

Determinación del coeficiente de partición ($\log P$) para derivados antraquinónicos aislados de *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas)

Laura R. COMINI ¹, Susana C. NÚÑEZ MONTOYA ¹,
Gustavo A. ARGÜELLO ² y José L. CABRERA ^{1*}

¹ Departamento de Farmacia y ² Departamento de Físico-Química,
Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. IMBIV ¹,
INFIQ ² - CONICET. Ciudad Universitaria. 5000 Córdoba, Argentina.

RESUMEN. Las antraquinonas (AQs) aisladas de la especie fototóxica *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas), soranjidiol, 1-metil éter de soranjidiol, rubiadina, 1-metil éter de rubiadina, damnacantal y damnacantol, son agentes fotosensibilizantes Tipo I y/o Tipo II. A su vez, presentan una potencial aplicación terapéutica debido a que extractos enriquecidos en las mismas y obtenidos a partir de hojas y tallos de *H. pustulata*, demostraron una importante actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* con baja toxicidad aguda *in vivo*. Con el fin de estimar la capacidad de estas AQs para ingresar y distribuirse en el organismo, atravesando membranas biológicas y así, poder desencadenar los efectos biológicos descritos, se determinó el $\log P$ (expresión logarítmica de la lipofilicidad) de las mismas mediante el método de la ampolla. Con excepción de damnacantol, las AQs ensayadas presentaron un valor superior de $\log P$ en comparación a metoprolol. Además el valor promedio de $\log P$ para cada AQ fue comparable al valor obtenido mediante cálculos teóricos (CLogP).

SUMMARY. "Partition coefficient ($\log P$) determination of anthraquinone derivatives isolated from *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiaceae)". The anthraquinones isolated from the phototoxic species *Hetero-phyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas), soranjidiol, soranjidiol 1-methyl ether, rubiadin, rubiadin 1-methyl ether, damnacanthol and damnacanthol, are Type I and/or Type II photosensitizers. In addition, they show a potential therapeutic use according to results where extracts enriched in these metabolites and obtained from leaves and stems of *H. pustulata* demonstrated an important antibacterial and antifungal activity *in vitro* with a low acute toxicity *in vivo*. In order to estimate the capacity of these AQs to penetrate into the cells and their body distribution by going through biological membranes with the aim to unleash the described biological effects, we determined the $\log P$ of each one by using the shake flash technique. Except for damnacanthol, all of the AQs tested showed a higher value of $\log P$ compared to metoprolol. In addition, the average value of $\log P$ for each AQ was similar to the theoretical value (CLogP).

INTRODUCCIÓN

En el reino vegetal se pueden encontrar grupos de plantas que contienen compuestos químicos tóxicos que desencadenan sus efectos nocivos bajo la acción de la luz, a través de un fenómeno de fotosensibilización ¹. A este grupo pertenece *Heterophyllaea pustulata* Hook. f. (Rubiáceas), especie conocida vulgarmente como "cegada", "ciegada" o "saruera", que crece espontáneamente en las regiones montañosas de Perú, Bolivia y NO Argentino, en las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán ². La ingesta de

sus hojas, flores y frutos en diferentes períodos de desarrollo vegetativo (brotación, floración y fructificación) produce, en animales con predominio de capas blancas, lesiones cutáneas severas y pérdida de la visión como consecuencia de una reacción típica de fotosensibilización primaria ³.

Considerando que numerosas sustancias naturales con propiedades fotosensibilizantes, exhiben variados efectos biológicos con potencial aplicación en terapéutica ⁴⁻⁶, iniciamos el estudio químico y farmacológico de *H. pustulata*

PALABRAS CLAVE: Antraquinonas, Coeficiente de partición, Fotosensibilizantes, *Heterophyllaea pustulata*, Lipofilicidad.

KEY WORDS: Anthraquinones, *Heterophyllaea pustulata*, Lipophilicity, Partition coefficient, Photosensitizers.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: jcabrera@dco.fcq.unc.edu.ar

con el fin de identificar los metabolitos responsables de su acción fototóxica y su posible utilización en la farmacología experimental.

