



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"Aislamiento e identificación de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en *Terminalia Australis* Cambess. (Combretaceae)"



TESIS - MAESTRÍA EN PLANTAS MEDICINALES

Teresita Di Bernardi

Director: Dr. Luis Bruno Blanch

Magíster en Plantas Medicinales – U.N.L.P.

El presente Trabajo de Tesis correspondiente a la Maestría en Plantas Medicinales ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Bruno Blanch en la Cátedra de Química Medicinal de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata entre los años 2001 y 2006 aunque recién pudo concretarse su publicación este año.

Los análisis por espectrometría de masas (MS), espectroscopia infrarroja (IR), resonancia magnética nuclear (NMR) y el análisis elemental de los compuestos se desarrollaron en el Dipartimento di Scienze Farmaceutiche della Università degli Studi di Salerno, Italia, bajo la dirección del Dr., Luca Rastrelli.

Los ensayos bacteriológicos fueron llevados a cabo en el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, bajo la dirección de la Dra. Liliana Sabini.

Me encontraré con el entrometido, el ingrato, el arrogante, el mentiroso, el envidioso. Todas estas cosas les suceden porque ignoran lo que es el bien y lo que es el mal. Pero no pueden herirme, pues yo he visto que el bien es bello y el mal, feo, y que la naturaleza de quien obra mal es como la mía; ni tampoco puedo enfadarme con mi compañero de clan, ni odiarlo. Pues estamos hechos para la cooperación, como los pies, las manos, los párpados, como nuestras hileras de dientes, superiores e inferiores. Actuar el uno Contra el otro es contrario a la naturaleza.

Marco Aurelio "Meditaciones", Libro II

Roma 121-Viena 180

Agradecimientos

Al Dr. Luis Bruno Blanch por alentarme en la realización de esta Maestría y bajo su dirección darme la oportunidad de concretar esta Tesis en el Laboratorio de Química Medicinal brindándome su tiempo, experiencia y amistad.

A la Facultad de Ciencias Exactas, por brindarme la capacitación con el Magíster en Plantas Medicinales y haberme permitido la concreción de este trabajo.

Al Dr. Manuel G. Escalante y en particular a la Dra. Marta T. Nájera por iniciarme en el fascinante mundo de las plantas medicinales y brindarme generosamente Su experiencia y cariño en todo momento.

A la Dra. Etilé D. Spegazzini por la confianza y estímulo constante y su cálida hospitalidad durante mi estadía en el LABRAM.

Al Dr. Néstor Oscar Caffini por sus valiosas sugerencias en relación a la organización de la presentación de este trabajo.

A la Dra. Stella M. Carpano por sus oportunos consejos.

Al Dr. Luca Rastelli de Salerno, Italia, a la Dra. Liliana Sabini y la Microbióloga Paula Cordero Gabrielli de la UNRC por su creativa colaboración.

A todos los profesores y compañeros del Magíster en Plantas Medicinales especialmente, a Gogui y Graciela, con quienes compartí tantos buenos momentos.

A Malena, Valeria, Susana, Luciano y Marilen, mis compañeros de trabajo en la "oficina farmacéutica" por su permanente apoyo.

A Silvia Young por sus innumerables consejos informáticos.

A Dora Lara por su amable compañía en el LABRAM.

A mis padres, hermanas y a José por el amor y la paciencia.

A mis padres, mis hermanas y a José.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

Principios activos de origen vegetal	1
Fitomedicina o Fitoterapia	2
Breve historia del uso de las plantas medicinale	5
La familia Combretaceae R. Br.	10
Los Taninos	14
Los Flavonoides	18

HIPOTESIS

Hipótesis de trabajo	21
----------------------------	----

OBJETIVOS

Objetivos	22
-----------------	----

MATERIALES y METODOS

Material botánico	23
Reactivos e instrumental	27
Material vegetal	28
Breve introducción de las Metodologías utilizadas	29
Cromatografía en capa fina	29
Cristalización	32
Punto de Fusión	33

Cromatografía Líquida de Alta Resolución -----	34
Espectroscopia infrarroja -----	35
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear -----	38
Espectroscopia de masas -----	39
Extractos	
Extracto acuoso -----	42
Extracción con Éter de petróleo -----	42
Extracción con Metanol -----	43
Experimental -----	44
Cristalización -----	44
Actividad antimicrobiana -----	44
Reacciones generales de caracterización -----	45
Caracterización cromatográfica -----	47
Preparación de la columna - Sephadex -----	50
Estudios antimicrobianos -----	53
Ensayos de actividad antimicrobiana -----	55
Determinación de la Concentración Inhibitoria -----	55
Mínima CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Fungicida Mínima (CFM) de las fracciones vegetales activas	
Obtención de compuestos -----	58

Aislamiento y purificación de la FV	58
Preparación de la columna – Celulosa	58
Espectrometría de masas	60
RESULTADOS y DISCUSION	
Resultados microbiológicos	61
Estudios antimicrobianos	61
Estudios antifúngicos	62
Compuestos Obtenidos	64
Compuesto 1	64
Compuesto 2	65
Compuesto 3	66
Compuesto 4	67
CONCLUSIONES	
Conclusiones	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	
Referencias bibliográficas	71

INTRODUCCIÓN

Principios Activos de Origen Vegetal

La investigación en el campo de las Plantas Medicinales es siempre alentadora, básicamente porque despierta en el investigador que la realiza un interés movilizador, al sentirse parte activa del conocimiento Creativo. Sabe que si su búsqueda es responsable puede aportar nuevos Compuestos que, si bien están presentes en la naturaleza, resultan aún desconocidos para el hombre, Como ha ocurrido en incontables oportunidades en la historia del Hombre, algunos de estos compuestos podrían constituirse en nuevos medicamentos o ser fuente de ellos, contribuyendo así a la mejora de la Salud Humana.

La búsqueda de nuevos principios activos vegetales es una tarea lenta, costosa y en la mayoría de los casos poco exitosa. Como ejemplo de ello puede tomarse el Programa que en 1950 inició el Instituto Nacional del Cáncer en los EE.UU. y que luego de 32 años de investigación solo aportó un compuesto relevante en la lucha contra la enfermedad: el taxol, una sustancia compleja aislada de la corteza de *Taxus brevifolia*, luego de haberse estudiado aproximadamente 35.000 diferentes compuestos (Krnietowicz, 2000).

Según estimaciones recientes, de las aproximadamente 250.000 especies vegetales reconocidas en el mundo, sólo el 4% de ellas ha sido objeto de estudios cuidadosos, lo que revela el enorme potencial existente en el campo de las plantas medicinales (Palacios Lozada, 2004).

Para la selección del material vegetal pueden definirse al menos tres estrategias. La primera de ellas es la de realizar un "screening" al

azar, utilizando un criterio probabilístico, que obviamente es la menos recomendable pero que ha sido utilizada en más de una oportunidad, esencialmente en la primera época de la búsqueda de principios activos, donde no existía información suficiente al respecto. La segunda estrategia está basada en relaciones quimiotaxonómicas o filogenéticas, donde las especies son seleccionadas de acuerdo a la categoría química de sustancias presentes en un género o familia, donde existe una información anterior respecto a su/s acciones biológicas; es el método que presenta más probabilidades de descubrir nuevas estructuras. Finalmente deben mencionarse los estudios basados en la información etnofarmacológica, donde la selección de la especie está basada en el conocimiento de su uso terapéutico por un grupo étnico dado (Elizabetsky & Wannmacher, 1993).

Fitomedicina o Fitoterapia

La Organización Mundial de la Salud (OMS 2000) ha definido el uso de las plantas en terapéutica como Fitomedicina o Fitoterapia. El gran interés que ésta ha despertado llevó a grandes laboratorios internacionales a crear centros de investigación en lugares donde la extrema biodiversidad vegetal asegurara una fuente confiable de material de estudio, como ha ocurrido en el Amazonas y en la Selva costarricense, entre otros casos.

Por su parte la Cooperativa Científica Europea sobre Fitoterapia (ESCOP), organización que centra su accionar en el avance del estado

<http://info.ex.ac.uk/phytonet/escop.html>

científico de la fitomedicina y en ayudar en la armonización de su estado legislativo en el ámbito europeo, ha definido a las fitomedicinas como "productos medicinales que contienen como ingredientes activos plantas, partes de las plantas o materiales de plantas, o combinaciones, tanto en crudo como en estado procesado" (OMS 2002).

La estructura de funcionamiento de los laboratorios dedicados a la búsqueda sistemática de principios activos de origen vegetal involucra varias áreas del conocimiento, hecho que conlleva al trabajo conjunto de biólogos, botánicos, farmacéuticos y hasta de la consulta a curanderos Y/o chamanes² que aún existen en algunas comunidades, ya que las plantas siempre han sido parte integral de la práctica de la medicina a lo largo de la historia del Hombre.

La palabra droga proviene de "drogge", del idioma holandés antiguo, y quiere decir "secar", ya que los antiguos farmacéuticos, médicos y curanderos con frecuencia dejaban secar las plantas para usarlas como fármacos (García Milian et al., 2005). Por otro lado, la OMS estima que la mitad de los seis mil seiscientos millones de habitantes de nuestro planeta confían en las Medicinas alternativas como una opción válida para resolver sus principales necesidades sanitarias y dentro de ellas el uso de extractos de Plantas o sus principios activos (OMS, 2002).

Como es natural cuando aparecen nuevas disciplinas de estudio, puede apreciarse un cierto grado de superposición en la terminología utilizada. En este trabajo los términos Fitomedicina o Fitoterapia se utilizarán de manera indistinta, haciendo referencia a una forma de

² Chamán, del idioma tungu, de Siberia, xaman O schaman, y éste del verbo scha, saber, es un individuo al que se le atribuye la capacidad curar, de comunicarse con los espíritus y de presentar habilidades visionarias y adivinatorias.

Terapia Alternativa que emplea plantas medicinales y fitofármacos en el tratamiento de las enfermedades. Por Su parte se considerarán cómo Plantas medicinales sólo a aquellas que contienen principios activos con un rol terapéutico conocido en el ser humano, reservando el nombre de Titorarmaco para aquellos principios activos, derivados de plantas, elaborados de acuerdo a estándares de calidad específicos, definidos por los organismos reguladores de cada país.

Si consideramos que sólo pueden denominarse medicamento a toda droga o preparación efectuada con drogas que por su forma farmacéutica y dosis puede destinarse a la curación, alivio, a la prevención o al diagnóstico de las enfermedades de los seres vivientes, resulta imperioso lograr estándares de los productos fitoterápicos que se elaboran con Plantas Medicinales.

Por otro parte y como ya ha sido mencionado, las relaciones quimiotaxonómicas que suelen manifestarse en especies que pertenecen a una misma familia o género, son de gran utilidad para establecer relaciones sistemáticas, cómo también para evaluar el contenido químico entre las mismas. Se ha encontrado que especies distintas fueron usadas para la misma patología por diferentes culturas, interrelacionando usos tradicionales entre culturas muy diferentes. En este sentido resulta importante destacar que el 35% de los medicamentos utilizados por la industria farmacéutica tienen como principios activos compuestos que provienen de Plantas Medicinales o modificaciones de éstos (Arkochim, 1997).

En nuestro país, la utilización de Plantas Medicinales, está basada principalmente en nuestra cultura aborígen, pero también en el aporte de

los inmigrantes que habitaron y habitan nuestro suelo, por lo que muchas plantas autóctonas recibieron su nombre trivial por semejanza con una especie similar originaria de o existente en otro continente.

Breve historia del uso de las plantas medicinales

El uso de las plantas medicinales, aromáticas y productoras de especias se remonta a la antigüedad, donde inicialmente fueron usadas siguiendo el instinto; más tarde se fue racionalizando su uso y determinando los compuestos a los que debían sus propiedades terapéuticas, aromáticas o su uso como especias en los alimentos (Arancibia et al., 1999).

La historia del uso de las plantas, con distintos fines, ha acompañado al hombre a lo largo de toda su historia. La destilación de las esencias se practica desde hace miles de años en Asia y la antigua Babilonia fue una importante productora de perfumes, extractos, lociones, aceites, pinturas de labios, etc. (Figurovsky, 1979). Los asirios y hebreos también estaban familiarizados con el uso de las plantas con poder curativo, y los egipcios describieron en sus papiros las propiedades de plantas tales como la mirra, el cáñamo, el opio, el aloe y la cicuta.

En el antiguo Egipto, el primero de los notables médicos de esta cultura fue Imhotep, arquitecto y "sanador" que después fue ascendido a la categoría de dios por las milagrosas curaciones que se le atribuían. En la actualidad se siguen usando Plantas Medicinales de la misma manera que se usaban en China hace 50.000 años.

El principal aporte de los griegos proviene de Dioscórides (Pedanio Dioscórides Anazarbeo clrca 40-90 dC) médico, farmacólogo y botánico de la antigua Grecia, cuya obra De Materia Medica describe, en cinco Volúmenes, unas 600 plantas medicinales, 90 minerales y alrededor de 30 sustancias de origen animal. A diferencia de otras obras clásicas, este libro tuvo una enorme difusión en la Edad Media tanto en su original griego como en otras lenguas. tales como el latín y el árabe. El dios de la medicina de los griegos era Asclepio o Asclepios (Esculapio para los romanos), cuyo emblema era una serpiente enroscada en una vara, símbolo que ha perdurado hasta nuestros días representando a la medicina.

A diferencia de otros pueblos, los eslavos empleaban menos las plantas herbáceas y mucho más las hojas y los frutos de especies forestales tales como abedul, pino, abeto, enebro, sauce, fresno, sicómoro, tilo, espino blanco o majuelo y cornejo, entre otros. También utilizaban la amapola y el cáñamo en calidad de anestésicos.

En la Edad Media, los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria "farmacia". En esa época la escuela árabe, famosa por sus grandes médicos, ya prescribía numerosas drogas vegetales, muchas de las cuales son usadas actualmente.

En 1492, a pesar de que Colón no llegó a las Indias, sí descubrió un nuevo continente que en materia de especias le dio la oportunidad a Europa de conocer el ají y el pimentón, el pimiento de Jamaica y la vainilla, entre otras. En 1511 se publica en Barcelona la primera farmacopea territorial del mundo llamada Concordia Pharmacopolarem.

ya en el siglo XVII prácticamente todas las esencias de Europa y el Cercano Oriente estaban identificadas.

En el siglo XVIII, Como resultado de las mezclas de las esencias nacen las aguas de colonia, que se divulgan ampliamente por Francia. En el siglo XIX se practican los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales, con la aplicación del microscopio y de las técnicas de la química analítica.

A partir de 1850 se desarrolla un movimiento orientado a la búsqueda de la composición química de los vegetales y puede considerarse que nace allí la base de la industria farmacéutica, perfumera y condimentaria actual.

En nuestro siglo, los grandes avances científicos y tecnológicos permitieron desarrollar sustitutos artificiales a los productos naturales. Sin embargo, el nivel de deterioro del ambiente, a raíz de la contaminación, ha producido un vuelco de mentalidad, sobre todo en países desarrollados, donde en los últimos veinte años se ha verificado una tendencia de volver a los productos naturales, libres de contaminación, al uso de hierbas medicinales, plantas aromáticas o de esencias y plantas condimentarias. También la toma de conciencia de que los productos artificiales podrían ser dañinos para la salud, ha contribuido a cambiar las tendencias de la demanda.

Este renacimiento del interés por las plantas medicinales suscita el problema de las orientaciones adecuadas para el éxito de las actividades de investigación porque, incluso si la humanidad entera concentrase en ello sus esfuerzos, es poco probable que algún día se lleguen a estudiar todas las especies vegetales que crecen en el planeta.

