



ATRAPADORES DE RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES DE BACCHARIS GRISEBACHII, CYMBOPOGON CITRATUS Y TAGETES MENDOCINA

**ANIBAL ALEJANDRO TAPIA
DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN INVESTIGACIÓN Y
DESARROLLO DE PRODUCTOS NATURALES**

RESUMEN

En el marco de esta Tesis, se investigó la actividad atrapadora de radicales libres y efecto antioxidante de extractos y compuestos de tres especies vegetales empleadas como medicinales en países de América Latina. Las plantas investigadas pertenecen a la familia Asteraceae (Compositae) (*Baccharis grisebachii* y *Tagetes mendocina*) y Gramineae [cultivos *in vitro* de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.]. Para determinar la actividad atrapadora de radicales libres se emplearon los ensayos de captura del radical libre 1,1-difenilpicrilhidrazilo (DPPH), atrapamiento del radical superóxido, inhibición de la enzima xantina oxidasa (XO) e inhibición de la lipoperoxidación en eritrocitos.

Las partes aéreas de *Baccharis grisebachii* son recomendadas en infusión como digestivas y para aliviar úlceras gástricas en Argentina. El exudado y los extractos seriados fueron activos como captadores de radicales libres e inhibidores de la lipoperoxidación en eritrocitos. El aislamiento bioguiado permitió obtener siete derivados del ácido *p*-cumárico y seis flavonoides como los constituyentes mayoritarios de la droga cruda. La actividad observada en el ensayo del anión superóxido fue principalmente debida a los flavonoides 5,7,4'-trihidroxi-6-metoxi flavona y quercetina con inhibiciones de 64 y 79%, respectivamente, a 12,5 µg/ml. Los compuestos con mejor efecto como atrapadores del radical DPPH fueron los derivados del ácido *p*-cumárico drupanina, el ácido *trans*-ferulic *O*-hexan-3-onil-eter (27-35% a 10 µg/ml) y quercetina (97 y 23% a 10 y 1 µg/ml, respectivamente).

El efecto inhibitorio de los extractos sobre la enzima XO se relaciona con la presencia de derivados del ácido *p*-cumárico incluyendo drupanina, ácido 4-acetil-3,5-diprenilcinámico y el ácido *trans*-ferúlico-*O*-hexan-3-onil-eter, con valores de IC₅₀ entre 28 y 40 µg/ml. A 100 µg/ml, el mejor efecto inhibitorio de la lipoperoxidación en eritrocitos se observó en los compuestos 4-acetil-3-prenil-etoxicinamato, 3-prenil-4-(4'-hidroxidihidro cinamoiloxi)-

cinamato y el ácido *trans*-ferulico O-hexan-3-onil-eter (69-82%) y los flavonoides 5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona, quercetina, 5,7,4'-trihidroxi-6,3'-dimetoxi flavona y 5,7,4'-trihidroxi-6,8-dimetoxiflavona (64-84%). La hierba perenne *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Gramineae) es utilizada ampliamente en países subtropicales y tropicales para variados fines medicinales tales como trastornos digestivos, catarro, para calmar la tos, bajar la presión arterial, para la indigestión y como sudorífico. También se usa para el reumatismo, neuralgias, gastralgias y espasmo estomacal. A partir de plantas proveniente de cultivos *in vitro*, producidas por la técnica del sistema de inmersión temporaria (TIS) se aislaron e identificaron una serie de compuestos con actividad atrapadora de radicales libres y antioxidante, incluyendo: ácido cafeico, dos isómeros del ácido clorogénico, ácido *p*-hidroxibenzoico y su 1-O- β -D-glucósido, ácido glutámico y un 6-C-glicósido de luteolina. Las muestras cultivadas *in vitro* presentaron un contenido de compuestos fenólicos entre 0,37 y 1,08% con un 0,13–0,51% de flavonoides totales. A la concentración de 100 μ g/ml, la capacidad atrapadora del radical libre DPPH de las diferentes muestras presentó valores entre 47 y 74 %. Los compuestos más activos sobre el DPPH fueron el ácido cafeico, ácido clorogénico y el 6-C-glicósido de luteolina con inhibiciones de 83-90% a 10 μ g/ml. El compuesto antioxidante mayoritario en las muestras *in vitro* de *Cymbopogon citratus* fue ácido clorogénico. A partir de las partes aéreas de *Tagetes mendocina* se obtuvieron una serie de productos con actividad capturadora de radicales libre y efecto antioxidante. Los compuestos se identificaron como *p*-hidroxiacetofenona, ácido protocatechuico, ácido siríngico, patuletina, quercetagetina 7-O- β -glucósido, quercetagetina 6-metil eter 7-O- β -D-glucósido y 3',4',5- trihidroxi-3,6-dimetoxiflavona 7-O- β -D-glucósido. El contenido total de compuestos fenólicos presentes en la droga cruda fue de un 3% donde un 0,37% corresponde a los flavonoides. La quercetagetina 7-O- β -glucósido fue el compuesto con mayor actividad atrapadora del DPPH, anión superóxido e inhibición de la lipoperoxidación en eritrocitos. Los compuestos fueron poco citotóxicos sobre fibroblastos de pulmón humano con valores de IC50 > 1mM para *p*-hidroxiacetofenona, ácido protocatechuico, ácido siríngico y 239- 516 μ M para los flavonoides. En las tres especies pudo asociarse la actividad antioxidante/atrapadora de radicales libres con determinados metabolitos, incluyendo fenólicos simples, flavonoides y derivados del ácido *p*-cumárico. La metodología empleada implicó una aproximación a los preparados tradicionales, ya que se investigaron también extractos polares. En el caso del *Baccharis grisebachii*, los resultados fundamentan el empleo tradicional de la droga cruda en Argentina. La actividad antioxidante demostrada para los cultivos *in vitro* de

Cymbopogon citratus debe ser comparada con la de plantas cultivadas en terreno y con los metabolitos específicos que produce la planta en ambas condiciones experimentales. La identificación y cuantificación de compuestos antioxidantes en *B. grisebachii* y *Tagetes mendocina* establece las bases para un control de calidad de las drogas crudas, basado en la combinación de ensayos de actividad con la cuantificación de grupos de compuestos definidos, responsables de este efecto.

