

Búsqueda de compuestos bioactivos en *Erythrina crista-galli* infectada con *Phomopsis* sp.

Flavia Redko

Universidad de Buenos Aires, Cátedra de Farmacognosia, IQUIMEFA (UBA-CONICET), Junín 956, 2° piso (1113)
Buenos Aires, Argentina.
Correo electrónico: fredko@ffyb.uba.ar

Compendio de tesis

Lugar y fecha de aprobación de la tesis:
Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. 9 de mayo de 2013.

Resumen

Una de las estrategias alternativas utilizadas para encontrar nuevas moléculas bioactivas es investigar otros organismos que habitan en los biotopos, y se presta especial atención a las interacciones ambientales entre sí y las plantas que podrían producir aún una mayor cantidad de metabolitos secundarios. Dentro de estos microorganismos, los endófitos son considerados una importante fuente de nuevos metabolitos secundarios de explotación potencial para usos médicos, agrícolas o por otras áreas industriales. En este trabajo la investigación se centró en la búsqueda de compuestos bioactivos de *Erythrina crista-galli* infectada con un hongo endofítico. Se recolectaron muestras de *E. crista-galli* de los alrededores de la Provincia de Buenos Aires y de todas estas muestras se aisló e identificó al endófito como perteneciente al género *Phomopsis*. Se estudiaron las actividades antimicrobiana y antiinflamatoria de los extractos de *E. crista-galli* relacionadas con algunos de sus usos tradicionales. El extracto acetónico de las ramas jóvenes presentó actividad antibacteriana sobre *Bacillus brevis* y *B. subtilis* y antiinflamatoria *in vivo* (en edema de oreja de ratón) e *in vitro* (en macrófagos activados por lipopolisacáridos). Del extracto acetónico con actividad antimicrobiana se aislaron e identificaron dos compuestos, daidzeína y coumestrol, y se identificó genisteína por cromatografía contra testigos. La concentración inhibitoria mínima de daidzeína, coumestrol y genisteína frente a *B. brevis* fue de 137,81, 16,33 y 64,81 μ M, respectivamente. En el extracto acetónico con actividad antiinflamatoria se identificaron, por cromatografía contra testigos, daidzeína, genisteína, coumestrol, biochanina A y formononetina. Genisteína, coumestrol y biochanina A presentaron una dosis efectiva 50, de 0,14, 0,54 y 0,75 μ g/ml, respectivamente, en el modelo de edema en oreja de ratón. Para evaluar la influencia del endófito en el metabolismo secundario de *E. crista-galli* se obtuvieron plantines de cultivo. No se pudieron obtener plantines libres de hongo con los tratamientos aplicados. Se sobreinfectó un lote de plantines con *Phomopsis* sp. y se cuantificó su contenido de coumestrol (0,04 %) y daidzeína (0,05 %) en comparación con el de un grupo control (0,01 % y 0,02 %, respectivamente). Del extracto acetónico de los plantines sobreinfectados se aisló e identificó un glicósido de isorhamnetina.

Palabras clave: *Erythrina crista-galli* - hongos endofíticos - actividad antimicrobiana - actividad antiinflamatoria - *Phomopsis* sp. daidzeína - genisteína - coumestrol.

Key words: *Erythrina crista-galli* - endophytic fungi - antimicrobial activity - antiinflammatory activity - *Phomopsis* sp. daidzein - genistein - coumestrol.

Search for Bioactive Compounds from *Erythrina Crista-galli* Young Twigs Infected with *Phomopsis* sp.

Abstract

One of the alternative strategies currently used to find new bioactive molecules is to investigate other organisms that inhabit in the biotopes. The environmental interactions between them and plants could produce more secondary metabolites. Within these microorganisms, endophytic fungi are considered an important source of new potential secondary metabolites for medicinal, agricultural or other industrial uses. The aim of this work was the search of bioactive compounds of medicinal plant infected with endophytic fungus. The research was focused in samples of *E. crista-galli* collected from the surroundings of the Buenos Aires Province. In all the samples, the endophytes belonging to the genus *Phomopsis* were isolated and identified. The antimicrobial and anti-inflammatory activities of *E. crista-galli* extracts related to some of their traditional uses were studied. Acetone extract showed antibacterial activity against *Bacillus brevis* and *B. subtilis* by disk diffusion assay and bioautography. *In vivo* (mouse ear edema) and *in vitro* (macrophages activated by lipopolysaccharides) anti-inflammatory activity was also found. From the acetone extract with antimicrobial activity two compounds, daidzein and coumestrol, were isolated and identified. Genistein was identified by chromatography against authentic sample. Minimum inhibitory concentration for daidzein, coumestrol and genistein, against *B. brevis*, were 137.81, 16.33 and 64.81 μM , respectively. Daidzein, coumestrol, genistein, formononetin and biochanin A were identified in the acetone extract with anti-inflammatory activity by chromatographic methods against standards. Genistein, coumestrol and biochanin A showed an ED_{50} of 0.14, 0.54 and 0.75 $\mu\text{g/ml}$, respectively, in the mouse ear edema model. In order to study the influence exerted by the endophyte in the secondary metabolism of *E. crista galli* young twigs, seedlings were cultivated. No seedlings free from the endophyte could be obtained. A group of seedlings were sprayed with a spore *Phomopsis* suspension. Coumestrol (0.04 %) and daidzein (0.05 %) content of these seedlings was determined in comparison with a control group (0.01 % and 0.02 %, respectively). An isorhamnetin glycoside was isolated and identified in the acetone extract of the over-infected seedlings.

Las plantas medicinales como productoras de metabolitos secundarios

Las plantas medicinales constituyen el elemento inicial para el tratamiento primario de la salud y ocupan un lugar muy importante en algunas comunidades en el mundo. En este sentido, los productos naturales sirvieron durante mucho tiempo para el alivio de enfermedades, aún sin conocer la naturaleza química de los compuestos bioactivos presentes en estas mezclas complejas. En la actualidad, se buscan nuevas moléculas bioactivas en otros organismos que habitan en los biotopos y se presta especial atención a las interacciones ambientales entre sí y las plantas que podrían producir aún una mayor cantidad de metabolitos secundarios.

Dentro de estos microorganismos los endófitos son considerados una fuente de nuevos metabolitos secundarios de explotación potencial para usos médicos y agrícolas, o por otras áreas industriales. Según Strobel (2003), la búsqueda de compuestos activos en organismos que crecen en ciertos biotopos es promisoría. Los organismos y sus biotopos están constantemente sometidos a cambios metabólicos e interacciones ambientales que producirían más metabolitos secundarios. Los endófitos son microbios que habitan esos biotopos (las plantas superiores) por lo cual son considerados una fuente de nuevos metabolitos secundarios de explotación potencial.

Existen sobre la tierra casi 300.000 especies, y cada planta individual hospeda, al menos, un endófito (Strobel y col., 2004). Como respaldo a esta idea se han aislado de los endófitos numerosos compuestos (que pertenecen a diferentes grupos químicos: alcaloides, péptidos, esteroides, terpenoides, fenoles, quinonas y flavonoides) (Guo y col., 2008). *Pestalotiopsis* sp., *Streptomyces* sp. y *Phomopsis* sp. son los hongos endofíticos más comunes en cuanto a la producción de metabolitos antimicrobianos activos sobre *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. y *Pyricularia oryzae*.

Además, algunas plantas producen los mismos metabolitos que los hongos que las habitan. Tal es el caso del tejo, su principio activo, el paclitaxel, es también biosintetizado por la especie *Taxomyces andreani*, el hongo endofítico que lo habita (Staniek y col., 2009).

Dada la conocida capacidad de los hongos endofíticos para sintetizar compuestos bioactivos que pueden proteger a su huésped del ataque de hongos patógenos y bacterias, es que algunos de estos productos naturales han despertado el interés de numerosos investigadores con el objeto de descubrir nuevas drogas líderes con un amplio espectro de actividades biológicas y con un alto nivel de diversidad estructural (Jalgaonwanay col., 2011; Staniek., 2008; Tenguriay col., 2011; Zhaoy col., 2012).

De modo que es posible promover la obtención de estos metabolitos secundarios por procesos biotecnológicos a través del crecimiento de los endófitos aislados de las plantas, en un medio de cultivo apropiado, de manera que le brinde las condiciones necesarias para desarrollarse como si estuviese cohabitando la planta.

El género *Erythrina* está integrado por aproximadamente 130 especies, entre árboles y arbustos no volubles, con flores rojas a naranjas o anaranjadas (Araújo-Júnior y col., 2012; Zuloaga y col., 2008). Este género se caracteriza por tener un amplio rango de variación morfológica, una gran diversidad ecológica y por ocupar una posición especial entre las Leguminosae, familia a la que pertenece, debido a la estructura de su flor.

En la Argentina, *Erythrina crista-galli* es conocida como “ceibo”, es una especie originaria de Sudamérica y endémica de la República Argentina (Figura 1). En el país, existen extensos ceibales en la zona del Delta del Tigre que proveen de una nota

Figura 1.- Ejemplar de *Erythrina crista-galli*



de color al paisaje isleño. Pero más importante aún, es que *E. crista-galli* es una especie medicinal, entre cuyos usos populares se puede destacar el empleo de la infusión de las hojas, la corteza y las flores como analgésico, antiinflamatorio, para la curación de heridas, antibiótico, astringente, anticoagulante, narcótico y sedante; también es utilizado como cicatrizante, desinfectante, antihemorroidal, antitussivo y calmante (Burgstaller, 1984; Ratera y Ratera, 1980; Saggese y Saggese, 1950; Hieronymus, 1882; González y col., 1928; Lahitte y col., 1999; Tous-sarkissian, 1980).