Es entonces lógico apoyarse en los conocimientos que existen en el campo de la medicina popular, depositaria de una experiencia acumulada a lo largo de los siglos; de este modo, el arsenal terapéutico moderno se nutre en buena parte de los principios activos de las plantas, ya sean aislados de ellas u obtenidas por síntesis.

Las ventajas del empleo de las plantas en su totalidad radican en que junto a sus principios activos pueden existir, en muchos casos, otros constituyentes de acción sinérgica, que potencian su acción y la hacen más completa y duradera que el principio o principios activos aislados. No obstante ello, no debe olvidarse que ciertas plantas medicinales no han mostrado las propiedades que les atribuye la experiencia popular, e incluso algunas han resultado peligrosas. Así mismo, el hecho de que gran número de plantas medicinales utilizadas ya por la medicina tradicional en tiempos de Hipócrates, Dioscórides y Galeno, hayan superado la prueba de una práctica milenaria y conserven su puesto meritorio en la actual terapia (en una época en que la duración de los medicamentos nuevos no pasa de los 5 ó 6 años), demuestra que, en muchos casos, las propiedades curativas más importantes de las plantas medicinales han sido descubiertas por el más seguro y riesgoso de los caminos, el empírico.

No se trata de elegir entre las plantas medicinales y las sustancias químicas obtenidas de los productos naturales. Lejos de excluirse mutuamente, ambos grupos se complementan si el profesional o conocedor de ambas técnicas los utiliza hábilmente. En la fase actual del desarrollo de la farmacoterapia, no cabe sustituir por sustancias simples los eficaces medicamentos de que hoy disponemos para luchar contra la mayor parte de las enfermedades.

Pero habría que reconocer que la fitoterapia presenta a menudo ventajas indiscutibles con relación a los medicamentos modernos. Toda vez que las sustancias biológicas activas de las plantas son productos debidos al metabolismo de un organismo vivo, una gran parte de ellas son asimiladas por el organismo humano en forma más natural que los medicamentos sintéticos.

Un examen de diversas farmacopeas muestra que más del 40% de los medicamentos utilizados en los países industrializados son directa o indirectamente de origen biológico. Hoy en día, en países como Italia, Hungría, Polonia, Alemania y el Reino Unido, las investigaciones fitoterapéuticas están adquiriendo un empuje insospechado; en Siberia existen grandes extensiones de cultivo de plantas medicinales y laboratorios que se dedican a su estudio. En muchos hospitales de China, disponen de amplios jardines donde se cultivan las plantas medicinales necesarias para los enfermos.

Actualmente son varios los países que envían investigadores a distintos lugares para el estudio de las plantas consideradas como medicinales. Estas nuevas tendencias abren la posibilidad a países en desarrollo para diversificar sus tipos de cultivo y tratar de acceder a otros sectores de los mercados internacionales.

La familia Combretaceae R. Br.

Se trata de una familia que pertenece al Orden Myrtales, que comprende alrededor de 600 especies de árboles, arbustos y trepadoras, agrupadas en alrededor de 20 géneros: Anogelssus, Buchenavla, Bucida, Conocarpus, Danslea, Gulera, Calopyxis, Calycopteris, Combretum, Laguncularia, Lumnizera, Macropteranthes, Melostemon, Pteleopsis, Quisqualis, Strephonema, Terminalia, Terminaliopsis y Thiloa. Su hábitat se extiende por los trópicos y subtrópicos.

El género Terminalia Cambess. es el más importante (150 especies distribuidas en los cinco continentes) y varias de sus especies han sido estudiadas en razón de sus variadas actividades biológicas. El género es conocido por la presencia de metabolitos secundarios tales como los triterpenos pentacíclicos, flavonoides, derivados glicosídicos y otros compuestos aromáticos, algunos de los cuales presentan actividades antibacterianas, antifúngicas, hepatoprotectoras, y en algunos casos acción anticancerígena (Russo & Speranza Sánchez, 2001). Varias especies de Terminalia han sido objeto de estudios fitoquímicos; en la Tabla 1 se consignan las especies estudiadas y los principales compuestos aislados.

Terminalia australis Cambess. es una especie botánica de Sudamérica. Son arbustos o árboles, hasta de 12 m de altura y 40 cm de diámetro. Habita en las selvas en galería a lo largo de las costas de grandes ríos en el noreste de Argentina y países vecinos. En nuestro país se lo encuentra a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay y en parte del río de la Plata. El nombre común de esta especie ("amarillo", "palo amarillo", "amarillo del río") obedece al color amarillo ocre de

su madera, que es finamente texturada, homogénea y moderadamente pesada (densidad relativa = 0,65), siendo usada como ornamental y para la fabricación de piezas de ajedrez, reglas, botones, etc. No se registran estudios sobre esta especie, excepto los de Escalante & Carpano (1977), Carpano et al. (2003) y Carpano (2007), en los que se hace referencia a su actividad antibacteriana y antifúngica.

Especie	Compuestos aislados o extractos ensayados	Actividad	Referencias
<i>T. arjuna</i>		hipolipidémico	Shaila <i>et al.</i> (1998)
	ác. elágico	antimutagénico	Kaur <i>et al.</i> (1998)
		antibacteriana	Perumal Samy <i>et al.</i> (1998)
	taninos, triterpenoides, saponinas (ác. arjúnico, ácido arjunólico, arjungenina, arjunglicósidos), flavonoides (arjuna, arjunolona, luteolina) ácido gálico, ácido elágico, proantocianidinas oligoméricas (OPCs), fitosteroles, calcio, magnesio, zinc y cobre	cardiotónica, antihipercolesterolemia antibacteriana, antimutagénica, antioxidante	Miller (1998)
	extracto de corteza	Antioxidante e hipocolesterolémico	Gupta <i>et al.</i> (2001)
<i>T. australis</i>		antibacteriana, antifúngica	Escalante & Carpano (1977); Carpano <i>et al.</i> (2005)
<i>T. avicennioides</i>	taninos y saponinas	antifúngica	Baba-Moussa <i>et al.</i> (1999)

Tabla 1. Especies de *Terminalia* que han sido objeto de estudios fitoquímicos.

<i>T. bellerica</i>	en ext etanólico al 80% de frutos y corteza: termilignano tanilignano, 7-hidroxi-3',4'-(metilenedioxy) flavan y anolignanoB	anti-HIV-1, antimalárica, antifúngica	Valsaraj <i>et al.</i> (1997)
<i>T. catappa</i>	ácido brevifolin-carboxílico, β -caroteno, corilagino, cianidin-3-glucósido, ácido elágico, ácido gálico, glucosa, pentosanos, taninos (frutos)	expectorante, antidiabético	Duke (1992), Nagappa <i>et al.</i> (2003)
	canferol, punicalagina, quercitina (hojas)	antirreumática, emética, anti-hepatotóxica, antioxidante	Duke (1992)
	catequinas, epicatequinas, leucocianidina, taninos (corteza); ácido terminálico (madera)	hepatoprotectora	Duke (1992)
	punicalagina y punicalina de hojas taninos	antioxidante, anti-hepatotóxica, dermatitis y hepatitis	Juang <i>et al.</i> (2004)
<i>T. chebula</i>	taninos hidrosolubles de frutos (mirobalanos)	citotóxica	Lee <i>et al.</i> (1995)
	decocción de frutos	movilidad gastrointestinal	Tamhane <i>et al.</i> (1997)
	extracto acuoso de planta entera	antifúngica	Dutta <i>et al.</i> (1999)
	extracción en etanol al 95% y acetato de etilo de taninos hidrolizables	antimutagénica	Kaur <i>et al.</i> (1998)
	extracto acuoso de planta entera	adaptógena	Rege <i>et al.</i> (1999)
	extracto acuoso	Antioxidante y radioprotector	Naik <i>et al.</i> (2004)
<i>T. ferdinandiana</i>	frutos, gran concentrado de Vitamina C	alto valor nutricional antioxidante	Fletcher (1995)
<i>T. glaucescens</i>	extracto acuoso de planta entera	antibacteriana de amplio espectro	Taiwo <i>et al.</i> (1999)
<i>T. glaucescens</i> y <i>T. laxiflora</i>	ácidos elágico, trimetil-elágico y tetrametilelágico		Idemudia (1970)
<i>T. ivorensis</i>	Extractos con acetato de etilo	tripanocida	Agbedahunsi <i>et al.</i> (2006)

Tabla 1. Especies de *Terminalia* que han sido objeto de estudios fitoquímicos (Continuación).

<i>T. ivorensis</i> y <i>T. avincennoides</i>	ácidos elágico y trimetil-elágico		Ekong & Idemudia (1967)
<i>T. macroptera</i>	triterpeno glucopiranosil de corteza		Conrad <i>et al.</i> (1998)
	taninos hidrolizables y Nuevo galato fenólico glucósido		Conrad <i>et al.</i> (2001)
	Taninos hidrolizables	activos contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Biomphalaria glabrata</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> y líneas celulares cancerosas	Conrad <i>et al.</i> (2001)
<i>T. oblongata</i>		intoxicación en ovejas	Filippich <i>et al.</i> (1997)
<i>T. paniculata</i>	3,3 demetilelágico 4-glucósido		Hegnauer (1964)
<i>T. serecia</i>		suplemento en dietas de cabras	Aganga & Moyatsiwa (1999)
<i>T. triflora</i>	extractos acuosos liofilizados	antioxidante	Desmarchelier <i>et al.</i> (1997)
	quercetina, afzelina, ácidos elágico y gálico, galato de metilo y dos nuevos taninos (hojas)		Martino <i>et al.</i> (1975)
	Taninos (extracto acuoso de hojas)	Inhibición de la actividad polimerasa y ribonucleasa de la transcriptasa reversa del virus del SIDA	Martino <i>et al.</i> (2002)

Tabla 1. Especies de *Terminalia* que han sido objeto de estudios fitoquímicos (Continuación).

Como puede apreciarse en la tabla 1, los taninos y compuestos relacionados (flavonoides) están abundantemente representados en las diferentes especies de *Terminalia* estudiadas.

Los Taninos

El término tanino fue originalmente utilizado para describir ciertas sustancias orgánicas que se usaban para convertir a las pieles crudas de animales en cuero, proceso conocido como "curtido" ("tanning" en inglés). Los taninos se extraen usualmente de diversas especies de plantas con agua o con una mezcla de agua y alcohol, que luego se decanta y se deja evaporar a baja temperatura hasta obtener el producto final. Tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente, y su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro. Expuestos al aire se oxidan y se tornan oscuros, perdiendo su efectividad para el curtido. La utilización de los taninos en el curtido obedece a su capacidad de reaccionar con las proteínas presentes en las pieles de los animales (en las que el colágeno es el compuesto principal), generando compuestos muy estables, con lo que se incrementa la resistencia de la piel (ahora convertida en cuero) al calor, a la putrefacción por agua, y al ataque por microbios. Químicamente son metabolitos secundarios de las plantas, de naturaleza fenólica, no nitrogenados, solubles en agua o en mezclas hidroalcohólicas, pero no en solventes orgánicos.

Hay dos categorías de taninos, clasificados en base a su vía de biosíntesis y a sus propiedades químicas: los taninos condensados y los Condensados (a veces también taninos hidrolizables. Los taninos llamados proantocianidinas) son polímeros de un flavonoide llamado antocianidina. Es común encontrarlos en la madera de las plantas leñosas. Los taninos hidrolizables son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos, en particular ácido gálico, y azúcares simples.

Son más pequeños que los taninos condensados y son hidrolizados con más facilidad. La mayoría tiene una masa molecular entre 600 y 3.000 Da (Taiz & Zeiger, 2006).

En las plantas cumplen funciones de defensa ante el herbivorismo. general los taninos actúan en forma de toxinas que reducen significativamente el crecimiento y la supervivencia de muchos herbívoros cuando se adicionan a su dieta. Además, tienen potencial de producir rechazo al alimento ("antifeedants" o "feeding repellents") en una gran diversidad de animales. Los mamíferos como la vaca, el ciervo y el simio característicamente evitan a las plantas o partes de las plantas con alto contenido de taninos. Las frutas no maduras, por ejemplo, con frecuencia tienen altos contenidos de taninos, que pueden estar concentrados en las capas celulares más externas de la fruta (Taiz & Zeiger, 2006).

Es de destacar que los humanos usualmente prefieren un cierto nivel de astringencia en las comidas que contienen taninos, como las manzanas, las zarzamoras, y el vino tinto. Recientemente, los taninos del vino tinto han demostrado poseer propiedades de bloquear la formación de endotelina-1, una molécula señal que produce la constricción de los vasos sanguíneos (Corder et al. 2001), lo cual disminuiría el riesgo de enfermedades cardíacas en aquellas personas que consumen vino tinto en forma moderada.

Si bien hay taninos específicos que pueden ser saludables para el hombre, en general son tóxicos, debido a las mismas propiedades que los hace buenos para la curtiembre: su capacidad de unir entre sí proteínas de forma no específica. Durante mucho tiempo se pensó que los taninos

formaban complejos con las proteínas del intestino de los herbívoros formando puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y los sitios electronegativos de la proteína, pero evidencia más reciente también avala una unión covalente entre los taninos (y otros compuestos fenólicos provenientes de las plantas) y las proteínas de los herbívoros que los consumen. El follaje de muchas plantas contiene enzimas que oxidan los fenoles a sus formas quinona en los intestinos de los herbívoros. Las quinonas son altamente reactivas, electrofílicas, y reaccionan con los grupos de proteínas nucleofílicos -NH, y -SH. Cualquiera sea el mecanismo por el que ocurra la unión proteína-tanino, este proceso tiene un impacto negativo en la nutrición de los herbívoros. Los taninos pueden inactivar las enzimas digestivas de los herbívoros y crear complejos agregados de taninos y proteínas de plantas que son difíciles de digerir (Felton et al. 1989).

Los herbívoros que habitualmente se alimentan de material rico en taninos parecen poseer algunas interesantes adaptaciones para eliminar los taninos de sus sistemas digestivos. Por ejemplo, algunos mamíferos como los ratones y los conejos, producen proteínas en la saliva que tienen un alto contenido de prolina (25-45%), que tiene una gran afinidad por los taninos. La secreción de estas proteínas es inducida por la ingestión de comida con un alto contenido de taninos, y su efecto es la disminución en una medida importante de los efectos adversos de la ingestión de taninos (Butler, 1989). La alta cantidad de residuos de prolina le otorga a estas proteínas una conformación muy flexible y abierta, y un alto grado de hidrofobia que facilita su unión con los taninos.

En animales de experimentación los taninos han demostrado ser los responsables de la disminución en la ingesta de alimentos, la tasa de crecimiento, la eficiencia alimenticia, la energía metabolizable neta y la digestibilidad proteica, por lo que las dietas ricas en taninos siguen siendo consideradas de bajo valor nutricional. Sin embargo, hallazgos recientes parecen indicar que el mayor efecto de los taninos no es debido a su capacidad de inhibir el consumo o la digestión de alimentos sino más bien a la disminución de la eficiencia en convertir los nutrientes absorbidos en nuevos compuestos corporales. La incidencia de ciertos tipos de cáncer, como el cáncer esofágico, parecería estar relacionada con el consumo de alimentos ricos en taninos como la nuez de Betel o nuez de Areca (Areca catechu) y té de hierbas, sugiriendo que los taninos podrían ser carcinogénicos. Otros informes sugieren que la actividad carcinogénica de los taninos podría estar relacionada con los compuestos a ellos asociados más que a los taninos en sí.