ABSTRACT

The Latin American medicinal plants *Baccharis grisebachii* and *Tagetes mendocina* (Asteraceae) as well as *in vitro* plants of the Gramineae *Cymbopogon citratus* were assessed for free radical scavenging activity, measured by the decoloration of a methanolic solution of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) and scavenging of the superoxide anion as well as for inhibition of the enzyme xanthine oxidase (XO) and inhibition of lipoperoxidation in erythrocytes.

The exudate and seriated extracts from the aerial parts of *Baccharis grisebachii* (Asteraceae) which is recommended as a digestive and to relieve gastric ulcers in Argentina, showed activity as free radical scavengers and inhibited lipoperoxidation in erythrocytes. Assay-guided isolation led to seven *p*-coumaric acid derivatives and six flavonoids as the main active constituents of the crude drug. The activity towards the superoxide anion was mainly due to the flavonoid constituents. 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone and quercetin presented high activity (64 and 79%) even at 12.5 µg/ml. The xanthine oxidase inhibitory effect of the extracts can be related with the *p*-coumaric acid derivatives drupanin, 4-acetyl-3,5-diprenylcinnamic acid and *trans*-ferulic acid *O*-hexan-3-onyl-ether which showed IC₅₀ values in the range 28-40 µg/ml. Both *p*-coumaric acid derivatives and flavonoids inhibited lipoperoxidation in erythrocytes. The highest activity was found for the *p*-coumaric acid derivatives 4-acetyl-3-prenyl-ethoxycinnamate, 3-prenyl-4-(4'-hydroxydihydrocinnamoyloxy)-cinnamate and *trans*-ferulic acid *O*-hexan-3-onyl-ether (69-82%) and the flavonoids 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone, quercetin, 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxyflavone and 5,7,4'-trihydroxy-6,8-dimethoxyflavone (64- 84%) at 100 µg/ml .

The most active free radical scavengers measured by the DPPH decoloration assay were the *p*-coumaric acid derivatives drupanin and *trans*-ferulic acid *O*-hexan-3-onyl-ether (27-35% at 10 µg/ml) and the flavonoid quercetin (97 and 23% at 10 and 1 µg/ml, respectively). The results support the use of *Baccharis grisebachii* in Argentinian traditional medicine. The perennial herb *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Gramineae) is widely used in tropical and subtropical countries for various medicinal purposes. From *in vitro* grown plants, produced by the temporary immersion system (TIS), several compounds with free radical scavenging and antioxidant effect were isolated and identified by spectroscopic

means. The compounds comprised caffeic acid, two isomers of chlorogenic acid, phydroxibenzoic acid and its 1-O- β -D-glucoside, glutamic acid and a 6-C-glycoside of luteolin. The total phenolic content of the *in vitro* plants (10 different samples) ranged between 0.37-1.08 % and 0.13-0.51% for total flavonoids, respectively. At 100 μ g/ml, the scavenging activity of the samples, measured by the decoloration of the free radical DPPH presented values from 47 and 74%. The most active compounds were caffeic and chlorogenic acid as well as the 6-C-glycoside of luteolin with inhibitions of 83- 90% at 10 μ g/ml. The main antioxidant compound in the *in vitro* grown *Cymbopogon citratus* simples was chlorogenic acid. *Tagetes mendocina* (Asteraceae) is a medicinal plant widely used in the Andean provinces of Argentina. Assay-guided isolation led to 4'-hydroxyacetophenone, protocatechuic acid, syringic acid, patuletin, quercetagetin 7-O- β -D-glucoside, patuletin 7-O- β -D-glucoside and axillarin 7-O- β -D-glucoside as the free radical scavengers and antioxidant compounds from *Tagetes mendocina*. On the basis of dry starting material, the total phenolic content of the crude drug was 3% with 0.37% of flavonoids. Quercetagetin 7-O- β -D-glucoside proved to be the main free radical scavenger of the extracts measured by the DPPH decoloration test as well as for quenching the superoxide anion and inhibition of lipoperoxidation in erythrocytes. In the lipid peroxidation assay the percentual inhibition was related with the number of methoxy groups in the molecule, ranging from 86% for the quercetagetin glucoside to 67% for the monomethoxylated and 31% for the dimethoxylated derivative. The compounds showed low cytotoxicity towards human lung fibroblasts with IC₅₀ > 1 mM for 4'-hydroxyacetophenone, protocatechuic acid and syringic acid and 0.24 to 0.52 mM for the flavonoids. The identification and quantification of the antioxidant/free radical scavengers from *B. grisebachii*, *Cymbopogon citratus* and *Tagetes mendocina* establish a scientific basis for a quality control of the crude drugs, based on both activity assays and quantification of welldefined groups of natural antioxidants.