

Puesta en valor de recursos costeros: integrando conocimientos al desarrollo de productos de interés biotecnológico

Dra. María Luján Flores

Dir. Reg. de la Carrera de Doctorado en Farmacia

Dir. del CRIDECIT - mlfl@hotmail.com.ar

Dr. Osvaldo León Córdoba

Prof. Reg. de Química Biológica II

Dir. de GQBMRNP y AAI - CRIDECIT

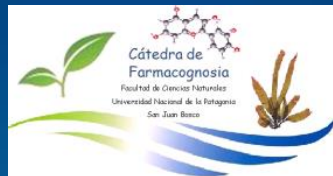
osvmar@unpata.edu.ar; okylola@gmail.com

Dra. Mónica Beatriz Becerra, Dra. Analía Verónica Uhrich, Farm. Miriam D. Escobar Daza, Farm. Florencia Rondini, Farm. Ayelén Montenegro, *Farm. Diana Quezada, Dra. Graciela Pinto Vitorino

Grupo Química, Bioactividad y Metabolismo de Recursos

Naturales Patagónicos (GQBMRNP), Area de Análisis Instrumental (AAI) y Grupo Química Medicinal (GQM) - CRIDECIT – FCNyCS – UNPSJB. *CONICET CIT GSJ





A la memoria de:

Lic. Eduardo Cabezas (2001, FCN, UNPSJB)

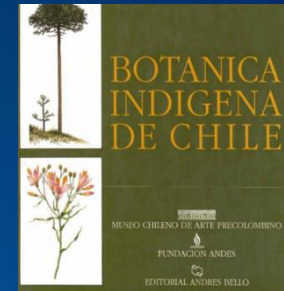
Dr. Honoris Causa Lic. Héctor Eliseo Zaixso (2015, UNPSJB)

Dr. Carsten Christophersen (2015, Tech. U. of Denmark, Copenhagen)

Dra. Graciela Ferraro (2016, FFyB, UBA)

(Q.E.P.D.)

INTRODUCCION



OBJETIVO GENERAL

- Alcanzar un conocimiento integral de especies de potencial aplicación farmacéutica y textil para su posterior uso racional.

Objetivos particulares:

- Investigar metabolitos biosintetizados por especies de importancia etnofarmacognóstica, considerando variaciones espacio temporales.
- Evaluar la potencialidad terapéutica mediante estudios de actividad biológica, y la textil a través de aplicaciones sencillas en tintes, hilos.
- Planificar estrategias de aprovechamiento sustentable, lo que implica cuidado y preservación de los recursos regionales.
- Académicamente, formar investigadores capacitados en la temática a través de estudios de postgrado.

Formación de RRHH: dictado de cursos de postgrado, actividades de grado, tesis de Doctorado y Maestría, becas, estancias de investigación.

1- Colección, clasificación

Etnofarmacognosia



- Hábitat
- Estación anual



2- histoquímica, secado, molienda

3- Extracción preliminar
Screening químico
perfiles cromatográficos

4- Extracción exhaustiva y
Fraccionamiento

5- Determinación estructural

6- Determinación de la bioactividad
primaria: BST, Inhib. radicular,
antioxidante, antimicrobiana,
anticoagulante
y específica: MG-ADN, SC_{50} , xantino
oxidasa, antiinflamatoria, antiviral
. Estudios bioautográficos

7- Aplicaciones farmacéuticas, textiles

Carbohydr. Res., **338** (2): 153-165, 2003.

Phytoterapy Research, **23**: 707-712, 2009.

J. Pharm. Res., **7**: 209-214, 2013.

ALGUNOS RESULTADOS CON:

- *Lessonia vadosa* Searles (Laminareaceae – Phaeophyta)
- *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) (J. Agardh) Link
(Scytosiphonaceae – Phaeophyta)
- *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Alariaceae – Phaeophyta)
- *Ulva rigida* (C. Agardh) Thuret (Ulvaceae – Chlorophyta)
- *Colliguaja integerrima* (ex Hook.) Hill. et Hook.
(Euphorbiaceae)
- *Suaeda divaricata* Moq. (Chenopodiaceae)

plantas superiores
borde costero

Lessonia vadosa



Fracción	Rendimiento (%)	Viscosidad (Cp)	Ac. urónicos constituyentes ¹	K ⁺ (%) ²	Na ⁺ (%) ²
M1	18	7,2	ManA - GulA	2,2	11,3
M2	7	32,0	ManA - GulA	2,8	14,1

Zambón et al., Anales del Instituto de la Patagonia, 17-22, 2003

MUE STRA	Az. Totales (%)	Ac. Urónicos (%)	Fenoles (%)	Proteínas solubles (%)	Sulfatos (%)	M.M. (kDa)
HAlgC	34	68	-	-	6	3
NaAlgC	35	46	0,09	3	4	5,4
NaAlgLv	32	65	-	-	1,5	8
NaAlgLv	32	49	0,5	3	1,5	13
HAlgLv	42	46	0,15	3	4	1,2

Lessonia vadosa

Golfo San Jorge
verano



EXTRACCIÓN

FRONDA SECA Y MOLIDA

Extracción con HCl 0,1 M, 2 h y 60 °C

Acido Algínico insoluble

Extracción alcalina con Na_2CO_3 al 2 %
2 h, 50 °C y pH 10

Alginato de sodio + marco

Hidratar con agua destilada agitación a
50 °C y Centrifugar a 4000 rpm 15 min

Solución de ALGINATO DE SODIO

DIALISIS

1° PURIFICACIÓN

ALGINATO DE SODIO DIALIZADO

CaCl_2 al 10 % agitación 1 h, 50 °C

2° PURIFICACIÓN

Alginato de Calcio

(precipitado como fibras)

Filtración al vacío y blanqueado
con hipoclorito de sodio al 12 %

+ HCl 0,1 M 30 min 50 °C con agitación

Acido Algínico insoluble

Neutralizar con Na_2CO_3 al 2 %

pH 7-8 50 °C 2 h Tratar con etanol y centrifugar.