En un estudio farmacológico previo determinamos que los extractos enriquecidos en derivados antraquinónicos, obtenidos a partir de hojas y tallos de *H. pustulata*, presentaron una importante actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* con baja toxicidad aguda *in vivo* ⁷. A partir de estos extractos bioactivos fueron aislados y purificados seis derivados antraquinónicos (AQs) mayoritarios: soranjidiol, 1-metil éter de soranjidiol, rubiadina, 1-metil éter de rubiadina, damnacantal y damnacantol; los cuales demostraron ser agentes fotosensibilizantes Tipo I y/o Tipo II, con generación de anión superóxido y/o oxígeno singlete respectivamente ⁸. Esto nos permitió estimar que las AQs presentes en *H. pustulata*, estarían involucradas en la manifestación del efecto fototóxico que ésta especie genera.

La capacidad de una sustancia para atravesar membranas biológicas es uno de los aspectos fundamentales dentro de las características farmacocinéticas de una droga, ya que le permite acceder al sitio de acción y así, generar el efecto biológico (terapéutico o tóxico). Existen numerosas propiedades fisicoquímicas que pueden afectar esta facultad. Entre ellas, la lipofilicidad es la de mayor interés para el desarrollo de drogas, debido a la relación directa que presenta con la habilidad para atravesar membranas biológicas por difusión pasiva, como así también, por contribuir en forma entrópica a la unión entre ligando y receptor. La lipofilicidad suele expresarse como coeficiente de partición (*P*) de un compuesto entre dos fases inmiscibles entre sí, una fase polar (acuosa) y una no polar (orgánica) en equilibrio, cuyo valor es comúnmente expresado en su forma logarítmica ($\log P$) ⁹.

Por lo expuesto, en este trabajo se determinó el $\log P$ de las seis AQs aisladas de *H. pustulata* en forma mayoritaria, con el fin de estimar su capacidad para ingresar y distribuirse en el or-

ganismo, atravesando membranas y así, poder desencadenar los efectos biológicos descriptos. A través del método de la ampolla fueron calculados los valores de $\log P_{o/w}$ y estos resultados fueron comparados con los respectivos valores teóricos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Derivados antraquinónicos

A partir de los extractos bencénicos de hojas y tallos de *H. pustulata* fueron aisladas y purificadas las AQs ensayadas (Fig. 1), mediante una sucesión de diferentes técnicas cromatográficas. La elucidación estructural de estos compuestos se llevó a cabo mediante la utilización de distintas técnicas espectroscópicas (¹H-RNM, ¹³C-RNM, IR, UV-Vis, EM) ⁷.

Determinación del coeficiente de partición

Los valores teóricos de $\log P$ para cada AQ fueron calculados mediante la aplicación del programa de computación CLogP para Windows (versión 1.0), generado con algoritmos basados en el tratamiento teórico desarrollado por Leo ¹⁰. El ingreso de las estructuras al programa se realizó mediante la nomenclatura SMILES.

El valor experimental de $\log P$ se obtuvo mediante la aplicación del método de la ampolla (Shake-Flask) a temperatura ambiente y utilizando n-octanol como fase no polar. Bajo estas condiciones, es frecuentemente utilizado como medida de lipofilicidad en los estudios de correlación entre estructura química y respuesta biológica, por ser considerado un sistema de referencia ^{9,11}. Este ensayo se realizó determinando la concentración inicial y final de cada AQ en la fase acuosa por espectrofotometría UV-Visible. El equipo utilizado fue un espectrofotómetro UV-Visible Hewlett Packard 8453 de arreglo de diodos con resolución de 1 nm.

Para cada AQ se preparó inicialmente una solución acuosa madre a partir de la cual se obtuvieron las diluciones correspondientes para confeccionar una curva de calibrado. Además, a

AQs	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
soranjidiol	OH	CH ₃	H	OH
1-metil éter de soranjidiol	OCH ₃	CH ₃	H	OH
rubiadina	OH	CH ₃	OH	H
1-metil éter de rubiadina	OCH ₃	CH ₃	OH	H
damnacantal	OCH ₃	CHO	OH	H
damnacantol	OCH ₃	CH ₂ -OH	OH	H

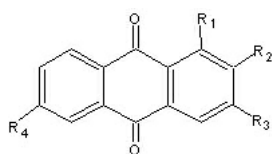


Figura 1. Estructura química de las AQs.