En distintos extractos de diferentes partes de esta planta, como las hojas o la corteza, se han comprobado las actividades antimicrobiana, narcótica y sedante (Lahitte, 1998; Etcheverry y col., 2003) y se han aislado, entre sus metabolitos secundarios, compuestos fenólicos (Ingham y Markham, 1980; Mitscher y col., 1988; Imamura y col., 1981; Iinuma y col., 1994; Tanaka y col., 1997) y compuestos nitrogenados (Maier y col., 1999; Pino-Rodríguez y Prieto-González, 2004; Soto-Hernández y col., 2011).

En las últimas décadas, los hongos endofíticos han llamado la atención de numerosos investigadores, ya sea por el aporte como agente potencial de control biológico (dado por su doble rol fisiológico-ecológico en el medio ambiente), o por tratarse de una interesante fuente de obtención de nuevos metabolitos secundarios con actividades biológicas como herbicida, fungicida, antibacteriana y anticancerígena.

Vista la importancia de las interacciones hongo endofítico-plantas medicinales en la producción de metabolitos secundarios bioactivos, se generó un

proyecto con el fin de buscar compuestos bioactivos de plantas medicinales argentinas infectadas con hongos endofíticos, que se enmarcó en un convenio de Cooperación Bilateral Científico Tecnológica entre la SECyT (ex Secretaria de Ciencia y Técnica, actual Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina) y el Ministerio Federal de Educación e Investigación de la República de Alemania (*Bundesministerium für Bildung und Forschung* - BMBF).

Desarrollo experimental

La especie *Erythrina crista-galli* fue seleccionada sobre la base de una combinación de criterios, el criterio etnomédico y la observación a campo de ciertas tumoraciones en la corteza y la aparición de unas marcas negruzcas en las ramas jóvenes de esta especie, que podrían estar relacionadas con la probable presencia de hongos endofíticos.

Se recolectaron muestras de *E. crista-galli* de los alrededores de la provincia de Buenos Aires (L: 34°32'54.27''S, L: 58°26'22.83''O), que se acondicionaron y se dividieron en dos partes. Se obtuvieron un total de 15 muestras iniciales. En la figura 2, se observa el perfil cromatográfico obtenido de análisis de los extractos acetónicos de las muestras 1 a 15 de ceibo recolectadas. Una parte se utilizó para realizar el aislamiento e identificación de endófitos.

El aislamiento de los hongos endofíticos de las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli* se realizó de acuerdo con Filip y col. (2003), en tanto para su identificación, se utilizó la técnica descrita por Köpcke

y col. (2002) y Weber y col. (2004). De todas las muestras se aisló e identificó al hongo endofítico como perteneciente al género *Phomopsis*. Demostró así ser selectivo para esta especie y su relación con la especie vegetal *E. crista-galli* podría encuadrarse como una relación huésped-preferencia, que indica la aparición de un hongo endofítico en un huésped en particular.

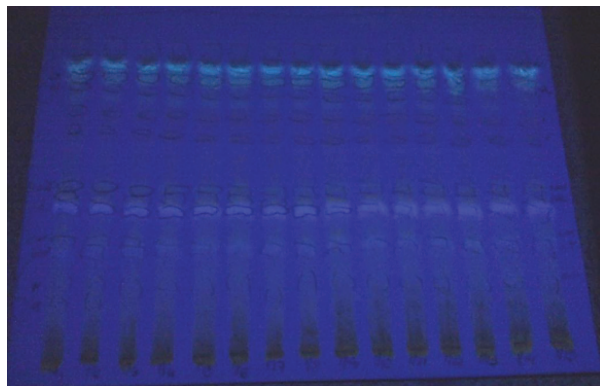
Visto que la contraparte alemana se abocó al estudio de los metabolitos producidos por los endófitos (Weber y col., 2004; 2005), nuestro aporte al proyecto de su investigación tuvo como objetivo la determinación de las actividades biológicas de los extractos de *E. crista-galli*, como las actividades antimicrobiana y antiinflamatoria; el aislamiento e identificación de los metabolitos responsables de esas actividades, y comprobar la influencia que ejercería la presencia del endófito en el metabolismo secundario de la especie.

En primer término, se planteó aislar, por fraccionamiento bioguiado de los extractos orgánicos de las ramas jóvenes de *E. crista-galli*, e identificar los compuestos responsables de las bioactividades en estudio. En una segunda etapa, se planteó obtener plantas de cultivo de *E. crista-galli* infectadas y no infectadas con *Phomopsis* sp., que permitieran determinar la influencia ejercida por la presencia del endófito en el metabolismo de la especie vegetal, en particular en cuanto a los compuestos bioactivos aislados. Se realizaron extractos de las muestras de ceibo recolectadas de distintas procedencias. Los perfiles cromatográficos obtenidos de los extractos de las ramas jóvenes, demostraron la presencia de compuestos fenólicos en todas las muestras y una composición cuali-semicuantativa similar entre sí.

Para evaluar la composición química de las ramas jóvenes de *E. crista-galli* se realizó una marcha fitoquímica. Esta técnica consistió en la obtención de un extracto metanólico, realizado a partir de las ramas jóvenes, de acuerdo con los lineamientos planteados por Rondina y Coussio (1969). Posteriormente se aplicaron diferentes reacciones químicas en cada una de las fracciones que permitieron realizar la caracterización preliminar de los grupos fitoquímicos presentes. Con los resultados obtenidos se pudo establecer la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, esteroides, alcaloides y saponinas en esta especie.

Este tipo de compuestos son característicos del género *Erythrina* según diversos antecedentes presentados por Mbafor y col. (1997); Ingham y

Figura 2.- Perfil cromatográfico tipo del extracto acetónico de *Erythrina crista-galli* recolectada en los alrededores de Buenos Aires



Markham (1980); Iinuma y col. (1994); Pino-Rodríguez y Prieto-González (2004); Rahman y col. (2007); Nkengfack y col. (1997); Tanaka y col. (1997); Wanjala y Majinda (2000); Soto-Hernández y Jackson (1994); Waffo y col. (2006); Yenesew y col. (2000); Dagne y col. (1993); Jang y col. (2008); El-Masry y col. (2002).

En el estudio preliminar de actividades biológicas que se realizó con los extractos de *E. crista-galli*, la selección de los bioensayos se basó en algunos de los usos etnomédicos (Toursarkissian, 1980); razón por la que se procedió a realizar el estudio de las actividades antibacteriana, antifúngica y antiinflamatoria tanto *in vitro* como *in vivo*, y se prepararon dos tipos de extractos, uno acetónico y otro, metanólico, de cada una de las muestras recolectadas. En tanto, para la evaluación de la actividad tripanocida, se prepararon tres extractos, un extracto diclorometánico, uno acetónico y uno metanólico de las ramas jóvenes de *E. crista-galli*.

Para el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de *E. crista-galli* se utilizó el método de difusión en medio sólido (DMS) de acuerdo con lo planteado por Kupka y col. (1979) frente a bacterias Gram + y Gram -, y una serie de hongos patógenos no endofíticos. Se observó que el extracto acetónico de las ramas jóvenes (*CRJ-13A*) fue el que inhibió el crecimiento de *Bacillus brevis* y *B. subtilis*, por lo que *CRJ-13A* fue seleccionado para realizar el fraccionamiento guiado por bioensayo y continuar con el estudio de la actividad antibacteriana.

Los resultados obtenidos constituyen el primer informe de la actividad antibacteriana del extracto acetónico de las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli* sobre *Bacillus subtilis* y *B. brevis*, si bien existen algunos antecedentes de actividad antifúngica en el género *Erythrina* (Portillo y col. 2001; Queiroz y col., 2002). Ni el extracto metanólico ni el extracto acetónico del ceibo dieron resultados positivos en los ensayos realizados.

Otro estudio incluido dentro del estudio preliminar de actividades biológicas de *E. crista-galli* fue la evaluación de la actividad tripanocida *in vitro*, sobre epimastigotes de *T. cruzi*, de los extractos obtenidos con las ramas jóvenes. Este hecho se fundamentó en el hallazgo en la bibliografía de la acción tripanocida de ciertas especies del género *Erythrina* (Graça de-Sousa y col., 2011). Se utilizó la metodología del recuento de parásitos por conteo directo en cámara de Neubauer (Chiari y Camargo, 1984). Sin embargo,

ninguno de los extractos ensayados presentó valores de inhibición del crecimiento de los epimastigotes, a las 72 h, superiores al 30 %, aún a la concentración de trabajo más alta (100 µg/ml), por lo que se descartó continuar con el estudio de esta actividad.

También se incluyó la determinación de la actividad antiinflamatoria, dado que el uso de esta especie como antiinflamatorio local (para la cicatrización de heridas, llagas y fistulas) es uno de los más popularmente conocidos. En la evaluación esta actividad de los extractos de *E. crista-galli* se utilizaron dos modelos: *in vivo* (edema auricular en ratón inducido por TPA) e *in vitro* (producción de TNF- α en macrófagos activados por lipopolisacáridos (LPS)). En el estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos acetónico (*CRJ-13A*) y metanólico (*CRJ-13M*) de las ramas jóvenes de *E. crista-galli* en un modelo *in vivo* se determinó la inhibición del edema de la oreja de ratón frente a la presencia del agente químico 12-O-tetradecanoil forbol-13 acetato (TPA) según la técnica descrita por Carlsón y col. (1985). El extracto *CRJ-13A* disminuyó el edema auricular en ratón en tanto el extracto *CRJ-13M* no produjo una inhibición significativa del edema, respecto a la indometacina. Este modelo permite determinar una acción antiinflamatoria en el nivel tópico, ya que permite observar cómo el TPA causa inflamación aumentando la permeabilidad vascular (Rubinchik y Pasetka, 2010).