Evaporar el alcohol 24 h y Liofilizar

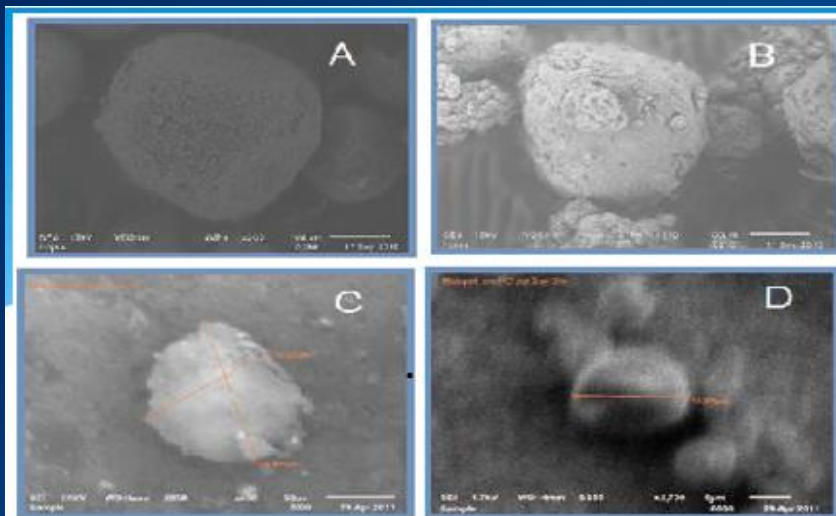
ALGINATO DE SODIO

(NaAlg)



Obtención de sus bloques
por Hidrólisis parcial

Muestra	Rend (%)	H. de Carbono (%)	Ac. Urónicos (%)	Proteínas (%)	SO_4^{2-} (%)	Fenoles (%)	MM (kDa)	Visc. (Cp)
NaAlg	30	32	65	-	1,5	-	9,1	10,0
NaAlg Comercial	-	34	68	-	6,0	-	3,8	20,7
HAlg Comercial	-	35	46	3	4,0	0,09	5,4	18,0



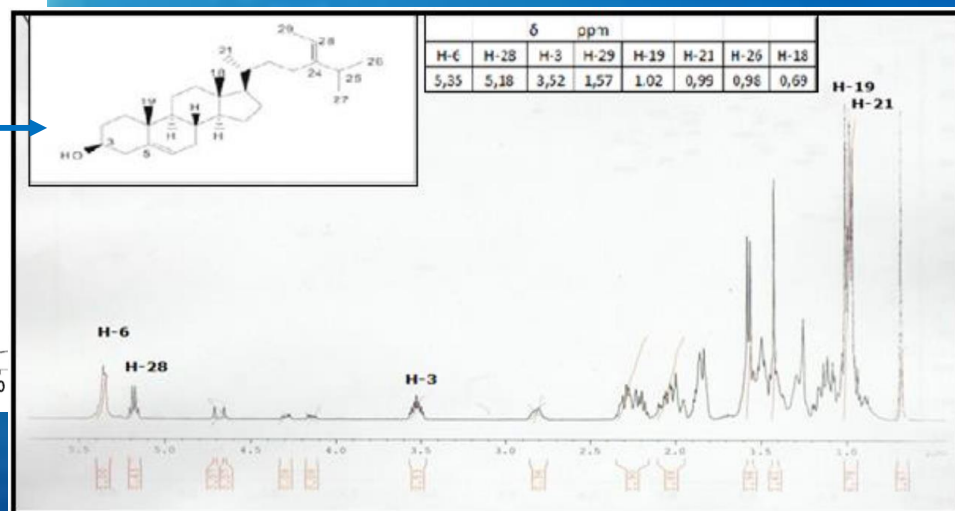
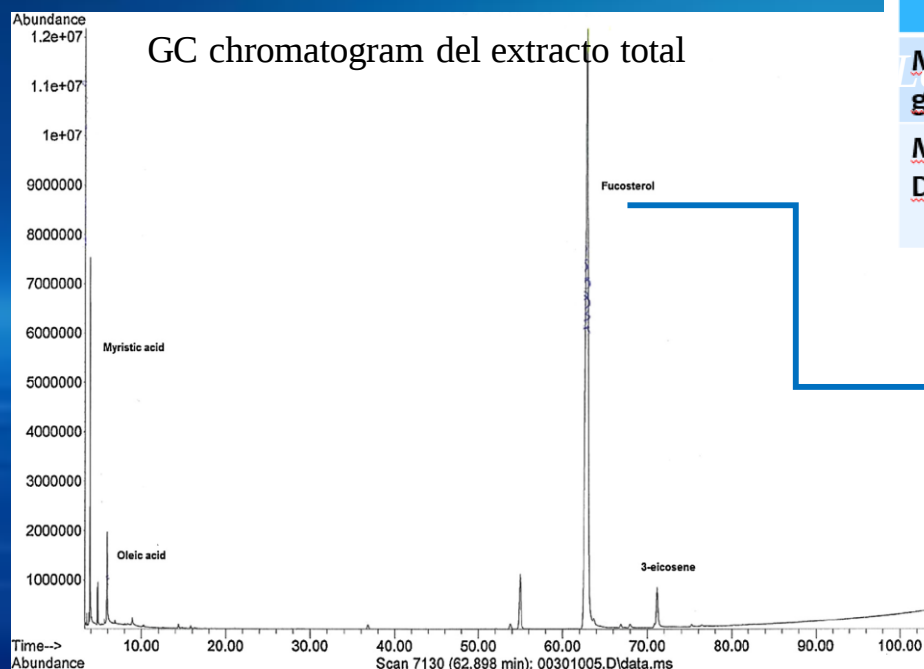
Micrografías de las micropartículas vacías o conteniendo paracetamol, captadas mediante Microscopía Electrónica de Barrido.

A y B. Micropartícula vacía (x 200) y cargada con paracetamol (x 150), respectivamente, ambas obtenidas por emulsificación / gelificación iónica interna.