Desde otro punto de vista, hay algunos informes que indican que no existe ninguna relación entre el consumo de taninos y el cáncer, a tal punto que se ha sugerido que los polifenoles y algunos componentes de los taninos son en realidad anticarcinogénicos, reduciendo la actividad de los agentes mutagénicos, hecho que podría estar relacionado a que muchos agentes mutagénicos son generadores de radicales libres y los polifenoles y taninos son compuestos antioxidantes que protegerían a las células del daño oxidativo. Las actividades antimicrobianas de los taninos están bien documentadas, ya que el crecimiento de muchos hongos, incluidas las levaduras, bacterias y hasta virus son inhibidas por la presencia de taninos. Estas propiedades serían debidas a la hidrólisis de

la unión éster entre el ácido gálico y los polioles durante la maduración de muchos frutos comestibles. donde los taninos constituirían un mecanismo de defensa de la planta frente a infecciones microbianas. Esta propiedad antimicrobiana de los taninos puede ser aprovechada en el procesamiento de alimentos para incrementar la vida útil ("shelf-life") de los alimentos, en especial los filetes de pescado.

También se ha informado que los taninos poseen otros efectos fisiológicos, tales como acelerar la coagulación de la sangre, reducir la presión sanguínea, disminuir el nivel de lípidos en suero y modular inmuno respuestas, entre otras (Chung et al., 1998).

Los Flavonoides

Flavonoide (del latín flavus, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases principales: las

chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados (Winkel-Shirley, 2001a) más una séptima clase, las auronas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas. También el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides o en el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides.

Se denominaron al principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2, porque algunos tenían propiedades similares a la vitamina C. El hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Singleton, 1981).

Los flavonoides se biosintetizan en todas las plantas y también en algunas algas que, aunque comparten la vía biosintética central, poseen una gran variabilidad en la composición química de sus productos finales y en los mecanismos de regulación de su biosíntesis, por lo que la composición y concentración es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente. Son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas.

Cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas; algunas funciones son comunes a todas ellas y otras son específicas de algunos taxones. Como ejemplo de funciones universales, son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante el herbivorismo, Una actividad importante cumplida en muchas plantas es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la

planta o a sus flores. Estos compuestos han adquirido importancia a raíz de su acción biológica en el hombre, que los consume con los vegetales.

Poseen propiedades muy apreciadas en medicina, antimicrobianos, anticancerígenos y en la disminución del riesgo de enfermedades cardíacas, entre otros efectos. También son conocidos por los cultivadores de plantas ornamentales, que manipulan el ambiente de las plantas para aumentar la concentración de éstos, que dan el color a las hojas, a las flores ya algunas cortezas.

Debido a las importantes funciones metabólicas que los flavonoides tienen en las plantas y los animales, sus vías biosintéticas y mecanismos de regulación están siendo cuidadosamente estudiados. La ciencia aplicada aprovechó este conocimiento en muchos trabajos de ingeniería metabólica, en los que se buscó aumentar la Concentración de flavonoides beneficiosos en las plantas de consumo humano o de uso farmacéutico, modificar su concentración en flores ornamentales para cambiarles el color, e inhibir su producción en el polen para lograr la esterilidad de los híbridos de interés comercial. En lo que respecta a su producción, se ha desarrollado con éxito un cultivo de bacterias que sintetiza flavonoides de interés humano.

Aún queda mucho por investigar de este interesante grupo de compuestos, de su valor medicinal y de su impacto en la nutrición y la salud humana y de los animales. También es necesario continuar la investigación de su estructura, su metabolismo y su biodisponibilidad, por lo que se esperan importantes progresos en este campo (Winkel-Shirley, 2001b).

HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

El género *Terminalia australis* Cambess. (Combretaceae) está integrado por unas 150 especies, distribuidas en los cinco continentes. Varias especies de *Terminalia* han sido objeto de estudios fitoquímicos, entre ellos *Terminalia australis* Cambess (n.v.: "armarillo", "palo amarillo", "amarillo del río), una especie sudamericana.

No se registran estudios sobre esta especie, excepto los de Escalante & Carpano (1977), de Carpano et al. (2003) y de Carpano(2007), en los que se demostró una importante actividad antibacteriana y antifúngica de extractos acuosos y metanólicos de la corteza de esta especie. Sin embargo, no se intentó el aislamiento de los principios activos responsables de la actividad antimicrobiana; lo que constituye el propósito del presente trabajo de tesis de maestría es aislar e identificar algunos principios activos de esta especie mediante la aplicación de un seguimiento bio guiado y determinar actividad antimicrobiana antifúngica de estos.

OBJETIVOS

Objetivos

- Seleccionar y acondicionar parte aérea sin frutos de *Terminalia australis* Cambess.
- Preparar infusión acuosa y extracto metanólico previa separación de compuestos lipídicos con éter, de petróleo.
- Caracterizar mediante reacciones químicas generales los principios activos presentes en extractos acuosos y metanólicos obtenidos de la parte aérea (hojas y tallos leñosos) de *Terminalia australis* Cambess.
- Efectuar mediante análisis cromatográfico en capa fina (CCF), utilizando diversos soportes y solventes de corrida, la diversidad de compuestos presentes en los extractos antes mencionados, orientando el posterior método de aislamiento de los mismos.
- Comprobar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos frente sobre cepas patógenas.
- Realizar el aislamiento y purificación por distintas metodologías cromatográficas (cromatografía en columna presión normal, cromatografía líquida de baja presión, cromatografía preparativa en capa delgada, etc), de los principios activos responsables de la acción antimicrobiana y posterior purificación de acuerdo a su estado de agregación.
- Caracterizar e identificar los compuestos puros (pf, CCF, HPLC, IR, Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H y ¹³C).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material botánico

La recolección de la especie en estudio, *Terminalia australis* Cambess. (Combretaceae), se realizó en su hábitat natural, en Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, Argentina, durante los meses de marzo y abril de 2001. Punta Lara es una reserva natural en el partido de Ensenada, sobre la margen del Río de la Plata (34° 51' 53" S, 57° 52' 23" O), a 12 km al norte de la ciudad de La Plata. En esa zona predominan las comunidades de pastizal, pajonal y selva marginal en galería (Cabrera & Dawson, 1944).

La planta fue identificada y clasificada por la Dra. Etilé Spegazzini, reservándose una muestra que se encuentra depositada en el Herbario de la Cátedra de Farmacobotánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina (LPE- N° 1022).

Terminalia australis es un árbol de 7 u 8 metros de altura, de copa amplia, generalmente ramificada en la base, de ramas muy flexibles y con el leño amarillo. Su follaje es caduco y las hojas son simples, alternas, enteras, angostamente elípticas o linear-elípticas; miden entre 2 y 7 cm de largo, raramente mayores de 1 cm de diámetro, de color verde claro, glabras en la cara superior, a veces pubescentes en la cara inferior especialmente cuando son jóvenes (Figs. 1-3). Las flores son unisexuadas, apétalas verduscas pequeñas de 5 mm de largo, dispuestas en inflorescencias axilares; el cáliz es acampanado, pubescente, las flores masculinas tienen 10 estambres 2-3 veces más largos que el cáliz, las femeninas tienen un pistilo de estilo alargado (Fig. 4), Florece en primavera. Los frutos son aovados o anchamente elípticos de 1,5 a 2cm de largo

y 1-2 cm de ancho con una costilla media visible en toda su extensión (Muñoz et al., 1993). Crece desde el sur de Brasil, Uruguay y noreste de Argentina hasta Buenos Aires. Se reproduce por semillas (Toursarkissian, 1980).



Figura 1. Terminalia australis Cambess. Planta entera.



Figura 2. *Terminalia australis* Cambess. Tronco con follaje. Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, Argentina



Figura 3. *Terminalia australis* Cambess. Árbol con tronco tendido. Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, Argentina



Figura 4. *Terminalia australis* Cambess. Hojas y flores dispuestas en inflorescencias capituliformes. Punta Lara, Provincia de Buenos Aires, Argentina

Reactivos e instrumental

Los puntos de fusión de los productos aislados se determinaron en un equipo Electrothermai y la temperatura no fue corregida.

Los solventes utilizados en todos los procesos fueron de grado analítico, y en el caso en que fue necesario, previamente se secaron, destilaron y almacenaron sobre tamiz molecular 4 A marca Merck y su pureza se verificó mediante cromatografía en capa delgada cromatografía gaseosa. La eliminación de solvente se realizó en rotavapor a temperatura ambiente y a una presión aproximada de 30 torr. El secado en tambor fue realizado aproximadamente a 20 torr y a temperatura ambiente en la mayoría de los casos.

Las columnas cromatográficas se prepararon con Sephadex LH-20 Pharmacia Fine Chemicals y Celulosa Cellulosepulver MN 300 HR, Macherey, Ángel & Co respectivamente.

Las CCF se hicieron en cromatofolios de sílica gel 60 F254 marca Merck (ref. 1.05554) y en cromatofolios de celulosa con fluorescencia Merck. Como revelador destructivo para las CCF se utilizó una solución ácida al 5.5 % p/v de molibdato de amonio (VI) tetrahidratado.

Adicionalmente, se utilizó radiación UV de 254 nm. y 366 nm. Como revelador no destructivo.

Se usó Cl_3Fe como revelador en las CCF y vapores de NH_3 para la detección de distintos tipos de compuestos

El control de pureza de los productos aislados se realizó por CCF y HPLC/MS en un equipo Agilent 1100 Series Liquid Chromatograph/Mass Selective Detector (LC/MSD VL), Serie Nro, US50400803 al que se tiene acceso a través de un

consorcio del cual la Cátedra de Química Medicinal forma parte. Se dispone de una columna de fase reversa C18 de 5µm del tamaño de la partícula (250mm x 4.6mm, Sigma-Aldrich y Phenomenex Luna de 150mm x 5mm).

Los ensayos que implicaron la realización de cromatografías líquidas de alta resolución (CLAR) se llevaron a cabo en la Cátedra de Control de Calidad de Medicamentos de la misma Unidad Académica.

Los espectros infrarrojos se determinaron en un equipo FT/IR Bruker IFS 66, usando pastillas de KBr en todos los casos.

Los espectros ¹H NMR (200 MHz) y ¹³C NMR (50 MHz) fueron realizados con un espectrómetro Bruker DRX-600.

Los compuestos fueron identificados por EM, análisis elemental, NMR cotejándolos con muestras Standard y/o datos de literatura.

Material vegetal

El material vegetal (hojas y tallos leñosos, parte aérea sin frutos) se secó al aire y fue triturado en máquina moledora a cuchillas marca Raluc modelo ISVI. Para homogeneizar el tamaño de partícula de la muestra, se utilizó un tamiz de 4 mm de diámetro. Este material fue secado a peso constante en tambor de secado con vacío a temperatura ambiente. El peso del material obtenido fue de 1416,90 g, el cual fue sometido a extracciones con solventes de polaridad creciente, hasta su agotamiento, en cada etapa.

Breve introducción de las metodologías utilizadas

Cromatografía en Capa Fina

Los primeros antecedentes históricos de este método de separación fueron los intentos de Izmailov y Shreiber, en el Instituto de Farmacia Experimental de la Universidad de Kharkov, Ucrania, quienes buscaban desarrollar métodos de análisis rápidos para el estudio de extractos vegetales. Para ello cubrieron un portaobjetos con una fina capa de óxido de aluminio, calcio o magnesio y luego de secarla depositaron una gota de la mezcla en cuestión, sobre la que una vez seca dejaron caer otra gota de un solvente. El solvente irradió desde el centro de la mancha y fue formando círculos concéntricos que correspondían a otras tantas sustancias. Los autores llamaron a este tipo de separación "cromatografía de punto" o "de mancha" ("spot chromatography") y "ultracromatogramas" a los resultados obtenidos (Shreiber, 1979).

Algunos años después Kirchner et al. (1951) en el Departamento de Agricultura de los EE.UU. utiliza pequeñas placas de vidrio recubiertas a las que denomina con sílica como soporte cromatográfico, "cromatotiras" ("chromatostrips") para la separación de compuestos terpenoides presentes en jugos de frutos, especialmente de uvas, pero el verdadero desarrollo de la Cromatografía en Capa Fina, así como la terminología finalmente aceptada para denominar a este procedimiento de separación es mérito de Egon Stahl, quien perfeccionó el método durante su estadía en las Universidades de Mainz y Saarbrücken, en Alemania (Stahl, 1969).

La Cromatografía en Capa Fina, usualmente denominada CCF por su nombre en inglés (TLC "Thin Layer Chromatography") es un procedimiento simple, rápido y barato que permite conocer cuántos componentes contiene una muestra. La CCE es también utilizada para comparar la identidad de un compuesto con un estándar o sustancia patrón (preferiblemente sembrando ambos en la misma placa cromatográfica).

La placa cromatográfica es una placa de vidrio, metal o plástico, que es cubierta con una delgada capa de un adsorbente (usualmente sílicagel o alúmina). La muestra ser analizada es depositada("sembrada") en forma de pequeña mancha en el extremo inferior de la placa y luego ésta es colocada en una cámara de desarrollo que contiene un solvente (usualmente una mezcla de dos o más solventes) en la que sólo la parte inferior de la placa queda sumergida en el mismo. El solvente de desarrollo ("fase móvil") asciende por capilaridad lentamente hacia la parte superior de la placa. En el momento en que el solvente supera la zona de siembra de la muestra se establece un equilibrio para cada componente de la mezcla entre las moléculas que continúan adsorbidas en la placa y las que están en solución. Como consecuencia de que los componentes de la mezcla usualmente difieren tanto en su solubilidad en el solvente de desarrollo Como en la fuerza con la que son adsorbidos sobre el adsorbente ("fase estacionaria"), algunos componentes son transportados hacia la parte superior de la placa más rápido que otros.

Cuando el solvente ha alcanzado casi el extremo superior de la placa se retira

la placa de la cámara, se indica de alguna manera la distancia recorrida por el solvente, se seca por exposición al aire o por el pasaje de una corriente de aire fría o caliente y se visualizan los componentes de la placa. Dado que usualmente los compuestos no poseen color es necesario exponerlos a la presencia de la luz UV o de algún compuesto que reaccione con ellos y permita su visualización.

Las identificaciones de los componentes de la muestra requieren de la determinación de la relación entre la sustancia recorrida por la sustancia desconocida y la recorrida por el solvente. Esta distancia se conoce como Rf o factor de retención (del inglés "Retention factor"). Es decir:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia problema desde el punto de siembra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente desde el punto de siembra}}$$

Lo más recomendable es correr un estándar o patrón de composición conocida conjuntamente con la muestra. En caso en que el valor del Rf de la sustancia problema no se corresponda con la sustancia patrón (idénticos valores de Rf) suele resultar de utilizad comparar los valores entre la distancia recorrida por la sustancia patrón y la sustancia problema. Este valor es denominado Rx, el que -a diferencia del Rf- puede alcanzar valores superiores a la unidad.

$$Rx = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia problema desde el punto de siembra}}{\text{Distancia recorrida por la sustancia patrón (estándar) desde el punto de siembra}}$$

Cristalización

La técnica de cristalización se utiliza para purificar sólidos, compuestos que puedan formar cristales mediante variaciones de tipo de solvente/s y temperatura. Las impurezas presentes en un sólido, puede ser solubles o insolubles, las insolubles se eliminan por filtrado en caliente o por centrifugación en caliente. Las impurezas solubles coloreadas se transforman en insolubles por el agregado de carbón activado, separándose luego por filtración. Las solubles, no coloreadas, quedan solubilizadas en las aguas madres. Este procedimiento de eliminación de impurezas suele ser previo al proceso de cristalización propiamente dicho.

