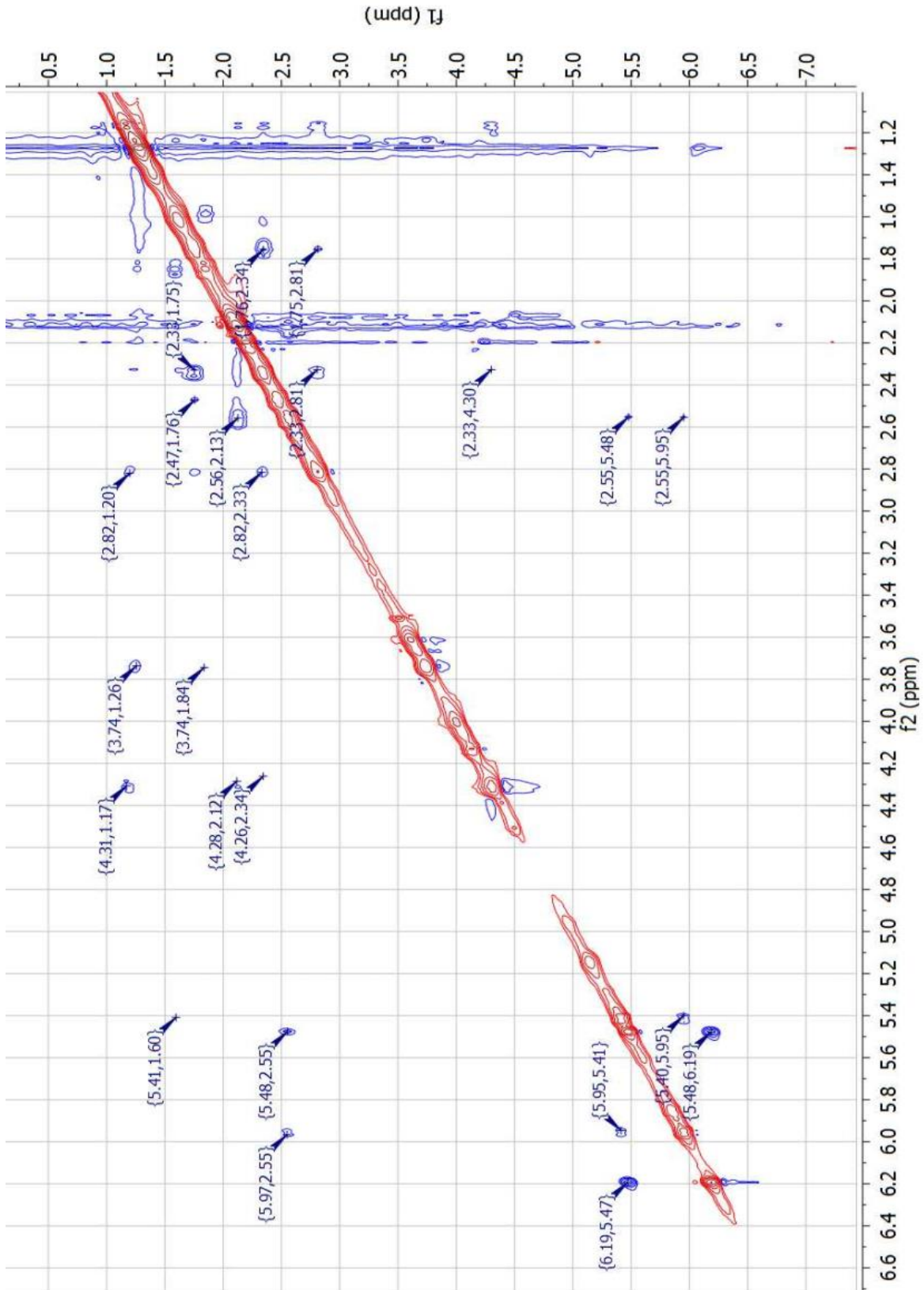


Figura 3.47. Espectro NOESY de sesquiterpenolactona 3.



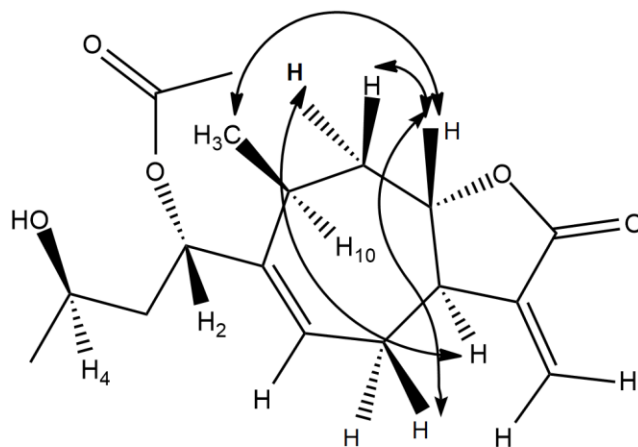


Figura 3.48. Algunas correlaciones NOESY de sesquiterpenlactona 3.

En bases a sus espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y a comparación con datos bibliográficos (Marco et al., 1993) la sesquiterpenlactona 3 fue identificada como **4-epi-xanthanol**.

La única diferencia relevante entre los espectros de  $^1\text{H}$  de la sesquiterpenlactona 2 (4-epi-isoxanthanol) y la sesquiterpenlactona 3 (4-epi-xanthanol) es el shift de H-2 [4.03 dd (SL 2) y 5.31 dd (SL 3)] y H-4 [4.98 m (SL 2) y 3.76 m (SL 3)]. Estos compuestos fueron aislados anteriormente del *X.strumarium* ( Marco et al., 1993) y del *X.italicum* (Kovacs et al., 2009). Nunca se habían aislado del *X.cavanillesii* (De Riscalca et al., 1993; Fabier et al., 2005).

#### *Sesquiterpenlactona 4.*

Las raíces del *Xanthium cavanillesii* fueron maceradas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 72 hs en la oscuridad y a temperatura ambiente. El residuo obtenido fué purificado siguiendo el esquema de la figura 3.49. Se realizó una cromatografía en columna usando silica gel 60 (0.2 - 0.5 mm) y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluyente. Las fracciones obtenidas (35) fueron analizadas mediante TLC y se juntaron las fracciones desde la 5 a la 17, las que posteriormente fueron fraccionadas usando cromatografía en columna usando silica gel 60 (0.04 - 0.063 mm) y eluyendo con un gradiente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /AcOEt (desde 100:0 a 90:10, v/v). Las fracciones obtenidas (85) fueron analizadas mediante TLC y se

juntaron las fracciones desde la 44 a la 65. Finalmente mediante una TLC preparativa de la fracción 44-65 desarrollada con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetona (9:1) se obtuvo la sesquiterpenlactona **4** (Fig. 3.50).

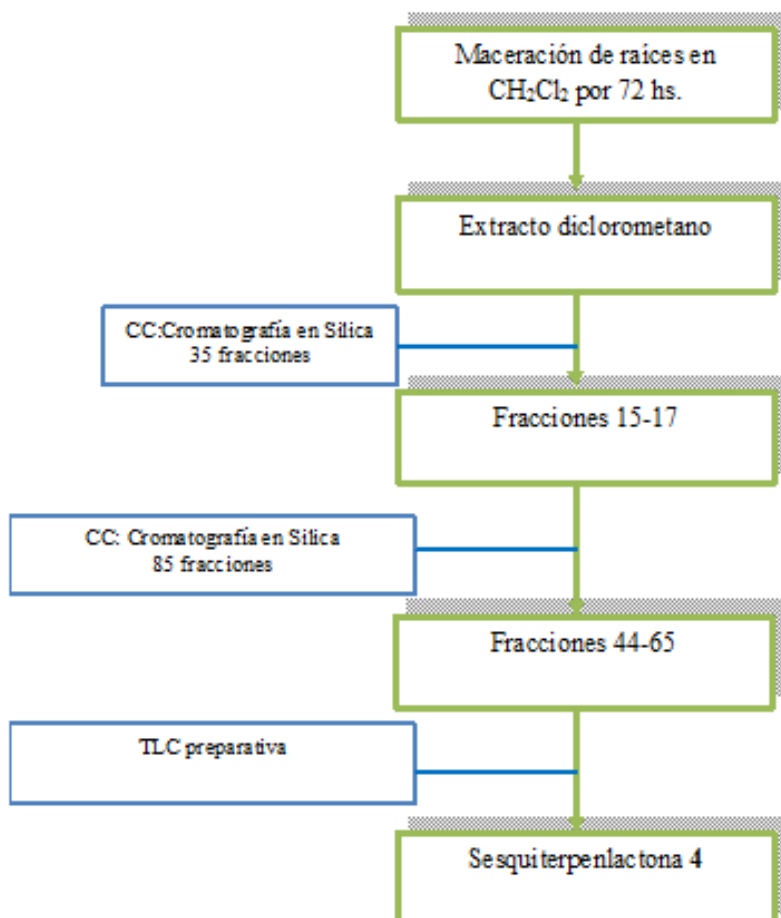


Figura 3.49. Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenlactona 4.



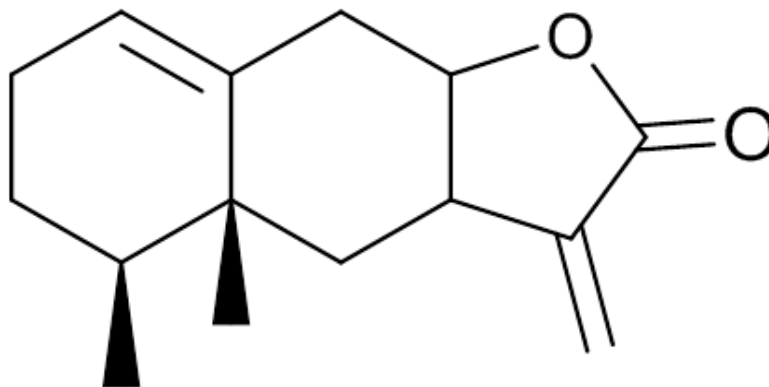


Figura 3.50. Estructura química de sesquiterpenlactona 4.

El análisis mediante espectrometría de masas exactas ESI-HRMS en el modo positivo revela el ion aducto a  $m/z$  255.1350  $[M+Na]^+$  (Fig. 3.51) compatible con una sesquiterpenlactona de forma molecular  $C_{15}H_{20}O_2$  y confirmado por análisis de RMN ( $^{13}C$  y DEPT) y por EI-MS que dió el ion molecular a  $m/z$  232 y otros iones a  $m/z$  217  $[M-CH_3]^+$  y  $m/z$  199  $[M-H_2O-CH_3]^+$  (Fig. 3.52).

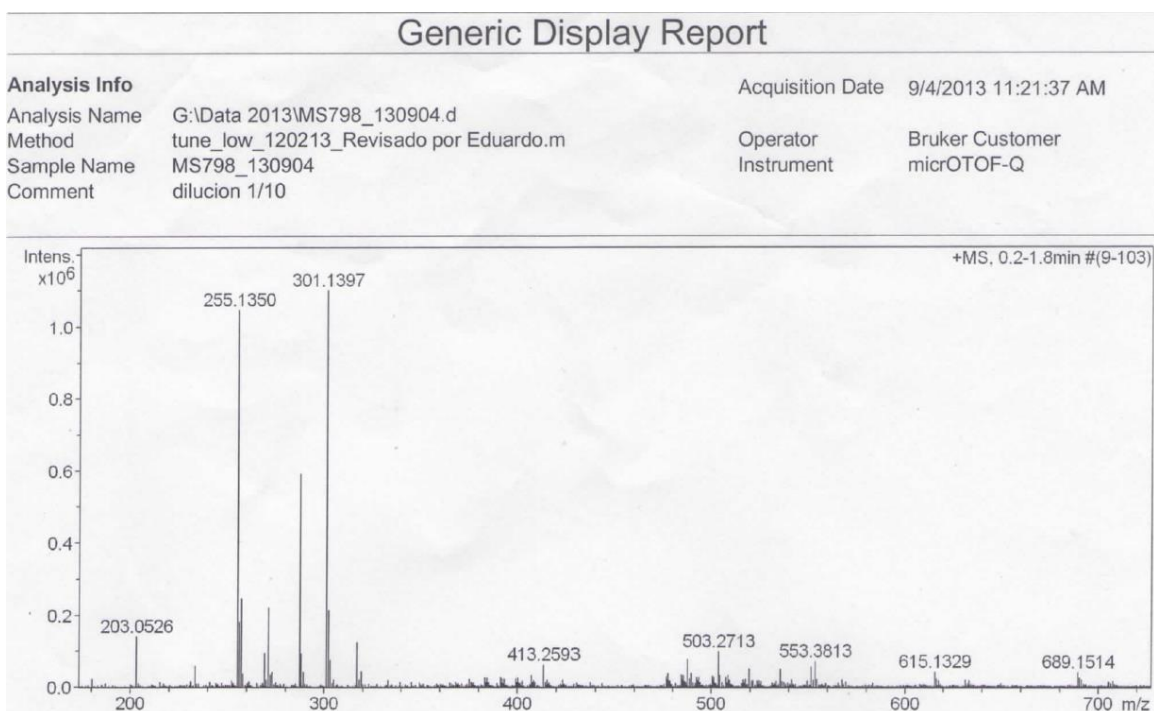


Figura 3.51. Espectro ESI-HRMS de sesquiterpenlactona 4.

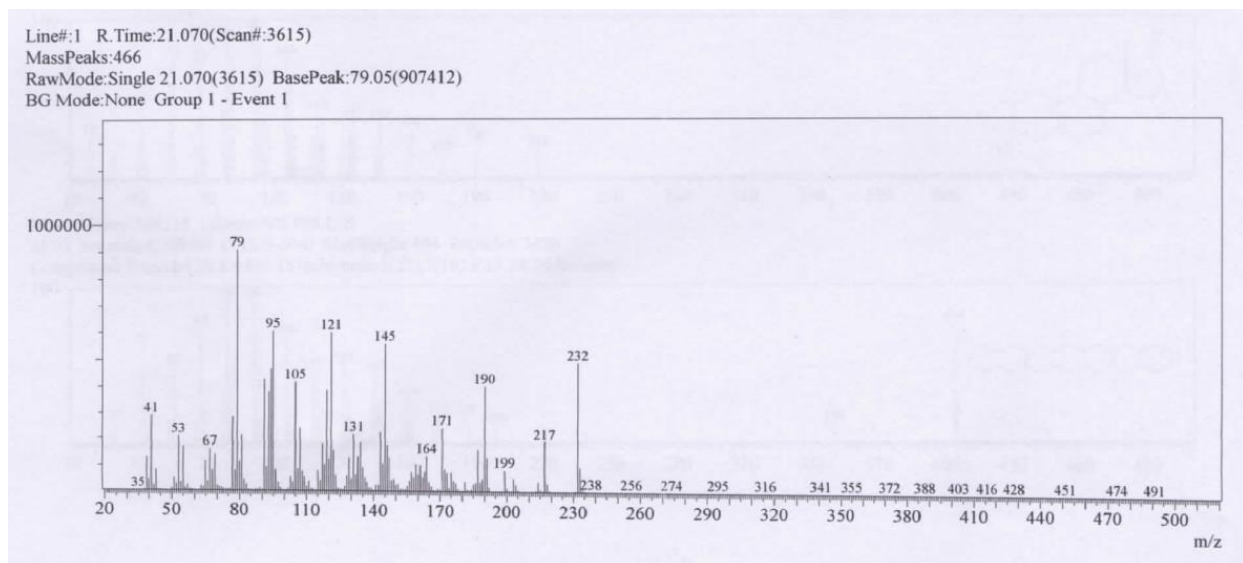


Figura 3.52. Espectro EI-MS de sesquiterpenlacona 4.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.53) exhibe quince señales incluyendo dos metilos a 20.6 ppm (C-14) y 16.5 ppm (C-15); cinco metilenos incluyendo uno olefínico a 121.9 ppm (C-13), 34.7 ppm (C-9), 38.8 ppm (C-6), 26.5 ppm (C-3) y 25.1 (C-2); cuatro metinos a 126.4 ppm (metino olefínico, C-1), 34.9 ppm (C-4), 79.0 ppm (metino oxigenado unido a la lactona, C-8) y 36.7 ppm (C-7); y cuatro carbonos cuaternarios a 170.8 (carbonilo de la lactona, C-12), 139.9 ppm (C-11), 138.4 (C-10) y 37.0 (C-5).

El espectro DEPT 135 (Fig. 3.54) exhibe seis señales positivas (dos metilos a 20.6 ppm y 16.5 ppm; y cuatro metinos a 126.4 ppm, 34.9 ppm, 79.0 ppm y 36.7 ppm) y cinco señales negativas (cinco metilenos a 121.9 ppm, 34.7 ppm, 38.8 ppm, 26.5 ppm y 25.1 ppm).