C y D. Micropartícula vacía (x 450) y cargada con paracetamol (x 2700), respectivamente, ambas obtenidas por Spray Drying

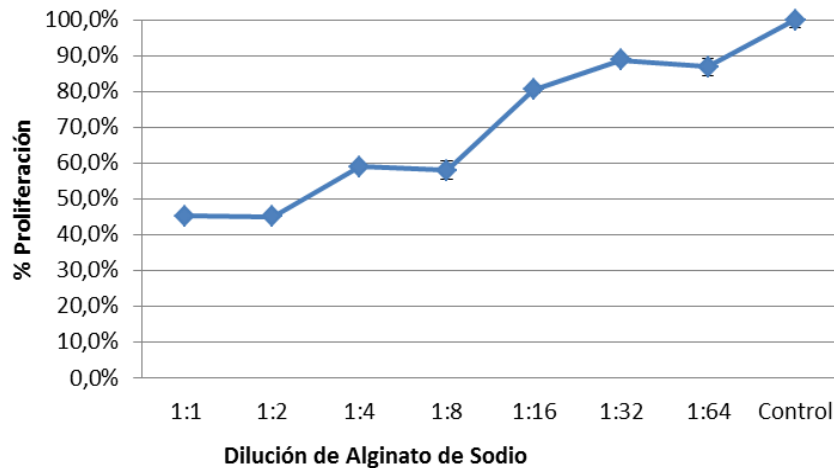
Resultados obtenidos en la preparación de micropartículas por gelificación iónica interna y por Spray Drying

<u>Alginate de Sodio</u> <u>Lessonia vadosa</u>	<u>Rendimiento</u> (%)	<u>EE</u> (%)
<u>Micropartículas por gelificación iónica</u>	46,7	98
<u>Micropartículas por Spray Drying</u>	54,6	78

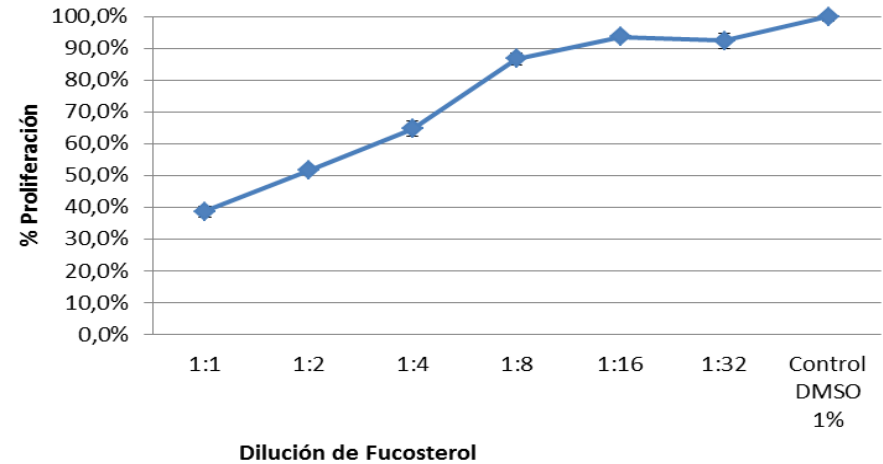


Ensayo *in vitro* con líneas celulares:

- CaCo-2 cáncer de colon, Alginato de sodio y fucosterol



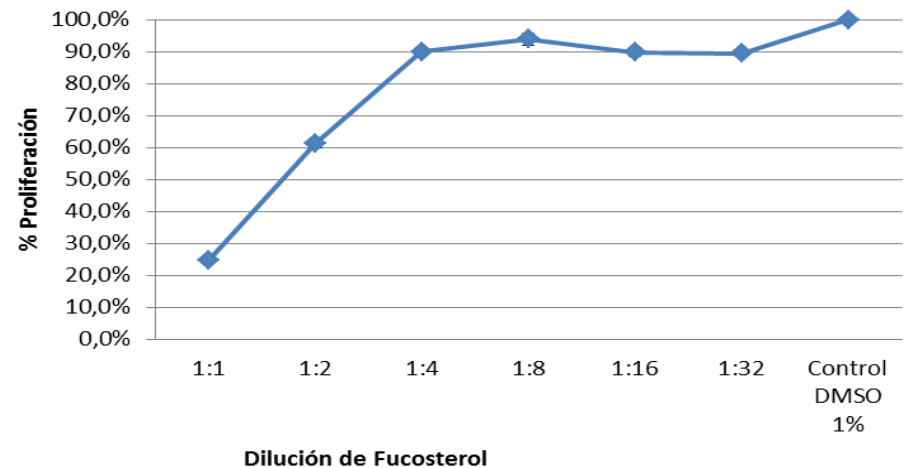
NaAlg a 1 mg/ml 55 % de actividad antiproliferativa



60 % de actividad antiproliferativa a la concentración de 1 mg/ml

- MCF-7 cáncer de mama, fucosterol

75,2 % de actividad antiproliferativa a la concentración de 1 mg/ml



- Trabajo en colaboración con la Dra. Caroline Weinstein-Oppenheim (Univ. de Valparaíso).
- FP-7 IRSES y PICTO GSJ 36871.

Actividad antileishmania del alginato de sodio y del fucosterol

Compuesto	<i>L. infantum</i> promastigotes	<i>L. amazonensis</i> promastigotes	<i>L. donovani</i> promastigotes	J774,1 MΦ
NaAlg	28 % inhibición a 250 µg/ml	Sin inhibición a 250 µg/ml	46 % inhibición a 250 µg/ml	Sin inhibición a 250 µg/ml