La operación de cristalización es el proceso por el cual se prepara una solución saturada de un sólido, a la temperatura de ebullición del solvente, la que por enfriamiento de la misma, se genera una solución sobresaturada por descenso de temperatura del sistema. Esto permite la generación de cristales que se van separando de la fase líquida.

Todo compuesto químico impuro, solubilizado en algún solvente puede ser separado por formación de cristales, bajo ciertas condiciones de concentración y temperatura, que el operador debe establecer, dependiendo de las características y propiedades del compuesto, principalmente la solubilidad, concentración de saturación, las impurezas presentes, etc.

Para poder ser cristalizado, un soluto cualquiera, debe eliminar su calor latente o entalpía de fusión, por lo que el estado cristalino, además de ser el más puro, es el de menor nivel energético de los tres estados físicos de la materia, en el que las moléculas permanecen inmóviles unas respecto a otras, formando

estructuras en el espacio, con la misma geometría, sin importar la dimensión del cristal ³.

Punto de Fusión

El punto de fusión es una técnica que tiene por objeto determinar la pureza de una muestra sólida.

Se determina en un equipo denominado tubo de Thiele o en un bloque de fusión. La sustancia se introduce en un tubo capilar cerrado en un extremo, y se coloca en el equipo de medida. Se calienta lentamente y se observa la temperatura en que cambia de estado, sólido a la primera gota de líquido (comienzo punto de fusión). El rango de temperatura a la que ocurre la transición es la temperatura de fusión.

El tubo capilar se deja caer a través de un tubo de vidrio de unos 60 cm de longitud. El golpe que recibe el capilar al chocar con la mesada, facilita el llenado del mismo y el desplazamiento del aire que es mal conductor de la temperatura.

Cuando ocurre el cambio de estado, lo esperado es observar en el interior del tubo capilar una pérdida de las características cristalinas del sólido, acompañado de la formación de gotas de líquido. En ese momento se anota la temperatura que marca el termómetro, siendo esta el inicio de el punto de fusión, cuando todo el sólido se convirtió en líquido es el final del punto de fusión. El rango del punto de fusión está dado por la temperatura de inicio y la final.

El calentamiento del bloque se realiza, puede realizarse mediante resistencias eléctricas o un mechero, y se controla el capilar en su interior por

³ <http://www.textoscientificos.com/quimica/cristales>

interior por medio de una lente externa, bien iluminada, se observa el cambio de estado de la sustancia en el interior del bloque.

Si la sustancia está pura: el punto de fusión se observa en un rango o intervalo de temperatura (aproximadamente 2°C). Si el rango es mayor, puede indicar la presencia de impurezas, por lo que el compuesto debe recristalizarse.⁴

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. También se la denomina a veces Cromatografía líquida de alta presión (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). En el HPLC isocrático el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de la fase móvil a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificatoria, característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

⁴ http://sensei.ieec.uned.es/palo/dermos/Q3_0001/s427.htm

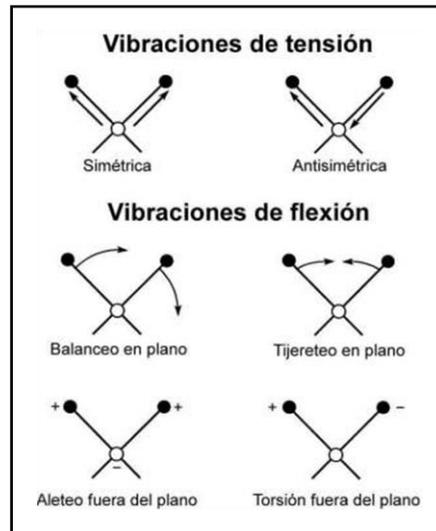
La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro la columna y reduce así su difusión dentro de la columna mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones reguladores del pH, sales, o Compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente. Un gradiente normal en una cromatografía de fase reversa puede empezar a un 5% de acetonitrilo y progresar de forma lineal hasta un 50% en 25 min. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. Así, utilizando un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo (Kazakevich & LoBrutto, 2007).

Espectroscopía Infrarroja (IR)

Esta espectroscopia se fundamenta en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja.

Pueden distinguirse dos categorías básicas de vibraciones: de tensión y de flexión. Las vibraciones de tensión son cambios en la distancia interatómica a lo largo del eje del enlace entre dos átomos. Las vibraciones de flexión están originadas por cambios en el ángulo que forman dos enlaces. En el siguiente esquema se representan los diferentes tipos de vibraciones moleculares.



Esquema 1. Diferentes tipos de vibraciones.

En principio, cada molécula presenta un espectro IR característico (huella dactilar), debido a que todas las moléculas (excepto las especies diatómicas homonucleares como O_2 y Br_2) tienen algunas vibraciones que, al activarse, provocan la absorción de una determinada longitud de onda en la zona del espectro electromagnético correspondiente al IR.

De esta forma, analizando cuáles son las longitudes de onda que absorbe una sustancia en la zona del infrarrojo, podemos obtener información acerca de las moléculas que componen dicha sustancia.

La espectroscopia infrarroja tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo, es decir la detección de las moléculas presentes en el material.

En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda del infrarrojo medio (entre 4000 y 1300 cm^{-1}) se suelen observar una serie de bandas de absorción provocadas por las vibraciones únicamente entre dos átomos de la molécula. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno o de grupos con dobles o triples enlaces aislados. En la zona del espectro electromagnético IR con longitudes de onda comprendidas entre 1300 y 400 cm^{-1} (infrarrojo lejano), la asignación de las bandas de absorción a vibraciones moleculares es más difícil de realizar, debido a que cada una de ellas está generada por absorciones individuales sumadas (multiplicidad de las bandas). Es la denominada zona de la huella dactilar (flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc.). En esta zona de longitudes de onda, pequeñas diferencias en la estructura y constitución de las moléculas dan lugar a variaciones importantes en los máximos de absorción.

Las muestras gaseosas requieren poca preparación más allá de su purificación, pero se usa una celda de muestra de larga longitud de celda (usualmente 5-10 cm) pues los gases muestran absorbancias relativamente débiles.

Las muestras líquidas se pueden disponer entre dos placas de una sal de alta pureza (comúnmente cloruro de sodio, aunque también se utiliza bromuro de potasio o fluoruro de calcio). Las placas son transparentes al IR y no introducirán líneas en el espectro.

Algunas placas de sal son altamente solubles en agua, por lo que la muestra, agentes de lavado y similares deben estar completamente anhidros.

Las muestras sólidas se pueden preparar principalmente de dos maneras. La primera es moler la muestra con un agente aglomerante para la suspensión (usualmente nujol, una parafina líquida aceitosa de alto peso molecular por lo que es químicamente inerte y tiene un espectro IR relativamente simple) en un mortero de mármol o ágata. Una fina película del agente aglomerante se aplica en las placas de sal y se realiza la medición. El segundo método es triturar una cantidad de la mezcla con una sal especialmente purificada (usualmente bromuro de potasio) finamente (para remover efectos dispersores de los cristales grandes). Esta mezcla en polvo se comprime en una prensa de troquel mecánica para formar un pellet translúcido a través del cual puede pasar el rayo del espectrómetro.

Es importante destacar que el espectro obtenido a partir de preparaciones distintas de la muestra se verá ligeramente distintas entre sí debido a los diferentes estados físicos en los que se encuentra la muestra (Nakamoto, 1997).

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es utilizada principalmente para la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplea con fines cuantitativos.

La técnica está basada en el hecho que algunos núcleos atómicos sometidos a un campo magnético externo absorben radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio o radiofrecuencias.

Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos, se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran estos (Keeler, 2005)

para que se pueda emplear la técnica los núcleos deben tener un momento magnético distinto de cero, condición que no cumplen los núcleos con número másico y número atómico par. Se prefieren además los núcleos de número cuántico de espín nuclear igual a 1/2, para que no den señales muy anchas. También es mejor que el isótopo sea abundante en la naturaleza, pues si no dan señales débiles. Por eso, uno de los más útiles en la elucidación de estructuras es el H, dando lugar a la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón. También es importante en química orgánica el ^{13}C , aun cuando se trate de un isótopo poco abundante (Balci, 2005).

Espectrometría de Masas

La Espectrometría de Masas es una poderosa técnica microanalítica usada para identificar compuestos por su peso molecular y fraccionamiento, puede cuantificar compuestos conocidos y elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas. La detección de compuestos puede ser llevada a cabo con cantidades realmente pequeñas (algunos pmoles) de muestra y obtener información característica como el peso y algunas veces la estructura del analito.

En todos los casos, alguna forma de energía es transferida a las moléculas a analizar para afectar la ionización. En principio, el espectro de masas de cada compuesto es único y puede ser usado Como una "huella química" para caracterizar la sustancia en estudio.

La espectrometría de masas ofrece numerosas ventajas frente a las técnicas espectrofotométricas: a) los límites de detección son hasta tres órdenes de magnitud más sensibles frente a los métodos ópticos, b) los espectros son notablemente más sencillos, generalmente únicos y con frecuencia fácilmente interpretables y c) tiene la capacidad de medir relaciones isotópicas atómicas.

La espectrometría de masas ha experimentado un gran desarrollo tecnológico en los últimos años, como ya se ha mencionado, mediante el análisis por espectrometría de masas es posible obtener información de la masa molecular del compuesto analizado, así como obtener información estructural del mismo. Para ello es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en la fuente de ionización y actualmente existen diferentes técnicas que permiten llevarlo a cabo, como el Impacto Electrónico (EI), el Bombardeo Con Átomos Rápidos (FAB), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI) o Electrospray (ESI). Los iones generados son acelerados hacia el analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

En el sistema de entrada de muestras, en un equipo gaseoso, un micromol o menos de muestra se convierte al estado gaseoso por calentamiento a unos

400°C y se introduce lentamente en la cámara de ionización. La finalidad del sistema de entrada es permitir la introducción de una muestra representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío. En los espectrómetros de masas más modernos encontramos diferentes tipos de sistemas de entrada:

-Sistemas indirectos de entrada: es el sistema más clásico y el más simple, en el cual la muestra se volatiliza externamente y se introduce en la región de ionización que está a baja presión. El sistema de entrada es normalmente de vidrio para evitar posibles pérdidas por adsorción.

- Entrada por sonda indirecta: los líquidos y los sólidos no volátiles se pueden introducir en la región de ionización mediante un soporte para muestra o sonda, el cual se inserta a través de un cierre de vacío. El sistema de cierre se utiliza para controlar la cantidad de aire que entra después de la inserción de la sonda en la región de ionización. Las sondas también se usan cuando la cantidad de muestra es limitada, ya que se pierde mucha menos cantidad.

-Sistemas de entrada cromatográficos y de electroforesis capilar: es un tipo de sistema de entrada especial; Su uso está indicado cuando al espectrómetro de masa va acoplado un sistema de cromatografía de gases o de líquidos de alta eficacia o a columnas de electroforesis capilar que permiten la separación y determinación de los componentes de mezclas complejas (Hoffnman & Stroobant, 2002).

Extractos

Extracto acuoso

Dado que en medicina popular se utilizan las infusiones y/o decocciones, con el objeto de verificar su actividad antimicrobiana indicada para ésta, se procedió a realizar una infusión de polvo seco de *Terminalia australis* según Farmacopea Argentina VIª Ed. (1978), con la que se hicieron ensayos bacteriológicos frente a cepas de referencia de bacterias y hongos responsables de infecciones corrientes en humanos (Tabla 2).

Microorganismos ensayados		Enfermedad que produce
Bacterias	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25212	Infecciones menores de la piel y neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico (SST) y sepsis.
Hongos	<i>Candida albicans</i> (Urocultivo)	Micosis cutánea, gastrointestinal, sistema respiratorio y genitales.

Tabla 2. Microorganismos ensayados frente al extracto acuoso de *T. australis*.

Extracción con Éter de petróleo

De acuerdo a los estudios previos existentes (cfr. Tabla 1) sobre especies de *Terminalia* en los que se detectó presencia de compuestos con actividad antibacteriana los mismos fueron realizados sobre extractos acuosos o metanólicos, los que son utilizados en el presente trabajo. Dado que el mismo material vegetal de estudio fue utilizado por otra tesista para la búsqueda de compuestos de solubles en solventes no polares, el material en estudio fue agotado con éter de petróleo, como se describe a continuación, previamente

a la obtención del extracto metanólico.

A 1416,90 g de material vegetal se le agregaron 4,5 L de éter de petróleo y se mantuvo en agitación mecánica periódica durante 7 días temperatura ambiente. Este proceso se repitió 4 veces filtrándose antes del agregado de solvente nuevo. A efectos de asegurar que la extracción había sido completa, después de cada período de extracción, se tomó una alícuota de 10 mL del extracto filtrado, se concentró en rotavapor a presión reducida y se llevó a peso constante en tambor de vacío; si el peso era superior a 1 mg, se continuaba la extracción con solvente nuevo. Concluida la extracción con este solvente se realizó la extracción sobre el material agotado con metanol⁵.

Extracción con Metanol

El marco de la extracción con éter de petróleo, una vez eliminado el éter de petróleo por vacío, fue sometido a extracciones con metanol utilizando el procedimiento antes descrito. Se aplicó el mismo criterio de agotamiento de alícuotas de 10 ml indicado anteriormente.

La reunión de los extractivos metanólicos se concentró en rotavapor obteniéndose un producto viscoso de color amarillo ocre (SA) de 70,90 g de peso, aproximadamente el 5% respecto del material de partida.

⁵ El extractivo éter de petróleo fue utilizado para el aislamiento, purificación e identificación de compuestos de la Lic. en Química Graciela Sabattini, estudiante del Magíster en Plantas Medicinales.