En el ensayo de actividad antiinflamatoria *in vitro* en el modelo donde se evaluó la producción de TNF en macrófagos activados por LPS, el extracto *CRJ-13A* disminuyó la producción de esta citoquina proinflamatoria, mientras que en el ensayo donde se estudió la producción de IL-10, el extracto *CRJ-13A* no afectó la producción de esta citoquina. Por lo tanto, en las condiciones ensayadas, el extracto acetónico de las ramas jóvenes de *E. crista-galli*, *CRJ-13A*, demostró tener actividad antiinflamatoria *in vivo* e *in vitro*.

En todo proceso de investigación de las plantas medicinales, luego del ensayo preliminar de determinación de actividad biológica es necesario fraccionar el extracto activo. Una de las estrategias empleadas es el fraccionamiento guiado por bioensayo (Muschietti y col., 2012; Cordell, 2000). Esta metodología permite detectar las fracciones activas para luego continuar con las etapas de purificación que conduzcan finalmente al aislamiento de los compuestos responsables de la actividad presentada por el

extracto inicial. En vistas de que el extracto *CRJ-13A* disminuyó el crecimiento microbiano de *B. brevis* y *B. subtilis* con el método DMS, es que se determinó continuar con el fraccionamiento guiado por bioensayo de la actividad antibacteriana de este extracto. Se realizaron además bioautografías de las fracciones y subfracciones obtenidas frente a *B. brevis*, con el fin de identificar, para luego aislar, los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.

La bioautografía es una técnica rápida y sencilla en la cual una cromatografía en capa delgada (TLC) de la muestra (adecuadamente corrida en un sistema cromatográfico) se pone en una placa de Petri con medio de cultivo enriquecido con los microorganismos de interés. Esto permite tener una aproximación de si uno o varios metabolitos que componen la fracción, son los responsables de la actividad de la muestra.

El extracto *CRJ-13A* fue fraccionado en una columna de cromatografía abierta empacada (CC) con silicagel 60, como fase estacionaria, eluida con solventes de polaridad creciente: ciclohexano, AcOEt, acetona, MeOH y sus mezclas. Del fraccionamiento del extracto activo *CRJ-13A* se obtuvieron 7 fracciones. De acuerdo con el análisis cromatográfico realizado por TLC de las fracciones, *CRJ-13A F I* a *VII*, se observaron bandas al UV, que por las características de color amarillo al revelado con el reactivo NPR, podrían tratarse de compuestos de naturaleza flavonoides.

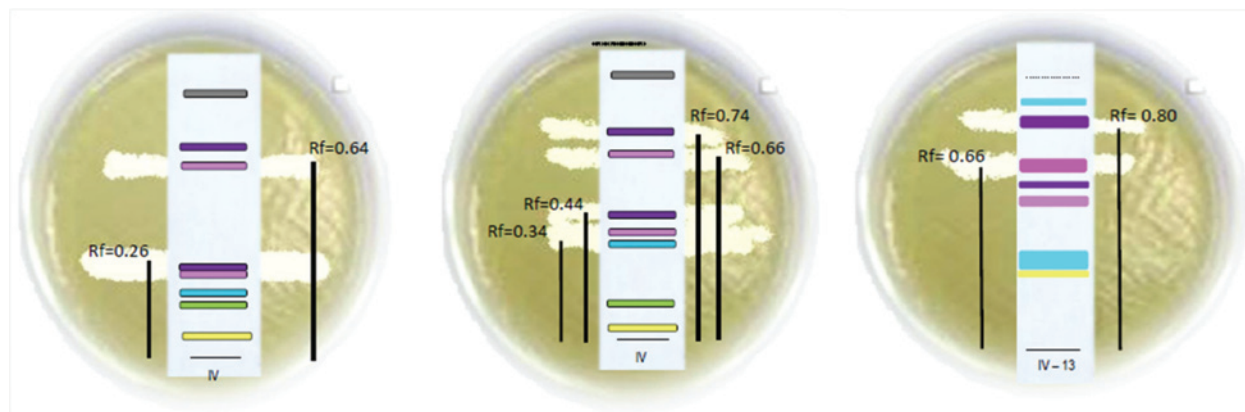
Las 7 fracciones obtenidas fueron sometidas a la determinación de la actividad antimicrobiana con el método DMS. Las fracciones *CRJ-13A F III*, *F IV* y *F V* fueron activas. Las fracciones *F III* y *F IV* inhibieron el crecimiento de *B. brevis* y *B. subtilis*,

en el método DMS. La fracción *F IV* también inhibió el crecimiento de *Sarcina lutea* y presentó actividad antifúngica al inhibir el crecimiento del hongo *Penicillium notatum*.

En cuanto a la fracción *F V* presentó actividad antifúngica frente a *Mucor miehei*, y actividad antibacteriana frente a *B. brevis*. Paralelamente se realizaron las bioautografías de las 7 fracciones. Para la separación de las fracciones *CRJ-13A F I* a *F VII*, se seleccionaron dos sistemas cromatográficos (SC). Para las fracciones *F I* a *F IV* se seleccionó FE Silicagel 60 F254 / CHx:AcOEt (7:3) y para las fracciones *F IV* y *F VII* el sistema óptimo fue FE Silicagel 60 F254/ Ciclohx:AcOEt (1:1). Como resultado de la bioautografía se determinó que la fracción *CRJ-13A F IV*, presentaba diversas bandas, de un color violeta intenso con el revelado al UV (a 254 nm).

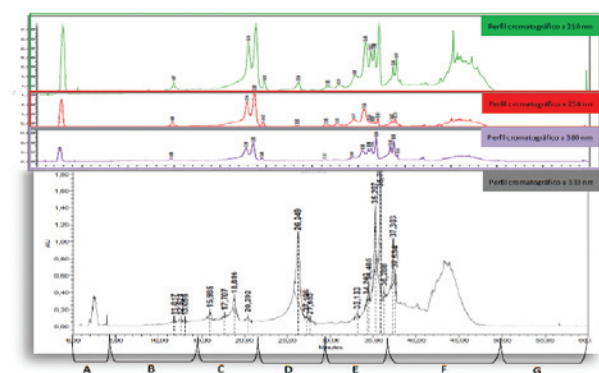
Estas bandas inhibieron el crecimiento de *B. brevis* en los dos sistemas cromatográficos ensayados. Se continuó con la purificación de la fracción *CRJ-13A F IV* mediante una CC cuya FM seleccionada fue Sephadex LH 20, y se eluyó con una mezcla de dos solventes, CH₂Cl₂ y MeOH. Se obtuvieron 100 subfracciones, que de acuerdo con el perfil cromatográfico observado por TLC fueron reunidas en 22 fracciones y se reservaron para continuar con el estudio de actividad antibacteriana. De las 22 subfracciones, 8 dieron actividad con el método DMS frente a *B. brevis*, *B. subtilis* y *Staphylococcus aureus*. En cuanto al ensayo de bioautografía, se observó una inhibición del crecimiento de *B. brevis* frente a la subfracción *CRJ-13A F IV (13)*. De esta fracción, dos bandas evidenciaron inhibición del crecimiento microbiano, con Rf de 0,66 y 0,80, respectivamente (Figura 3).

Figura 3.- Esquema de la bioautografía de las fracciones *CRJ-13A IV*. A: *CRJ-13A IV* en el sistema cromatográfico N° 1 y 4. B: *CRJ-13 IV (13)*



Para aislar los compuestos activos de la fracción *CRJ-13A F IV (13)*, se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Figura 4). La columna utilizada fue una SP C₁₈ (250 mm x 10 mm, Nucleosil 100-7) y se usó una fase móvil (FM) binaria compuesta por H₂O, ACN en gradiente con un flujo de 4 ml/min y se inyectaron 100 µl de muestra. La detección se realizó utilizando un detector UV/DAD a longitudes de onda de 210 nm, 280 nm y 330 nm. Cada corrida cromatográfica se desarrolló en 60 min, y se recolectaron fracciones cada 5 a 10 min. Se obtuvieron 7 fracciones, *CRJ-13A F IV (13) A* a *G*.

Figura 4.- Fraccionamiento por HPLC/DAD de la fracción *CRJ-13A F IV (13)*



El seguimiento de la actividad antibacteriana de las 7 fracciones obtenidas se realizó según el método DMS frente a *B. brevis*. Las fracciones *CRJ-13A F IV (13) D* y *E* demostraron tener un claro efecto antimicrobiano, con halos de inhibición del crecimiento bacteriano de 14 y 13 mm, respectivamente. Se continuó con la purificación de ambas fracciones, *CRJ-13A F IV (13) D* y *E*. Para la purificación de la fracción *CRJ-13A F IV (13) D* por HPLC se utilizó una columna SP C₁₈ y una FM binaria (H₂O: ACN) en gradiente a un flujo de 4 ml/min y se inyectaron 100 µl de la muestra. Las longitudes de onda de trabajo fueron 210, 280 y 330 nm. Se recolectaron manualmente 4 eluatos, rotulados *CRJ-13A F IV (13) D [I a IV]*.

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a *B. brevis* por el método de DMS. La fracción *CRJ-13A F IV (13) D II* inhibió el crecimiento de *B. brevis* significativamente, respecto a la penicilina. En el análisis por HPLC de la fracción activa *CRJ-13A F IV (13) D [III]* se observó la presencia de dos picos, el de tr 17,8 min claramente mayoritario. Estos picos

fueron separados por HPLC/DAD con una columna SP C₁₈ y una FM binaria (H₂O: MeOH) en gradiente a un flujo 2,5 ml/min y se inyectó 100 µl. Las longitudes de onda de trabajo fueron de 210, 280 y 330 nm. Se recolectaron 3 fracciones; de la fracción *CRJ-13A F IV (13) DII [2]* se aisló el compuesto *B*.