El espectro  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.55) muestra un metilo doblete a  $\delta$  0.95 ppm (3 H, d,  $J=6.5$  Hz, Me-14), un metilo singulete a  $\delta$  0.94 ppm (H, s, Me-15), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.61 ppm (H, dd,  $J=7.9, 12.8$  Hz, H-9) y a  $\delta$  2.34 ppm (H, td,  $J=1.5, 10.8$  Hz, H-9'), un metileno con dos señales a  $\delta$  1.74 ppm (H, m, H-6) y  $\delta$  1.64 ppm (H, m, H-6'), un metileno a  $\delta$  2.05 ppm (2 H, m, H-2), un metileno a  $\delta$  1.55 ppm (2H, m, H-3), un metileno olefínico exocíclico con dos dobletes a  $\delta$  6.25 ppm (1 H, d,

$J=2.2$  Hz, H-13) y  $\delta$  5.61 ppm (1 H, d,  $J=2.0$  Hz, H-13'), dos metinos a  $\delta$  2.93 ppm (1H, m, H-7) y a  $\delta$  1.61 ppm (1H, m, H-4), un metino oxigenados a  $\delta$  4.55 ppm (1H, m, H-8) y un metino olefínico a  $\delta$  5.50 ppm (1H, t,  $J=3.2$ Hz, H-1).

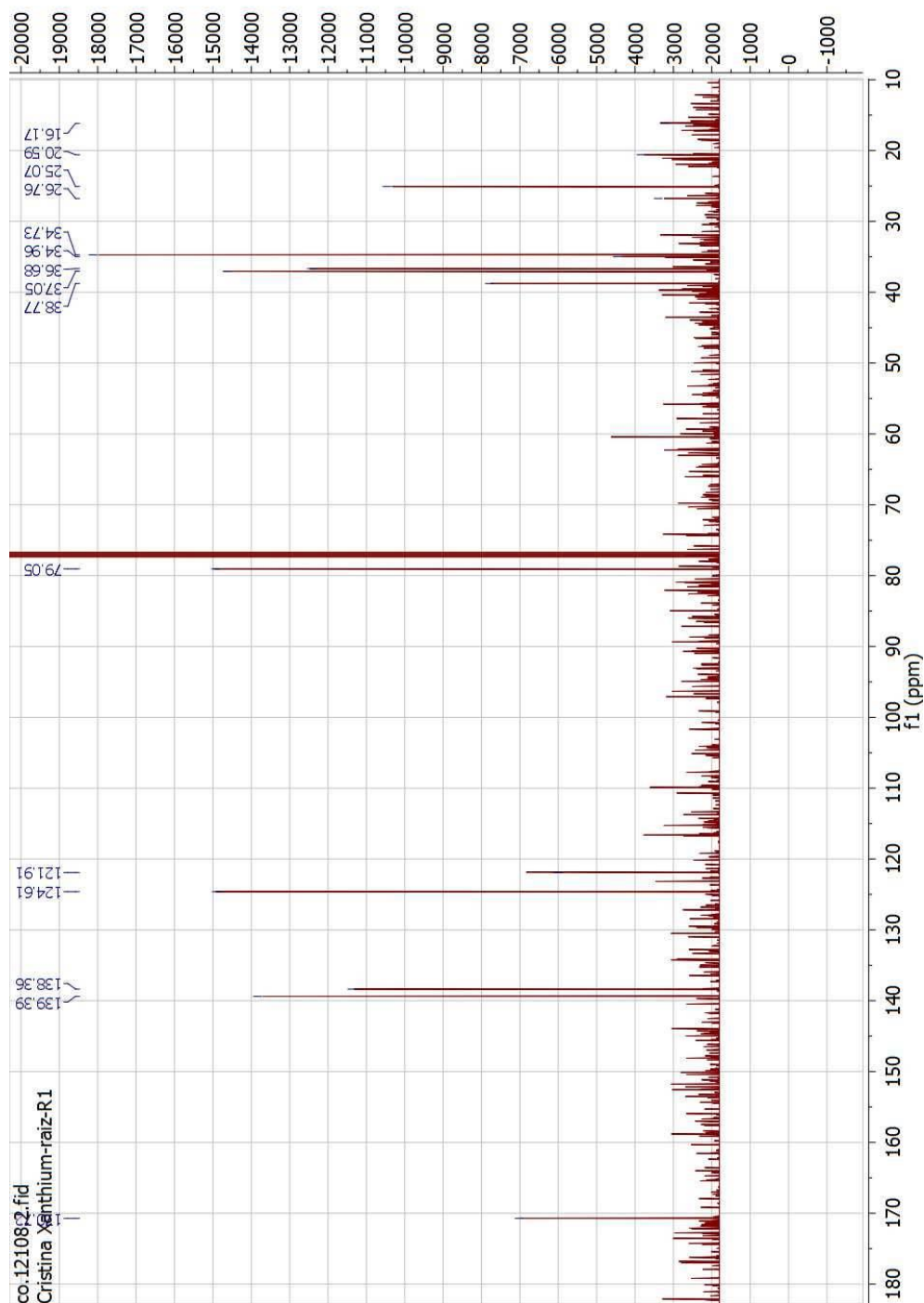


Figura 3.53. Espectro  $^{13}\text{C}$  de sesquiterpenolactona 4 en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.

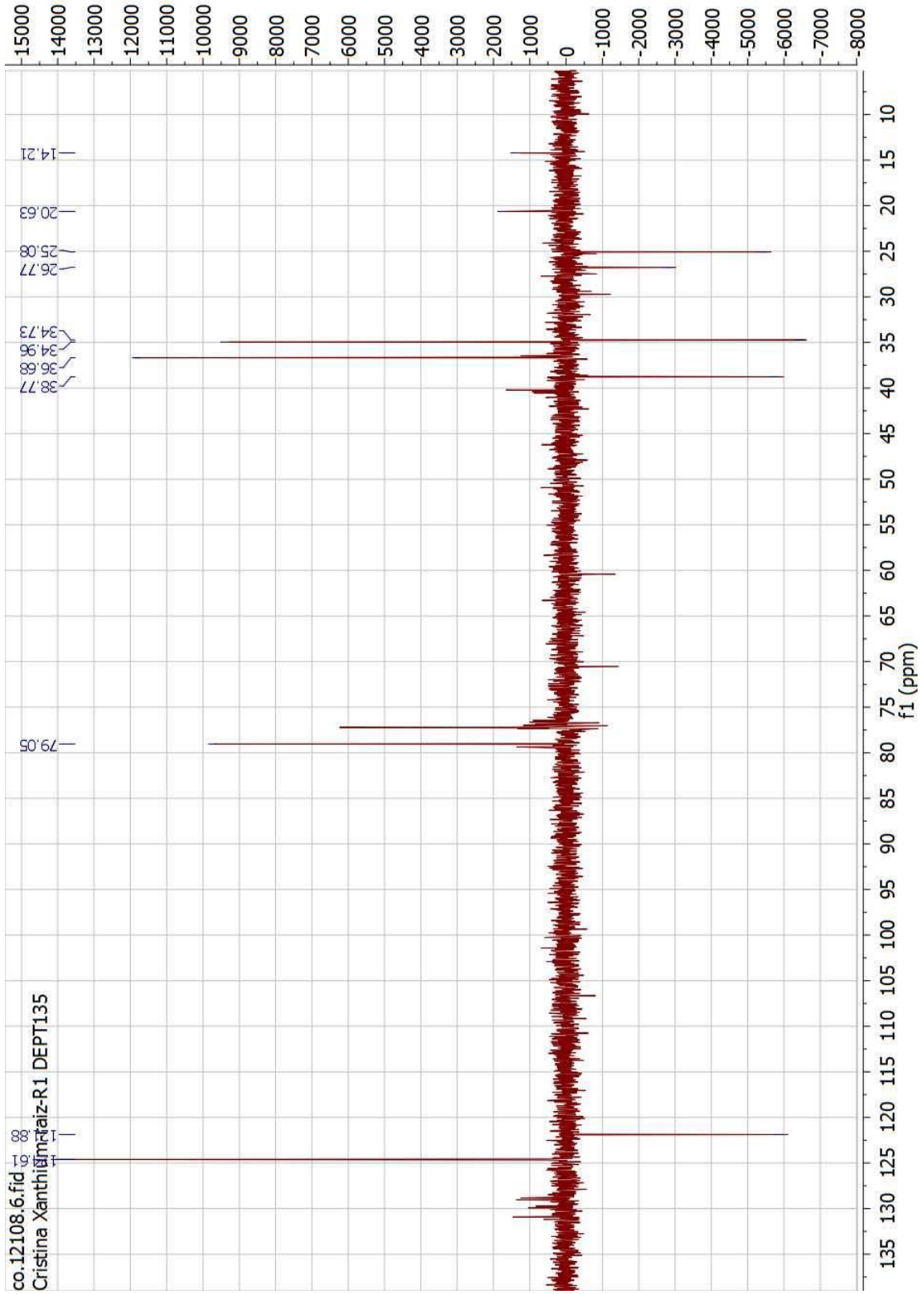


Figura 3.54. Espectro DEPT 135 RMN de sesquiterpenolactona 4.

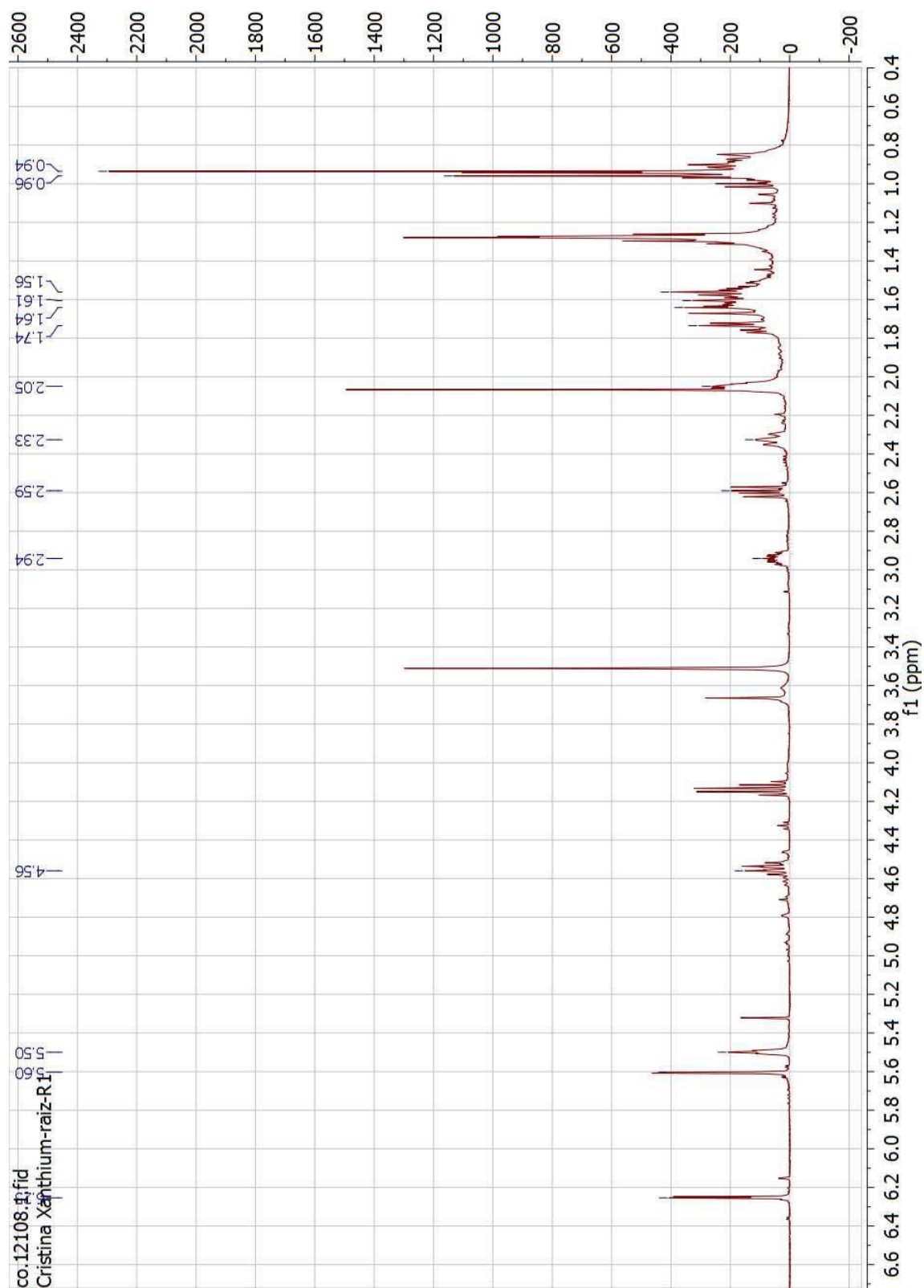


Figura 3.55. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de sesquiterpenolactona 4 en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

Usando diferentes métodos 2D de RMN: COSY (Fig. 3.56), HSQC (Fig. 3.57) y HMBC (Fig. 3.58) todas las señales pudieron ser asignadas (Tabla 3.4) y ésto sugiere que la estructura básica de la sesquiterpenlactona **4** corresponde a un eremofilanólido.

Tabla 3.4. Desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para sesquiterpenlactona 4.

| N° Carbono | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)              |
|------------|---------------------------|--|
| 1          | 124.6                     | 5.50 (t, 3.2)                              |
| 2          | 25.1                      | 2.05 (m)                                   |
| 3          | 26.5                      | 1.55 (m)                                   |
| 4          | 34.9                      | 1.61 (m)                                   |
| 5          | 37.0                      | ---  |
| 6          | 38.8                      | 1.74 (m)<br>1.64 (m)                       |
| 7          | 36.7                      | 2.93 (m)                                   |
| 8          | 79.0                      | 4.55 (m)                                   |
| 9          | 34.7                      | 2.61 (dd 7.9, 12.8)<br>2.34 (td 1.5, 10.8) |
| 10         | 138.4                     | ---  |
| 11         | 139.4                     | ---  |
| 12         | 170.7                     | ---  |
| 13         | 121.9                     | 6.25 (d 2.2)<br>5.61 (d 2.0)               |
| 14         | 20.6                      | 0.94 (s)                                   |
| 15         | 16.5                      | 0.95 (d 6.5 )                              |

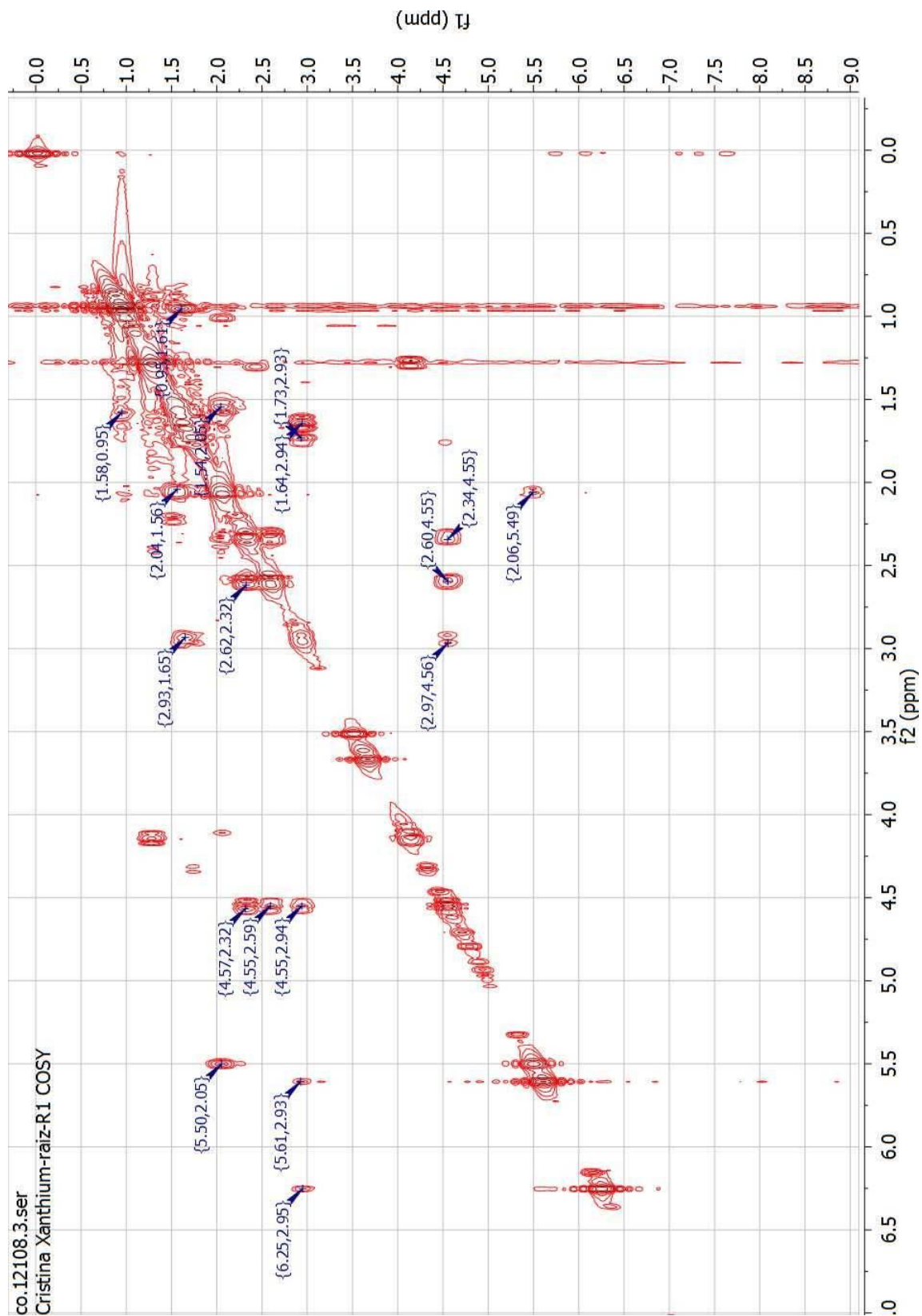


Figura 3.56. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de sesquiterpenolactona 4.