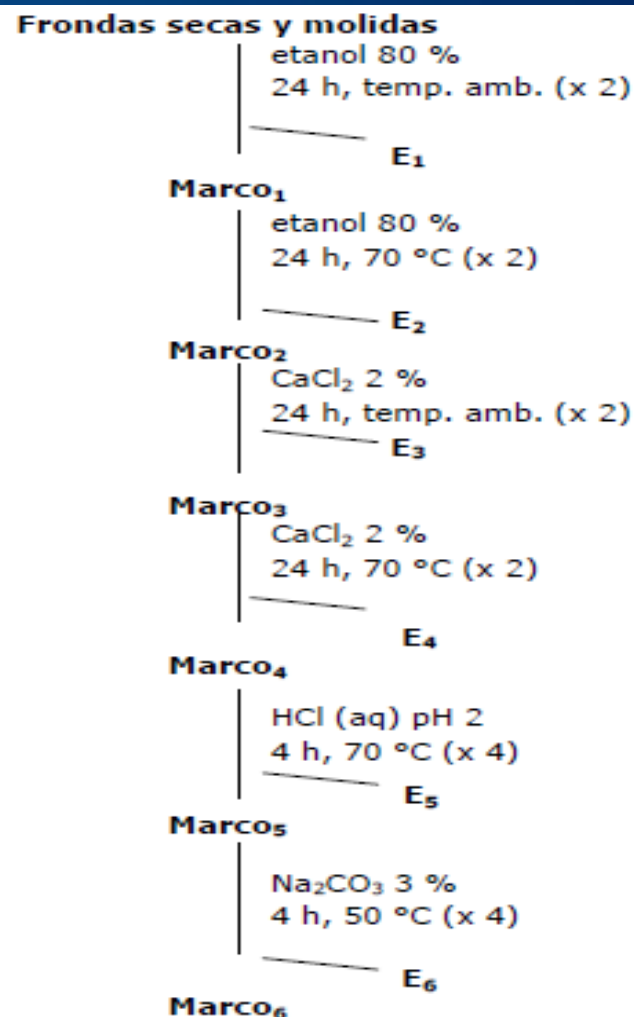
Compuesto	CI ₅₀ (µM)				
	L. infantum		L. amazonensis		J774,1 MΦ
	Promastigotes	Intracelular Amastigotes	Promastigotes	Intracelular amastigotes	
FUCOSTEROL	45,00±9,29	10,30±1,85	55,00±6,23	7,89±2,12	>100
ANFOTERICINA B	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,03	-

Scytosiphon lomentaria



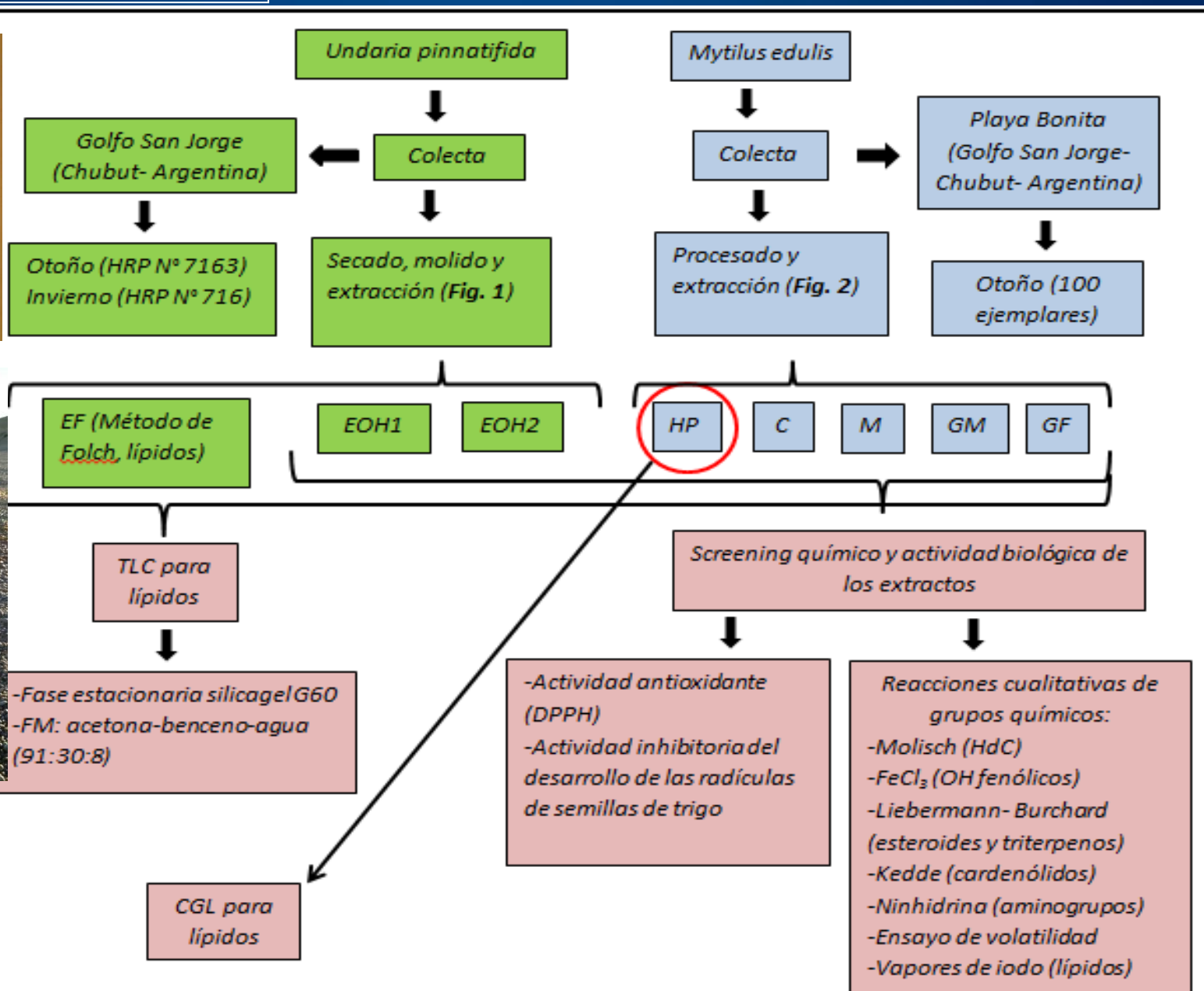
FRACCION	HSV-1	HSV-2	BST (LC ₅₀)	ATB
E-1 _{ol} Scy	-	>50	12	+
E-2 _{ol} Scy	-	>50	79	+
E-3 _{Ca} Scy	5,9	7,0	2	-
E-4 _{Ca} Scy	5,4	7,3	30	-

Becerra, M.B. *et al.*, *Cs. del Mar*, 2006
 Becerra, M.B. *et al.*, *Naturalia patagónica*,
 2008