Experimental

Cristalización

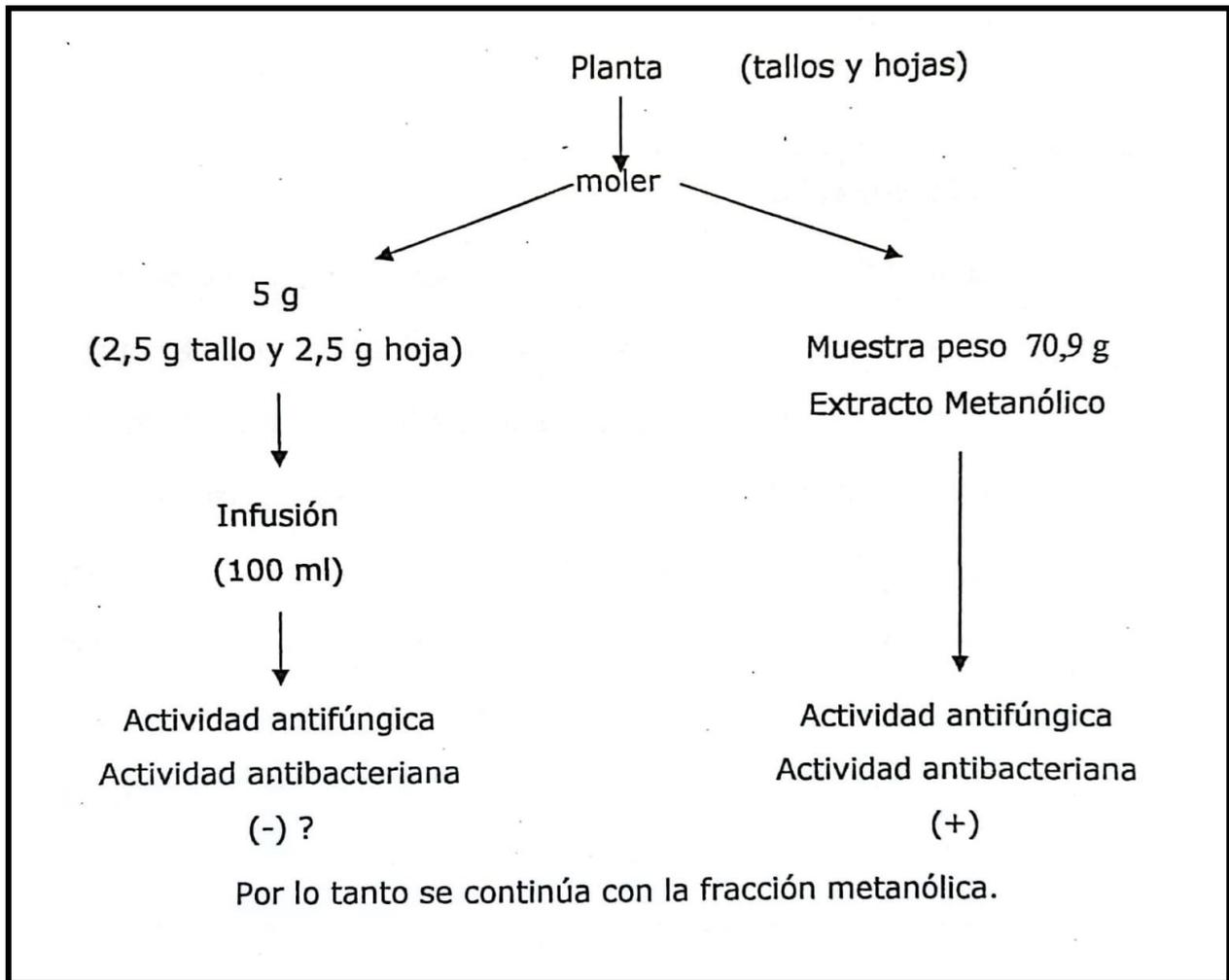
La muestra pesó 70,90, fue sometida a la técnica de purificación por cristalización, para ello se realizaron ensayos con distintos solventes y mezclas de solvente, siendo la más adecuada, en cuanto al rendimiento de la misma y su punto de fusión la mezcla agua: metanol.

El producto cristalizado p:70,90 se solubiliza en caliente en 14 ml de agua, se agrega gota a gota metanol hasta ligera opalescencia, deja enfriar a temperatura ambiente, lleva a heladera y separa por centrifugación invertida, seca en tambor de vacío a temperatura ambiente y a 40 °C hasta peso constante, peso: 8,2 g., la cual fue controlada por cromatografía en capa fina (varios productos).

Actividad antimicrobiana

Para probar la actividad antibacteriana de *Terminalia australis* se preparó una infusión acuosa a partir de fracciones de 5 g de la parte aérea de la planta y uso el extracto metanólico (peso de 8.2 g). La infusión se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en Farmacopea Argentina VIª Edición, "Infusiones" (1978).

Ver Esquemas 2 y 3.



Esquema 2. Obtención de la infusión y el extracto metanólico

Reacciones generales de caracterización

Como ya fue mencionado y con el propósito de orientar la búsqueda del tipo de sustancias presentes en *Terminalia australis* Cambess., se llevaron a cabo las reacciones generales de caracterización que se describen en la Tabla 3 con infusión y extracto metanólico peso 70.9g

	Reactivo	Infusión	E. Metanólico
Alcaloides	Dragendorff-Meyer	(-)	(-)
Saponósidos	Agua destilada y agitación	(-)	(-)
Taninos condensados	Solución de gelatina al 1%	(-)	(+)
Flavonoides	Shinoda	(-)	(+)
Polifenoles, Taninos hidrolizables y/o Flavonoides	Cl ₃ Fe	(+) Verde	(+) Verde azulado
Monosacáridos reductores	Fehling directa	(-)	(+)
Heterósidos y/o Polisacáridos	Fehling indirecta	(-)	(+)
Antraquinonas	Börntraeger	(-)	(-)

Tabla 3. Reacciones generales de caracterización de principios activos en los extractos acuoso y metanólico de *Terminalia australis* Cambess.

Como puede verse, las reacciones de caracterización de alcaloides, saponósidos y antraquinonas dieron negativas frente a ambas muestras. Por su parte, las reacciones de polifenoles, taninos hidrolizables y/o flavonoides dieron positivo en ambos casos. Finalmente, las reacciones de flavonoides, monosacáridos de taninos condensados, presencia reductores, heterósidos y/o polisacáridos dieron resultados negativos frente a la infusión, pero positivos frente al extracto metanólico, razón por la cual se decidió continuar con la realización de ensayos bioguiados solamente con el extracto metanólico, de modo de tratar de lograr la identificación de los compuestos responsables de la acción antibacteriana descrita.

Caracterización cromatográfica

A efectos de determinar los compuestos presentes y conocer cual podría ser el mejor sistema de separación de dichos compuestos, se realizaron utilizando el extractivo metanólico peso 8,2g distintos ensayos por cromatografía en Capa Fina (CCF) con diferentes fases estacionarias y fases móviles, se presenta los resultados más significativos a continuación.



10 λ 15 λ

Fase estacionaria: silicagel

Fase móvil: metanol 5: agua 1

Revelador: Cl_3Fe

No se observan desplazamientos en el UV.



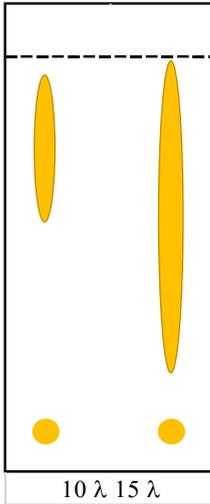
10 λ 15 λ

Fase estacionaria: silicagel

Fase móvil: acetona

Revelador: sulfomolibdica

La siembra migra con el frente del solvente.

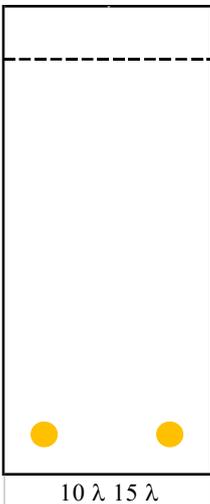


Fase estacionaria: celulosa

Fase móvil: metanol 5: agua 1

Revelador: vapores de amoniaco

Se observan sendas manchas marrón amarillento.

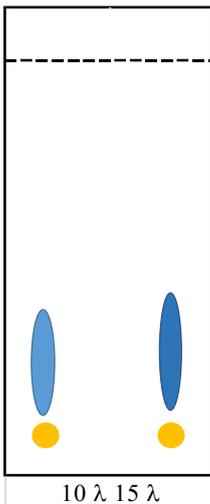


Fase estacionaria: poliamida

Fase móvil: metanol 5: agua 1

Revelador: 2,7 diclorometano-fluoresceína Merck 01%

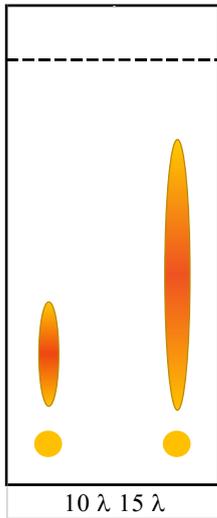
No se detectan separaciones.



Fase estacionaria: silicagel

Fase móvil: acetona

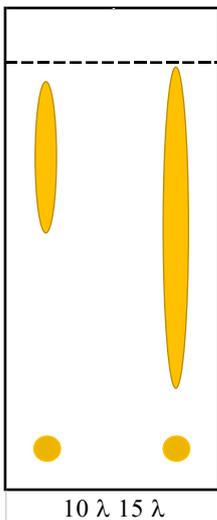
Revelador: sulfomolibdica



Fase estacionaria: celulosa

Fase móvil: metanol 5: agua 1

Revelador: UV 254

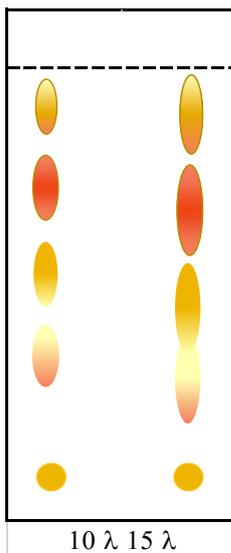


Fase estacionaria: celulosa

Fase móvil: metanol 5: agua 1

Revelador: Cl_3Fe

Se observan sendas manchas marrones amarillento verdosas.



Fase estacionaria: celulosa

Fase móvil: metanol 5: agua 1

Revelador: UV 366

Se observan diferentes manchas, siendo las más significativas las que presentan fluorescencia. Este resultado se relaciona con la acción antibacteriana y antifúngica.

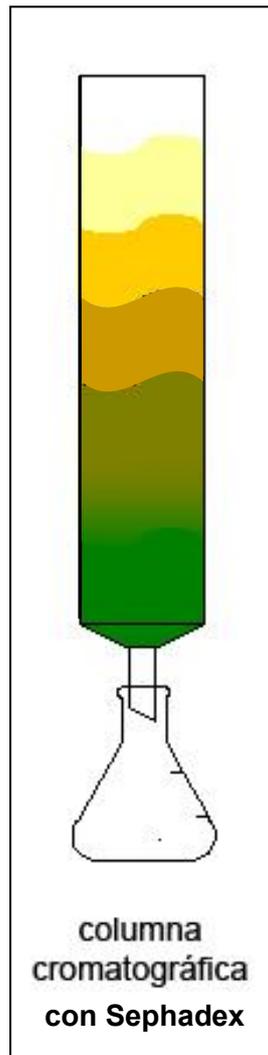
Como puede apreciarse, la silicagel y la poliamida utilizadas como fases estacionarias no consiguieron una buena resolución de la mezcla en estudio, a pesar de haberse ensayado diversos sistemas de solventes. Por el contrario, las placas de celulosa permitieron lograr buenas separaciones. Este resultado confirmó la característica del material respecto a su polaridad, y que es un compuesto muy polar al quedar retenido en esas fases estacionarias, debe incluirse en esta observación, que es muy soluble en agua, no así en la mayoría de los solventes orgánicos.

Estas características orientaron al uso de un sistema que permitiera separar estos productos, recurriendo al uso de Sephadex LH-20, el cual es un soporte para cromatografía líquida diseñado para la separación por exclusión molecular (gel-filtración) de productos naturales de distinto peso molecular.

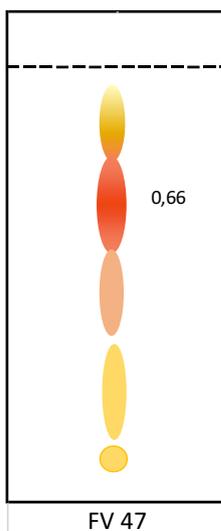
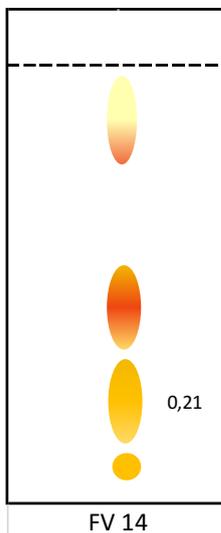
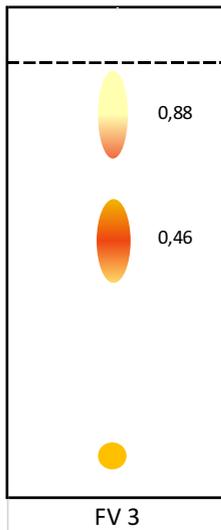
Preparación de la columna - Sephadex

Se utilizó una columna cromatográfica de vidrio (25 x 3 cm), rellena con Sephadex LH-20 Pharmacia Fine Chemicals (37 g). La muestra (siembra líquida, 8,2 g de extracto metanólico disuelto en 10 ml de una solución MeOH-H₂O % 5:1) fue corrida con MeOH-H₂O (80:20) utilizando un gradiente de concentración que finalizó con MeOH-H₂O (50:50). Se obtuvieron de este modo 54 fracciones (FV) que se controlaron por CCF, seleccionándose tres muestras (fracciones FV3, FV14 y FV47) que presentaron un grado creciente de compuestos (FV3 contiene dos componentes de R_f = 0,48 y 0,88, en FV14 aparece un tercer componente de R_f = 0,21 y en FV47 se evidencia un cuarto componente de R_f = 0,66, además de

estar presente en todas el punto de siembra. Controles cromatográficos de estas 3 fracciones demuestran que los productos de estas fracciones tienen similar perfil cromatográfico.



Placas cromatográficas (FV 3,14 Y 47)



Fase estacionaria: celulosa

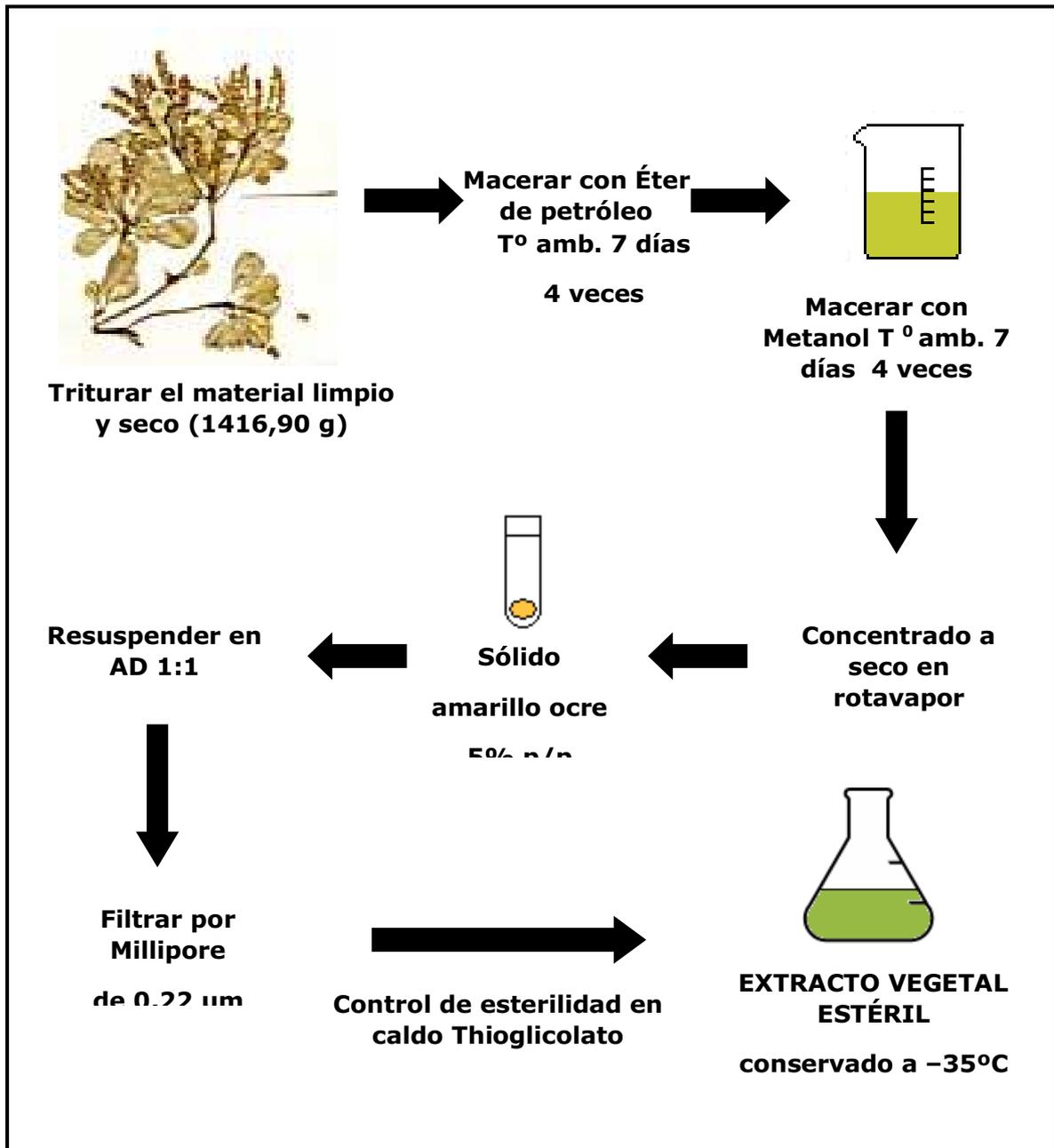
Fase móvil: metanol-agua (5:1)

Muestra: 5 λ

Revelador: UV 366

Estudios antimicrobianos

La preparación general de las muestras (FV) a ser evaluadas biológicamente, cumplió las etapas según esquema adjunto.