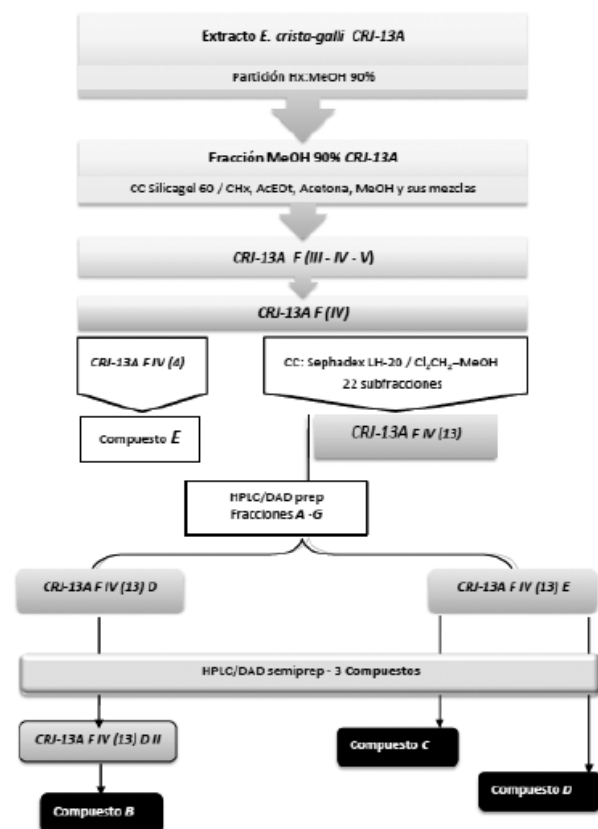
Paralelamente la fracción *CRJ-13A F IV (13) E*, también se purificó por la técnica de HPLC/DAD semipreparativa en una SP C₁₈ y se usó una FM compuesta por un gradiente de solventes formado por H₂O y MeOH. La elución se realizó con un flujo 2,5 ml/min y se inyectaron 100 µl de la fracción activa. La detección se realizó a las longitudes de onda de trabajo de 210, 280 y 330 nm. Se recolectaron 3 subfracciones, *CRJ-13A F IV (13) E [I a III]*.

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a *B. brevis* por el método DMS de las subfracciones a 10 µg/µl. La fracción *CRJ-13A F IV (13) E II* inhibió el crecimiento de *B. brevis* significativamente, respecto a la penicilina. En la fracción *CRJ-13A F IV (13) E [II]*, se observó la presencia de dos picos (uno mayoritario, y otro, visiblemente menor) que componían el perfil cromatográfico, cuyos respectivos espectros eran bien diferenciados. El pico mayoritario de la fracción *CRJ-13A F IV (13) E [II]* se purificó por medio de HPLC/DAD, utilizando el sistema cromatográfico mencionado y se obtuvieron 3 subfracciones, *CRJ-13A F IV (13) E [II] (1-3)*. De la subfracción *CRJ-13A F IV (13) E [II] (2)* se aisló el compuesto *C*.

En la fracción *CRJ13-A F IV (13) E* se determinó la presencia del compuesto *D* por HPLC/DAD, correspondiente al pico minoritario de la fracción en análisis y por TLC, contra un testigo auténtico, identificándolo como genisteína. Los compuestos aislados fueron ensayados por el método DMS frente a *B. brevis*. Los compuestos *B*, *C* y *D* presentaron halos de inhibición del crecimiento bacteriano de: 8,5, 17,0 y 20,0 mm, respectivamente. En la Figura 5, se observa el esquema de fraccionamiento bio guiado del extracto acetónico de *E. crista-galli*.

Para determinar la identidad de los compuestos se procedió a correr los espectros UV, IR, MS y 1H-RMN. De acuerdo con el análisis de los datos espectroscópicos para los compuestos *B*, *C* y *D* con actividad antimicrobiana, se desprendió que estos compuestos presentan los máximos de absorción UV típicos de los compuestos flavonoides. Así se pudo identificar al compuesto *B* como la 7,4'-dihidroxiisoflavona o daidzeína (Figura 6). Los datos

Figura 5.- Fraccionamiento guiado por bioensayo del extracto acetónico de *Erythrina crista-galli*

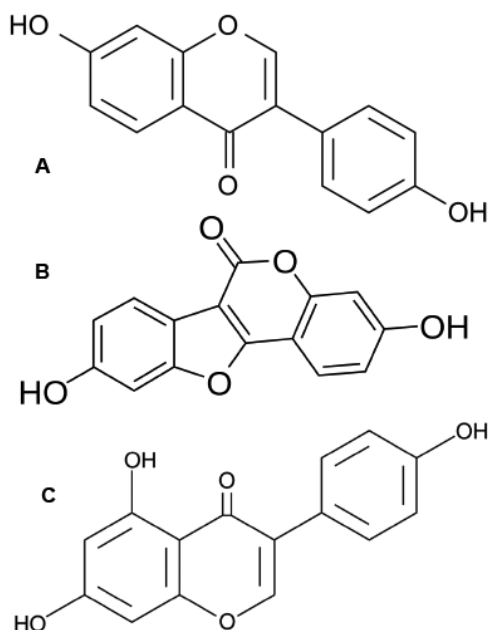


espectroscópicos obtenidos coincidieron con la información aportada por la bibliografía (Chang y Nair, 1995; Nkengfack y col., 2000; Kanabuko y col., 2001).

De acuerdo con el análisis realizado de los datos espectroscópicos obtenidos por HPLC/MS/UV, los espectros UV y los espectros IR, ¹H RMN y MS, se pudo identificar al compuesto C como 3, 9-dihidroxi-6-benzofurano [3, 2-C] cromenona o coumestrol (Figura 6). Los datos de los espectros UV, RMN y de MS se corresponden exactamente con los publicados por Bickoff y col. (1969), Durango y col. (2002) y Hong y col. (2011).

El pico minoritario de la fracción *CRJ-13A F IV (13) E (II)*, denominado compuesto D, presentó por HPLC/DAD un espectro UV con un pico máximo a 260 nm, que se correspondía con una isoflavona. Se realizó la identificación del compuesto D como el 4', 5, 7-trihidroxiisoflavona o genisteína por HPLC/DAD en 3 sistemas cromatográficos adecuadamente desarrollados y seleccionados para ese fin (Figura 6).

Figura 6.- Compuestos identificados en el extracto acetónico de *Erythrina crista-galli*



A: Daidzeína (compuesto B), B: Coumestrol (compuesto C), C: Genisteína (compuesto D).

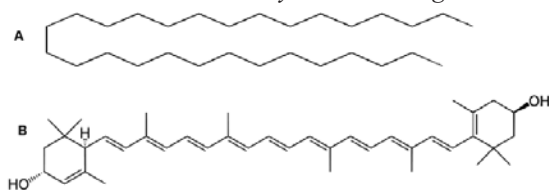
Una vez identificados los compuestos B, C y D, como daidzeína, coumestrol y genisteína, respectivamente, y habiéndose determinado que estos compuestos son activos frente a *B. brevis*, se procedió a evaluar su actividad antimicrobiana frente a *B. brevis* por el método de dilución seriada y con el objetivo de determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) frente a este microorganismo.

Los resultados obtenidos de las CIM fueron de 137,81, 16,33 y 64,81 μ M, para los compuestos daidzeína, coumestrol y genisteína, respectivamente. Daidzeína (Juma y Majinda, 2006) y genisteína ya habían sido informadas como activas frente a otros microorganismos (Dastidar y col., 2004). Coumestrol fue el compuesto que presentó mayor actividad frente a *B. brevis* y es la primera vez que se informa su actividad antibacteriana.

Se aislaron otros compuestos del extracto *CRJ-13A* de *Erythrina crista-galli*. De la fracción *FI* precipitó el compuesto A, en tanto de la fracción activa *F IV* se obtuvo el compuesto E. En ambos casos los compuestos aislados carecieron de actividad antimicrobiana. El compuesto A se identificó como el *n-nonacosano* (Figura 7) por espectrofotometría

IR y GC/FID/MS, mientras que el compuesto *E* se identificó como luteína (Figura 7) por comparación en la base de datos del equipo (Agilent ChemStore C/S database).

Figura 7.- Estructura de los compuestos A y E, aislados del extracto acetónico de *Erythrina crista-galli*



A: n-nonactosano. **B:** Luteína

Para el seguimiento del estudio de la actividad antiinflamatoria de los extractos de las ramas jóvenes de esta especie, se realizó un fraccionamiento bioguiado del extracto acetónico de *E. crista-galli* (*CRJ-15A*). El extracto activo fue purificado por CC, en condiciones similares a las empleadas en el fraccionamiento guiado por la actividad antimicrobiana. Se obtuvieron 6 fracciones (*CRJ-15A F I a VI*). Estas fracciones fueron evaluadas en su actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*.

En este punto se incluyó, para el estudio de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de las fracciones, además del ensayo de producción de TNF en macrófagos activados por lipopolisacáridos (LPS), el ensayo denominado *Reporter Gene Assays*, utilizando a su vez dos líneas celulares (Erkel, 2000).