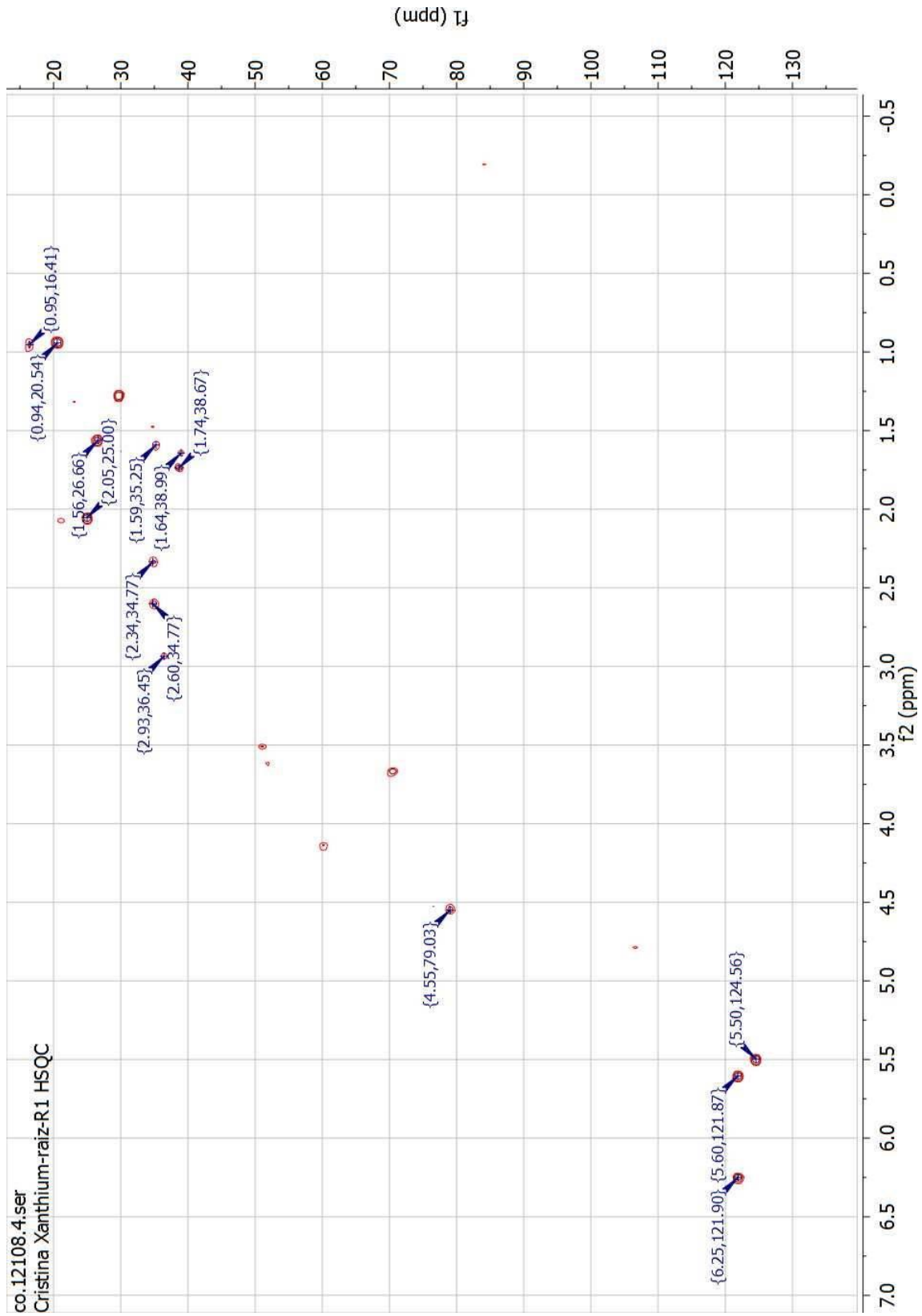


Figura 3.57. Espectro HSQC de sesquiterpenolactona 4.



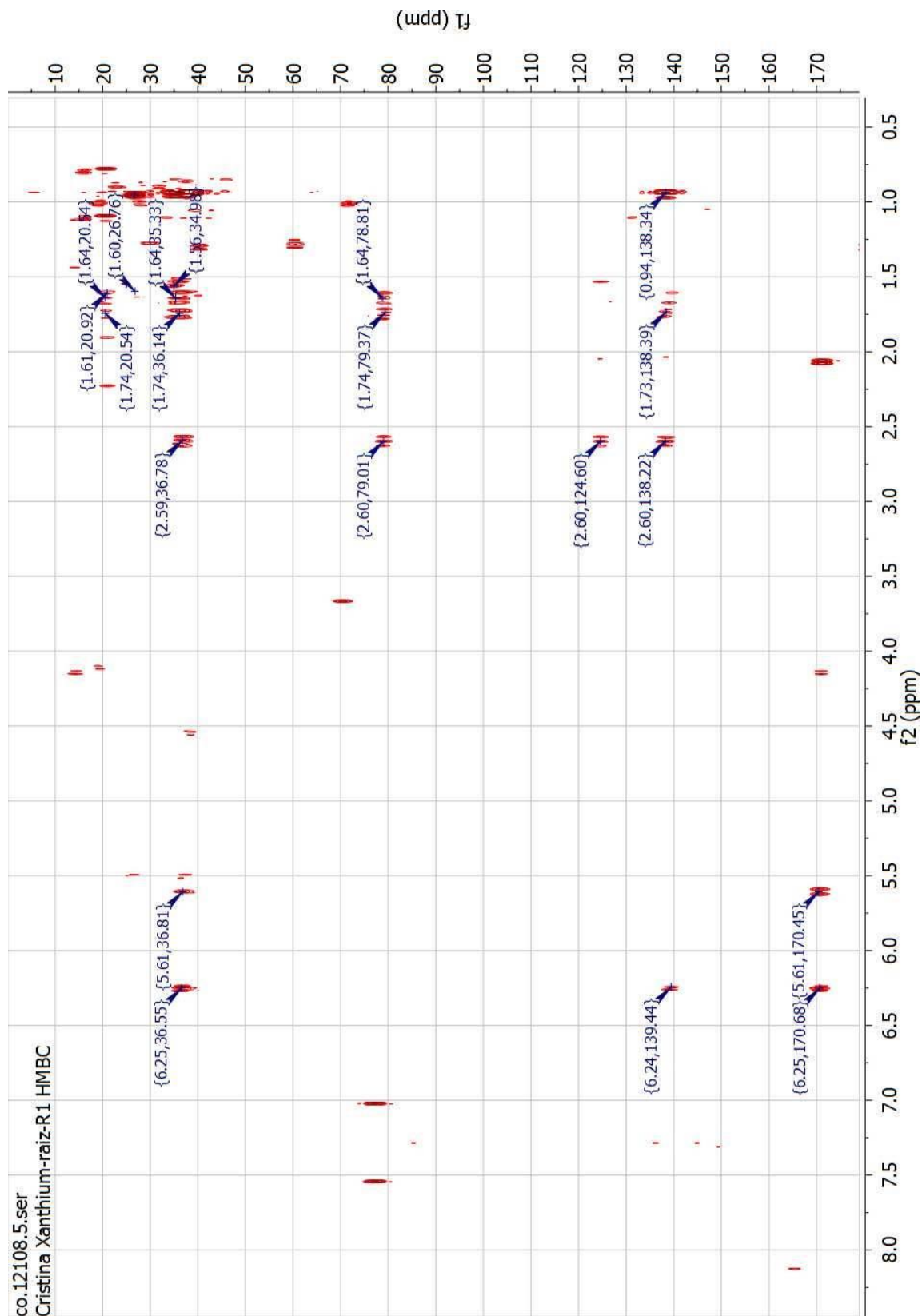


Figura 3.58. Espectro HMBC de sesquiterpenlactona 4.

A través de la correlación  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, dos estructuras parciales fueron reveladas:  $\text{CH}(1)\text{-CH}_2(2)\text{-CH}_2(3)\text{-CH}(4)\text{-CH}_3(15)$  y  $\text{CH}_2(6)\text{-CH}(7)\text{-CH}(8)\text{-CH}_2(9)$  (Fig. 3.59).

Se observaron las siguientes correlaciones : H-13 y H-13' con  $\delta_{\text{H}}$  2.93 (H-7), H-7 con  $\delta_{\text{H}}$  4.55 (H-8),  $\delta_{\text{H}}$  1.74 (H-6),  $\delta_{\text{H}}$  1.64 (H-6'),  $\delta$  6.25 (H-13),  $\delta$  5.61 (H-13'); H-6 y H-6' con  $\delta_{\text{H}}$  2.93 (H-7), H-8 con  $\delta_{\text{H}}$  2.93 (H-7),  $\delta_{\text{H}}$  2.61 (H-9),  $\delta_{\text{H}}$  2.34 H-9', H-1 con  $\delta_{\text{H}}$  2.05 (H-2), H-2 con  $\delta_{\text{H}}$  5.50 (H-1) y  $\delta_{\text{H}}$  1.55 (H-3), H-3 con  $\delta_{\text{H}}$  2.05 (H-2) y  $\delta_{\text{H}}$  1.61 (H-4), H-4 con  $\delta_{\text{H}}$  0.95 (H-14) y  $\delta_{\text{H}}$  1.55 (H-3).

También a través del experimento HSQC-TOCSY (Fig. 3.60 y 3.61) es posible ver los dos sistemas de spin descritos previamente.

La interconexión C-C de todos los fragmentos pudo ser establecida a través del espectro HMBC. Se observan las correlaciones  $^nJ$  ( $n=2$  o  $3$ ) entre H-9 ( $\delta$  2.61) y C-10 ( $\delta$  138.4) / C-1 ( $\delta$  124.6) / C-8 ( $\delta$  79.0), C-7 ( $\delta$  36.7); las correlaciones entre H-6 ( $\delta$  1.64) y C-7 ( $\delta$  36.7) / C-8 ( $\delta$  79.0), C-14 ( $\delta$  20.6); entre H-6' ( $\delta$  1.74) y C-7 ( $\delta$  36.7) / C-8 ( $\delta$  79.0) / C-10 ( $\delta$  138.4), C-14 ( $\delta$  20.6); entre H-4 ( $\delta$  1.61) y C-3 ( $\delta$  26.5) / C-14 ( $\delta$  20.6); entre H-3 ( $\delta$  1.55) y C-2 ( $\delta$  25.1) / C-4 ( $\delta$  34.9); entre H-14 ( $\delta$  0.94) y C-10 (138.4); entre H-15 ( $\delta$  0.95) y C-3 ( $\delta$  26.5); entre H-13 ( $\delta$  6.25) y C-12 ( $\delta$  170.7) / C-11 (139.4) / C-7 (36.7); entre H-13' ( $\delta$  5.61) y C-12 ( $\delta$  170.7) / C-7 (36.7). ( Fig. 3.62)

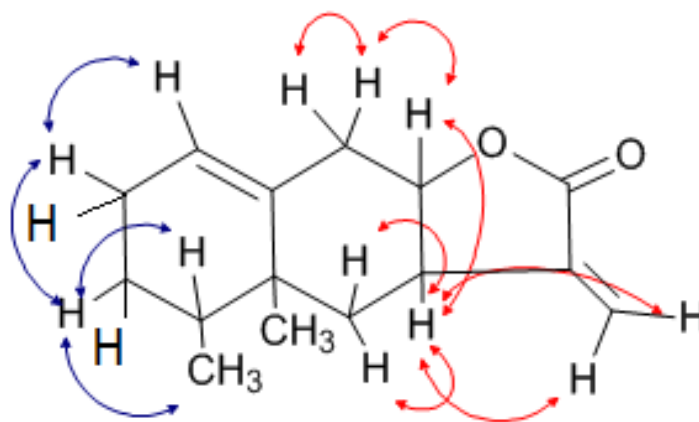


Figura 3.59. Correlaciones COSY de sesquiterpenolactona 4.

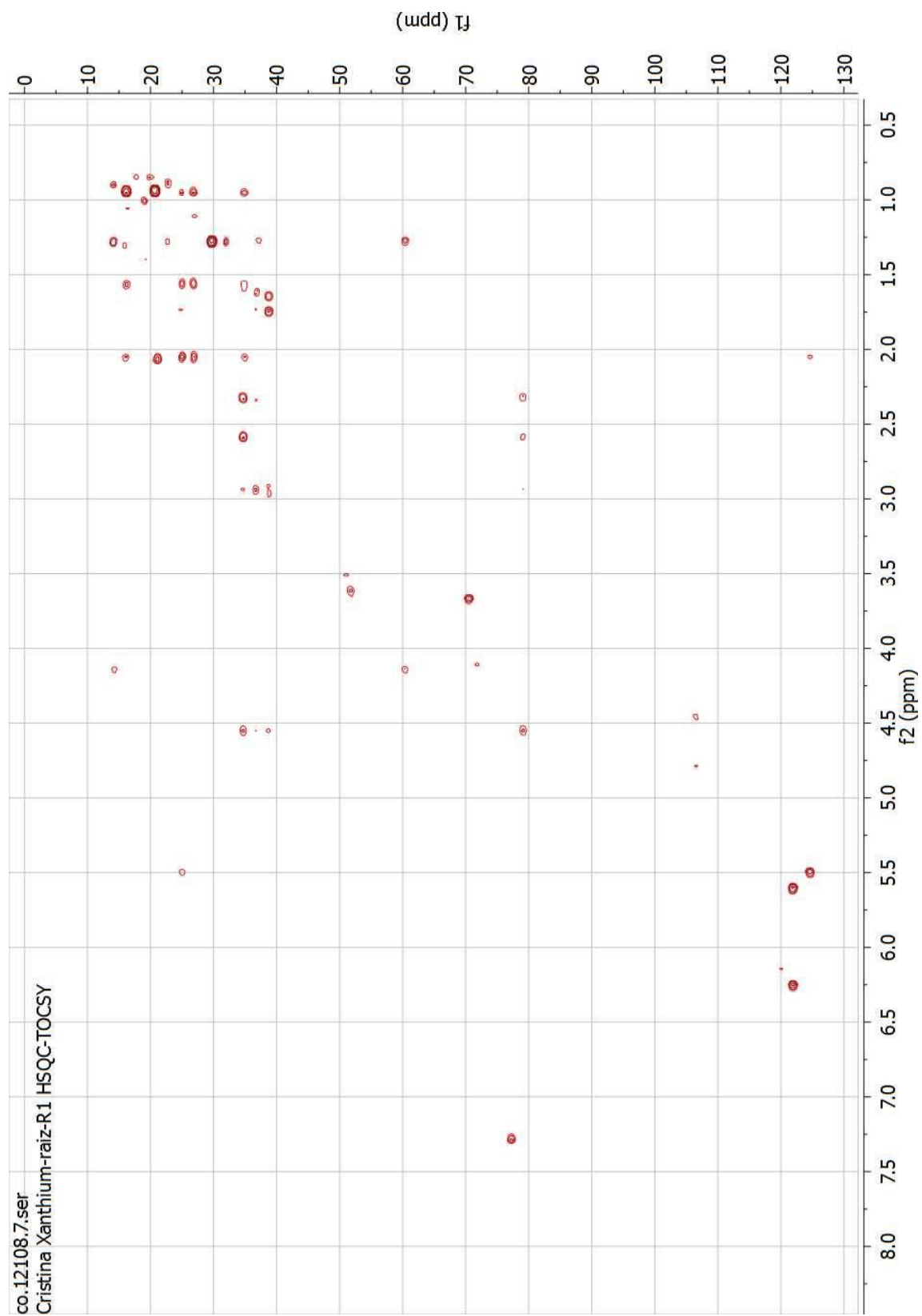


Figura 3.60. Espectro HSQC-TOCSY de sesquiterpenolactona 4.