partir de la solución madre, se prepararon diferentes soluciones de concentración y volumen conocido (concentración inicial, $C_{inicial}$), a las cuales se les adicionó el mismo volumen de n-octanol (fase no polar) y luego de alcanzar el equilibrio, se determinaron las disminuciones en la concentración de la fase acuosa (concentración final, C_{final}). Por lo tanto, el coeficiente de partición fue determinado a través de la siguiente ecuación:

$$P = C_{org} / C_{ac} = (C_{inicial_{ac}} - C_{final_{ac}}) / C_{final_{ac}} \quad [1]$$

Para calcular el coeficiente de partición verdadero mediante la aplicación de la ecuación [1] es necesario un comportamiento ideal del soluto, lo que significa trabajar en un intervalo de concentraciones, donde el valor de P es una constante. Una de las causas más comunes de desviaciones de la linealidad de P es la presencia de moléculas de soluto ionizadas ¹². Por lo tanto, considerando la naturaleza fenólica de los derivados antraquinónicos y con la finalidad de lograr la presencia de una sola especie (no ionizada) en el sistema, se utilizó como fase acuosa buffer de pH = 7,4.

Para comprobar el intervalo de linealidad se determinó el valor de P a distintas concentraciones de soluto y se graficó concentración de soluto en fase orgánica (C_{org}) vs. concentración de soluto en fase acuosa (C_{ac}) en condiciones de equilibrio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se pudo comprobar que cada AQ tuvo un comportamiento ideal, ya que el valor de P fue constante para el intervalo de concentraciones ensayado. El cumplimiento de esta condición implica además, que el valor de P obtenido no es función de las concentraciones absolutas ni de los volúmenes relativos de cada una de las fases ¹³. Esto se muestra a modo de ejemplo para damnacantal en la Figura 2.

Como se puede observar en la Tabla 1, el valor experimental promedio de $\log P$ determinado para cada AQ fue comparable en todos los casos al valor teórico (CLogP). Cabe destacar que los valores obtenidos para los compuestos aquí estudiados son similares a los reportados para otros derivados antraquinónicos ¹⁴. El análisis de los valores de $\log P$ y CLogP de las AQs probadas sugiere que la sustitución de un grupo hidroxilo (OH) por un grupo metoxilo (OCH₃) y el reemplazo de un grupo hidroximetilo

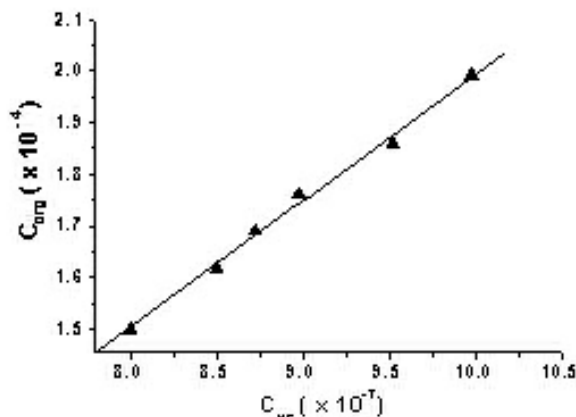


Figura 2. Variación de las concentraciones en la fase acuosa y orgánica para damnacantal.

(CH₂OH) por un metilo (CH₃), produce un incremento del valor de $\log P$, lo cual estaría de acuerdo con lo observado por Shang & Yuan ¹⁴.

Por otra parte, si tomamos como compuesto de referencia de permeabilidad a metoprolol, que con un valor de $\log P = 1,72$ se absorbe en un 95% desde el tracto gastrointestinal ¹⁵, las AQs ensayadas presentaron un valor superior al de referencia (Tabla 1), con excepción de damnacantol.

CONCLUSIONES

La importancia de los estudios de lipofiliidad de drogas radica en la necesidad de conocer su grado de penetración dentro de las células donde va a ejercer su acción biológica. Kasim *et al.* ¹⁵ utilizaron los valores teóricos de $\log P$ y CLogP, entre otros, como parámetros para estimar la permeabilidad de numerosas drogas, en referencia a los valores de $\log P$ y CLogP de metoprolol que posee una alta permeabilidad (95%). De esta manera, las drogas que exhiben valores de $\log P$ y CLogP iguales o mayores al valor del metoprolol (1,72 y 1,35, respectivamente) son categorizadas como drogas altamente permeables, mientras que aquellas que pre-