En la evaluación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones *CRJ-15A F I a VI* en el modelo *in vitro* en macrófagos activados por LPS, la fracción *CRJ-15A F IV* demostró una clara inhibición de la producción de TNF- α a 25 y 12.5 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en las fracciones *CRJ-15A F III, V* y *VI* solamente se observó una disminución de la producción de TNF a la concentración más baja ensayada (12.5 $\mu\text{g/ml}$). Se define como “gen reportero”, a un gen que codifica para una proteína con un fenotipo, fácilmente medible y distinguible. De modo que, en la determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* de las fracciones de *CRJ-15A* se utilizaron dos modelos en el *Reporter Gene Assay*. Por un lado, un modelo con la línea celular HELA S3, para evaluar la producción del interferón γ (IFN) en la secuencia GAS (secuencia activada del IFN γ) / ISRE (elemento de respuesta al IFN γ estimulado).

En este caso se midió el IFN γ , que es una citoquina pleiotrópica que regula muchas funciones celulares diferentes. En el segundo modelo de *Reporter Gene Assay*, se empleó la línea celular JURKAT, en la cual se determinó la producción de pro-TNF, citoquina pro-inflamatoria y sustrato a partir del cual se escinde el TNF α medido en las condiciones del ensayo. Las fracciones *CRJ-15A F IV* y *VI* disminuyeron la producción de TNF en el ensayo *Reporter Gene*; en tanto que, en la fracción *CRJ-15A F V* la actividad observada no fue dosis dependiente. Estas fracciones activas (*F IV, F V* y *F VI*) demostraron efectividad a 200 $\mu\text{g/ml}$ sin verse afectada la viabilidad celular.

En la evaluación de la producción de IFN- γ , las fracciones *CRJ-15A F IV, F V* y *F VI* resultaron activas a 200 y 100 $\mu\text{g/ml}$, con una citotoxicidad dosis dependiente (valores entre 75 % y 100 % de citotoxicidad). Se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vivo* de las fracciones *CRJ-15A F I - VI* mediante el ensayo de edema en oreja de ratón inducido por TPA. De las fracciones ensayadas, las muestras que presentaron una disminución del edema auricular fueron *CRJ-15A F IV* y *F V*, con valores de inhibición de la inflamación de 80,8 % y 71,2 %, respectivamente.

Del análisis cualitativo por HPLC/DAD de las fracciones que presentaron actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vitro*, se desprendió que las fracciones *CRJ-15A F III, F IV* y *F V* presentaban el mismo perfil cromatográfico. En la determinación de la actividad antiinflamatoria *in vivo* y en los dos modelos de evaluación *in vitro*, la fracción *CRJ-15A F IV*, fue la más activa. En el perfil cromatográfico de esta fracción se observó la presencia mayoritaria de compuestos polifenólicos, más precisamente del tipo isoflavonoide, por los colores violeta de las bandas observadas a la luz UV de 366 nm en la TLC y por la presencia de picos, con máximos de absorción al UV característicos para este tipo de compuestos en el espectro obtenido por HPLC/DAD. Genisteína, daidzeína y coumestrol pertenecen a un grupo de compuestos fenólicos conocido como “isoflavonas de la soja”, presentes en *Glycine max* y otras Leguminosas (Yu y col., 2003). También se decidió investigar en la fracción activa *CRJ-15A F IV*, la presencia otras isoflavonas, como la biochanina A y la formononetina, relacionadas biosintéticamente con las isoflavonas de la soja. Finalmente, en esta fracción, se identificaron por HPLC/DAD contra muestras auténticas los compuestos *F, G* y *H* como

daidzeína, *genisteína* y *coumestrol*, y además, los compuestos *I* y *J* como las isoflavonas biochanina A y formononetina, respectivamente.

Se ensayaron los efectos de la genisteína, coumestrol, daidzeína y biochanina A en el ensayo de edema auricular en ratón inducido por TPA. Se realizó una curva dosis-respuesta para cada compuesto entre 0,03 y 1,0 µg/ml. De esta curva fue posible calcular la dosis efectiva 50 (DE₅₀) de cada uno de los compuestos, que permitió comparar su actividad antiinflamatoria tóxica.

La genisteína presentó una DE₅₀ de 0,14 µg/ml, mientras que para el coumestrol la DE₅₀ fue de 0,54 µg/ml y para la biochanina A de 0,75 µg/ml. La daidzeína no disminuyó la inflamación inducida por TPA a las concentraciones ensayadas.

En vista de la elevada citotoxicidad observada para las fracciones *CRJ-15A F I* a *VI* en el ensayo de la producción de TNF en macrófagos activos por LPS, y la estrecha relación entre este marcador de la inflamación y la génesis del cáncer, se ensayó la citotoxicidad de las mismas fracciones sobre dos líneas celulares humanas: L1210 (leucemia linfocítica) y Colo320 (carcinoma de colon).

De las fracciones ensayadas, *CRJ-15A F IV* presentó actividad frente a L1210 a todas las concentraciones estudiadas; se observó un 20 % de viabilidad celular para la concentración de 25 µg/ml, y del 75 % a las concentraciones de 50 y 100 µg/ml. Mientras que en la línea celular Colo320, la misma fracción, *CRJ-15A F IV*, solo presentó un 20 % de inhibición de crecimiento celular a la concentración más alta ensayada (100 µg/ml). En la fracción *CRJ-15A F IV* fueron identificados genisteína, daidzeína, coumestrol, biochanina A y formononetina. La presencia de estos compuestos podría justificar la actividad citotóxica sobre las líneas celulares L1210 y Colo320; se encuentra en la bibliografía abundante documentación de la citotoxicidad de estas isoflavonas en distintas líneas celulares (Dixon y Ferreira, 2002; Duan y col., 2003; Mense y col., 2008; Patisaul y Jefferson, 2010; Boersma y col., 2001; Hwang y col., 2009; Li y col., 2005b; Banerjee y col., 2008; Guar y Bhatia, 2009; Gupta y col., 2011; Kole y col., 2011).

Para determinar si había metabolitos en común entre el hongo endofítico *Phomopsis* sp. y la especie *E. crista-galli*, se realizaron extractos AcOEt, ambos obtenidos en las mismas condiciones experimentales, tanto del hongo como de las ramas jóvenes y

viejas de *E. crista-galli*. Se realizó una comparación de la composición cualitativa de estos extractos, a partir del análisis de los perfiles cromatográficos por HPLC/DAD, comparando los tiempos de retención de los picos obtenidos (Tr) y sus respectivos espectros ultravioletas (UV).

Se analizaron tres extractos obtenidos a partir del micelio del endofito recogido de distintas muestras de *E. crista-galli*: E02011, E01094 y E01105. En el perfil cromatográfico por HPLC/DAD de los extractos obtenidos a partir de los micelios de *Phomopsis* sp., se pudieron identificar los siguientes metabolitos por comparación de sus tr y sus respectivos espectros UV, con los datos publicados por Weber y col. (2004; 2005): E02011: phomopiranol, tirosol y clavatul; E01094: tirosol, clavatul, phomopiranol, melleína; E01105: tirosol, clavatul, ácido 4 - (2, 3 - dihidroxipropoxi) benzoico, 4-hidroximelleína, phomol, nectriapirona, melleína, scytalona.

De la observación del perfil cromatográfico por HPLC/DAD de los extractos AcOEt de *CRJ* y *CRV*, se dedujo que ambos extractos tienen una composición química similar caracterizada por la presencia de compuestos de naturaleza flavonoide. Tanto en los extractos de *CRJ* como *CRV* fueron identificados: genisteína, daidzeína, coumestrol y biochanina A, por comparación con sustancias de referencia. En el extracto AcOEt de *CRV* se observó además, un pico que fue identificado como scytalona, metabolito presente en el extracto AcOEt del hongo.

Si bien existe documentación de que genisteína y daidzeína han sido aisladas de una especie de un hongo endofítico, *Rahnella aquatilis* (Hsieh y col., 2009), no se detectaron en los extractos de *Phomopsis* sp. ninguno de los compuestos identificados en las ramas jóvenes de *E. crista-galli*.

Con el fin de evaluar la influencia del hongo endofítico *Phomopsis* sp. en el metabolismo secundario de *E. crista-galli* se decidió cultivar plantines de esta especie bajo diferentes condiciones, para obtener plantines infectados y no infectados con este hongo (Figura 8). Las semillas utilizadas en la germinación para la obtención de los plantines, se tomaron a partir de los especímenes utilizados durante la primera etapa de este trabajo para el aislamiento de los compuestos bioactivos de *E. crista-galli*.

Para la obtención de los plantines de ceibo, se buscó imitar las condiciones de crecimiento vegetativo de los ejemplares silvestres. Se utilizó tierra de la zona de El Tigre, lugar donde existen extensos

Figura 8.- Plantines de cultivo de *Erythrina crista-galli* en distintos estadios de crecimiento vegetativo



ceibales. Una porción de tierra utilizada para obtener plantines de cultivo, no infectados con el hongo, fue esterilizada por radiación gamma. Las semillas fueron tratadas con una secuencia de lavados, para la eliminación del hongo endofítico de la superficie. A continuación, las semillas fueron sometidas a un procedimiento de ablandamiento del tegumento.

Una vez establecidas las condiciones de cultivo para cada grupo, los plantines infectados (*C-CC*) y no infectados (*C-CE*), se mantuvieron en invernaderos separados, en condiciones de temperatura y humedad controladas, por un período de 6 meses. Se detectó, por observación directa, la presencia de unos particulares puntos negros en las ramas, que fueron asociados a la presencia de los cuerpos de fructificación del hongo en la superficie de las ramas, tanto de los plantines infectados como no infectados.

Se procedió entonces, a verificar la presencia del hongo en ambos grupos de plantines. De acuerdo con Weber y col. (2004), un típico *Phomopsis*, observado con una lupa a 40X, contiene conidiomas oscuros. En el aislamiento de los endófitos de los plantines cultivados de *E. crista-galli* se examinaron los cuerpos de fructificación, y la mayoría mostró ambos tipos de conidios, con predominio de los β . Se determinó que el hongo desarrollado sobre las ramas de ambos grupos de plantines pertenecía a *Phomopsis* sp.

La presencia del hongo *Phomopsis* sp. en ambas muestras determinó que la técnica de esterilización sobre las semillas no fue efectiva. Si bien pudo haberse evitado la transmisión horizontal, no se logró impedir la transmisión vertical del endófito. Según Strobel (2003), la multiplicación de los hongos

endofíticos puede ocurrir por transmisión horizontal (cuando la esporulación se ve enriquecida por el accionar del viento que facilita la dispersión de las esporas y la multiplicación de la especie) o por transmisión vertical (cuando la transferencia genética es intrínseca a la semilla y se transmite de la semilla al individuo que produce). Es decir que, en este caso, si bien las semillas fueron esterilizadas en su superficie, contenían material genético del hongo endofítico en sus tejidos internos que se propagaron durante su cultivo, y por ende, el endófito no pudo ser eliminado.

Se analizó el perfil cromatográfico por HPLC/DAD de los extractos acetónicos de las ramas de cada grupo (*C-CE* y *C-CC*). Además, se incluyó en este análisis, un extracto acetónico de una muestra silvestre (*C-S*) de los mismos ejemplares a partir de los cuales se obtuvieron las semillas para el ensayo y se lo tomó como control. Las ramas jóvenes de los plantines cultivados no infectados e infectados –previamente desecadas y molidas– fueron maceradas con acetona. Se obtuvieron los extractos *C-CEA* y *C-CCA*.

Al extracto control se lo denominó *C-SA*. Los extractos acetónicos secos fueron tomados con MeOH en una concentración de 5 mg/ml y fueron analizados por HPLC/DAD y por TLC. Se realizó el estudio comparativo de los perfiles cromatográficos de los extractos acetónicos de los plantines de *E. crista-galli*. En el análisis cualitativo por TLC y por HPLC/DAD no se observaron diferencias significativas en los perfiles cromatográficos de los extractos de los plantines infectados o no infectados, ni en los silvestres.

Visto que la presencia del endófito se verificó en todos los plantines cultivados del lote *C-CE* y el *C-CC*, y que los perfiles cromatográficos por HPLC/DAD de los extractos acetónicos de los mismos plantines no presentaron diferencias significativas, se sometió a un grupo de plantines (tomados del lote *C-CE*) a un antifúngico comercial. Posteriormente a la aplicación del antifúngico comercial, se dejaron desarrollar vegetativamente los plantines tratados, y al cabo de 6 meses se tomaron muestras de sus ramas y se procedió a determinar la presencia del hongo endofítico.

Nuevamente se observó en los plantines cultivados y tratados con el antifúngico comercial, la presencia del endófito *Phomopsis* sp.; se dedujo que la aplicación del antifúngico no afectó el normal

crecimiento del hongo endofítico en las ramas de *E. crista-galli*. En vista de los resultados obtenidos se decidió sobreinfectar: aplicar una sobrecarga de esporas de *Phomopsis* sp a un grupo de plantines, para comprobar si la sobreinfección producía cambios en el metabolismo de las ramas de *E. crista-galli*. Así, se tomaron 9 plantines cultivados, con 12 meses de crecimiento vegetativo del grupo *C-CE*, se trataron durante 15 días con una suspensión de esporas de *Phomopsis* sp. y se dejaron desarrollar por un período de 6 meses más. Los plantines sobreinfectados se rotularon como grupo *C-CSI*. A los 18 meses de crecimiento vegetativo se tomaron muestras de los plantines cultivados de ceibo no infectados (*C-CC*) y de los plantines sobreinfectados (*C-CSI*). Se obtuvieron los respectivos extractos acetónicos, *C-CA* y *C-CSIA*.

También se preparó un extracto acetónico de las ramas jóvenes de *E. crista-galli* silvestre (*C-SA*). Se analizó el perfil cromatográfico de los extractos así obtenidos por HPLC/DAD. De la observación de los perfiles cromatográficos de las muestras analizadas, se concluyó que existe una similitud en los perfiles cromatográficos de las muestras de los extractos *C-CA*, *C-SA* y *C-CSIA*, y se detectó en todos, de acuerdo con la comparación con muestras auténticas, la presencia de genisteína, daidzeína y coumestrol. En el perfil cromatográfico de *C-CSIA* se observó además, la presencia de un pico mayoritario con tr de 15,7 min ausente en los otros dos extractos en estudio.

Se determinó el contenido de genisteína, daidzeína y coumestrol en todas las muestras obtenidas, *C-CEA*, *C-CCA* y *C-SA*, entre las muestras tomadas a los 6, a los 12 y a los 18 meses. En la última toma de muestra se agregó el grupo *C-CSIA*. Los contenidos de coumestrol y daidzeína en *C-CSIA*, no difieren significativamente en comparación con el contenido en el extracto acetónico de la muestra sin infectar con *Phomopsis* sp (*C-CCA*). En este caso, el contenido de isoflavonoides obtenido en las muestras de *E. crista-galli* aquí analizadas, no sufrió variaciones significativas, por lo que podemos concluir que la daidzeína y el coumestrol serían constitutivas en las ramas de esta especie, cumpliendo con las características propias de las fitoanticipinas.

Visto que el extracto *C-CSIA* presentó un pico mayoritario de tr de 15,7 min, que no estaba presente en la muestra *C-CCA* ni en la muestra *C-SA*, se procedió a su aislamiento mediante sucesivas

corridas por HPLC/DAD, hasta la obtención de un precipitado amarillo, con un rendimiento de 5,7 mg, que fue rotulado como compuesto *K*.

El compuesto *K* fue analizado por técnicas espectroscópicas, así como su comportamiento cromatográfico por TLC en distintos sistemas cromatográficos, y también por sus características de revelado, indicaron que se trataba de un compuesto de naturaleza flavonoide. Por análisis de los espectros UV, MS, ¹H-RMN, y ¹³C-RMN y por técnicas bidimensionales de correlación directa ¹H-¹³C (HSQC), de correlación indirecta ¹H-¹³C (HMBC) y de correlación homonuclear de hidrógeno (¹H-¹H COSY), se dedujo que el compuesto *K* podría tratarse de un flavonol con grupos OH en las posiciones 5, 7 y 4', con 4 grupos OH y 1 grupo OCH₃ en el anillo B. No se pudo determinar ni el peso molecular ni el número de azúcares unidos a la molécula del flavonoide en las condiciones experimentales utilizadas. Este compuesto pudo ser parcialmente caracterizado como un glicósido de isorhamnetina (Mabry, 1970) con dos o tres azúcares unidos al carbono 3.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo marcan la importancia de la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de fuentes naturales, no solamente a partir de plantas medicinales de reconocido uso tradicional, sino también a partir de los hongos endofíticos que los habitan.

Se determinó la presencia de un hongo endofítico en las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli*. El hongo endofítico se identificó como perteneciente a la especie *Phomopsis* sp. Este microorganismo demostró ser selectivo para esta especie.

En las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli* se caracterizaron, por medio de una marcha fitoquímica, los siguientes grupos: fenoles, flavonoides, esteroides, alcaloides y saponinas.

El extracto acetónico de las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli* presentó actividad antibacteriana contra *Bacillus brevis* y *B. subtilis*, como también presentó inhibición del edema de la oreja de ratón (modelo *in vivo*) y disminución de producción de TNF- α en macrófagos (modelo *in vitro*).

Se aislaron e identificaron por fraccionamiento bioguiado del extracto acetónico de las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli* con actividad

antibacteriana daidzeína y coumestrol. Se identificó además genisteína por métodos cromatográficos y en comparación con testigos. Los compuestos daidzeína, coumestrol y genisteína demostraron actividad antibacteriana frente *B. brevis* con una concentración inhibitoria mínima de 137,81; 16,33 y 64,81 μM , respectivamente. Este es el primer estudio donde se determina la actividad antibacteriana de daidzeína, genisteína y coumestrol contra *B. brevis*. Se informa también de la presencia de estos compuestos en las ramas jóvenes de la especie *Erythrina crista-galli*, así como la presencia de coumestrol en el género *Erythrina*.

Se identificaron además, luteína y nonacosano en el extracto acetónico de *Erythrina crista-galli*.

Por fraccionamiento bioguiado del extracto acetónico de las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli*, se obtuvieron varias fracciones con actividad antiinflamatoria. Una de las fracciones demostró inhibir la producción de $\text{TNF } \alpha$ a 25 y 12,5 $\mu\text{g/ml}$ en el modelo de macrófagos activados por LPS. En los modelos del *Reporter Gene Assay* varias de las fracciones demostraron inhibir la producción de $\text{TNF } \alpha$ y la producción de $\text{IFN } \gamma$. En las fracciones con actividad antiinflamatoria, se identificaron los compuestos daidzeína, coumestrol, genisteína, formononetina y biochanina A, por HPLC/DAD contra testigos. Genisteína, coumestrol y biochanina A presentaron actividad antiinflamatoria en el modelo de edema auricular de ratón con una DE_{50} 0,14; 0,54 y 0,75 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Se informa la actividad antiinflamatoria *in vivo* del coumestrol, y se describe la actividad antiinflamatoria *in vivo* de la genisteína en el modelo de edema en oreja de ratón.

Algunas de las fracciones del extracto acetónico de las ramas jóvenes de *Erythrina crista-galli*, con actividad antiinflamatoria, demostraron también actividad en las líneas celulares tumorales L1210 (Leucemia linfocítica) y Colo320 (carcinoma de colon).

Se compararon los perfiles cromatográficos de los extractos de los endófitos aislados de las ramas de *E. crista-galli* y de las ramas jóvenes y viejas de la especie vegetal en estudio. Phomopiranol, melleína, tirosol, clavatul, ácido 4-(2, 3-dihidroxiopropoxi) benzoico, 4-hidroximelleína, phomol, nectriapirona, melleína y scytalona, fueron identificadas por HPLC/DAD en el extracto AcOEt del hongo endofítico *Phomopsis* sp. Genisteína, daidzeína, coumestrol y biochanina A fueron identificados en

los extractos AcOEt de las ramas jóvenes, y de las viejas de *Erythrina crista-galli*, por HPLC/DAD contra testigos. En el extracto AcOEt de las ramas viejas se pudo identificar además, la scytalona, metabolito del hongo.

Se obtuvieron plantines de cultivo de *Erythrina crista-galli* bajo distintas condiciones experimentales. En todos los lotes de plantines cultivados se detectó la presencia del hongo endofítico *Phomopsis* sp., indicando que no se pudo evitar la transmisión vertical del hongo endofítico a su huésped, a pesar de los tratamientos aplicados. Se comprobó la presencia de coumestrol, genisteína y daidzeína, en el extracto acetónico de los plantines de cultivo obtenidos bajo distintas condiciones (plantines control y plantines sobreinfectados). Se cuantificó el contenido de coumestrol y daidzeína. El contenido de daidzeína (0,05 %) y de coumestrol (0,04 %) en los plantines sobreinfectados fue ligeramente mayor respecto al de las muestras control (0,01 % y 0,02 %, respectivamente). El contenido de coumestrol de las muestras silvestres demostró ser superior (0,12 %) al de los plantines sobreinfectados con *Phomopsis* sp.

Se aisló e identificó además en los plantines sobreinfectados, un compuesto de naturaleza flavonoide. Este compuesto fue identificado en forma parcial como un glicósido de isoramnetina.

Genisteína, daidzeína, coumestrol, biochanina A, formononetina y el glicósido de isoramnetina no inhibieron el crecimiento del hongo endofítico *Phomopsis* sp. *in vitro*. Por lo cual estos compuestos tendrían un rol constitutivo en las ramas de esta especie, cumpliendo con las características propias de las fitoanticipinas.

Los resultados presentados en esta tesis sobre la actividad farmacológica de los compuestos aislados e identificados en las ramas de *Erythrina crista-galli*, constituyen un aporte al conocimiento de nuestra flora medicinal y remarcen el importante papel que desempeñan los productos naturales en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para la cura de enfermedades infecciosas e inflamatorias.

Referencias bibliográficas

Araújo-Júnior, J. de; de Oliveira, M.; Aquino, P.; Alexandre-Moreira, M.; Sant'Ana, A. (2012). "A phytochemical and ethnopharmacological review

- of the genus *Erythrina*". *Phytochemicals - A Global perspective of their role in nutrition and health* (Cap. 16), Venketeshewer Rao, Rijeka, Croacia: 327-352.
- Banerjee, S.; Li, Y.; Wang, Z.; Sarkar, F. (2008). "Multi-targeted therapy of cancer by genisteína". *Cancer Letters* 269(2): 226-242.
- Bickoff, E.; Spencer, R.; Witt, S.; Knuckles, B. (1969). "Studies on the chemical and biological properties of coumestrol and related compounds". *Technical Bulletin* N°1408. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Superintendent of Documents, Washington D. C.: 32-43.
- Boersma, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Wang, C.-C.; Smith, M.; Kimb, H.; Xub, J.; Patel, R.; Darley-Usmar, V. (2001). "Soy isoflavonoids and cancer-metabolism at the target site". *Mutation Research* 480-481: 121-127.
- Burgstaller, J. (1984). *700 Hierbas medicinales*. Hachette, Buenos Aires, 52.
- Carlson, R.; O' Neill-Davis, L.; Lewis, A. (1985). "Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents". *Agents and Actions* 17: 198-20.
- Chang, Y.-C.; Nair, M. (1995). "Metabolites of daidzein and genistein and their biological activities". *Journal of Natural Products* 58(12): 1901-1905.
- Chiari, E.; Camargo, E. (1984). "Culturing and cloning of *T. cruzi*". En: *Genes and Antigens of Parasites*. Morel C. M. (Ed.), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 23-26.
- Cordell, G. (2000). "Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship". *Phytochemistry* 55(6): 463-480.
- Dagne, E.; Gunatilaka, A.; Kingston, D. (1993). "Two bioactive pterocarpanes from *Erythrina burana*". *Journal of Natural Products* 56(10): 1831-1834.
- Dastidar, S.; Manna, A.; Kumar, K.; Mazumdar, K.; Dutta, N.; Chakrabarty, A.; Motohashi, N.; Shirataki, Y. (2004). "Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones". *International Journal of Antimicrobial Agents* 23: 99-102.
- Dixon, R.; Ferreira, D. (2002). "Genistein". *Phytochemistry* 60: 205-211.
- Duan, W.; Kuo, I. C.; Selvarajan, S.; Chua, K.; Bay, B.H.; Wong, W.S.F. (2003). "Antiinflammatory effects of genistein, a tyrosin kinase inhibitor, on a Guine pig model of asthma". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167: 185-192.
- Durango, D.; Quiñones, W.; Torres, F.; Rosero, Y.; Gil, J.; Echeverri, F. (2002). "Phytoalexin accumulation in colombian vean varieties and amino-sugars as elicitors". *Molecules* 7: 817-832.
- El-Masry, S.; Amer, M.; Abdel-Kader, M.; Zaatout, H. (2002). "Prenylated flavonoids of *Erythrina lysistemon* grown in Egypt". *Phytochemistry* 60: 783-787.
- Erkel, G. (2000). "Trichodion, a new inhibitor of inflammatory signal transduction pathways from a *Trichosporiella* species". *FEBS Letters* 477(3): 219-223.
- Filip, P.; Weber, R.; Sterner, O.; Anke, T. (2003). "Hormonemate, a new cytotoxic and apoptosis-inducing compound from the endophytic fungus *Hormonema dematioides*. I. Identification of the producing strain and isolation and biological properties of Hormonemate". *Z. Naturforschung* 58 c: 547-552.
- Graça de Sousa, V.; Faria, T.; Panis, C.; Menolli, R.; Marguti, I.; Yamauchi, L.; Yamada-Ogatta, S.; Pinge-Filho, P. (2011). "Trypanocidal activity of *Erythrina speciosa* Andr. (Leguminosae)". *Latin American Journal of Pharmacy* 30(6): 1085-1089.
- González, M.; Coppetti, V.; Lombardo, A. (1928). "*Planta Diaphoricae, Florae Uruguayensis*", En: Tomo I, Imprenta Nacional, Montevideo: 22-23.
- Guar, A.; Bhatia, A. (2009). "Genistein: a multipurpose isoflavone". *International Journal of Green Pharmacy* 3: 176-183.
- Guo, B.; Wang, Y.; Sun, X.; Tang, K. (2008). "Bioactive natural products from endophytes: A Review". *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(2): 136-142.
- Gupta, S. G.; Kim, J.H.; Kannappan, R.; Reuter, S.; Dougherty, P.M.; Aggarwal, B.B. (2011). "Role of nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in cancer-related symptoms and their regulation by nutritional agents". *Experimental Biology and Medicine* 236: 658-671.
- Hieronymus, H. (1882). "*Plantae diaphoricae florae artintinae, ó Revista sistemática de las plantas medicinales, alimenticias ó de alguna otra utilidad y de las venenosas, que son indígenas de la*

- República Argentina ó que, originarias de otros países se cultivan o se crían espontáneamente en ella*”, Boletín de la Academia Nacional de Ciencias de Córdoba, Buenos Aires, Tomo IV: 272-273.
- Hong, Y.-H.; Wang, S.; Hsu, C.; Lin, B.-F.; Kuo, Y.-H.; Huang, C. (2011). “Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol”. *Journal of agricultural and food chemistry* 59(1): 131-137.
- Hsieh, P.W.; Hsu, L.-C.; Lai, C.-H.; Wu, C.-C.; Hwang, T.-L.; Lin, Y.-K.; Wu, Y.-C. (2009). “Evaluation of the bioactivities of extracts of endophytes isolated from Taiwanese herbal plants”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1461-1469.
- Hwang, J.-T.; Lee, Y.-K.; Shin, J.-I.; Park, O. (2009). “Anti-inflammatory and anticarcinogenic effect of genistein alone or in combination with capsaicin in TPA-treated rat mammary glands or mammary cancer cell line”. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1171: 415-420.
- Iinuma, M.; Okawa, Y.; Tanaka, T. (1994). “Three new cinnamylphenols in heartwood of *Erythrina crista-galli*”. *Phytochemistry* 4(7): 1153-1155.
- Imamura, H.; Ito, H.; Ohashi, H. (1981). “Isoflavonoids of *Erythrina crista-galli* (Leguminosae)”. *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture - Gifu University* 45: 77-82.
- Ingham, J.; Markham, K. (1980). “Identification of the *Erythrina* phytoalexin cristacarpin and a note on the chirality of other 6a-hydroxypterocarpanes”. *Phytochemistry* 19(6): 1203-1207.
- Jalgaonwala, R.; Mohite, B.; Mahajan, R. (2011). “A review: Natural products from plant associated endophytic fungi”. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research* 1(2): 21-32.
- Jang, J.; Na, M.; Thuong, P.; Njamen, D.; Mbafor, J.; Fomum, Z.; Woo, E.-R.; Oh, W. (2008). “Prenylated flavonoids with PTP1B inhibitory activity from the root bark of *Erythrina mildbraedii*”. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 56(1): 85-88.
- Juma, B.; Majinda, R. (2006). “Three new compounds from *Erythrina lysistemon* and their antimicrobial, radical scavenging activities and their brine shrimp lethality”. En: 11st Natural Product Research Network for Eastern and Central Africa (NAPRECA) Symposium Book of Proceeding, Antananarivo, Madagascar: 97-109.
- Kanakubo, A.; Koga, K.; Isobe, M.; Fushimi, T.; Saitoh, T.; Ohshima, Y.; Tsukamoto, Y. (2001). “First finding of daidzein 7-O-phosphate and genistein 7-O-phosphate that are hydrolyzed by sulfatase”. *Tetrahedron* 57: 8801-8805.
- Kole, L.; Giri, B.; Manna, S.K.; Pal, B.; Ghosh, S. (2011). “Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFκB nuclear translocation”. *European Journal of Pharmacology* 653: 8-15.
- Köpcke, B.; Weber, R.; Anke, T. (2002). “Galiella lactone and its biogenetic precursors as chemotaxonomic markers of the *Sarcosomataceae* (Ascomycota)”. *Phytochemistry* 60: 709-714.
- Kupka, J.; Anke, T.; Obertwinkler, F.; Schramm, G.; Steglich, E. (1979). “Antibiotics from basidiomycetes. VII. Crinipellin, a new antibiotic from the basidiomycetous fungus *Crinipellis stipitaria* (Fr.)”. *The Journal of Antibiotics* 32(2): 130-135.
- Lahitte, H.; Hurrell, J.; Belgrano, M.; Jankowski, L.; Haloua, M.; Mehlreter, K. (1998). “*Plantas medicinales rioplatenses. Plantas nativas y naturalizadas utilizadas en medicina popular en la región del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense*”. Edición L.O.L.A. (Literature of Latin América), Buenos Aires: 160-161.
- Lahitte, H.; Hurrell, J. (1999). “*Biota Rioplatense. Inventario temático de la biota de la región del Delta del Paraná, Isla Martín García y Ribera Platense*”. Edición L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires: 88-93.
- Li, H.; Qing, C.; Zhang, Y.; Zhao, Z. (2005a). “Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 1515-1519.
- Mabry, T.; Markham, K.; Thomas, M. (1970). “*The Systematic Identification of Flavonoids*”. Springer - Verlag, Berlin.
- Maier, U.; Rödl, W.; Deus - Neumann, B.; Zenk, M. (1999). “Biosynthesis of *Erythrina* alkaloids in *Erythrina crista-galli*”. *Phytochemistry* 52(3): 373-382.
- Mbafor, T.; Ndom, J.; Fomum, T. (1997). “Triterpenoids saponins from *Erythrina sigmoidea*”. *Phytochemistry*, 44(6): 1151-1155.

- Mense, S.; Hei, T.; Ganju, R.; Bhat, H. (2008). "Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanisms of action". *Environmental Health Perspective* 116(4): 426-433.
- Mitscher, L.; Gollapudi, S.; Gerlach, D.; Drake, S.; Véliz, E.; Ward, J. (1988). "Erycristin, a new antimicrobial pterocarpin from *Erythrina crista-galli*". *Phytochemistry* 27(2): 381-385.
- Muschietti, L.; Sülsen, V.; Martino, V. (2012). "Metodología empleada en el estudio de los productos naturales para el descubrimiento de fármacos con actividad tripanosomicida". En: Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos Medicamentos. Una visión iberoamericana. Laboratorios Silanes, SA de CV, México D.F.: 227-252.
- Nkengfack, A.; Vouffo, T.; Vardamides, J.; Kouam, J.; Fomum, Z.; Meyer, M.; Sterner, O. (1997). "Phenolic metabolites from *Erythrina* species". *Phytochemistry* 46(3): 573-578.
- Nkengfack, A.; Waffo, A.; Azebaze, G.; Fomum, Z.; Meyer, M. (2000). "Indicanine A, a new 3-phenylcoumarin form root bark of *Erythrina indica*". *Journal of Natural Products* 63: 855-856.
- Patisaul, H.; Jefferson, W. (2010). "The pros and cons of phytoestrogens". *Frontiers in Neuroendocrinology* 31: 400-419.
- Pino - Rodríguez S.; Prieto - González, S. (2004). "Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica". *Acta Farmacéutica Bonaerense* 23(2): 252-258.
- Portillo, A.; Vila, R.; Freixa, B.; Adzet, T.; Cañigüeral, S. (2001). "Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine". *Journal of Ethnopharmacology* 76: 93-98.
- Queiroz, E.; Wolfender, J.; Atindehou, K.; Traore, D.; Hostettmann, K. (2002). "On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation". *Journal of chromatography A*, 974(1-2): 123-134.
- Rahman, M.; Sultana, S.; Faruquee, C.; Ferdous, F.; Rahman, M.; Islam, M.; Rashid, M. (2007). "Phytochemical and biological investigations of *Erythrina variegata*". *Saudi Pharmaceutical Journal* 15(2): 140-145.
- Ratera, E.; Ratera, M. (1980). "Plantas de la flora Argentina empleadas en medicina popular". Hemisferio Sur S. A., Buenos Aires: 144.
- Rondina, R.; Coussio, J. (1969). "Estudio Fitoquímico de Plantas Medicinales Argentinas". *Revista de Investigaciones Agropecuarias Serie 2*: 6(33): 351-366.
- Rublinchik, E.; Pasetka, C. (2010). "Assay systems for measurement of anti-inflammatory activity". *Methods in Molecular Biology* 618(3): 349-358.
- Saggese, D.; Saggese, A. (1950). "Yerbas medicinales argentinas. Breves apuntes de las propiedades de las mismas e indicaciones para su uso". Editorial Antognazzi & Cia. S. R. L., Rosario: 44-45.
- Soto-Hernández, R.; García-Mateos, R.; San Miguel-Chávez, R.; Kite, G.; Martínez-Vázquez, M.; Ramos-Valdivia, A. (2011). "*Erythrina*, a potential source of chemicals from the Neotropics". En: *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, (Chapter 9), Ed. Iraj Rasooli, Rijeka, Croacia: 163-184.
- Soto-Hernández, M.; Jackson, A. (1994). "*Erythrina* alkaloids: isolation and characterization of alkaloids from seven *Erythrina* species". *Planta Medica*, 60(2): 175-177.
- Staniek, A.; Woerdenbag, H.; Kayser, O. (2008). "Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery". *Journal of Plant Interactions*, 3(2): 75-93.
- Staniek, A.; Woerdenbag, H. J.; Kayser, O. (2009). "*Taxomyces andreanae*: A presumed paclitaxel producer demystified?". *Planta Medica* 75: 1561-1566.
- Strobel, G. (2003). "Endophytes as sources of bioactive products". *Microbes and Infection* 5: 535-544.
- Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; Harper, J. (2004). "Natural products from endophytic microorganisms". *Journal of Natural Products* 67(2): 257-268.
- Tanaka, H.; Tanaka, T.; Etoh, H. (1997). "Three pterocarpanes from *Erythrina crista-galli*". *Phytochemistry* 45(4): 835-838.
- Tenguria, R.; Khan, F.; Quereshi, S. (2011). "Endophytes- mines of pharmacological therapeutics". *World Journal of Science and Technology*, 1(5): 127-149.
- Toursarkissian, M. (1980). "Plantas Medicinales de la Argentina. Sus nombres botánicos, vulgares,

- usos y distribución geográfica*". Hemisferio Sur, Buenos Aires: 70.
- Waffo, A.; Coombes, P.; Mulholland, D.; Nkengfack, A.; Fomum, Z. (2006). "Flavones and isoflavones from the west African Fabaceae *Erythrina vogelii*". *Phytochemistry* 67: 459-463.
- Wanjala, C.; Majinda, R. (2000). "Two novel glucodienoid alkaloids from *Erythrina latissima* seeds". *Journal of Natural Product* 63(5): 871-873.
- Weber, D.; Sterner, O.; Anke, T.; Gorzalczany, S.; Martino, V.; Acevedo, C. (2004). "Phomol, a new anti-inflammatory metabolite from an endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*". *The Journal of Antibiotics* 7(9): 559-563.
- Weber, D.; Gorzalczany, S.; Martino, V.; Acevedo, C.; Sterner, O.; Anke, T. (2005). "Metabolites from endophytes of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*". *Z. Naturforsch*, 60c: 467-477.
- Yenesew, A.; Midiwo, J.; Heydenreich, M.; Schanzenbach, D.; Peter, M. (2000). "Two isoflavanones from the stem bark of *Erythrina sacculusii*". *Phytochemistry* 55: 457-459.
- Yu, O.; Shi, J.; Hession, A.; Maxwell, C.; Mc Goni-
gle, B.; Odell, J. (2003). "Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed". *Phytochemistry* 63(7): 753-763.
- Zhao, L.; Xu, L.; Jiang, C. (2012). "Methods for the study of endophytic microorganisms from traditional Chinese medicine plants". *Methods in Enzymology*, 517: 3-21.
- Zuloaga, F.; Morrone, O.; Belgrano, M.; Marti-
corena, C.; Marchesi, E. (2008). "Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)". En: *Monographs in Systematic Botany from the Mis-
souri Botanical Garden* 107(1).