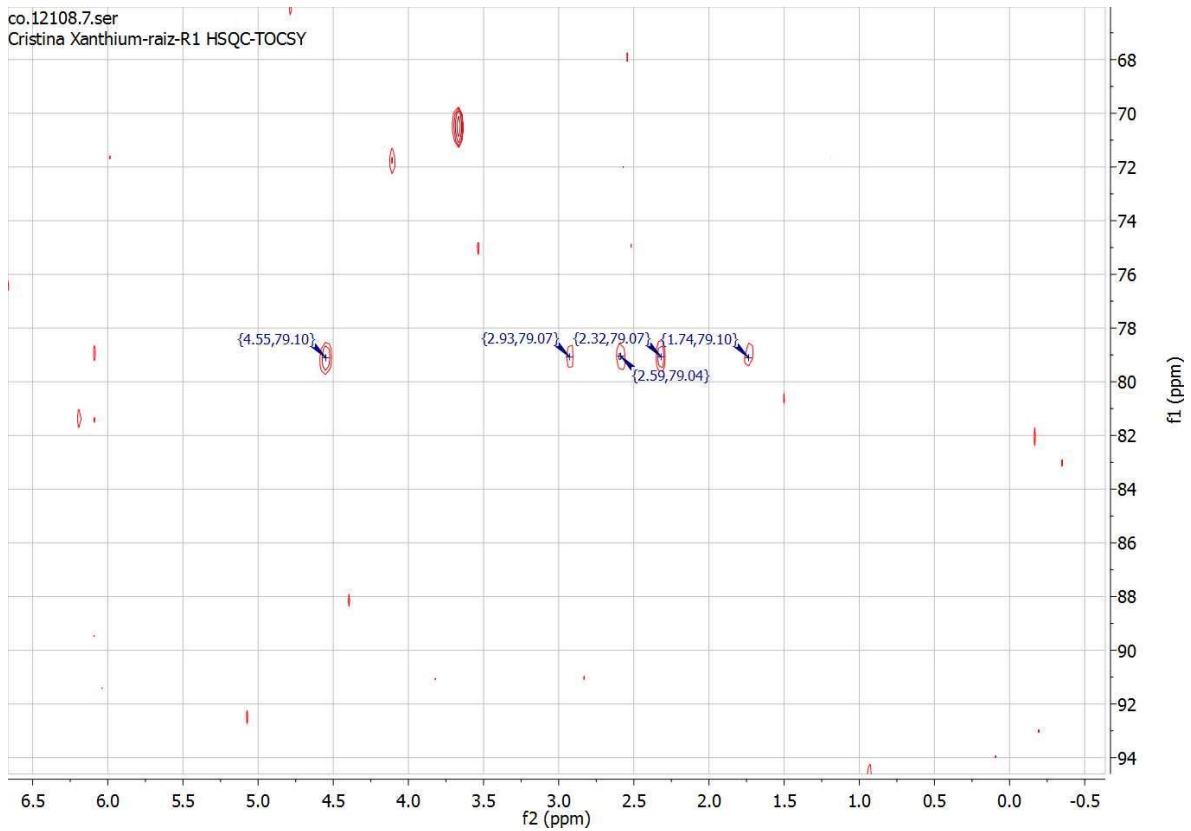
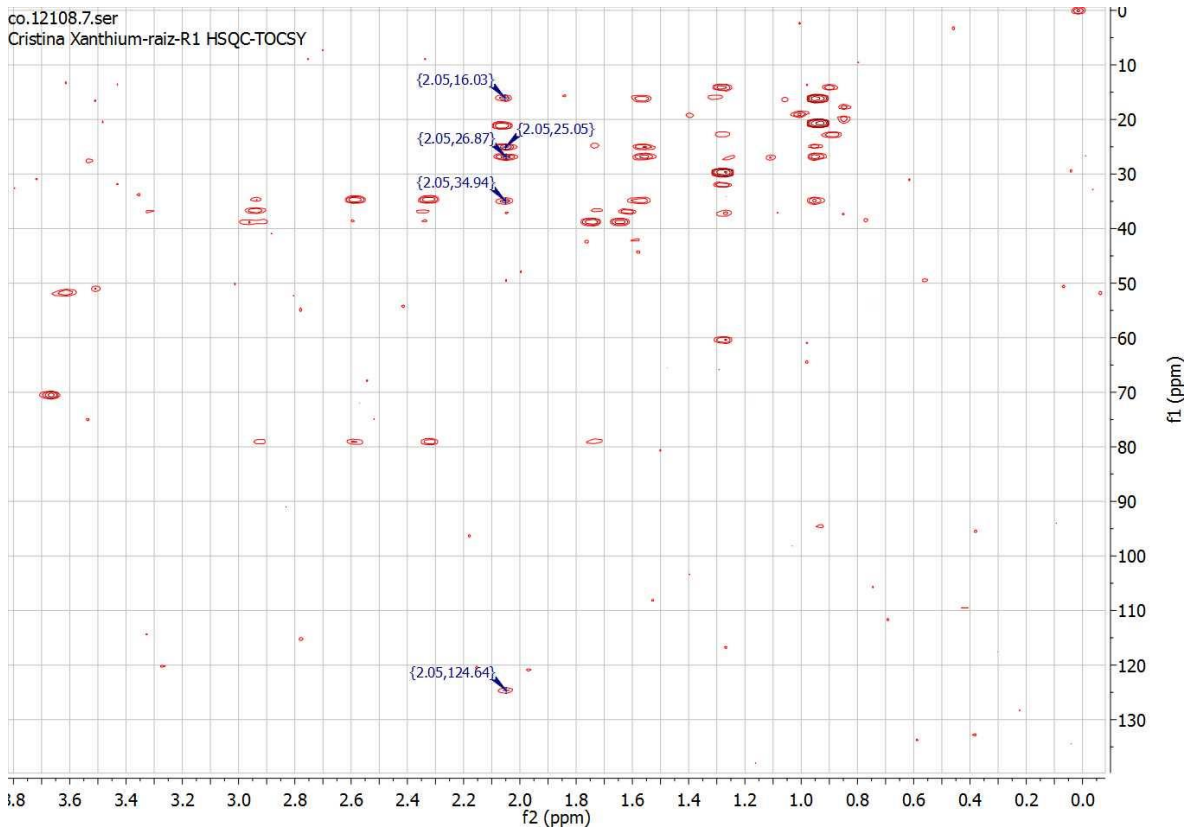


Figura 3.61. Ampliaciones del Espectro HSQC-TOCSY de sesquiterpenolactona 4.

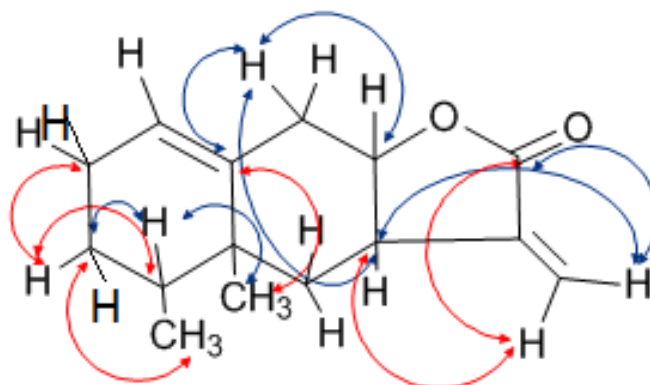


Figura 3.62. Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenlactona 4.

No se pudo determinar la configuración de la molécula pero se han aislado del género *Xanthium* tanto la forma  $7\alpha\text{H}$ ,  $8\alpha\text{H}$  (dugesialactona: Eremophil-1(10), 11(13)-dien-12,8  $\beta$ -olide) (Tanaka et al., 1976; Bui et al., 2012) como la forma  $7\alpha\text{H}$ ,  $8\beta\text{H}$  (xanthanodiene: Eremophil-1(10), 11(13)-dien-12,8 olide) (Bohlmann et al., 1982). Generalmente este tipo de esqueleto (eremofilanos) se encuentra en las raíces de especies de la familia *Asteraceae* (Delgado et al., 1996; Huo et al., 2010), pero no había sido reportado en raíces del género *Xanthium* con anterioridad.

#### *Sesquiterpenlactona 5.*

Las flores del *Xanthium cavanillesii* fueron maceradas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  durante 72 hs en la oscuridad y a temperatura ambiente. El extracto diclorometano obtenido fue sometido a TLC preparativa desarrollada con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetona}$  (9:1) y dió las sesquiterpenlactonas **5** y **6**. (Fig. 3.63 y 3.64). La sesquiterpenlactona 6 de acuerdo a sus datos espectroscópicos resultó ser la sesquiterpenlactona 3 (4-epi-xanthanol) aislada previamente de las hojas.

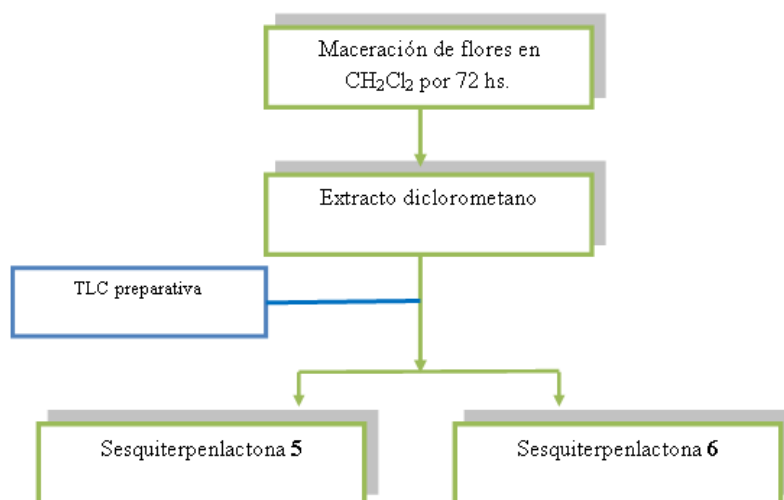


Figura 3.63. Esquema de aislamiento y purificación de sesquiterpenlactonas 5 y 6.

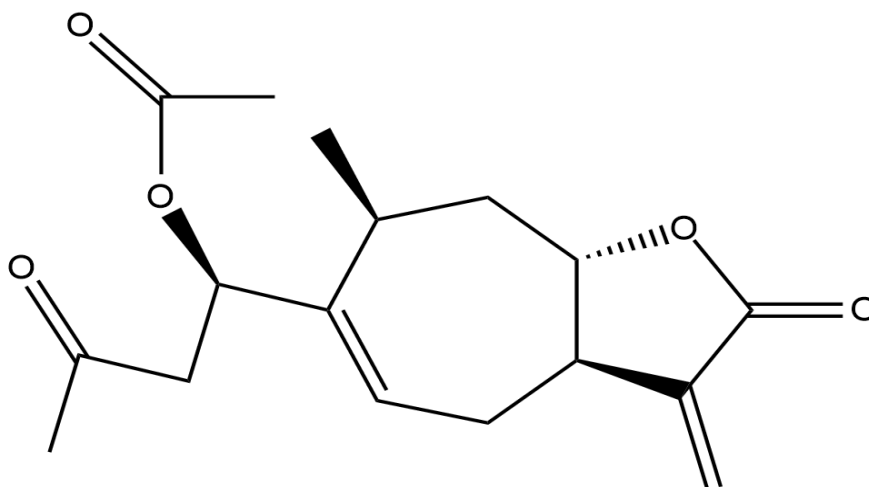


Figura 3.64. Estructura química de la sesquiterpenlactona 5.

El análisis mediante espectrometría de masas por EI-MS (Fig. 3.65) dió como pico base el ion  $m/z$  122 y otros iones a  $m/z$  246  $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}]^+$ ,  $m/z$  231  $[\text{246}-\text{CH}_3]^+$ ,  $m/z$  187  $[\text{231}-\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$ ,  $m/z$  43  $[\text{H}_3\text{CCO}]^+$ .

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.66) exhibe diecisiete señales incluyendo tres metilos a 19.3 ppm (C-14), 30.5 ppm (C-15) y 21.1 ppm (metilo del

grupo acetoxi), cuatro metilenos incluyendo uno olefínico a 118.7 ppm (C-13), 36.8 ppm (C-9), 25.3 ppm (C-6) y 47.2 ppm (C-3); cinco metinos a 127.2 ppm (metino olefínico, C-5), 76.0 ppm (metino oxigenado unido a un grupo acetoxi, C-2), 82.0 ppm (metino oxigenado unido a la lactona, C-8), 47.9 ppm (C-7) y 29.8 ppm (C-10); y cinco carbonos cuaternarios a 169.8 (carbonilo del grupo acetoxi), 169.9 (carbonilo de la lactona, C-12), 144.7 (C-1), 139.2 ppm (C-11) y 204.4 (C-4).

El espectro  $^1\text{H}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  (Fig. 3.67) muestra un grupo metilo doblete a  $\delta$  1.13 ppm (3 H, d,  $J=7.2$  Hz, Me-14) y dos metilos singuletes a 2.20 ppm (3 H, s, Me-15) y 2.06 ppm (3 H, s, metilo del grupo acetoxi), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.94 ppm (H, dd,  $J=8.3, 16.6$  Hz, H-3) y a  $\delta$  2.62 ppm (H, dd,  $J=5.5, 16.6$  Hz, H-3'), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.56 ppm (H, ddd,  $J=2.7, 9.3, 16.2$  Hz, H-6) y  $\delta$  2.12 ppm (H, ddd,  $J=3.4, 11.3, 16.2$  Hz, H-6'), un metileno con dos señales a  $\delta$  2.35 ppm (H, ddd,  $J=3.1, 4.3, 12.6$  Hz, H-9) y  $\delta$  1.74 ppm (H, td,  $J=3.5, 12.3, 12.3$  Hz, H-9'), un metileno olefínico exocíclico con dos dobletes a  $\delta$  6.19 ppm (1 H, d,  $J=3.3$  Hz, H-13) y  $\delta$  5.47 ppm (1 H, d,  $J=3.1$  Hz, H-13'), dos metinos a  $\delta$  2.43 ppm (1H, m, H-7) y a  $\delta$  2.79 ppm (1H, m, H-10), dos metinos oxigenados a  $\delta$  5.61 ppm (1H, dd,  $J=5.6, 8.4$  Hz, H-2) y  $\delta$  4.30 ppm (1H, ddd,  $J=3.1, 9.6, 12.6$  Hz, H-8) y un metino olefínico a  $\delta$  6.00 ppm (1H, dd,  $J=3.5, 9.3$  Hz, H-5).

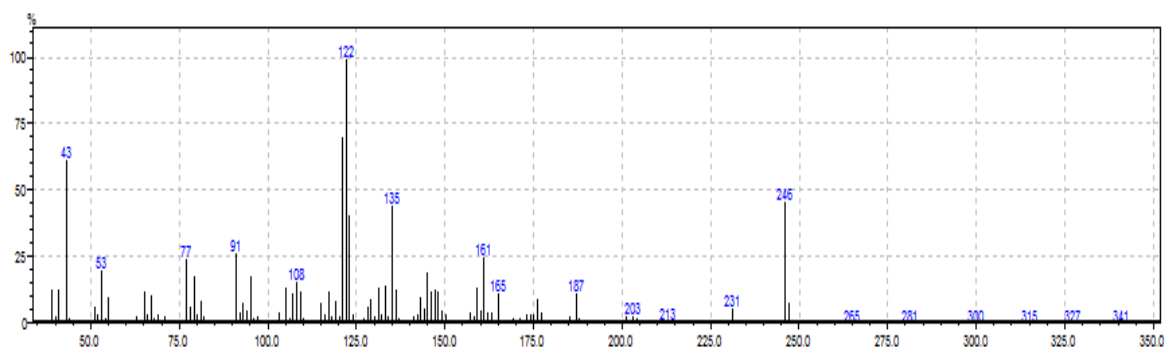


Figura 3.65. Espectro EI-MS de sesquiterpenolactona 5.