AQs	$\log P$ experimental	CLogP
soranjidiol	2,02 ± 0,01	2,422
1-metil éter de soranjidiol	2,79 ± 0,02	2,902
rubiadina	2,36 ± 0,01	2,422
1-metil éter de rubiadina	2,83 ± 0,07	2,914
damnacantal	2,28 ± 0,01	2,288
damnacantol	1,29 ± 0,01	1,377

Tabla 1. Valores de $\log P$ y CLogP obtenidos para las AQs aisladas de *H. pustulata*.

sentan valores menores se clasifican como drogas de baja permeabilidad. Los compuestos que requieren de una alta permeabilidad a nivel de las membranas, ya que actúan a nivel del sistema nervioso central, como piroxicam y naproxeno, exhiben valores de CLogP relativamente altos (1,98 y 2,82, respectivamente), en perfecta concordancia con las determinaciones experimentales de permeabilidad, que arrojaron valores de 6,65 y 8,50 (10^4 cm/s), respectivamente. Por el contrario, los compuestos que actúan a nivel local, por ejemplo en el tracto gastrointestinal, tales como cimetidina y ranitidina (antiácidos), muestran valores bajos de CLogP (0,35 y 0,63, respectivamente), lo cual también se refleja en la baja permeabilidad a nivel de las membra-

nas biológicas que presentan: 0,26 y 0,27 (10^4 cm/s).

Las seis Aqs ensayadas presentaron valores elevados comparables a metoprolol. Por lo tanto, estarían demostrando una alta capacidad para atravesar membranas biológicas y alcanzar su sitio de acción, ya sea como agentes fotosensibilizantes o potenciales agentes terapéuticos en las dosis adecuadas.

Agradecimientos. L.R.C. agradece la beca doctoral otorgada por CONICET. Agradecemos a la Dra. M.C. Briñón y colaboradores por el asesoramiento en el cálculo de los CLogP. Este trabajo ha sido financiado por SeCyT (UNC), FONCYT y Agencia Córdoba Ciencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Harbone, J.D., H. Baxter (eds.) & G.P. Moss (Associate) (1996) "Dictionary of Plant Toxins". John Wiley & Sons Ltd., New York.
2. Bacigalupo, N.M. (1993) "*Rubiaceae*", en "Flora de la Provincia de Jujuy" (A.L. Cabrera, ed.), Colección Científica INTA, Buenos Aires, Tomo III, parte IX, págs. 375-80.
3. Hansen, E.W. & C.A., Martiarena (1967) *Rev. Invest. Agropecuarias (INTA)* **4**: 88-111.
4. Towers, G.H.N. & J.B. Hudson (1987) *Photochem. Photobiol.* **46**: 61-6.
5. Hudson, J.B., E.A. Graham & G.H.N. Towers (1994) *Planta Med.* **60**: 329-32.
6. Chen, B., Y. Xu, T. Roskams, E. Dalaey, P. Agostinis, J.R. Vandenheede & P. De Witte (2001) *Int. J. Cancer* **93**: 275-82.
7. Núñez Montoya, S.C., A.M. Agnese, C. Pérez, I.N. Tiraboschi & J.L. Cabrera (2003) *Phytomedicine* **10**: 569-74.
8. Núñez Montoya, S.C., L.R. Comini, M. Sarmiento, C. Becerra, I. Albesa, G.A. Argüello & J.L. Cabrera (2005) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **78**: 77-83.
9. Kubinyi, H. (1993) "*QSAR: Hansch Analysis and Related Approaches*" en "Methods and Principles in Medicinal Chemistry" (R. Mannhold, P. Krosggaard-Larsen, H. Timmerman, eds.) Ed. VCH, New York, Vol. 1.
10. Leo, A.J. (1993) *Chem. Rev.* **93**: 1281-306.
11. Hansch, C. & W.J. Dunn (1972) *J. Pharm. Sci.* **61**: 1-19.
12. Leo, A.J., C. Hansch & D. Elkins (1971) *Chem. Rev.* **71**: 525-612.
13. Rekker, R.F. & R. Mannhol (1992) "*Calculation of Drug Lipophilicity. The Hydrophobic Fragmental Constant Approach*", Ed. VCH, New York.
14. Shang, X. & Z. Yuan (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**: 617-22.
15. Kasim, N.A., M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo, H. Lennernäs, A.S. Hussain, H.E. Junginger, S.A. Stavchansky, K.K. Midha, V.P. Shah & G.L. Amidon (2003) *Mol. Pharm.* **1**: 85-96.