Esquema 3. Obtención del extracto metanólico

La actividad antimicrobiana de las FV fueron probadas sobre las siguientes cepas bacterianas:

- Staphylococcus aureus ATCC 25212
- Staphylococcus aureus meticilina resistente (osteomielitis en humano) ATCC 6538
- Bacillus cereus
- Escherichia coli
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- Proteus mirabilis
- Enterococcus faecalis ATCC 29212.

Todas las cepas bacterianas fueron repicadas en tubos conteniendo Caldo Müller-Hinton (CMH), los que fueron incubados a 37°C durante 18 h a partir de los cuales se obtuvo por dilución 10^6 bacterias/ml (dilución de trabajo).

Las FV también fueron ensayadas sobre las cepas fúngicas que a continuación se indican:

- Candida albicans
- Candida spp.
- Candida spp.
- Candida spp.
- Candida albicans
- Candida spp.

Ensayos de actividad antimicrobiana

La técnica de difusión en disco (screening) fue llevada a cabo siguiendo las especificaciones técnicas descritas por De Pooter et al. (1995).

Para el ensayo con bacterias se sembraron 0,2 ml del cultivo microbiano (10 bacterias/ml) en placas de Petri conteniendo Agar Mueller Hinton (AMH), se colocaron los discos de papel de filtro embebidos con 10 ul de la dilución 1:2 de cada FV en las placas con el AMH previamente sembradas con 100 ul del inóculo microbiano en cuestión y se dejaron por 30 min a temperatura ambiente para permitir que la FV difundiera. El sistema se incubó a 370°C durante 24 h y luego se midieron los halos de inhibición tomando 10 mm como límite de positividad. Se incluyeron controles negativos (discos de papel embebidos con agar-agar) y controles positivos (discos con gentamicina, 10 ug/ml).

El ensayo de screening antifúngico se realizó de igual manera, sólo que el medio empleado fue Agar Saboroud glucosado (ASG) y el control de acción antifúngica positiva consistió en discos de papel embebidos con Anfotericina B a una concentración de 1 mg/ml.

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Fungicida Mínima (CFM) de las fracciones vegetales activas

Para la determinación de CIM por la técnica de Microdilución en Caldo para hongos (MDC), también conocida como M27-A, se siguieron las especificaciones descritas por Pemán García et al. (1996) con modificaciones. Para ello se empleó

una policubeta de 96 pocillos a la cual se agregaron 100 ul de cada dilución factor 2 de cada FV en estudio en los pocillos numerados del 1 al 8, En los pocillos 9 y 10 se Incorporaron Nistatina y Anfotericina B en concentración de 0,02 mg/ ml cada una, como controles positivos de actividad antifúngica. El pocillo 11, conteniendo sólo 100 ul de CSG, representó el control de desarrollo fúngico normal, mientras que el 12 representó control de esterilidad de todo el sistema ya que sólo contenía 200 ul de CSG. Posteriormente se sembraron 100 ul del inóculo fúngico problema, con una concentración final de $0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$ UFC/ml en todos los pocillos, a excepción del pocillo del control de esterilidad del medio (Diagrama 1). El sistema fue incubado durante 72 h a 37°C.

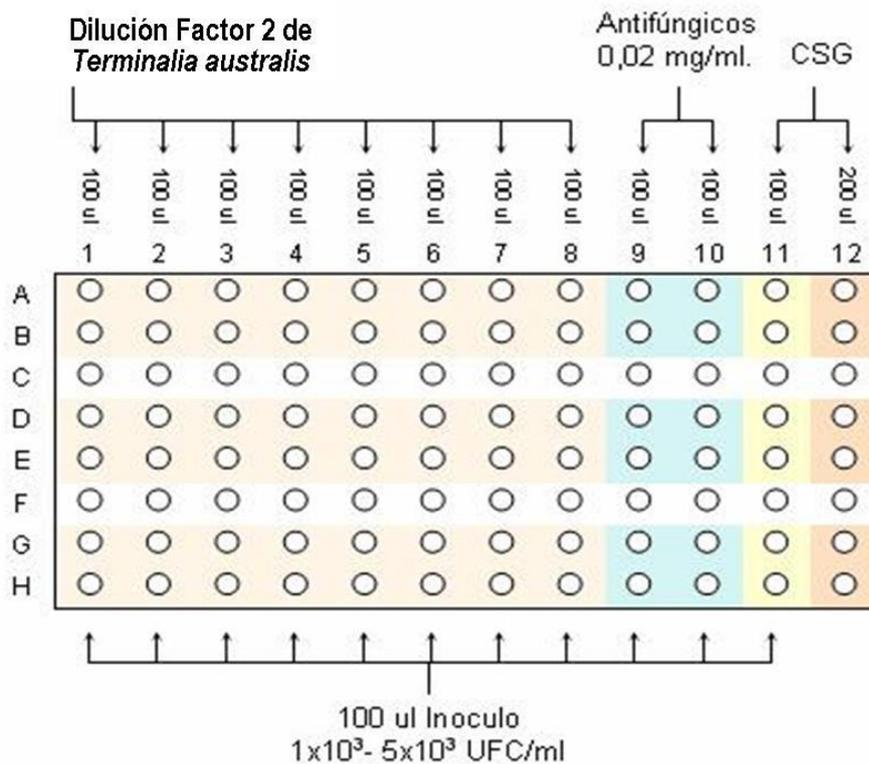


Diagrama 1. Esquema de trabajo para la determinación de CIM de cada fracción vegetal mediante el desarrollo de la técnica de MDC.

El valor de CIM se determinó por visualización directa del desarrollo fúngico y por observación paralela al microscopio óptico invertido durante los 3 días que duró el ensayo. Se consideró CIM a la última dilución del AE que inhibió el desarrollo de la cepa problema.

Para realizar la técnica de microdilución en caldo para bacterias las FV se diluyeron (factor 2) en solución de Agar-Agar al 0,15%, desarrollándose la técnica descrita por Mann & Markham (1998). La determinación de la CIM se realizó visualmente. El color azul (resazurina Oxidada) reveló inhibición del crecimiento microbiano. En contraposición el color rosado (resazurina reducida) indicó presencia de desarrollo microbiano. Se consideró CIM a la última dilución que presentó color azul. Se incluyeron controles de reducción positivo (microorganismo sin tratar) y negativo (CMH solo).

Para calcular la CFM a partir de la microplaca, se inocularon 100 ul de la última dilución que evidenció ausencia de desarrollo fúngico (CIM) en placas con ASG, incubándolas a 37°C toda la noche. Se definió la CFM como la mínima concentración a la cual menos del 0,1% del inóculo inicial sobrevivió. Cada ensayo se realizó por duplicado.

Obtención de compuestos

Aislamiento y purificación de la FV

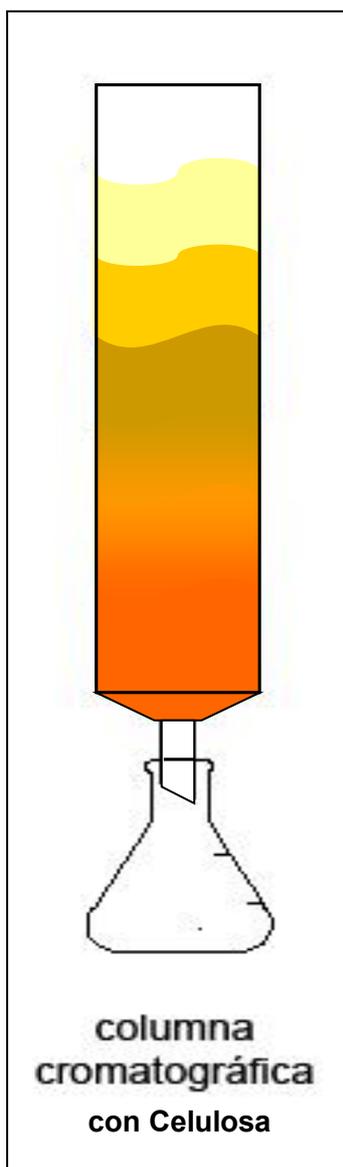
En mérito a los resultados obtenidos frente a especies de *Candida* en las que la fracción FV47 resultó ser activa, se decidió tratar de identificar los posibles componentes responsables de la acción fungicida. Debe tenerse en cuenta que las fracciones FV3 y FV14 no mostraron actividad, por lo que en principio ésta podría deberse al componente de $R_f = 0,66$, que sólo está presente en la FV47 y que es detectable mediante la aplicación de luz UV de 366 nm. En función de ello se decidió realizar un aislamiento y purificación de los posibles compuestos presentes en estas fracciones.

Preparación de la columna -Celulosa

Se reunieron las FV 3, 14 y 47, con el objeto de obtener mayor cantidad de producto a purificar, obteniéndose 1,125 g de muestra.

Se utilizó una columna cromatográfica de vidrio (20 x 2 cm), rellena con Celulosa Celluiosepulver MN 300 HR, Macherey-Nagel & Co. (25 g). Se hizo una siembra sólida de la muestra (1,125 g de extracto metanólico con 3 g de Celulosa). La cromatografía se desarrolló utilizando un gradiente de concentración inicial de MeOH-H₂O (80:20) hasta MeOH- H₂O (50:50). Se obtuvieron de este modo 63 Fracciones Vegetales obtenidas en la columna de Celulosa (FVC) que se controlaron por CCF de celulosa. Se reunieron cuatro fracciones por presentar similar perfil cromatográfico: FVC 3-5, FVC 18-21, FVC 32-36 y FVC 48-50.

Cada una de ellas se purificó por cristalización, controlando su pureza por punto de fusión y CCF, y posteriormente se realizaron espectros IR, NMR ^1H y ^{13}C , MS y análisis elemental en los casos que fue necesario o factible, dada la escasa cantidad de muestra.



Espectrometría de Masas

Se realizó un Espectro de Masas de la muestra (peso 1, 1259) para conocer la complejidad de la muestra a analizar (Grafico 1).

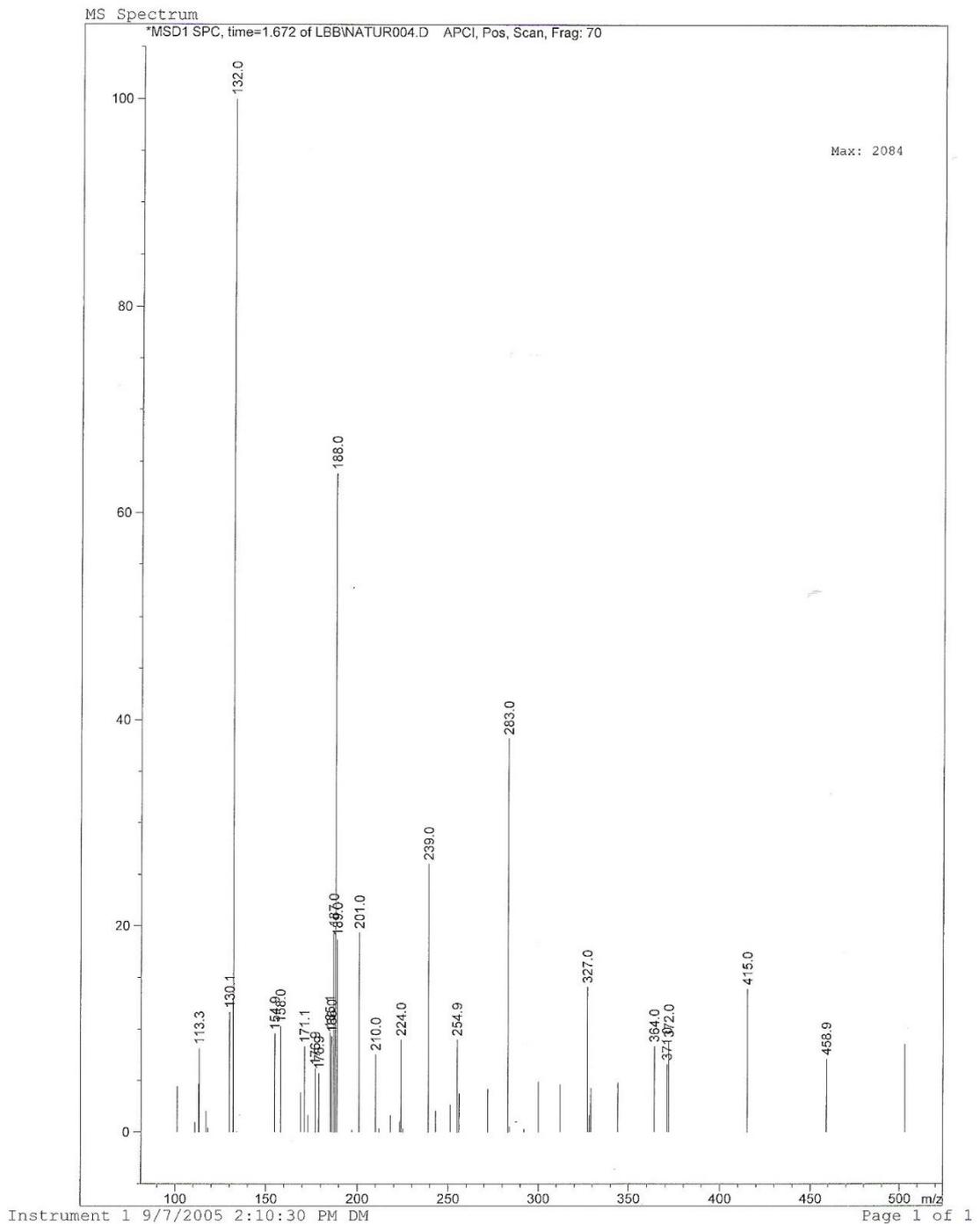


Grafico 1. Espectro de Masa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados microbiológicos

Estudios antimicrobianos

Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Terminalia australis* Cambess, v de las tres FV seleccionadas (fracciones V3, FV14 y FV47) sobre las cepas bacterianas mencionadas en Materiales & Métodos. El sólido (SA) del que provienen todas las FV, mostró actividad frente a *Staphylococcus aureus*. ATCC 6538 y sólo resultó activo el extracto metanólico (EM) completo frente *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 5), que es un importante agente patógeno normalmente resistente a los antimicrobianos de uso frecuente.

El hecho de que ninguna de las fracciones aisladas por cromatografía en columna resultara activa frente a dicha bacteria no es inusual, ya que en la mayoría de los fitofármacos la acción más evidente la ejerce todo el extracto.