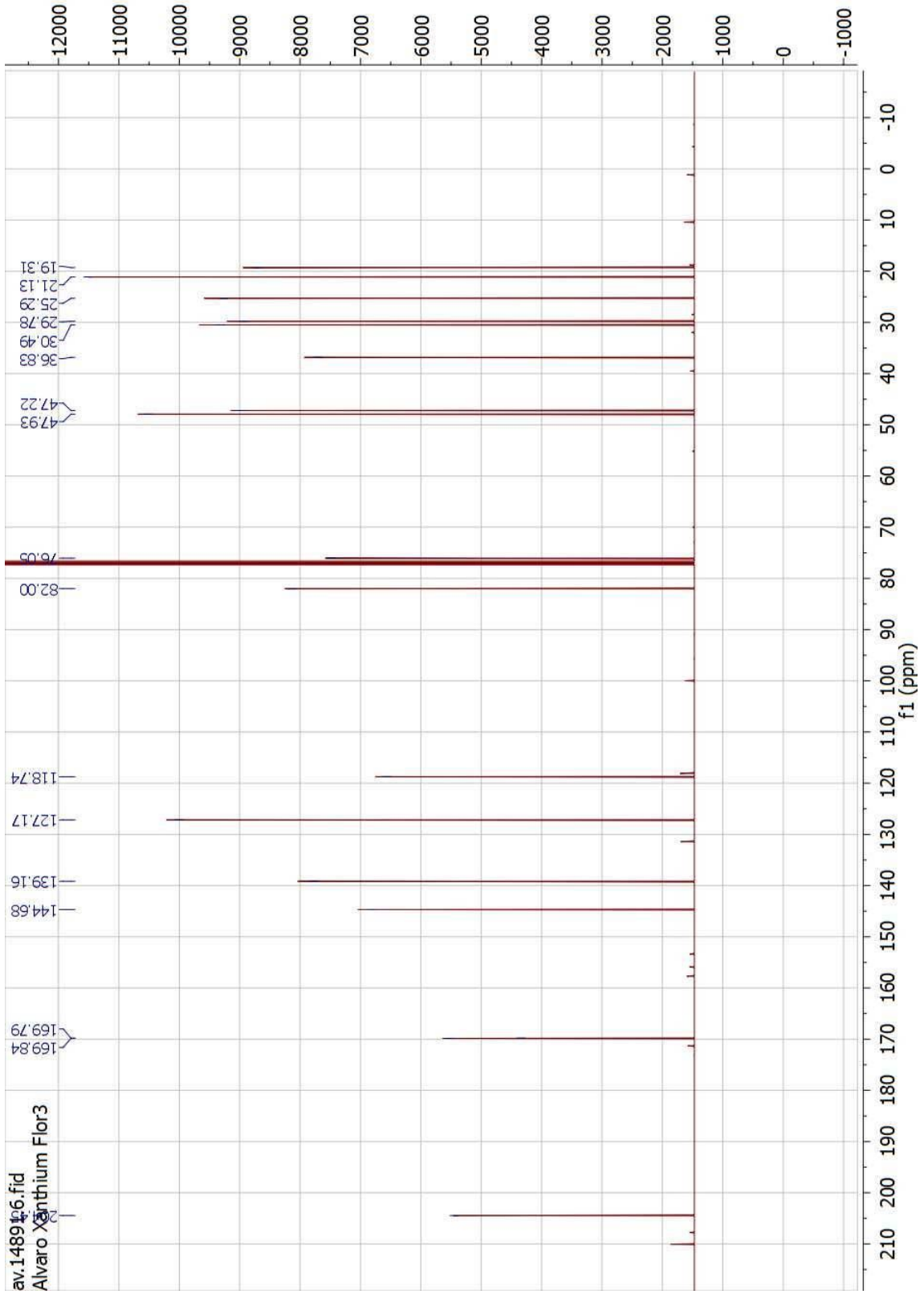


Figura 3.66. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN de sesquiterpenolactona 5 en  $\text{CDCl}_3$  a 100 MHz.



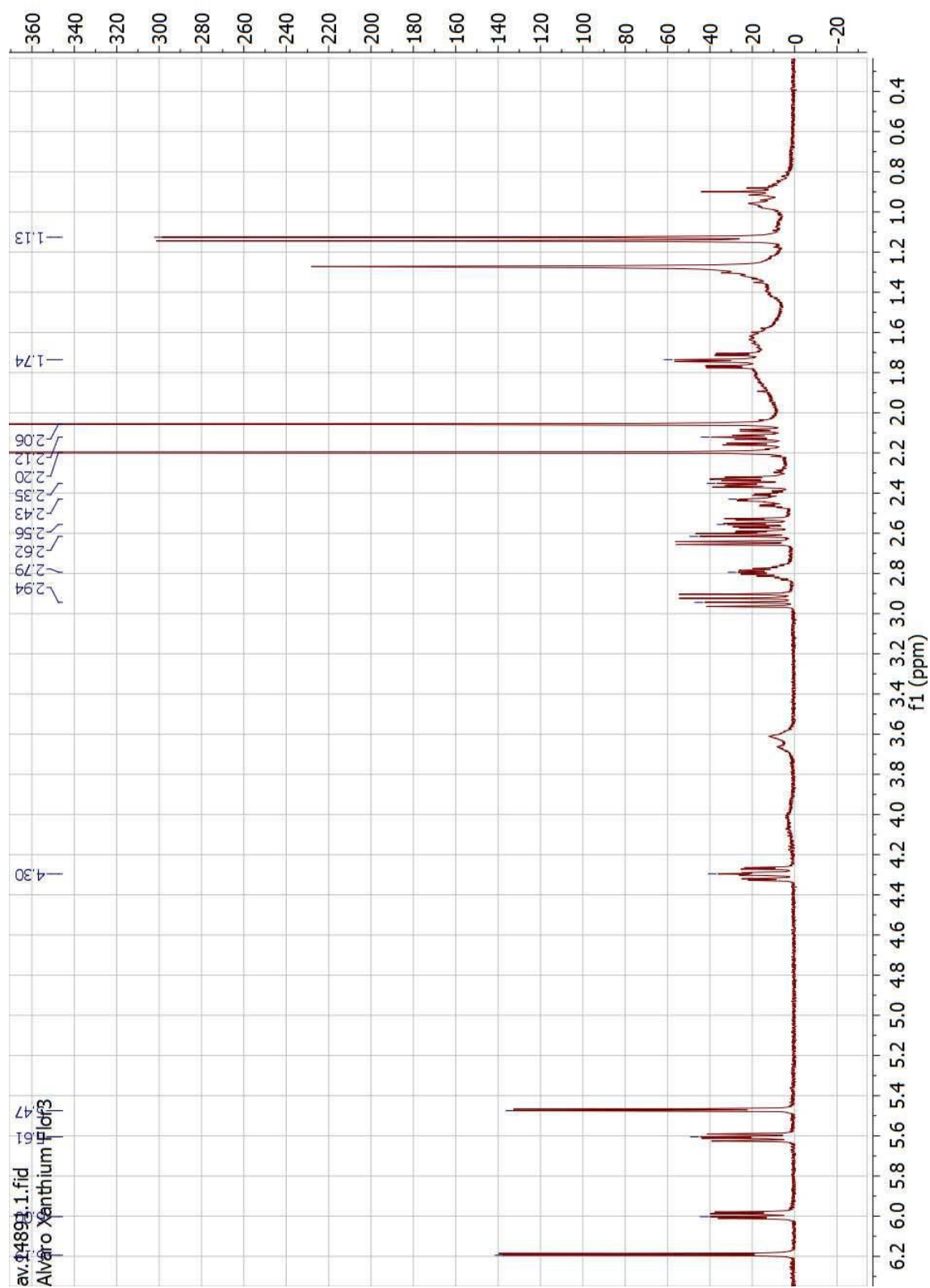


Figura 3.67. Espectro  $^1\text{H}$  RMN de sesquiterpenolactona 5 en  $\text{CDCl}_3$  a 400MHz.

Usando diferentes métodos 2D de RMN: COSY (Fig. 3.68), HSQC (Fig. 3.69) y HMBC (Fig. 3.70) todas las señales pudieron ser asignadas (Tabla 3.5) y la estructura básica de la sesquiterpenlactona **5** fue xanthan-11 (13) - en - 12,8 - olide.

Tabla 3.5. Desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para sesquiterpenlactona **5**

| N° Carbono              | $\delta_{\text{C}}$ (ppm) | $\delta_{\text{H}}$ (m, J Hz)                            |
|-------------------------|---------------------------|--|
| 1                       | 144.7                     | ---  |
| 2                       | 76.0                      | 5.61 (dd 5.6, 8.4 )                                      |
| 3                       | 47.2                      | 2.94 (dd 8.3, 16.6)<br>2.62 (dd 5.5, 16.6)               |
| 4                       | 204.4                     | ---  |
| 5                       | 127.2                     | 6.00 (dd 3.5, 9.3)                                       |
| 6                       | 25.3                      | 2.56 ( ddd 2.7, 9.3, 16.2)<br>2.12 (ddd 3.4, 11.3, 16.2) |
| 7                       | 47.9                      | 2.43 (m)   |
| 8                       | 82.0                      | 4.30 (ddd 3.1, 9.6, 12.6)                                |
| 9                       | 36.8                      | 2.35 (ddd 3.1, 4.3, 12.6)<br>1.74 (td 3.5, 12.3, 12.3)   |
| 10                      | 29.8                      | 2.79 (m)   |
| 11                      | 139.2                     | ---  |
| 12                      | 169.9                     | ---  |
| 13                      | 118.7                     | 5.47 (d 3.1 )<br>6.19 (d 3.3 )                           |
| 14                      | 19.3                      | 1.13 (d 7.2 )  |
| 15                      | 30.5                      | 2.20 (s)   |
| <b>CH<sub>3</sub>CO</b> | 21.1                      | 2.06 (s)   |
| <b>CH<sub>3</sub>CO</b> | 169.8                     | ---  |

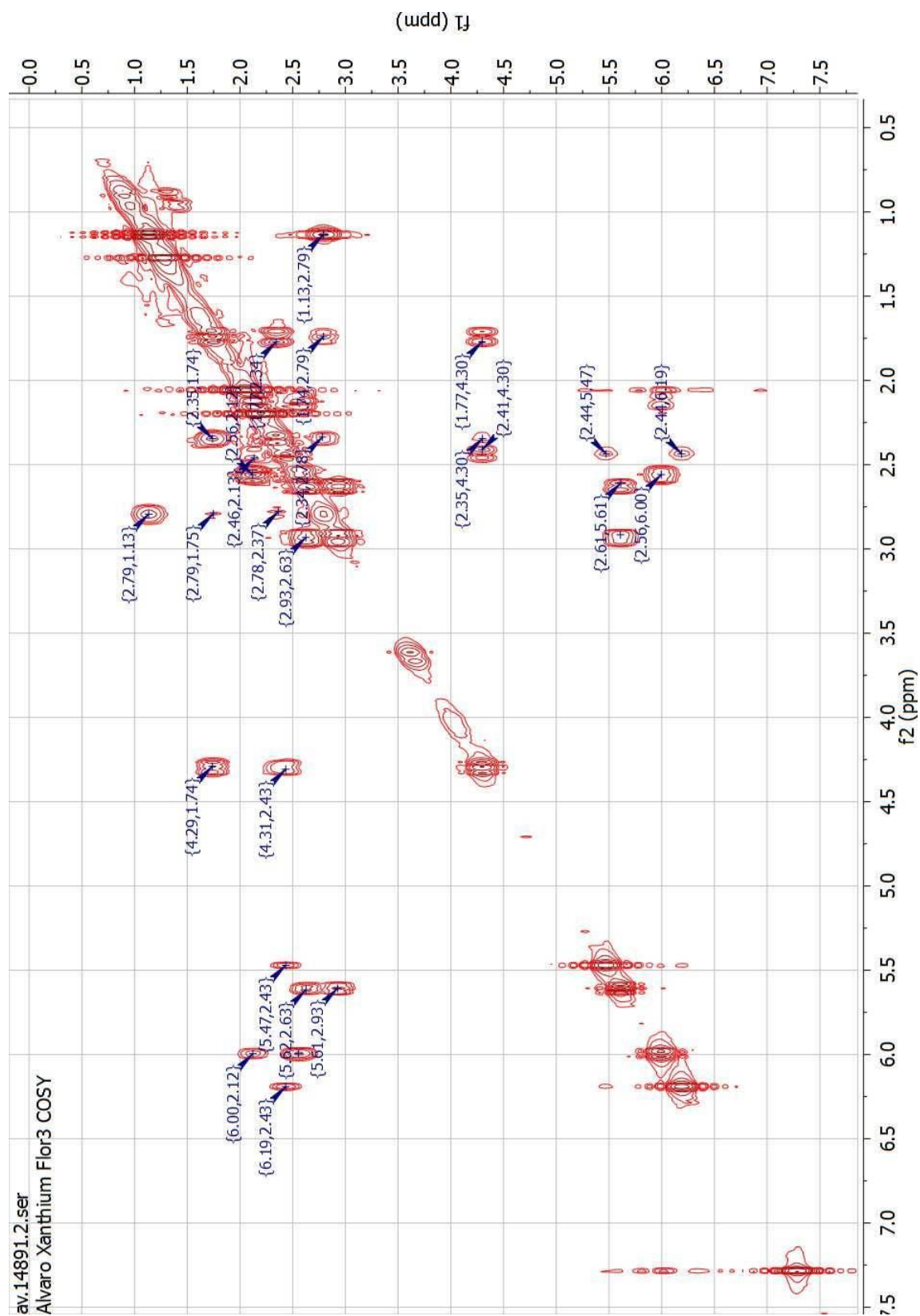
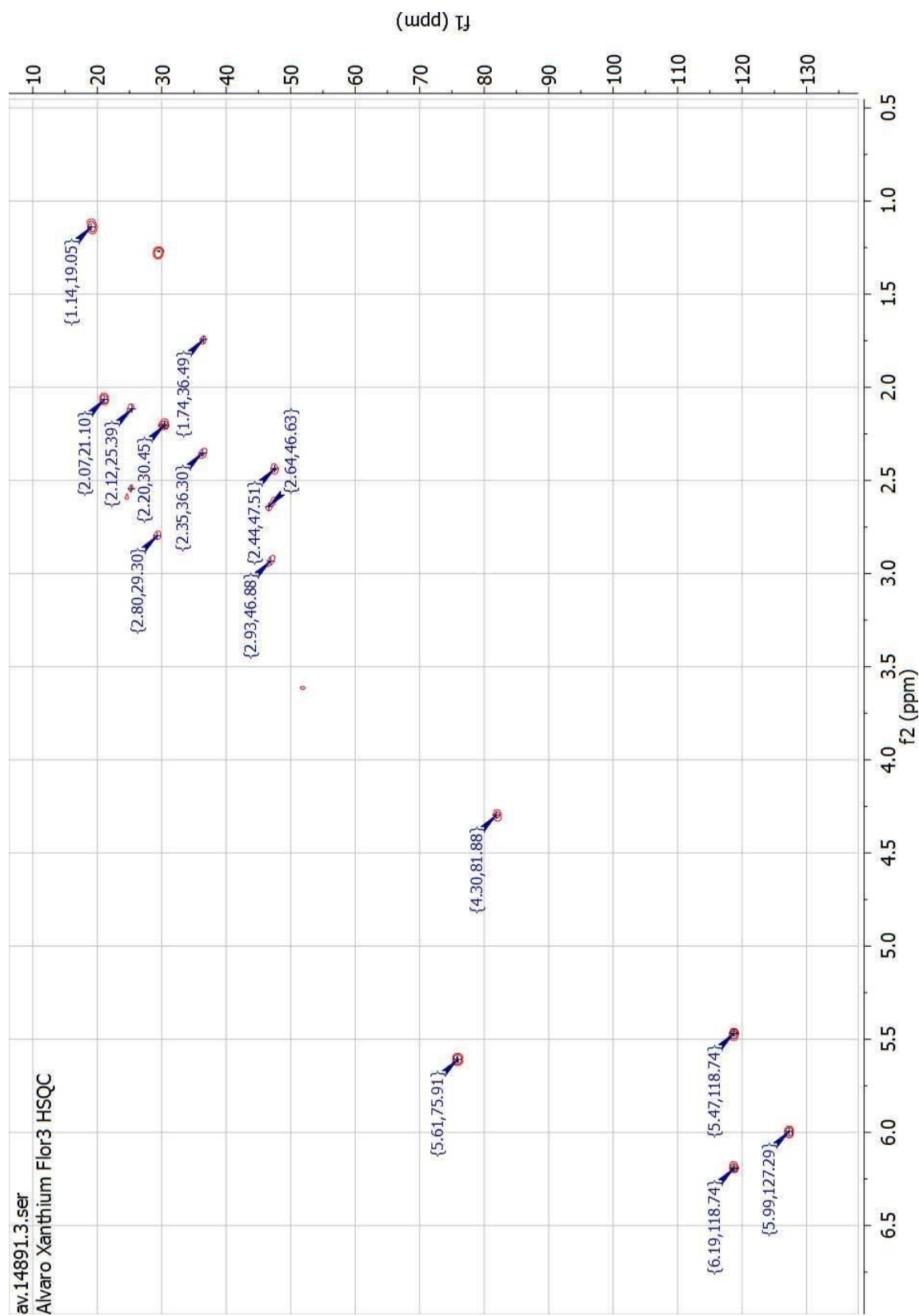


Figura 3.68. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de sesquiterpenolactona 5.

Figura 3.69. Espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC de sesquiterpenolactona 5.