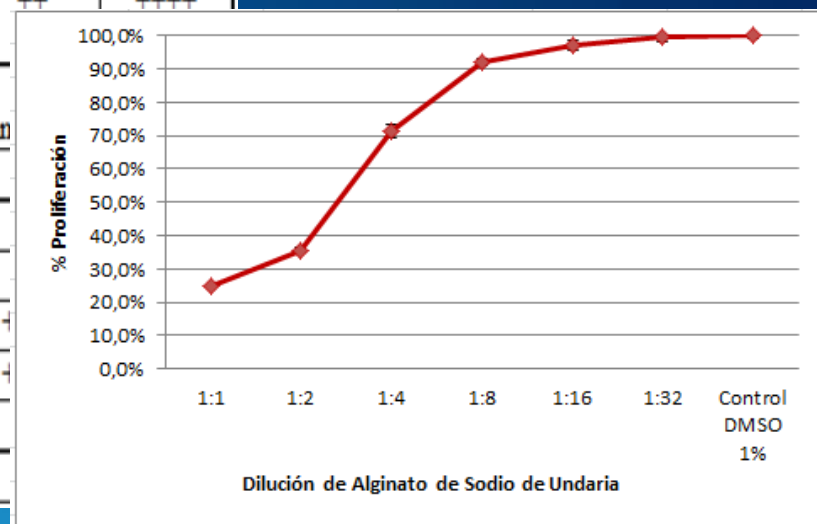


Fracción	Monosacáridos (moles %)							
	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Glc	Gal	Manitol
E ₁	-	-	1	-	-	tr	1	98
E ₂	-	4	2	-	-	-	2	91
E ₃	4	63	tr	7	6	2	17	-
E ₄	12	59	tr	-	9	1	18	-
E ₅	9	58	-	tr	9	6	16	-

Undaria pinnatifida



Grupo Fitoquímico	<i>Upp</i>		<i>Upv</i>		<i>Upo</i>		<i>Upi</i>	
	EOH1	EOH2	EOH1	EOH2	EOH1	EOH2	EOH1	EOH2
Hidratos de Carbono	+++	+++	++	++	++	+	++	++++
OH fenólicos	+	+	+	+	+	+	+	+
Taninos	-	++	-	-	++	++		
Esteroides	+	+	-	-	-	+		
triterpenos	-	+	+	+	+	+		
Cardenólidos	+++	++	+	+	++++	++		
Péptidos	+++	++	++	+	++++	++		
Lípidos	++	++	+	+	-	-		
flavonoides	-	-	-	-	-	-		



Escobar Daza, M.D. et al., *Naturalia patagónica* ,9:61-75, 2016.

Muestras	rham (%)	xyl (%)	glc (%)	gal (%)	man (%)	Proteínas (%)
AlgUPP	28,0	17,0	18,54	20,4	20,0	1,56
AlgUPV	27,0	12,0	19,0	21,4	21,05	2,5
AlgUPO	20,37	8,90	13,0	14,0	14,0	1,63
AlgUPI	15,0	6,48	10,17	11,0	11,0	2,05

Grupo Fitoquímico	Undaria pinnatifida				Mytilus edulis		
	Up otoño		Up invierno				
	EOH1	EOH2	EOH1	EOH2	HP	C	M
Hidratos de Carbono	++	+	++	++++	+	++	+
OH fenólicos	+ (amarillo)	+ (amarillo)	+ (amarillo)	+ (amarillo)	-	-	-
Taninos	++	++	+	+	-	-	-
Esteroides	-	+	-	-	+	+	+
triterpenos	+	+	+	+	+	+	+
Cardenólidos	++++	++	++++	+++	-	-	-
a.a. / péptidos	++++	++	++++	+++	+	+	+
Antraquin.	-	-	-	-	-	-	-
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-
Lípidos	-	-	+	+	+	+	+

PICTO GSJ 36871

X Congreso Chileno Micro y Macroalg 2017

Ulva (Ulvaceae): lúá, luga-luga, para inflamaciones internas, gota, escrófulas



Ulva rigida

Ulva lactuca

Punta Maqueda

Punta Borja



Otoño

Invierno

Primavera

Verano

Extracción

Lípidos

Estudios biofarmacológicos

Estudio
ficoquímico

Pigmentos

Uhrich et al.,
Ars Pharmaceutica, 57 (2): 67-75, 2016.

Ulva rigida

Estudios
cromatográficos

Punta
Maqueda

Primavera

4

estaciones
del año

Decocto - EOH

Decocto y
fracciones

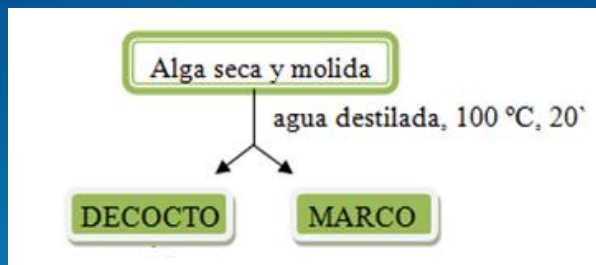
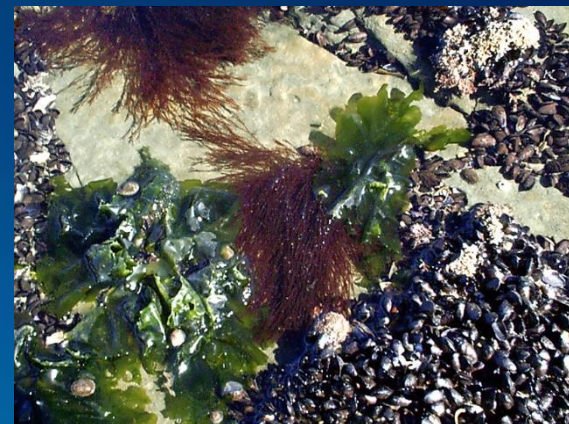
Actividad
farmacológica

Análisis
químico
cuantitativo

Estudios
Biofarmacológicos



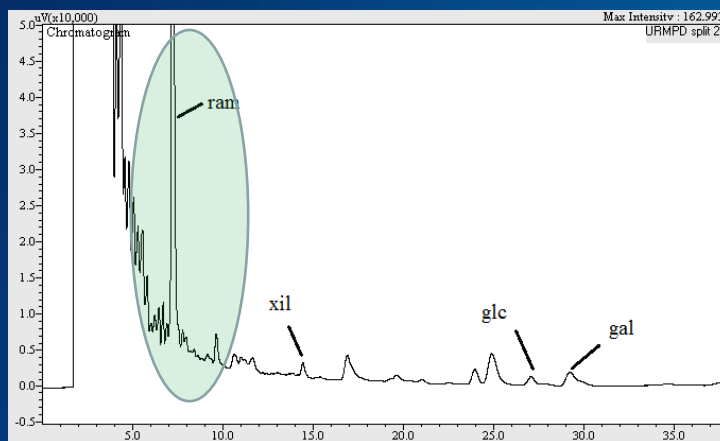
Ulva rigida Punta Maqueda Decoctos



Muestras	man (%)	gal (%)	ram (%)	xil (%)	Sulfatos (% SO ₄ ⁻²)	Proteínas (%)	Acidos Urónicos (%)	Fenoles (%)
URMO-D	6,6	10,3	10,1	5,8	22,8	2,4	10,3	0,3
URMI-D	4,1	6,4	8,0	4,5	16,5	3,0	9,3	0,9
URMP-D	11,4	17,9	18,8	10,7	28,7	5,4	9,3	0,6
URMV-D	16,3	25,6	26,0	14,8	14,6	3,0	9,1	0,3

Muestras	man (%)	gal (%)	ram (%)	xil (%)	Fenoles (%)	Proteínas (%)
URMO-d	58,8	43,4	33,7	23,9	2,0	15,3
URMI-d	24,5	18,1	14,4	10,3	0,5	22,2
URMP-d	100,0	90,1	59,7	42,2	6,0	33,8
URMV-d	75,6	54,2	42,7	30,2	1,0	1,5

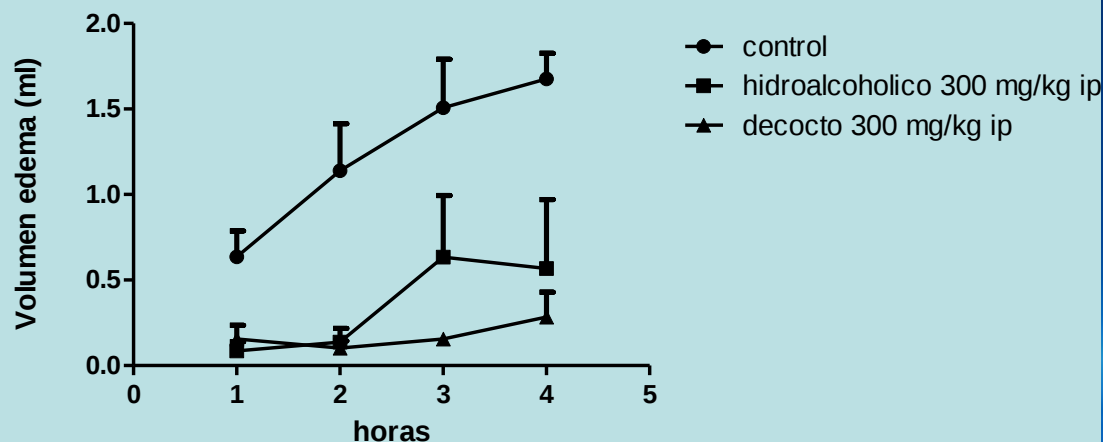
Determinación de monosacáridos componentes mediante Cromatografía Gaseosa - MS



Muestra*	ram	ara	xil	glc	gal
URMP-D	93,1	-	1,8	1,4	3,7
URMP-di	95,2	1,6	3,2	-	-

*hidrolizadas con TFA 2 M.

Test de carragenina



Decocto URMP



**40 % inhib. Caco 2
y MCF-7**

Grupos	Dosis (mg/kg)	Volumen del edema (ml)				% de inhibición
		1 h	2 h	3 h	4 h	
control	-	0,635	0,14	1,5	1,675	-
EHA	300	0,085	0,137	0,635	0,567	71,38
D	300	0,155	0,136	0,155	0,285	86
Indometacina	10	0,07		0,46	0,52	71,88

Colliguaya integerrima (Euphorbiaceae)



Acido graso	<i>C. integerrima</i>	<i>R. communis</i>
C-14	+	-
C-16	+	+
C-16:1	+	-
C-18:1(9)	-	+
C-18:1, OH	+	+
C-18:2	+	-

EXTRACTO/ FRACCION	SUSTANCIAS CARACTERIZADAS
E3	Kaempferol, Miricetina-3,7,3',4'-tetraM
E4	Datiscetina , Kaempferol, K-3-glc Miricetina, M-3-glc
E5	Kaempferol, Pelargonidina, Delfinidina, Gal, Glc
Eac	Kaempferol, Pirogalol, Ac. sinápico, Floroglucinol

Pinto Vitorino et al, *Jor de Inv y Tec en el contexto del desarrollo patagónico*, PEIP, Vol I: 64-67, 1998.

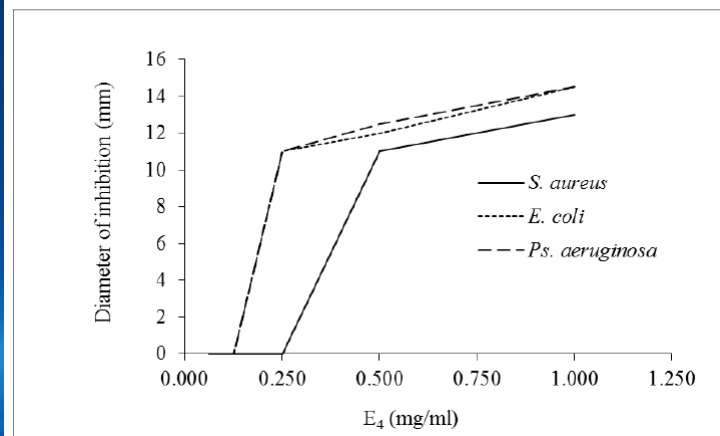
Pinto Vitorino et al, *Acta Farm. Bonaerense*, 23 (4): 459-465, 2004.



Parte vegetal	Hidratos de Carbono (%)* T.amb. 80 °C		Sulfato (%)* T. amb. 80 °C		Monosacáridos componentes	Fenoles totales (%)*	Flavonoides (%)*
Semillas	2,8	1,4	2,9	1,2	glucosa, fructosa	n.d.	n.d.
Inflorescencias	7,7	4,6	11,8	2,3	galactosa, manosa, xilosa	12,9	18,2
Partes aéreas	5,7	1,5	8,4	6,2	galactosa, glucosa	12,9	6,2

Metabolites	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅
Carbohydrates	-	-	-	-	+
Proteins	-	-	-	-	+
Lipids	-	+	-	+	-
Flavonoids	-	-	+	+	+
Tannins	-	-	-	+	+
Triterpenes	+	-	+	-	-

Antimicrobial activity of E₄ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*.



Antioxidant activity by DPPH method of extracts of leaves of *C. integririma*.

Fractions	Solvent	Antioxidant activity	
		Inhibition (%)	SC ₅₀ (μg/mL)
E _t	Metanol	70.4	12.04
E ₁	Petroleum ether	81.3	14.71
E ₂	Chloroform	89.1	53.43
E ₃	Ethyl ether	68.4	6.90
E ₄	Ethyl acetate	68.7	5.75
E ₅	Water	72.8	7.99

Biological activity of ethyl acetate fraction (E₄) of leaves of *C. integririma*.

Sample	MIC (mg/mL)			Inhibition (%)		SC ₅₀ (μg/mL)	Cytotoxicity (μg/mL)
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	0.5	1.0		
E ₄	0.25	0.50	0.25	92.4	95.9	5.75	1179.30

Suaeda divaricata (Chenopodiaceae)

Típica marisma de la Patagonia austral, dominada por una compacta alfombra de pocos centímetros de alto formada por picles de mar (*Sarcocornia perennis*). Esas marismas son ambientes exentos del aporte de ríos caudalosos, caracterizados por la amplitud de las mareas, cuya diferencia vertical entre bajamar y pleamar puede alcanzar los 14m. Los canales de marea llegan fácilmente a los 6m de profundidad.



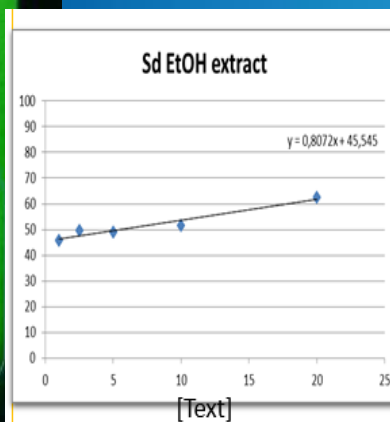
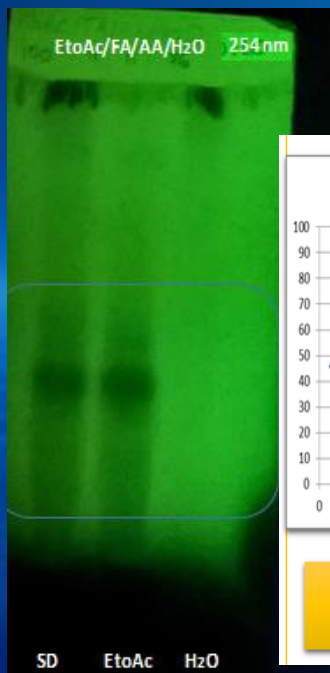
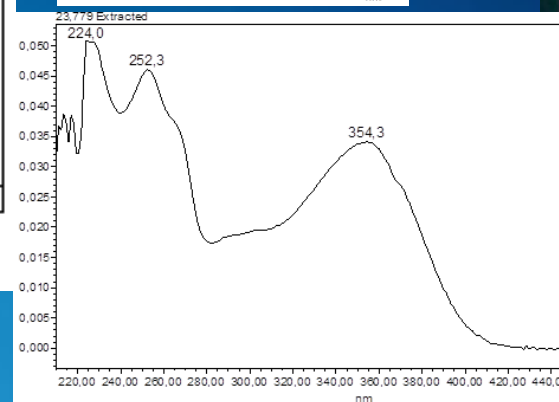
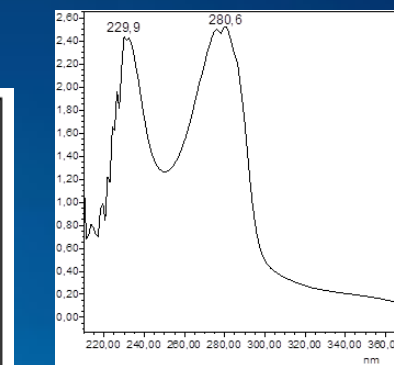
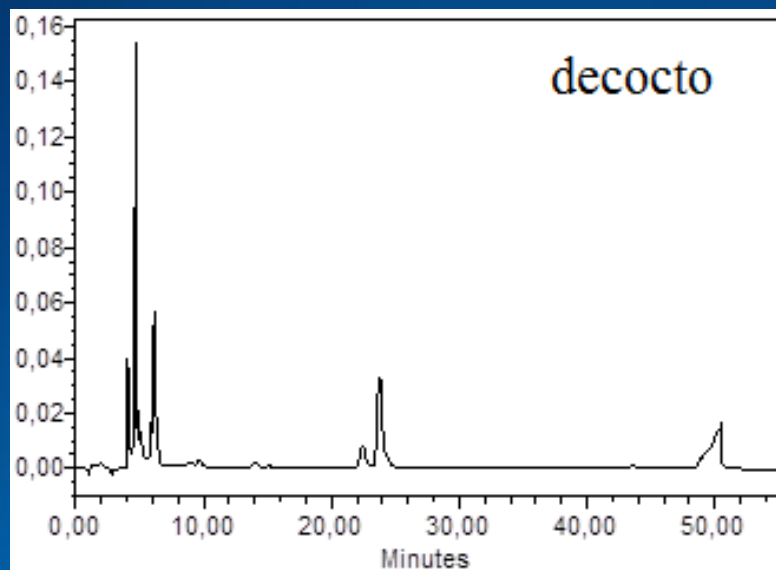
Marisma de *Spartina* spp., *Sarcocornia perennis*, *Limonium brasiliense*, *Atriplex lampa*, *A. vulgatissima* y *Suaeda divaricata*.

Dr. Alejandro Bortolus - CENPAT

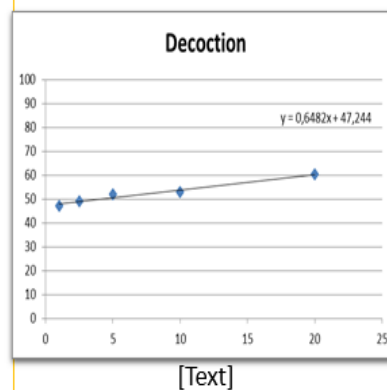


Metabolites	Fraction A	Fraction B	Fraction C	Decoction H ₂ O	Infusion H ₂ O
Flavonoids	√			√	√
Lipids	√				
Carbohydrates	√			√	√
Terpenoids			√	√	√
Steroids		√			
Quinones			√	√	√
Alkaloids					
Tannins					
OH Phenolics	√			√	√

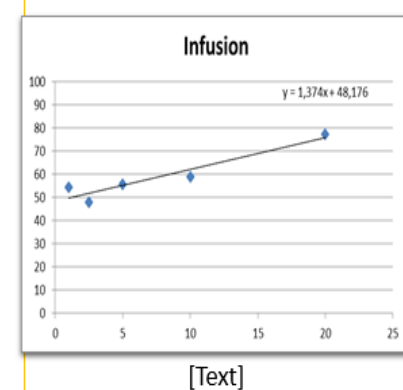




IC₅₀=5,52μg/mL



IC₅₀=4,25μg/mL



IC₅₀=1,33μg/mL



CONCLUSIONES

- Los resultados aportan al conocimiento integral a la vez que guardan relación con los principales usos descriptos para las especies.
- Los estudios estacionales permiten seleccionar racionalmente la época de colecta óptima.
- Los resultados químicos y de actividad biológica demuestran la influencia geográfica en las estrategias metabólicas de los organismos.
- Las especies evidencian perspectivas para una potencial utilización.

PROYECCIONES

- Estudios metabólicos, los que constituyen un nuevo horizonte en las investigaciones con miras a desarrollos de productos de valor agregado.
- Interacciones con otros organismos. *J. Marine Biolog. Assoc. U.K.*, doi:10.1017/S0025315416000667. 2016.
- Empleo de los productos en la industria textil y en obesidad / diabetes.
- **Micro / nanoencapsulación de biomasa / productos de microalgas aisladas de efluentes industriales para alimentación animal.....**

GRUPO DE TRABAJO - VINCULACION INTERDISCIPLINARIA

GQBMRNP y AAI – CRIDECIT – FCNyCS – UNPSJB QUÍMICA ORGANICA - FCEN – UBA

. Dra. María L. FLORES - Farmacognosia

Farm. Miriam ESCOBAR DAZA

Farm. Ana María CANGIANO

Farm. Elisabet BRAIDOT

Farm. Diana P. QUEZADA

Farm. Florencia RONDINI

Farm. Ayelén MONTENEGRO HERRERA

- **Dra. NM Andrea PONCE**

- **Dr. Carlos A. STORTZ**

FARMACOLOGIA - FFyB – UBA

- **Dr. Carlos TAIRA**

- **Dra. Susana GORZALCZANY**

FARMACOGNOSIA - FFyB – UBA

- **Dra. Graciela FERRARO (Q.E.P.D.)**

FARMACIA – UV – CHILE

- **Dra. Caroline WEINSTEIN-OPPENHEIMER**

ANTROPOLOGIA y ESTET. - UNPA

- **Dr. Aldo ENRICI**

METABOLOMICA – Leiden - Holanda

- **Dr. Yang CHOI**

- **Dr. Robert VEERPORTE**

- **Dra. Erica WILSON**

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

- **Dra. Marina KRITSANIDA**

- **Dr. Raphael GROUGNET**

- **Dra. Sylvie Michel**

FP7-PEOPLE-2010-IRSES

UNIV. CATOLICA DEL NORTE - Chile

. Dr. Osvaldo L. CORDOBA – Qca. Biológica II

Dra. Mónica BECERRA

Alum. Soledad NAMUNCURA

. Dra. Sandra M. ALCALDE – Farmacología I

. Dra. Analía V. UHRICH – Farmacología II

. Farm. Adriana OUVIÑA – Farmacognosia UBA

. MSc. Mariana JIMENEZ VEUTHEY - UNNE

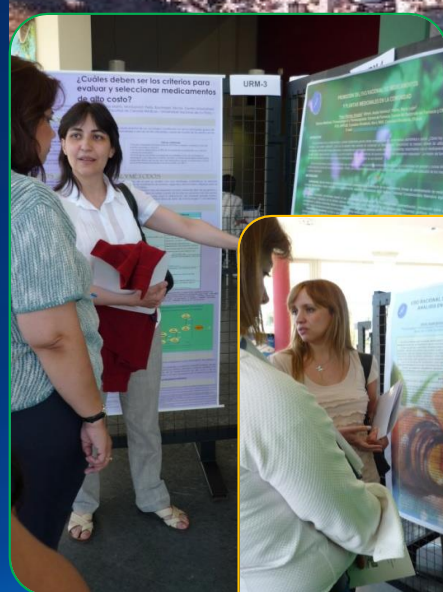
GQM - CRIDECIT

. Dra. Graciela PINTO VITORINO – Química Medicinal

. Dr. Alfio ZAMBON

. Dra. Luz Alejandra ARANCIBIA

**FARMACOGNOSIA, QUIMICA BIOLOGICA
II, DOCTORADO EN FARMACIA –
GQBMRNP, AAI, GQM - CRIDECIT –
FCNyCS– UNPSJB - Km 4 - 9000 - Comodoro
Rivadavia - Chubut - Argentina**



Financiamiento de la investigación:

- FONCYT: PME 216
- PICTO GOLFO SAN JORGE 36871.
- PNUD ARG 02/018 BB-34.
- PI 10/C211 UNPSJB - CIPAMCO.
- PROMFYB B2-Farmacia, A. Farmacognosia.
- PI Chubut, Res. SCTeI 07/10
- IRSES FP7 ChemBioFight



Muchas Gracias!