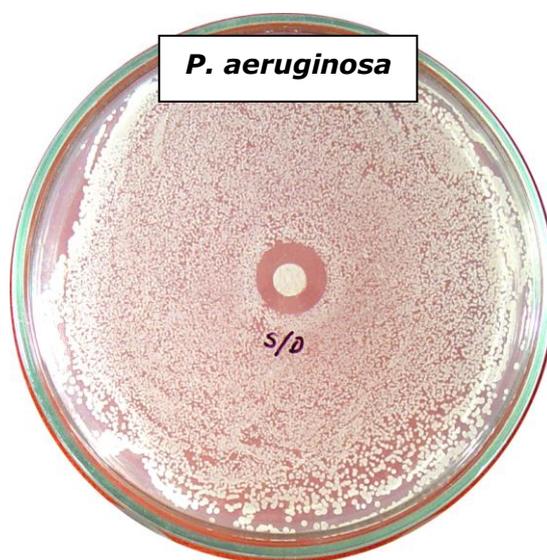


Figura 5. Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* mostrando el halo de inhibición por la presencia del extracto metanólico de *Terminalia australis*.

Estudios antifúngicos

Las FV también fueron ensayadas sobre diversas cepas fúngicas pertenecientes al género *Candida*, responsable de variadas patologías. Únicamente resultó activa la fracción Fy47 sobre *Candida albicans* (muestra proveniente de una paciente con vulvovaginitis a repetición y tratamientos antimicrobianos previos reiterados), con valores de CIM Y CFM del orden de 0,08 ug/ml (Fig. 6).

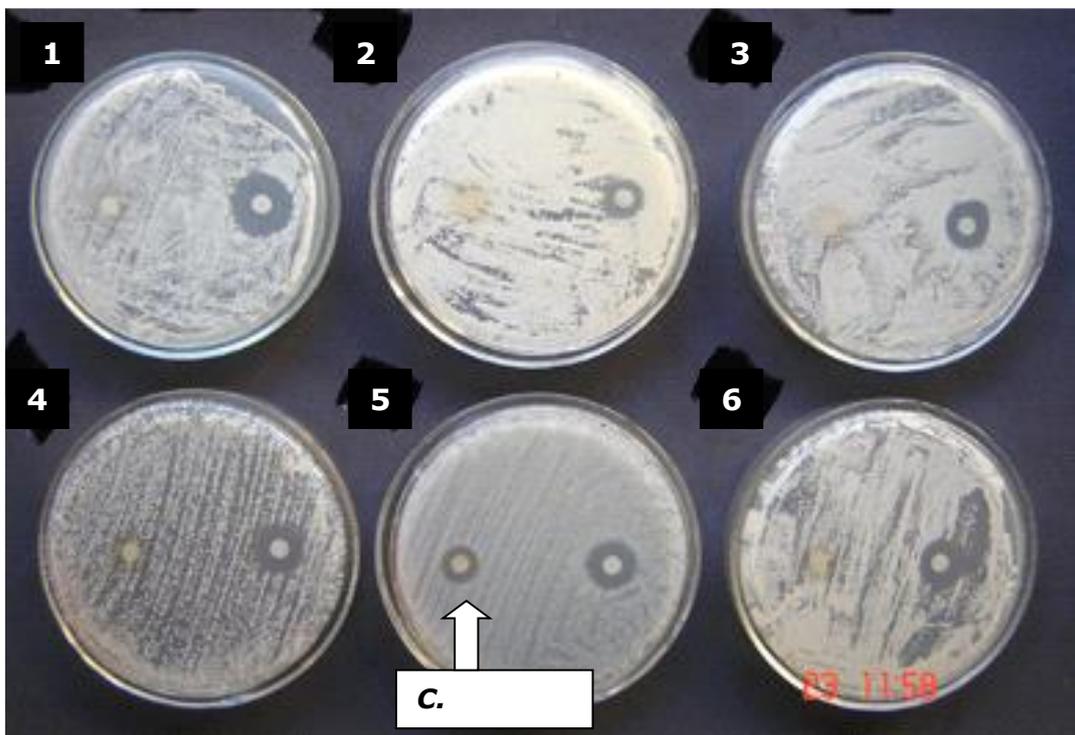


Figura 6. Inhibición del desarrollo de cultivos fúngicos por la fracción FV47 del extracto metanólico de *Terminalia australis*. Las placas muestran cultivos de *Candida albicans* (1) y *Candida* spp. (2) provenientes de uro cultivos, *Candida* Spp. aislada de exudado vaginal (3 y 6), *Candida* spp. aislada de esputo (4) y *Candida albicans* aislada de exudado vaginal (5).

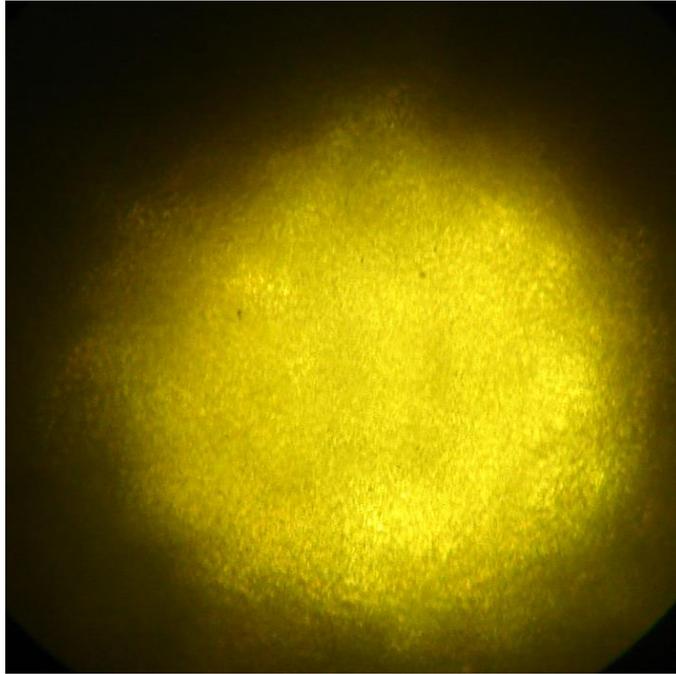


Figura 7. Determinación de la CIM de la fracción FV47 del extracto metanólico de *Terminalia australis* sobre *Candida albicans*.

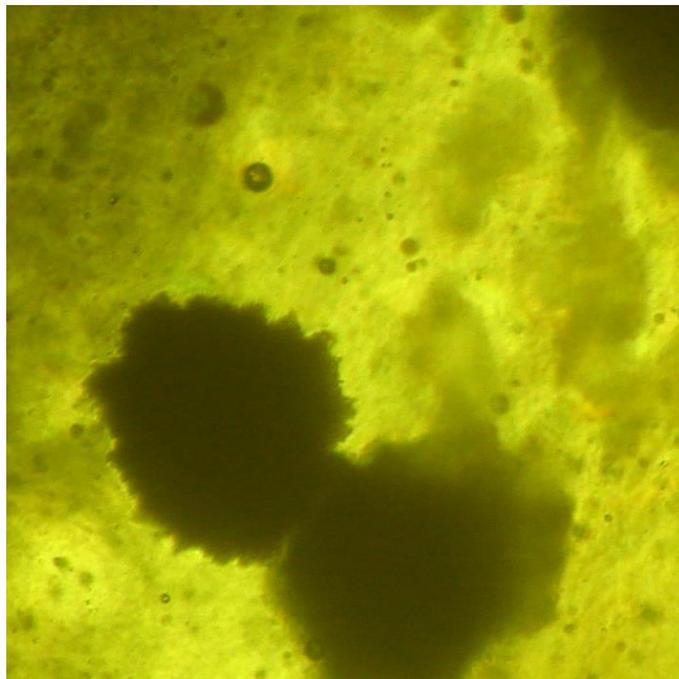


Figura 8. Control de crecimiento.

Compuestos obtenidos

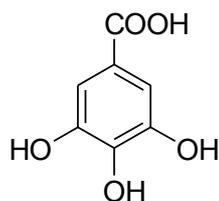
El análisis del espectro IR muestra la existencia de agrupamientos fenólicos, grupos alquílicos (Csp³), grupos carbonílicos y anillos aromáticos por la presencia de bandas a 3327, 2930, 2852, 1654, 1616, 1593, 1558 y 1513 cm⁻¹. Este espectro presenta bandas características de flavonoides.

Compuesto 1

- Reunión de FVC 3-5: se obtuvo un producto amorfo (peso 84 mg).

Fue identificado como ácido gálico (Chanwitheesuk, 2007; Braca, 2006) a partir de un único singlete (δ 7.12) en el espectro ¹H NMR y siete señales de carbono observadas en el campo bajo (δ 110.6 x 2, 121.4, 135.9, 144.9 X 2, 170.8) del espectro ¹³C NMR, con posterior confirmación mediante la comparación de su comportamiento cromatográfico frente a una muestra auténtica. Pf 250-251, con descomposición.

Sólido blanco-amarillento amorfo; ES-MS, m/z (int. rel. 100 V, modo negativo):169 [M-H] ⁻(100). Análisis calculado para C₇H₆O₅: C 68.85 %, H 4.95 %, O 26.20 %. Hallado: C 69.45 %, H 5.04 %, O 25.26 %. ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ 7.12 (2H, s, H-2 y H-6); ¹³C NMR (CD₃OD, 600 MHz) ppm 110.6 (C-2, C-6), 121.4 (C-1), 135.9 (C-4), 144.9 (C-3, C-5), 170.8 (C-7).



1

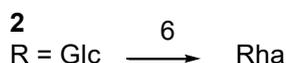
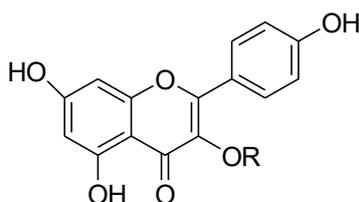
Compuesto 2

Reunión de FVC 18-21: se obtuvo un producto amorfo (peso 54 mg). No se disponía de muestra testigo. Se caracterizó por métodos fisicoquímicos.

- Identificado como kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil(1->6)- β -D-glucopiranosido.

El anillo aromático exhibió señales protónicas de acuerdo con las que corresponden a kaempferol. La disustitución 5,7 fue demostrada por la presencia de un par de dupletes 1H meta-acoplados a δ 6.25 ($J=2$ Hz) y 6.44 ($J=2$ Hz), asignable a los protones H-6 y H-8, de acuerdo a la bibliografía existente; de hecho, para las 5,7-dihidroxi flavonas y flavonoles la resonancia H-6 fue informada a un campo mayor que la resonancia H-8 (Shen et al., 1993). El espectro ^1H NMR de 1 presentó un duplete 3H a δ 1.16 ($J=6$ Hz), típico del grupo ramnosil-metilo y dos señales anoméricas de protones a δ 4.58 (d, $J=1.5$ Hz), asignable al protón H-1 α -ramnosilo, y 5.14 (d, $J=7.5$ Hz), asignable al protón H-1 β -glucosilo. En la ^{13}C NMR of 5, la señal C-6 (δ 68.5) de glucosa mostró una desviación hacia abajo de 7.2 en comparación ppm con la señal correspondiente a C-6 (δ 61.3) de quercetina 3-glucósido (Markham,1982), indicando una unión 1->6 entre la glucosa de C₃ y la ramnosa.

Datos NMR para el Compuesto 2. ^1H NMR (CD_3OD), señales de la aglicona: δ 6.25 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6), 6.44 (1H, d, $J=2$ Hz, H-8), 6.90 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-3', H-5'), 8.12 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-2', H-6'); señales de azúcares: δ 1.21 (3H, d, $J=6$ Hz, Me-ramnosa), 4.58 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-1 de ramnosa), 5.14 (1H, d, $J=7.5$ Hz, H-1 de glucosa); ^{13}C NMR (CD_3OD), señales de la aglicona: ppm 158.7 (C-2), 135.4 (C-3), 178.8 (C-4), 163.1 (C-5), 100.0 (C-6), 165.5 (C-7), 94.8 (C-8), 158.7 (C-9), 105.4 (C-10), 124.0 (C-1'), 132.3 (C-2', C-6'), 116.0 (C-3', C-5'), 159.2 (C-4'); señales de azúcares: glucosa ppm 105.4 (C-1), 72.8 (C-2), 75.0 (C-3), 70.1 (C-4), 75.3 (C-5), 68.5 (C-6), ramnosa ppm 101.8 (C-1), 72.0 (C-2), 72.2 (C-3), 73.7 (C-4), 69.6 (C-5), 17.8 (C-6).



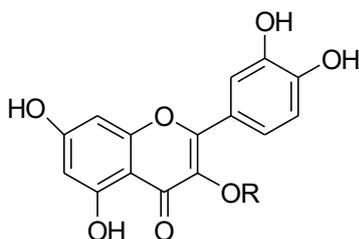
Compuesto 3

Reunión de FVC 32-36: posteriormente a la eliminación del solvente se obtuvo un producto amorfo (peso 28 mg).

- Fue identificado como quercetina 3-O- β D-glucopiransido.

Datos NMR para el Compuesto 3. ^1H NMR (CD_3OD), señales de la aglicona: δ 6.22 (1H, d, $J=2$ Hz, H-6), 6.41 (1H, d, $J=2$ Hz, H-8), 6.90 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-5'), 7.62 (1H, dd, $J=8.5, 2$ Hz, H-6'), 7.91 (1H, d,

J=2 Hz, H-2'); señales de azúcares: 5.09 (1H, d, J=7.5 Hz, H-1 of glucosa); ¹³C NMR (CD₃OD), señales de la aglicona: ppm 159.0 (C-2), 135.3 (C-3), 179.4 (C-4), 162.9 (C-5), 99.5 (C-6), 166.4 (C-7), 94.9 (C-8), 158.5 (C-9), 105.9 (C-10), 123.1 (C-1'), 116.1 (C-2'), 145.7 (C-3'), 149.9 (C-4'), 117.9 (C-5'), 122.8 (C-6'); señales de azúcares: glucosa ppm 101.9 (C-1), 73.9 (C-2), 78.2 (C-3), 70.2 (C-4), 78.4 (C-5), 62.2 (C-6).



3
R = Glc

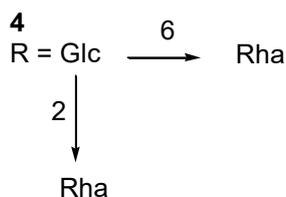
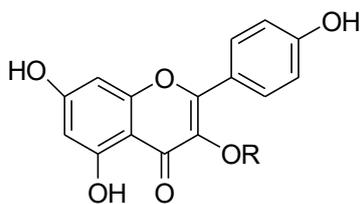
Compuesto 4

Reunión de FVC 48-50: se obtuvo un producto amorfo (peso 42mg).

- Fue identificado como kaempferol 3-O- [α-L-rhamnopyranosyl (1->2)- O- [α-L-rhamnopyranosyl (1->6)]- β-D-glucopyranoside.