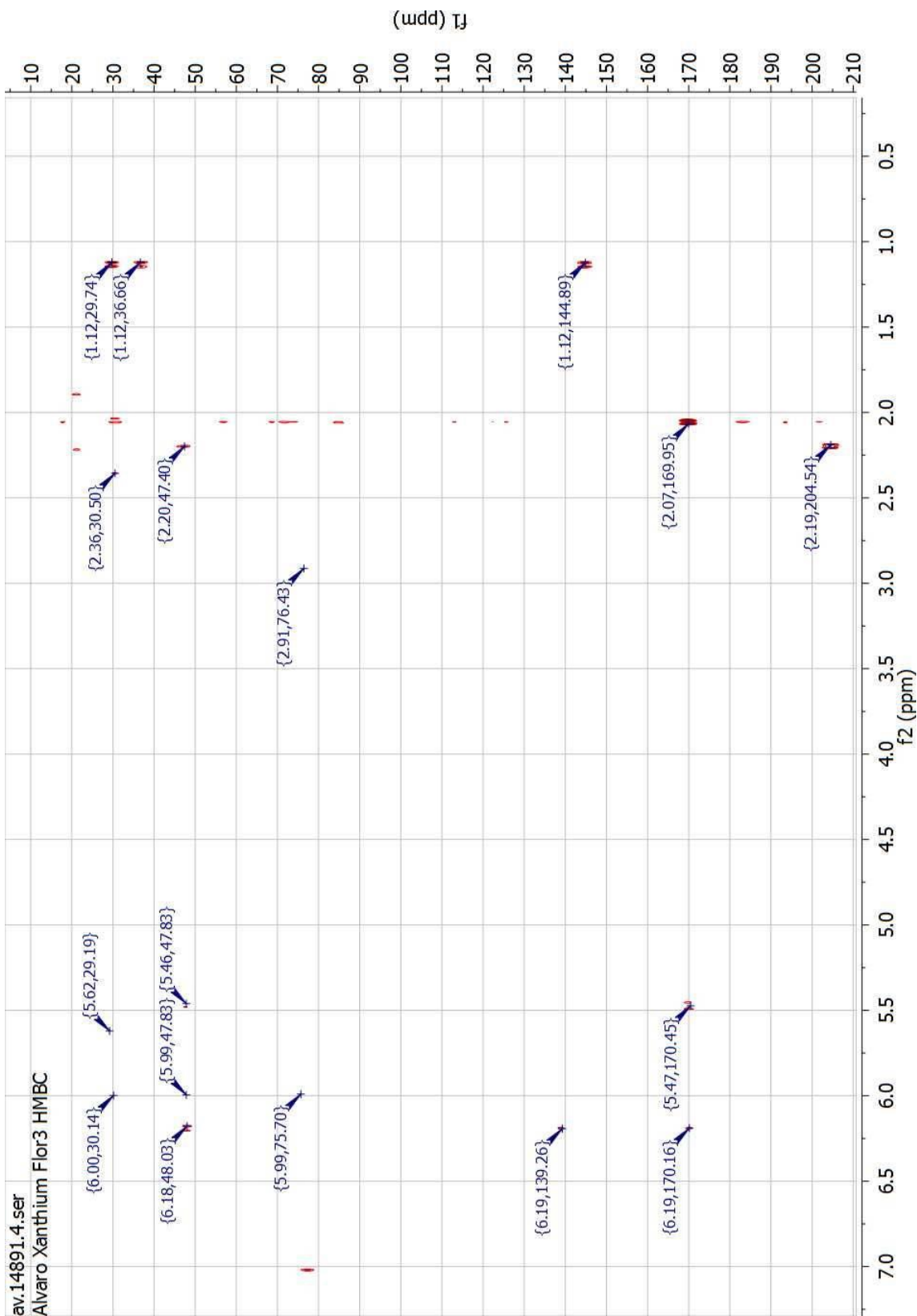


Figura 3.70. Espectro HMBC de sesquiterpenolactona 5.

Las ubicaciones del grupo acetoxi en C-2 (singulete a  $\delta$  2.06 ppm unido a un C de 21.1 ppm) y el grupo carbonilo en C-4 son confirmadas por los experimentos 2D de RMN (COSY, HSQC, y HMBC). En el espectro HMBC se observan las correlaciones  $^nJ$  ( $n=2$  o  $3$ ) entre H-15 ( $\delta$  2.20) y C-4 ( $\delta$  204.4) / C-3 ( $\delta$  47.2); la correlación entre H-3 ( $\delta$  2.94) y C-2 ( $\delta$  76.0) y la correlación entre H-2 ( $\delta$  5.61) y C-10 ( $\delta$  29.8) (Fig. 3.72). En el espectro COSY se observa el sistema de spin **CH (OAc)(2)-CH<sub>2</sub>(3)** (Fig. 3.71).

Un metileno ( $\delta_C$  118.7), un metino ( $\delta_C$  127.2) y dos carbonos cuaternarios ( $\delta_C$  139.2 y  $\delta_C$  144.7), señalan la presencia de dos olefinas en la molécula. El protón olefinico en C-5 y la  $\gamma$ -lactona entre C-12 y C-8 fueron determinadas por los experimentos 2D de RMN (COSY, HSQC y HMBC). En el espectro HMBC se observan las correlaciones  $^nJ$  ( $n=2$  o  $3$ ) entre H-5 ( $\delta$  6.00) y C-10 ( $\delta$  29.8) / C-7 ( $\delta$  47.9) / C-2 ( $\delta$  76.0); entre H-14 ( $\delta$  1.13) y C-10 ( $\delta$  29.8) / C-1 ( $\delta$  144.7) / C-9 ( $\delta$  36.8); entre H13 ( $\delta$  5.47) y C-12 ( $\delta$  169.9) / C-7 ( $\delta$  47.9); entre H13' ( $\delta$  6.19) y C-11 ( $\delta$  139.2) / C-12 ( $\delta$  169.9) / C-7 ( $\delta$  47.9); entre H-9 ( $\delta$  2.35) y C-10 ( $\delta$  29.8) (Fig. 3.72). En el espectro COSY se observa el otro sistema de spin de la molécula **CH(CH<sub>3</sub>)(10)-CH<sub>2</sub>(9)-CH(8)-CH(7)-CH<sub>2</sub>(6)-CH(5)** (Fig. 3.71).

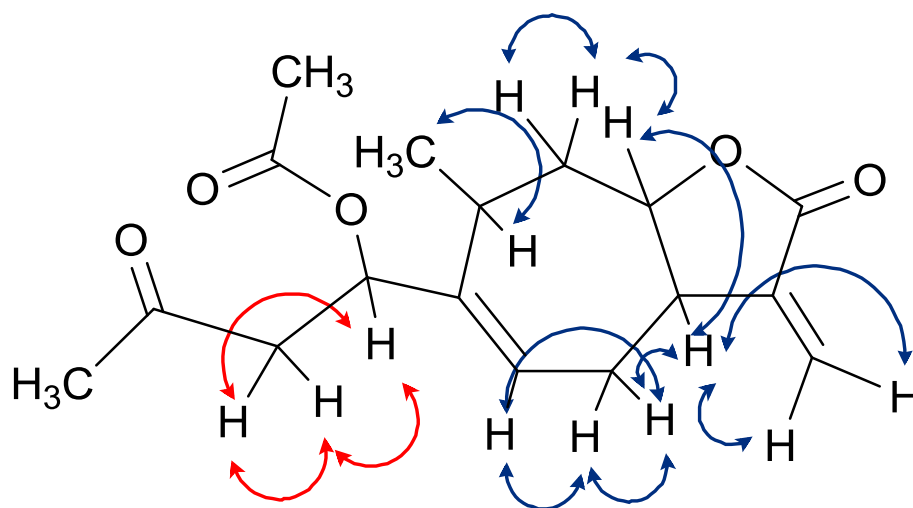


Figura 3.71. Correlaciones COSY de sesquiterpenolactona 5.

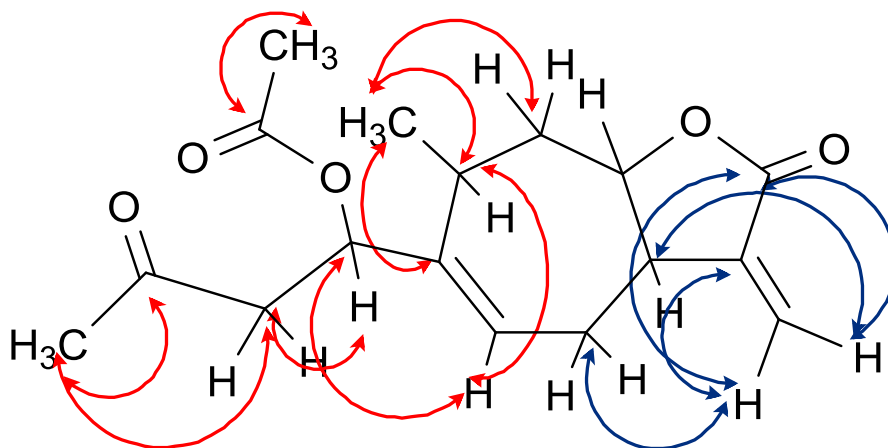


Figura 3.72. Algunas correlaciones HMBC de sesquiterpenlactona 5.

La estereoquímica relativa de la sesquiterpenlactona 5 fue confirmada mediante análisis del espectro NOESY (Fig. 3.73 ). Las correlaciones que se observan en dicho espectro se detallan en la tabla 3.6. De acuerdo a las correlaciones entre H-8/CH<sub>3</sub>-14, H-8/H-9 (2.36), H-8/H-6 (2.13), H-7/H-9' (1.74) y H-2/H-10 y a la ausencia de correlaciones entre H-8/H-10 y H-8/H-7 se determina que CH<sub>3</sub>-14, H-9 (2.36), H-8 y H-6 (2.13) están a un mismo lado de la estructura, mientras que H-10, H-7, H-9' (1.74) y H-2 están hacia el otro lado (Fig. 3.74). Por lo expuesto anteriormente se deduce la fusión trans del anillo lactónico (H-7  $\alpha$  y H-8  $\beta$ ), CH<sub>3</sub>-14  $\beta$  y H-2  $\alpha$ .





Tabla 3.6. Correlaciones NOESY (H-H) de sesquiterpenolactona 5.

|             |   |
|-------------|---|
| H-8         | H-14, H-6 (2.13), H-9 (2.36)              |
| H-7         | H-9 (1.74)                                |
| H-10        | H-14, H-9 (2.36), H-9' (1.74), H-2 (5.61) |
| H-6 (2.13)  | H-14, H-6' (2.55), H-8                    |
| H-6' (2.55) | H-6 (2.13), H-13 (5.47), H-5              |
| H-9 (2.36)  | H-14, H-9' (1.74), H-10, H-8              |
| H-9' (1.74) | H-9 (2.36), H-10                          |
| H-5         | H-6 (2.13), H-6'(2.55), H-2               |
| H-2         | H-5, H-10, H-3 (2.63), H-3'(2.93), H-15   |
| H-13 (5.47) | H-6' (2.55), H-13' (6.19),                |
| H-13'(6.19) | H-13 (5.47)                               |

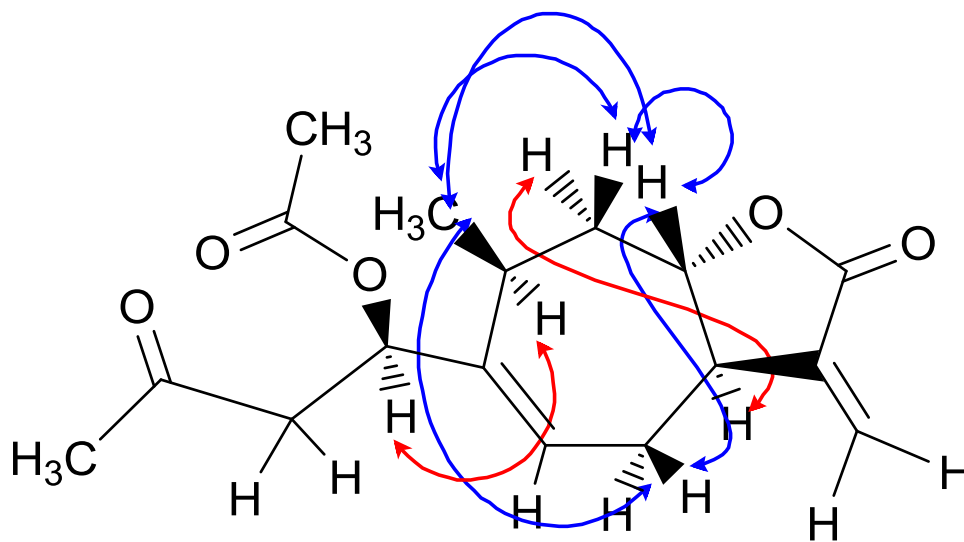


Figura 3.74. Algunas correlaciones NOESY de la sesquiterpenolactona 5.

En base a sus espectros de RMN la sesquiterpenlactona 5 fue identificada como 2-epi-xanthinin. Esta molécula no se había aislado antes del *X.cavanillesii*, sólo está reportada la presencia de su isómero xanthumina en hojas (De Riscalá et al., 1994).

Tampoco se había estudiado en forma independiente las flores del *X.cavanillesii*. Los trabajos anteriores estudiaron las partes aéreas del mismo (De Riscalá et al., 1994; Favier et al., 2005).

### **3.3.2- Identificación de Sesquiterpenlactona 1 en extracto *Xanthium cavanillesii* utilizando UPLC/ESI-MS/MS.**

#### *Introducción.*

La espectroscopia de masas en tándem con ionización por electrospray (ESI-MS/MS) ha sido exitosamente aplicada para la identificación de compuestos bioactivos en extractos de plantas (Wolfender et al., 2003; Smyth et al., 2004; Colombo et al., 2005; Pivatto et al., 2005). Esta técnica combinada es particularmente útil ya que elimina la necesidad de aislar un compuesto puro (proceso largo y tedioso) antes de la etapa de identificación.

El objetivo del presente estudio es el desarrollo de un método rápido y sensible para la identificación de sesquiterpenlactonas en extractos de *Xanthium* de forma de mejorar tanto la dereplicación de los compuestos comunes como la búsqueda específica de los más interesantes.

Para este fin se optimizó el método para la identificación de sesquiterpenlactona 1 en el extracto del *Xanthium cavanillesii* usando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI MS/MS).

#### *Optimización condiciones (ESI) MS/MS.*

Espectros *full scan* y MS/MS de la sesquiterpenlactona 1 (Fig. 3.12) fueron obtenidos por infusión directa de 0.1 mg/mL en MeOH a un flujo de 10  $\mu$ L/min. Se realizaron los experimentos en el modo positivo y negativo de ionización resultando mejores señales en el modo positivo.

El compuesto presenta un importante aducto con sodio  $m/z$  271,04  $[M+Na]^+$  (ESI+) el cual se pudo minimizar agregándole a la fase móvil una pequeña cantidad de ácido fórmico. Se seleccionó el precursor  $m/z$  249,04  $[M+H]^+$ . Las mejores condiciones para su detección fueron: voltaje de cono, 18 V; temperatura de la fuente, 120 °C; temperatura desolvatación, 300 °C; flujo gas cono, 30 L/h; flujo gas desolvatación, 350 L/h. Dos iones productos fueron adquiridos:  $m/z$  231,03  $[(M+H)-H_2O]^+$  y  $m/z$  203,05  $[(M+H)-H_2O-CO]^+$  y la mejor energía de colisión fue 10 eV para los dos iones (Fig. 3.75). La energía de colisión afecta significativamente la abundancia y también el tipo de iones generados en los espectros MS/MS. De esta manera para cada ion fragmento se elige la energía de colisión que produzca su máxima respuesta. Las transiciones  $m/z$  249,04  $\rightarrow$  231,03 y  $m/z$  249,04  $\rightarrow$  203,05 fueron utilizadas para detectar el compuesto bioactivo por MRM. Dwell seleccionado fue 30 ms para obtener formas de picos adecuados en UPLC.

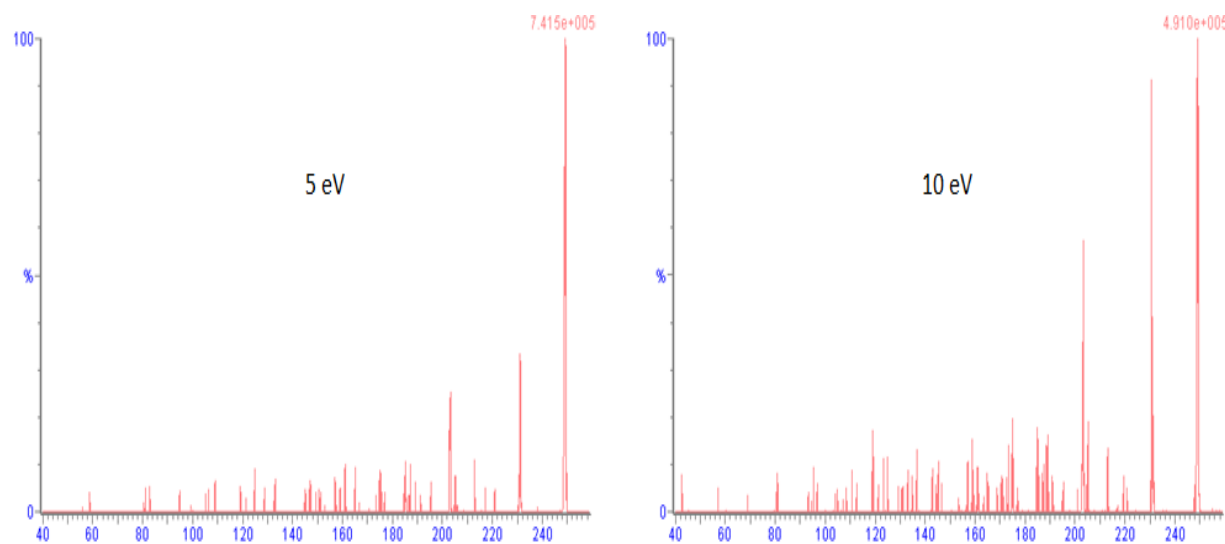


Figura 3.75. Optimización de la energía de colisión ( $m/z$  249,04  $\rightarrow$  231,03 y  $m/z$  249,04  $\rightarrow$  203,05). Espectros *daughter scan* para  $m/z$  249,04 con energía de colisión 5 eV y 10 eV.

### Optimización condiciones LC.

La separación cromatográfica fue realizada usando un flujo de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Diferentes flujos fueron probados, la elección se basó en el compromiso entre sensibilidad, resolución y tiempo de análisis (Fig. 3.76). Como fase móvil se usó un gradiente con dos componentes: A (Agua + 1%  $\text{HCOOH}$ ) y B (Acetonitrilo + 1%  $\text{HCOOH}$ ). El porcentaje del modificador orgánico (B) fue cambiando linealmente de la siguiente manera: 0 min, 10%; 7min, 90%; 8.5 min, 100%; 9.5 min, 100%; 9.75 min, 10%, 11 min, 10%. El volumen de inyección fue 5  $\mu\text{L}$ . La temperatura de la columna fue 30  $^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de retención del compuesto bioactivo fue de 4.42 min (Fig. 3.77).

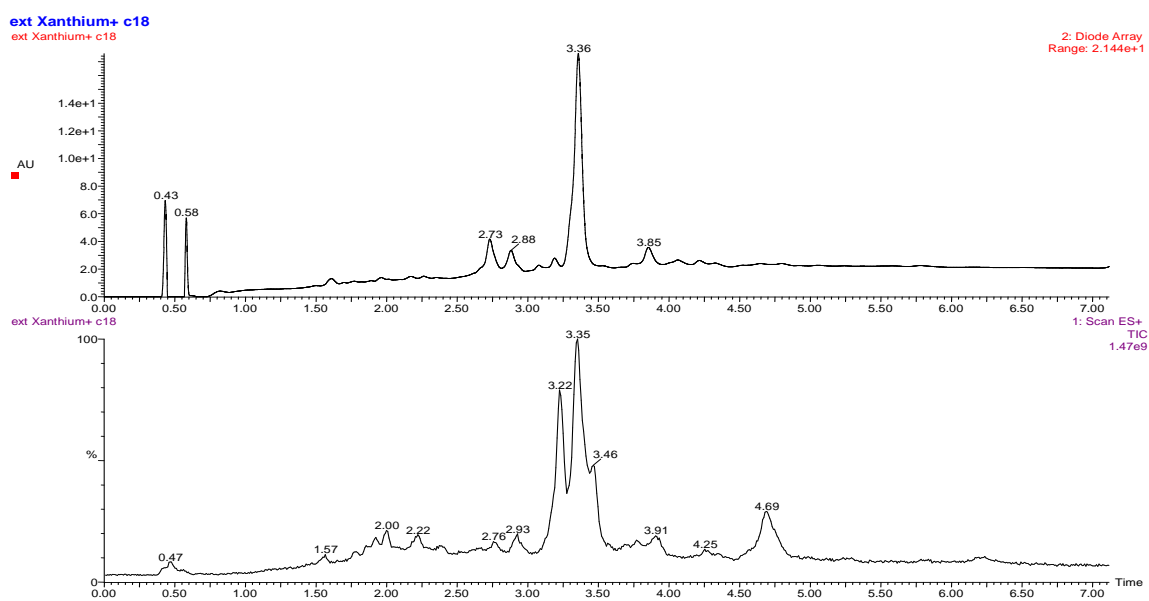


Figura 3.76. Cromatogramas extracto *X. cavanillesii*: Arreglo de Diodos y Corriente Iónica Total.

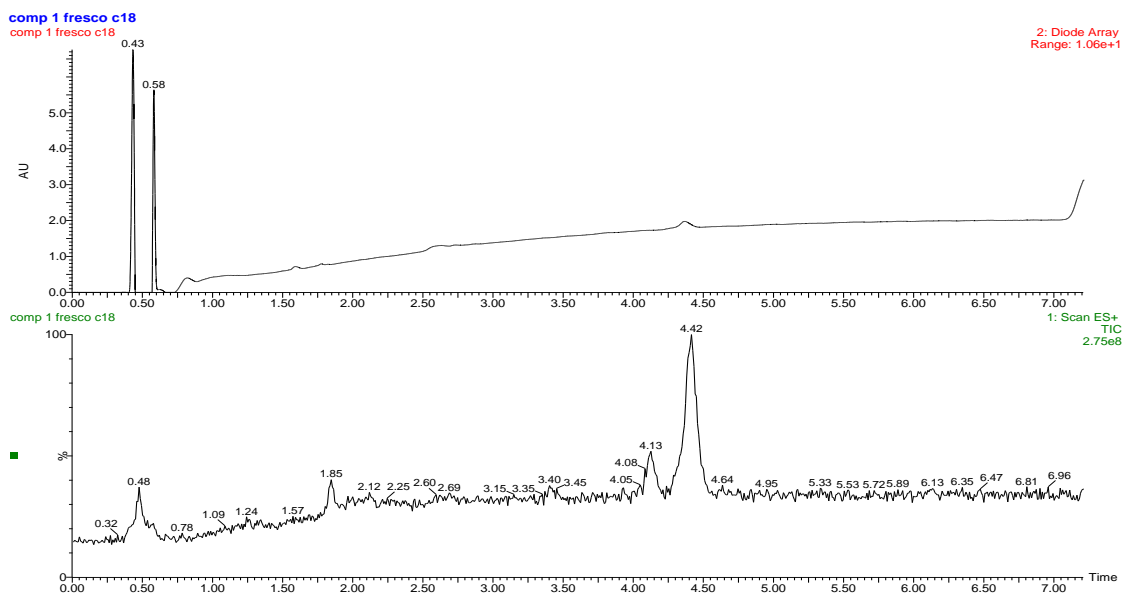


Figura 3.77. Cromatogramas de sesquiterpenolactona 1: Arreglo de Diodos y Corriente Iónica Total.

#### *Análisis del extracto.*

La Figura 3.78 presenta los cromatogramas del *X.cavanillesii* obtenidos por el modo MRM. Aunque no se detectó la sesquiterpenolactona 1 (tr: 4.42 min.) se pudo determinar la presencia de otras sesquiterpenolactonas ya que aparecen otros compuestos con las transiciones seteadas (las cuales son comunes a otras sesquiterpenolactonas). Dos de éstos compuestos fueron luego identificados como 4-epi-xanthanol y 4-epi- isoxanthanol. En los espectros ESI-MS/MS de las lactonas los principales fragmentos derivan de las pérdidas neutrales de CO y/o H<sub>2</sub>O (Crotti et al., 2004).

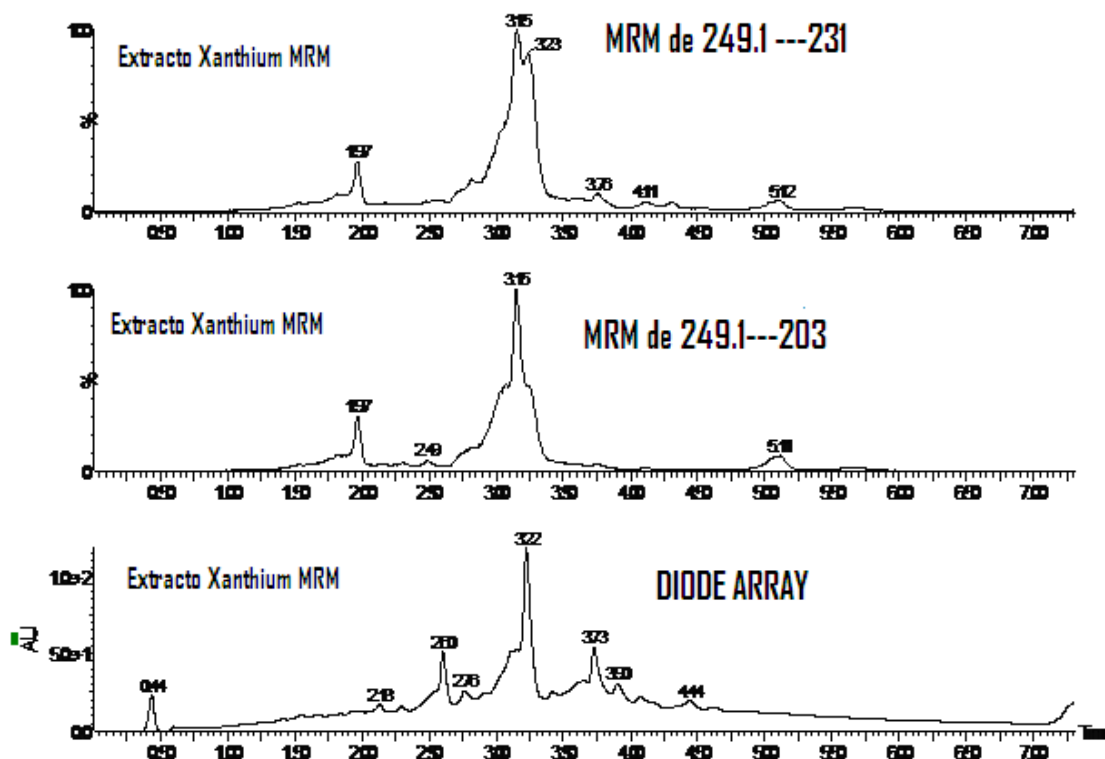


Figura 3.78. Análisis UPLC-MS/MS en modo MRM del extracto *X.cavanillesii*.

### Conclusiones.

El método desarrollado en el presente trabajo basado en LC-ESI-MS/MS permite una rápida y selectiva detección de la sesquiterpenlactona 1 en una matriz compleja usando una mínima cantidad de muestra. Dicho método debe validarse para verificar que es apto para el propósito planteado. También sería interesante ampliar el alcance y extenderlo a otras matrices como por ejemplo raíz y flor de *X. cavanillesii* así como a otras especies de *Xanthium* dónde es probable que se encuentre ésta molécula.

### 3.3.3 - Actividad antibacteriana del *Xanthium cavanillesii*.

#### *Concentraciones inhibitorias mínimas (CIM's).*

Las Concentraciones Inhibitoria Mínimas (CIM's) fueron determinadas por el método de microdilución usando cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible (ATCC 6538 p) y meticilino resistentes (ATCC 43300, ATCC 700699).

La actividad antibacteriana del extracto, fracciones y compuestos puros (sesquiterpenlactonas 1, 2, 3, 4 y 5) contra cepas sensibles y resistentes de *S.aureus* son presentadas en la Tabla 3.7.

Las CIM's halladas para todas las muestras fueron mayores comparadas con los antibióticos testeados contra la cepa sensible ATCC 6538 p.

Para la cepa resistente ATCC 700699 la actividad de los compuestos puros superó claramente a los antibióticos, con MICs de 31, 236 y 356  $\mu\text{g} / \text{mL}$  para los compuestos del *Xanthium*, gentamicina y oxacilina, respectivamente.

Todos los compuestos aislados mostraron una actividad muy similar contra todas las cepas, lo cual es consistente con estudios anteriores, siendo el farmacóforo principal de estas moléculas el  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lactona, y el resto de la molécula actuando como modulador de la actividad (Schmidt, 1999; Gibbons, 2004; Ordoñez et al., 2011; Vasas & Hohmann, 2011).

Tabla 3.7: CIM's de muestras contra cepas de *S. aureus*

| Muestra/Cepa                            | Concentración inhibitoria mínima<br>(µg/mL) |             |            |
|---|---|-------------|------------|
|   | ATCC 6538 p                                 | ATCC 700699 | ATCC 43300 |
| Extracto hojas<br><i>X.cavanillesii</i> | 67  | 135         | 269        |
| Fracción VLC 8                          | > 500                                       | > 500       | > 500      |
| Fracción VLC 7                          | > 500                                       | > 500       | > 500      |
| Fracción VLC 6                          | 67  | 116         | 233        |
| Fracción VLC 5                          | 116   | 233         | 233        |
| Fracción VLC 4                          | > 500                                       | > 500       | > 500      |
| Fracción 18-35                          | 125   | 62.5        | 62.5       |
| Sesquiterpenlactona<br>1                | 15  | 31          | 62.5       |
| Sesquiterpenlactona<br>2                | 15  | 31          | 62.5       |
| Sesquiterpenlactona<br>3                | 15  | 31          | 62.5       |
| Sesquiterpenlactona<br>4                | 15  | 62.5        | 62.5       |
| Sesquiterpenlactona<br>5                | 15  | 125         | 62.5       |
| Gentamicina sulfato                     | 4   | 236         | 15         |
| Oxacilina sódica                        | 0.15  | 356         | 45         |

Nota: Ver muestras de la fila 1-7 en la Fig. 3.28 (Esquema aislamiento y purificación de sesquiterpenlactona 2 y 3).



### 3.4.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, A.A., Jakupovic, J., Bohlman, F., Ahmed, A.M. (1990) Sesquiterpene lactones from *Xanthium pungens*. *Phytochemistry*, 29, 2211-2215.
- Akter, R., Hasan, S.M.R., Hossain, Md. M., Jamila, M., Mazumder, Md. E.H., Rahaman, S. (2009) *In vitro* antioxidant and *in vivo* antidiarrheal activity of hydromethanolic extract of *Xanthium Indicum* Koenig Leaves. *European Journal Science Research*, 33 (2), 305-312.
- Ancuceanu, R.V. & Istudor, V. (2004) Pharmacologically active natural compounds for lung cancer. *Alternative Medicine Review*, 9 (4), 402-419.
- Bachelier, A., Mayer, R., Klein, C.D. (2006) Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16 ,5605-5609.
- Bremer, K. (1996) Major clades and grades of the Asteraceae. En *Compositae: Systematics*; Royal Botanic Garden: Kew, Australia.
- Bohlmann, F., Singh, P., Joshi, K.C., Singh, C.L. (1982) Xanthanolides from *Xanthium indicum*. *Phytochemistry*, 21, 1441-1443.
- Bohlmann, F. & Zdero, C. (1981) An isomer of xanthanol from *Xanthium orientale*. *Phytochemistry*, 20 (10), 2429-2430.
- Bui, V-B., Liu, S-T., Zhu, J-J., Xiong, J., Zhao, Y., Yang, G-X., Xia, G., Hua, J-F. (2012) Sesquiterpene lactones from the aerial parts of *Xanthium sibiricum* and their cytotoxic effects on human cancer cell lines, *Phytochemistry Letters*, 5, 685-689.
- Cerdeiras, M.P., Alborés, S., Etcheverry, S., Lucían, V., Soubes, M., Vázquez, A. (2007) Antimicrobial activity of *Xanthium cavanillesii* extract. *Pharmaceutical Biology*, 45 (3), 251-254.
- CLSI (2012) *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition*. CLSI, Wayne, PA, USA.

- Colombo, R., Yariwake, J.H., Queiroz, E.F., Ndjoko, K. and Hostettmann, K. (2005) On-line identification of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) methoxyflavones by liquid chromatography–UV detection using post-column derivatization and liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1082, 51-57.
- Crotti, A.E.M., Fonseca, T., Hong, H., Staunton, J., Galembeck, S.E., Lopes, N.P., Gates, P.J. (2004) The fragmentation mechanism of five-membered lactones by electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 232, 271-276.
- Cumanda, J., Marinoni, G., De Bernardi, M., Vidari, G., Vita Finzi, P. (1991) New Sesquiterpenes from *Xanthium catharticum*. *Journal of Natural Products*, 54 (2), 460-465.
- De Riscalca, E. C., Fortuna, M. A., Catalán, C. A., Díaz, J. G., Herz, W. (1994) Xanthanolides and a bis-norxanthanolide from *Xanthium cavanillesii*. *Phytochemistry*, 35 (6), 1588-1589.
- Delgado, G., García, P.E., Roldan, R.I., Bye, R., Linares, D. (1996) New eremophilane sesquiterpene lactones from the roots of the medicinal plant *Roldana sessilifolia* (Asteraceae). *Natural Product Letters*, 8, 145-150.
- Djeddi, S., Karioti, A., Sokovic, M., Koukoulitsa, C., Skaltsa, H. (2008) A novel sesquiterpene lactone from *Centaurea pullata*: structure elucidation, antimicrobial activity, and prediction of pharmacokinetic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 3725-3731.
- Emerenciano, V.P., Ferreira, M.J.P., Branco, M.D., Dubois, J.E. (1998) The application of Bayes theorem in natural products as a guide for skeletons identification. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 40, 83-92.
- Facey, P.C., Peart, P.C., Porter, R.B.R. (2010) The Antibacterial Activities of Mikanolide and its Derivatives. *West Indian Medical Journal*, 59 (3), 249-252.

- Favier, L.S., Maria, A.O.M., Wendel, G.H., Borkowski, E.J., Giordano, O.S., Pelzer, L., Tonn, C.E. (2005) Anti-ulcerogenic activity of *Xanthium cavanillesii* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (3), 260-267.
- Fischer, N.H., Olivier E.J., Fischer H.D. (1979) The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. En: W.Herz, H. Grisebach, G.W Kirby (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer, Wien, New York, 38, 47-390.
- Fischer, N.H. (1990) Sesquiterpe Lactones: Biogenesis and Biomimetic Transformations. En: G.H.N.Towers & H.A. Stafford (Eds.), *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*, Plenum Press, New York, 161-201.
- Gibbons S. (2004) Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Products Reports*, 21, 263-277.
- Ginesta-Peris, E., Garcia-Breijo, F.J., Primo-Yúfera, E. (1994) Antimicrobial activity of xanthatin from *Xanthium spinosum* L. *Letters in Applied Microbiology*, 18 (4), 206-208.
- Haasnoot, C. A. G., de Leeuw, F. A. A. M., Altona, C. (1980) The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I: An empirical generalization of the Karplus equation. *Tetrahedron*, 36 (19), 2783-2792.
- Han, T., Li, H.L., Zhang, Q.Y., Zheng, H.C., Qin, L.P. (2006) New thizinediones and other compounds from *Xanthium strumarium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 42 (5), 567-570.
- Han, T., Li, H.L., Zhang, Q.Y., Han, P., Zheng, H.C., Rehman, K., Qin, L.P. (2007) Bioactivity-guided fractionation for anti-inflammatory and analgesic properties and constituents of *Xanthium strumarium* L. *Phytomedicine*, 14 (12), 825-829.
- Harborne, J. B., Baxter, H., Moss, G. P. (1999) *Phytochemical Dictionary: a Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 2nd edition. Taylor and Francis, London.

- Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Droge, W., Schmitz, M.L. (1999) The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappaB by targeting the I kappa B kinase complex. *Journal of Immunology*, 163, 5617-5623.
- Herz, W. (1973) Pseudoguaianólides in Compositae. En: G. Bendz & J. Santesson (Eds.), *Chemistry in Botanical Classification Nobel Symposia 25*, Academic Press, New York, 153-173.
- Holm, L.G., Plucknett, D.L., Pancho, J.V., Herberger, J.P. (1977) *The World's Worst Weeds*. East-West Center, University Press, Hawaii, Honolulu.
- Hsu, F.L., Chen, Y., Cheng, J. (2000) Caffeic acid as active principle of fruits *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetics rat. *Planta Medica*, 66, 228-230.
- Huo, Y., Shi, H., Li, W., Wang, M., Li, X. (2010) HPLC determination and NMR structural elucidation of sesquiterpene lactones in *Inula helenium*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (4), 942-946.
- Joshi, S.P., Rojatkar, S.R., Nagasampagi, B. (1977) Antimalarial activity of *Xanthium strumarium*. *Journal of Medicinal Aromatic Plant Sciences.*, 19, 366-368.
- Kovács, A., Vasas, A., Forgo, P., Réthy, B., Zupkó I., Hohmann, J. (2009) Xanthanolides with antitumour activity from *Xanthium italicum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 64, 343-349.
- Lavault, M., Landreau, A., Larcher, G., Bouchara, J-P., Pagniez, F., Le Pape, P., Richomme, P. (2005) Antileishmanial and antifungal activities of xanthanolides isolated from *Xanthium macrocarpum*. *Fitoterapia*, 76 (3-4), 363-666.
- Lee, K.H., Ibuka, T., Wu, R.Y., Geissman, T.A. (1977) Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. *Phytochemistry*, 16, 1177-1181.
- Lombardo, A. (1983). *Flora Montevidensis*. Montevideo: IMM.

- Loretti, A.P., Bezerra, P.S., Silva Ilha, M.R., Barros, S.S., Barros, C.S.L. (1999) Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em ovinos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 19 (2), 71-78.
- Love, D., Dansereau, P. (1959) Biosystematic studies on *Xanthium*: taxonomic appraisal and ecological status. *Canadian Journal of Botany*, 37 (2), 173-208.
- Ma, Y.T., Huang, M.C., Hsu, F.L., Chang, H.F. (1998) Thiazinedione from *Xanthium strumarium*. *Phytochemistry*, 48 (2), 1083-1085.
- Mangel, S.M., Sangwan, N.K., Dhindsa, K. (1992) Xanthanolides from *Xanthium strumarium*. *Phytochemistry*, 32, 206-207.
- Marco J. A., Sanz-Cervera J. F., Corral J., Carda M., Jakupovic J. (1993) Xanthanolides from *Xanthium*: Absolute configuration of xanthanol, isoxanthanol and their C-4 epimers. *Phytochemistry*, 34, 1569-1576.
- Masvingwe, C. & Maveyengwa, M. (1998) Toxicological evaluation of the plant *Xanthium strumarium* in pigs in Zimbabwe. *J. Venomous Anim. Toxins*, 4 (2), 113-119.
- Ordóñez, P.E, Quave, C.L., Reynolds, W.F., Varughese, K.I., Berry, B., Breen, P.J., Malagón, O., Smeltzer, M.S., Compadre, C.M. (2011) Sesquiterpene lactones from *Gynoxys verrucosa* and their anti-MRSA activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (2), 1055-1059.
- Pagán, O.R., Rowlands, A.L., Azam, M., Urban, K.R, Bidja, A.H., Roy, D.M., Feeney, R.B., Afshari, L.K. (2008) Reversal of cocaine-induced planarian behavior by parthenolide and related sesquiterpene lactones. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 89, 160-170.
- Picman, A.K. (1986) Biological activities of sesquiterpenelactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, 14, 255-281.

- Picman, A.K, Ranieri, R.L., Towers, G.H.N., Lam, J. (1980) Visualization reagents for sesquiterpene lactones and polyacetylenes in thin -layer chromatograms. *Journal of Chromatography A*, 189 (2), 187-198.
- Pivatto, M., Crotti A.E.M., Lopes, N.P., Castro-Gamboaa, I., Rezendea, A., Viegas, C., Young, M.C.M., Furlana, M., Bolzani, V.S. (2005) Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 1431-1438.
- Qin, L.P., Han, T., Li, H.L., Zhang, Q.Y., Hanchen Zheng, H.C. (2006). A new thiazinedione from *Xanthium strumarium*. *Fitoterapia*, 77, 245-246.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettman, K., Monod, M., Frenck, E. (1991) A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2, 199-203.
- Ragonese, A.E. & Milano, V.A. (1984) Vegetales y sustancias tóxicas de la flora Argentina. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. (Ed. Acme S.A.C.I.), 2, 8, 413.
- Ramírez-Erosa, I., Huang, Y., Hickie, R.A., Sutherland, R.G., Barl, B. (2007) Xanthatin and xanthinosin from the burs of *Xanthium strumarium* L. as potential anticancer agents. *Canadian Journal Physiology and Pharmacology*, 85 (11), 1160-1172.
- Raushanara, A., Hasan, S.M.R., Hossain, M.M., Jamila, M., Mazumder, M.E.H., Rahaman, S. (2009) *In vitro* antioxidant and *in vivo* antidiarrheal activity of hydromethanolic extract of *Xanthium Indicum* Koenig. Leaves. *European Journal of Scientific Research*, 33 (2), 305-312.
- Rodriguez, E., Towers, G.H.N., Mitchell, J.C. (1976) Biological Activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15, 1573-1580.

- Roussakis, Ch., Chinou, I., Vayas, C., Harvala, C., Verbist, J.F. (1994) Cytotoxic activity of xanthatin and the crude extract of *Xanthium strumarium*. *Plantas Medicinales*, 60, 473-474.
- Sato, Y., Oketani, H., Yamada, T., Singyouchi, K., Ohtsubo, M., Kihara, T. (1997) A xanthanolide with potent antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10, 1042-1044.
- Seaman, F.C. (1982) Sesquiterpene lactones as taxonomic characters in the Asteraceae. *The Botanical Review*, 48, 123-551.
- Seckbach, J. (2011) The *Xanthium* Genus. En: Z. Dubinsky & J. Seckbach (Eds.), *All Flesh Is Grass*, 16, 311-319. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-9316-5> [Accessed March 21, 2014].
- Scherer, R., Duarte, M.C.T., Catharino, R.R., Nachtigall, F.M., Eberlin, M.N., Teixeira Fiho, J., Godoy, H.T. (2009) *Xanthium strumarium* L. antimicrobial activity and carboxyatractyloside analysis through electrospray ionization mass spectrometry. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11(2), 159-163.
- Scotti, M. T., Emerenciano, V., Ferreira, M. J., Scotti, L., Stefani, R., da Silva, M. S., Junior, F. J. B. M. (2012) Self-organizing maps of molecular descriptors for sesquiterpene lactones and their application to the chemotaxonomy of the Asteraceae family. *Molecules*, 17(4), 4684-4702.
- Schmidt, T.J. (1999) Toxic activities of sesquiterpene lactones: structural and biochemical aspects. *Current Organic Chemistry*, 3, 577- 608.
- Schmidt, T. J. (2006) Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones. *Studies in Natural Products Chemistry*. En: A. Rahman (Ed.), Elsevier, 309-392.
- Smyth, W.F., Joyce, C., Ramachandran, V.N., O'Kane, E., Coulter, D. (2004) Characterization of selected hypnotic drugs and their metabolites using electrospray ionisation with ion trap mass spectrometry and with quadrupole

- time-of-flight mass spectrometry and their determination by liquid chromatography–electrospray ionization–ion trap mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 506, 203-208.
- Spring, O. & Buschmann, H. (1996) A chemosystematic survey of sesquiterpene lactones in the Helianthinae (Compositae). En: D.J.N. Hind, H.J. Beentje (Eds.), *Compositae: Systematics, Proceedings of the International Compositae Conference, 1994*, 1, Kew Scientist, Kew, 307-311.
- Spring, O., Klaus, A., Hager, A. (1982) Three biologically active heliangolides from *Helianthus annuus*. *Phytochemistry*, 21 (10), 2551-2553.
- Talakal, T.S., Dwivedi, S.K., Sharma, S.R. (1995) In vitro and in vivo antitrypanosomal activity of *Xanthium strumarium* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 49 (3), 141-145.
- Tanaka, N., Yazawa, T., Aoyama, K., Murakami, T., 1976. Chemische Untersuchungen der Inhaltsstoffe von *Xanthium canadense* Mill. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 24, 1419-1421.
- Tsankova, E.T., Trendafilova, A., Kujumgiev A, Galabov, A.S., Robeva, P.R. (1994) Xanthanolides of *Xanthium italicum* Moretti and their biological activity. *Zeitschrift fuer Naturforschung*, 49, 154-159.
- Vasas, A. & Hohmann, J. (2011) Xanthane sesquiterpenoids: structure, synthesis and biological activity. *Natural Product Reports*, 28, 824-827.
- Wagner, H.(1977) Pharmaceutical and economic uses of the Compositae. En: V.H. Heywood, J.B. Harborne, B.L.Turner (Eds.), *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Academic Press, London,1, 411-433.
- Wolfender, J.L., Ndjoko, K. and Hostettmann, K. (2003) Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A*, 1000, 437-455.



- Wu, C., Chen, F., Rushing, J., Wang, X., Kim, H., Huang, G., Haley-Zitlin, V., He, G. (2006) Antiproliferative activities of parthenolide and golden feverfew extract against three human cancer cell lines. *Journal of Medicinal Food*, 9 (1), 55-61. doi:10.1089/jmf.2006.9.55.
- Zdero, C. & Bohlmann, F. (1990) Systematics and evolution within the Compositae, seen with the eyes of a chemist. *Plant Systematics and Evolution*, 171(1-4), 1-14.
- Zingarelli, B., Hake, P. W., Denenberg, A., Wong, H.R. (2002) Sesquiterpene lactone parthenolide, an inhibitor of I $\kappa$ B kinase complex and nuclear factor- $\kappa$ B, exerts beneficial effects in myocardial reperfusion injury, *Shock*, 17(2), 127-134.

**CAPÍTULO 4**  
**CONCLUSIONES**

## CAPÍTULO 4

### CONCLUSIONES

#### 4.1.- Conclusiones

Durante el transcurso de este trabajo de investigación se ha reafirmado a las plantas como fuente de nuevos metabolitos secundarios biológicamente activos. A pesar que la especie *X.cavanillesii* ya había sido estudiada desde el punto de vista fitoquímico se descubrió una nueva sesquiterpenlactona con un esqueleto nunca antes descrito.

La estrategia usada de colecta dirigida, especialmente con un enfoque etnomédico, fue exitosa. El 67 % de los extractos fueron activos frente a por lo menos una de las cepas bacterianas testeadas.

Las plantas presentan compuestos con actividad antibacteriana, pero dicha actividad es generalmente débil comparada con los antibióticos comunes producidos por hongos y bacterias. Las CIM's halladas para los compuestos puros del *Xanthium* fueron mayores comparadas con los antibióticos testeados tanto contra la cepa sensible ATCC 6538 p como con la cepa resistente ATCC 43300. Una explicación es que las plantas pueden utilizar una estrategia química diferente para el control de las infecciones microbianas, produciendo compuestos que actúan en combinación y que tienen poca eficacia actuando individualmente (Dixon, 2001; Lewis & Ausbel, 2006).

En efecto, los vegetales presentan miles de compuestos secundarios que son débilmente activos que actúan sobre diversas dianas celulares. Estos compuestos son de amplio espectro y suelen ocurrir en mezclas multicomponentes. Estos cócteles proporcionan ventajas evolutivas, ya que las plantas pueden protegerse contra una amplia variedad de depredadores sin la necesidad de adaptarse específicamente a cada uno de ellos (Rather et al., 2013).

Consistentemente, el 90% de todas las plantas medicinales que han sido minuciosamente estudiadas contienen compuestos de amplio espectro con bioactividad moderada o débil (Wink & Schimner, 1999).

Esto abre entonces una nueva estrategia a seguir para la búsqueda de antibacterianos a partir de las plantas enfocándose en la búsqueda de moduladores de la resistencia bacteriana (Tegos et al., 2002). Los moduladores de la resistencia bacteriana son compuestos que potencian la actividad de un antibiótico contra una cepa resistente. Estos compuestos pueden tomar como blanco un mecanismo de resistencia o actuar en forma sinérgica mediante un mecanismo no conocido. Esta idea ha sido probada con el caso de la berberina y 5'-methoxyhydrocarpin aislados de *Berberis fremontii*. La berberina, es un catión hidrófobo que aumenta la permeabilidad de la membrana y se intercala en el ADN, sin embargo es inefectivo como antibacteriano porque es activamente bombeado hacia el exterior celular por una bomba de eflujo (MDR). El compuesto 5'-methoxyhydrocarpin es un potente inhibidor de dicha bomba de eflujo por lo que la combinación de ambos compuestos posee una gran actividad antibacteriana (Stermitz et al., 2000). Otro ejemplo de un modulador de la resistencia es el galato de epicatequina. Este compuesto es un constituyente del té verde e inhibe la resistencia a la meticilina en cepas MRSA (Hamilton-Miller & Shah, 2000). Actúa inhibiendo la síntesis de PBP2a afectando sólo las cepas de *S.aureus* que sintetizan esa proteína por lo que es capaz de revertir la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en las cepas MRSA.

#### **4.2.- Bibliografía**

- Dixon, R.A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 14, 411(6839), 843-847.
- Garvey, M.I., Rahman, M., Gibbons, S., Piddock, L.J.V. (2010) Medicinal plant extracts with efflux inhibitory activity against Gram negative bacteria, *International Journal of Antimicrobial Agents*,37(2), 145-151.
- Hamilton-Miller, J.M., Shah, S. (2000) Activity of the tea component epicatechin gallate and analogues against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46, 852-853.
- Lewis, K. & Ausubel, F. M. (2006) Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*, 24 (12), 1504-1507.

- Rather, M.A., Bhat, B.A., Qurish, M.A. (2013) Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the “one drug to fit all” model breaking down? *Phytomedicine*, 21(1), 1-14.
- Stermitz, F. R., Lorenz, P., Tawara, J. N., Zenewicz, L. A., Lewis, K. (2000) Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), 1433-1437.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, K., Lewis, K. (2002) Multidrug pumps inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (10), 3133-3141.
- Wink, M. & Schimmer, O. (1999) Modes of action of defensive secondary metabolites. En: Wink, E. (Ed.), *Function of Plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*, Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press and CRC Press, 17-133.