Datos NMR para el Compuesto 4. ¹H NMR (CD₃OD), señales de la aglicona: δ 6.24 (1H, d, J=2 Hz, H-6), 6.44 (1H, d, J=2 Hz, H-8), 6.91 (1H, d, J=8.5 Hz, H-3, H-5'), 8.13 (1H, d, J=8.5 Hz, H-2', H-6'); señales de azúcares: δ 0.92 (3H, d, J=6 Hz, Me-ramnosa), δ 1.21 (3H, d, J=6 Hz, Me-ramnosa), 4.58 (1H, d, J=1.5 Hz, H-1 de ramnosa unida al C-6 de glucosa), 5.62 (1H, d, J=1.5 Hz, H-91 de ramnosa unida al C-2 de glucosa), 5.23 (1H, d, J=7.5 Hz, H-1 de glucosa); ¹³C NMR (CD³OD),

señales de la aglicona: ppm 158.7 (C-2), 135.4 (C-3), 178.8 (C-4), 163.1 (C-5), 100.0 (C-6), 165.5 (C-7), 94.8 (C-8), 158.7 (C-9), 105.4 (C-10), 124.0 (C-1'), 132.3 (C-2', C-6'), 116.0 (C-3, C-5'), 159.2 (C-4'); señales de azúcares: glucosa ppm 105.4 (C-1), 72.8 (C-2), 75.0 (C-3), 70.1 (C-4), 75.3 (C-5), 68.5 (C-6), ramnosa (1->2) ppm 101.8 (C-1), 72.1 (C-2), 72.4 (C-3), 73.8 (C-4), 69.8 (C-5), 17.3 (C-6), ramnosa (1->6) ppm 100.3 (C-1), 72.3 (C-2), 72.4 (C-3), 73.9 (C-4), 69.7 (C-5), 17.9 (C-6).



CONCLUSIONES

Conclusiones

- ✓ Se lograron aislar e identificar por métodos fisicoquímicos del extracto metanólico proveniente de la especie *Terminalia australis* Cambess, al menos, cuatro compuestos: ácido gálico, kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil (1- \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosido, quercetina, 3-O- β -D-glucopiranosido y kaempferol 3-O- [α -L-ramnopiranosil (1- \rightarrow 2)-O- [α -L-ramnopiranosil (1- \rightarrow 6)]- β -D-glucopiranosido. Estos compuestos son reportados por primera vez para esta especie de *Terminalia*
- ✓ Los compuestos **1, 2, 3 y 4** son reportados en bibliografía como sustancias con acción antiséptica, antioxidante, antimicrobiana y antiviral.
- ✓ El estudio de la actividad antimicrobiana destaca la importancia de esta especie vegetal debido al alto grado de inhibición ejercida por el extracto metanólico (EM) sobre *Pseudomonas aeruginosa*, importante patógeno, normalmente resistente a los antimicrobianos disponibles. Además, el sólido (SA) del que provienen todas las fracciones vegetales (FV), mostró actividad frente a *Staphylococcus aureus*. ATCC 6538.
- ✓ La importancia de *Terminalia australis* Cambess. se incrementa en razón de su capacidad para inhibir el crecimiento de *Candida albicans* (muestra proveniente de paciente con vulvovaginitis a repetición y tratamientos antimicrobianos previos reiterados), con valores de CIM del orden de 0,08 ug/ml.

- ✓ El análisis comparativo entre los valores de CIM y CFM fueron prácticamente similares, corroborando los antecedentes etnobotánicos de la especie y validando su potencial aplicabilidad como fitofármaco.

REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

Aganga, A.A. & Monyatsiwa C.B. (1999) "Use of Browsers (*Terminalia seresia*, *Combretum apiculatum* or *Euclea schimperi*) as a Supplement for Growing Tswana Goats", *Trop. Anim. Health Pro.* 31: 295-305

Agbedahunsi, J. M., I. Anao, C.O. Adewunmi & S.L. Croft (2006) "Trypanocidal Properties of *Terminalia ivorensis* A. Chev. (Combretaceae)" *Afr. J. Trad. Complement. Altern. Med.* 3: 51-6

Arancibia, J., A. Bastias & E. Martínez (1999) "Relación bosque plantas medicinales. Reseña Histórica, Universidad Católica de Temuco, Chile

<http://orbita.starmedia.com/plantamed/resena.htm> [consulta: 24 de agosto de 2007].

Arkochim (1997) "La industria farmacéutica. Elaboración de medicamentos a base de plantas medicinales. Calidad, Seguridad y Eficacia" <http://www.uae.ma/dossiers/down/formations/unia+uae/6> *Calidad_seguridad_y_eficacia.pdf* [acceso 23 de junio de 2001].

Baba-Moussa, F., K. Akpagana & P. Bouchet, (1999) "Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine". *J. Ethnopharmacol.* 66: 335-8.

Balci, M. (2005) "Basic ^1H - and ^{13}C -NMR Spectroscopy", Elsevier, The Netherlands.

Braca, A., A.M. Pawlowska & M. De Leo, "Phenolics of *Arbutus unedo* L. (Ericaceae) Fruits: Identification of Anthocyanins and Gallic Acid Derivatives". *J. Agric. Food Chem*, 2006, 54; 10234-38.

Butler, L.G. (1989) "Effects of condensed tannin on animal nutrition". En "Chemistry and significance of condensed tannins" (R.W. Hemingway & J.J. Carchesy, eds.). Plenum, Nueva York. Pág. 391-402.

Cabrera A.L & G. Dawson (1944) La selva marginal de Punta Lara en la ribera argentina del Río de La Plata, *Revista del Museo de La Plata (Argentina)* 5: 267-382.

Carpano, S.M. (2007) "Actividad antifúngica de extractos de *Terminalia australis* Cambess. Exo-endomorfología de sus órganos aéreos". Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas Universidad Nacional de La Plata.

Carpano, S.M., E.D. Spegazzini, J.S. Rossi, M.T. Castro & S.L. Debenedetti (2003) "Antifungal activity of *Terminalia australis*" *Fitoterapia* 74: 294-7.

Conrad, J., B. Vogler, I. Klaiber, G. Roos, U. Walter & W. Raus (1998) "Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark" *Phytochemistry* 48 647-50.

Conrad, J.; B. Vogler; S. Reeb, I. Klaibe, S. Papajewski, G. ROos, E. Vasquez, M.C.Setzer & W. Kraus (2001) "Isoterchebulin and 4,6-O- isoterchebuloyl-D-glucose, novel hydrolyzable tannins from *Terminalia macroptera*", *J. Nat. Prod.* 64: 294-9.

Corder, R., J.A. Douthwaite & D.M. Lees (2001) "Endothelin-1 synthesis reduced by red wine". *Nature*. 414: 863-4.

Chanwitheesuk, A., A. Teerawutgulrag, J.D. Kilburn & N. Rakariyatham. "Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk". *Food Chemistry* 100 (2007) 1044-48.

Chung, K.T., T.Y. Wong, C.I. Wei, Y.W. Huang & Y. Lin (1998) "Tannins and human health: a review". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38:421-64

De Pooter, H.L., E.A. Aboutabl & A.O. El-Shabrey (1995) "Chemical Composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa* (J.C. Wendl) K. Schum. grown in Egypt, antimicrobiana". *Flavour Frag. J.*, 10: 63-7

Desmarchelier, C., M.J. Novoa Bermudez, J. Coussio, G. Ciccía & A. Boveris (1997) "Antioxidant and Prooxidant Activities in Aqueous Extracts of Argentine Plants", *Pharm. Biol.* 35: 116-20

Duke, J.A., 1992. *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Dutta, B. K., I. Rahman (1999),. *Terminalia* (Myrobalan) and its effect on dermatophytes. *Geobios Jodhpur*. Jan. 26: 43-45. Defence Research Laboratory, Tezpur, India

Ekong, DEU & O.G. Idemudia (1967) "The state of medicinal plants research in Nigeria" *J. Chem. Soc. C.* 863-4.

Elizabetsky, E & L. Wannmacher (1993) "The status of ethnopharmacology in Brazil", *J. Ethnopharmacol.* 38: 137-43.

Escalante, M.G. y S.M. Carpano (1977) "Acción antibiótica de plantas argentinas silvestres y cultivadas" *Rev. Farm. (Bs. As.)* 119: 109-13.

Farmacopea Nacional Argentina (1978). Codex Medicamentarius argentino. VI Edición. Buenos Aires, Argentina. Infusión. 581.

Felton, G.W., K. Donato, R.J. Del Vecchio & S.S. Duffey (1989) "Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores". J. Chem. Ecol. 15: 2667-94.

Figurovski N.A. (1979) "Los conocimientos químicos en la Antigüedad. Historia de la Química, Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Pág. 5-9.

Filippich L.J., G.R. Cao, M.T. Alsalami & P.B.English (1997) "Intoxication by Yellow-Wood (*Terminalia oblongata*) in sheep". Online 3. Vet. Res. 1: 20-26.

Fletcher, R.J. (1995) "Survey of the Australian readership of the Australian New Crops" Austral. New Crops Newstett. 3: 2-5.

García Milian, A.J., F. Morón Rodríguez, L. Alonso Carbonell, P. López Puig y A.K. Ruiz Salvador (2005) "Estrategia para lograr un uso racional de los medicamentos herbarios", Rev. Cubana Plant. Med, 10 (2): versión on line <<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v10n2/pla14205.pdf>> [consulta: 4 de noviembre de 2007]

Gupta, R., S. Singhal, A. Goyle & V.N. Sharma (2001) "Antioxidant and hypocholesterolaemic effects of *Terminalia arjuna* tree-bark powder:a randomised placebo-controlled trial". J. Assoc. Physicians India, 49: 231-5.

Hegnauer, R. (1964) *Chemotaxonomie Der Pflanzen: Vol 3: Dicotyledoneae*. Springer-Verlag, pág. 443

Hoffman, E. & V. Stroobant (2002) "Mass Spectrometry", 2nd. Ed. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Idemudia, O.G. (1970) "Terpenoids of Nigerian Terminalia species", *Phytochemistry* 9: 2401-2.

Juang L.-J., Sh.-J. Sheu, T.-Ch. Lin (2004) "Determination of hydrolyzable tannins in the fruit of Terminalia chebula Retz. by high- performance liquid chromatography and capillary electrophoresis", *J. Sep. Sci.* 27: 718-24.

Kazakevich, Y.V. & R. LoBrutto (2007) "HPLC for Pharmaceutical Scientists". John Wiley & Sons.

Kaur S., I.S. Grover & M. Singh (1998) "Antimutagenicity of hydrolysable tannins from Terminalia chebula in Salmonella typhimurium", *J. Ethnopharmacol* 419: 169-79.

Keeler, J. (2005), "Understanding NMR Spectroscopy", Wiley, Chichester, UK.

Kirchner, J.C., J.M. Miller & G.J. Keller (1951) "Separation and Identification of Some Terpenes by a New Chromatographic Technique", *Anal Chem.* 23: 420-5.

Kmietowicz, Z. (2000) "NICE approves Taxol for ovarian cancer" *Brit. Med. J.* 1293.

Lee, S.-H., S.Y. Ryu, S.U. Choi, C.O. Lee, Z. No, S.-K. Kim & J.-W., Ahn, (1995) "Hydrolyzable tannins and related compounds having Cytotoxic activity from the fruit of Terminalia chebula" *Arch. Pharm. Res. Seoul* 18: 118-20.

Mann, C.M. & J.L. Markham (1998) "A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils". *J. Appl. Microbiol*, 84: 538-44

Markham, K.R. (1982) *Techniques of Flavonoids Identification*. Academic Press Ed., New York, 1-2

Martino, V.S, M.N Graciano, O. Hnatyszyn & J.D Coussio (1975) "Phenolic compounds of *Terminalia triflora*", *Planta Med*. 27: 226-30.

Martino V. S., P. López, J. J. Martínez Irujo, M. Sanromán, M. T. Cuevas, E. Santiago, J. J. Lasarte, M. Font, J. D., Coussio & A. Monge (2002) "Inhibitory effect against polymerase and ribonuclease activities of HIV-reverse transcriptase of the aqueous leaf extract of *Terminalia triflora*", *Phytother. Res*. 16: 778-80

Merck, E. (1972) "Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel". Merck, Darmstadt, DD.

Miller, 1998. A.L. (1998) "Botanical influences on cardiovascular Disease". *Altern. Med.Rev*.3: 422-31

Muñoz, J., P. Ross & P. Cracco (1993) "*Flora Indígena del Uruguay*", Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires

Nagappa, A.N., P.A. Thakurdesaia, N. Venkat Raob & J. Singhb (2003) "Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn, Fruits". *J. Ethnopharmacol*. 88: 45-50.

Naik, G.H., K.I. Priyadarsini, D.B. Naik, R. Gangabthagirathi & H. Mohan (2004) "Studies on the aqueous extract of *Terminalia chebula* as a potent antioxidant and a probable radioprotector". *Phytomedicine*, 11: 530-8

Nakamoto, K. (1997) *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*", Ed. John Wiley & Sons, New York

OMS (2000) *Estrategias sobre medicamentos de la OMS: 2000-2003. Programa de Acción sobre Medicamentos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud*". Ginebra.

OMS (2002) *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*", Ginebra, Suiza, http://www.enfermeriaalternativa.cl/pdf/estrategia_OMS.pdf [consulta: 2 de diciembre de 2007]

Palacios Lozada, E.E. (2004) "Economía y Plantas Medicinales", Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Mayor de San Marcos, Perú. CSI, Boletín 52, págs. 28-31.

Peman García J, Cantón-Lacasa E. (1996) "Las pruebas de sensibilidad antifúngica en un laboratorio de microbiología clínica". *Rev Esp Quimioter.* 9: 17-20.

Perumal Samy, R., S. Ignacimuthu & A. Sen (1998) "Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties", *J Ethnopharmacol.* 62: 173-82.

Rege, N.N., U.M, Thatte & S.A Dahanukar (1999). *Adaptogenic properties of six rasayana herbs used in Ayurvedic medicine.* *Phytother. Res.* 13: 275-91.

Russo, R.O. & M. Speranza Sánchez (2001) "Terminalia arjuna (Combretaceae) y otras especies del género: mitos, realidades y oportunidades en la terapia cardiovascular, *Rev. Costarric. Cardiol.* 3: 35-40.

Shaila, H.P., S.L. Udupa & A.L. Udupa (1998) "Hypolipidemic activity of trees indigenous drugs in experimentally induced atherosclerosis". *Int. J. Cardiol.* 67: 119-24.

Shen, Z., C. Wang, X. Chen & S. Arihara (1993) "A new type of gypenosides" *Linchan Huaxue Yu Gongye* 13: 265-9.

Shreiber, M.S. (1979) "75 Years of Chromatography-an Historical Dialogue", Elsevier Scientific Publishing Company, pág. 413.

Singleton VL. 1981. "Flavonoids". En: Childester CO, Mrak EM, Stewart GF (editores). *Advances in Food Research*. Academic Press, Nueva York. 149-242.

Stahl, E. (1969) "Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook". Springer-Verlag New York, Inc.

Taiwo, O., H.X. Xu & S.F. Lee 1999 "Antibacterial activities of extracts from Nigerian chewing sticks", *Phytother Res.* 13: 675-9.

Taiz, L. & E. Zeiger (2006). "Secondary Metabolites and Plant Defense". En: *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.

Tamhane, M.D., S.P. Thorat, N.N. Rege & S.A. Dahanukar (1997) Effect of oral administration of *Terminalia chebula* on gastric emptying: an experimental study. *J. Postgrad. Med.* 43: 12-3.

Toursarkissian, M. (1980) "Plantas Medicinales de la Argentina". Ed. Hemisferio Sur S.A., pág 24.

Valsaraj, R., P. Pushpangadan, U.W. Smitt, A. Adersen, S.B. Christensen, A. Sittie, U Nyman, C. Nielsen & and C.E. Olsen (1997) "New Anti-HIV-1, Antimalarial, and Antifungal Compounds from *Terminalia bellerica*" *J. Nat. Prod.*, 60, 739-42.

Winkel-Shirley, B. 2001 a. "Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology". *Plant Physiology* 126: 485-493.

Winkel-Shirley, B. 2001 b. "It takes a garden. How work on diverse plant of flavonoid species has contributed to an understanding metabolism". *Plant Physiology* 127: 1399-404.

TESIS – MAESTRÍA EN PLANTAS MEDICINALES

Teresita Di Bernardi



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS