

Informe final publicable de proyecto

?Estudio de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del primer fitofármaco registrado en Uruguay: identificación y evaluación de la capacidad bioactiva de metabolitos de Oenotina B?

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_156225

Fecha de cierre de proyecto: 30/12/2022

FERREIRA CHIESA, Fernando Amaury (Responsable Técnico - Científico)

ARAUJO MARTINEZ, Milton Martin (Investigador)

ARAÚJO MARTINEZ, Milton Martín (Investigador)

KRAMER XAVIER, Maria Gabriela (Investigador)

LAVAGGI DESTRO, María Laura (Investigador)

MININI RIVAS, Lucía (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO DE RIVERA \\\

FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

La Oenoteína B (OeB) es un tanino presente en las plantas herbáceas del género *Epilobium*. En Uruguay los extractos de *Epilobium* fueron registrados como especialidad farmacéutica para su uso en el tratamiento de HBP, siendo el primer fitofármaco registrado en el país. Se cree que OeB es la responsable de dicha actividad. En el presente proyecto se optimizó un procedimiento para obtener OeB de alta pureza a partir de un extracto acetónico de *Epilobium parviflorum*. La OeB obtenida fue sometida a diferentes condiciones de estrés que permitieron simular su pasaje por el tracto gastrointestinal. De lo anterior pudo determinarse que la OeB solo se ve alterada a un pH 7 y que las enzimas participantes no son las responsables de dicha alteración. A su vez pudo determinarse mediante análisis de la etapa intestinal a distintos valores de pH y mediante simulaciones con software que el pH óptimo para la absorción de OeB en el intestino sería a pH 4.5 correspondiendo a la región proximal del intestino. Mediante la metabolización in vitro y la simulación en software fue posible determinar que la OeB no es metabolizada por las enzimas presentes en la fracción subcelular S9.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Farmacología y Farmacia / Biodisponibilidad de fitofarmacos

Palabras clave: Oenoteína B / Hiperplasia benigna de próstata / /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El género *Epilobium* de plantas herbáceas perennes consiste en 200 especies estrechamente relacionadas distribuidas alrededor del mundo [1,2]. Especies de este género originarias de Europa y América del Norte han sido empleadas como plantas medicinales. Han sido utilizadas ampliamente para el tratamiento de diversas dolencias, como hiperplasia benigna de próstata (HBP), infecciones en la piel, úlceras de estómago, hemorragias uterinas, problemas reumáticos y desórdenes gastrointestinales [1,2]. En Uruguay los extractos de *Epilobium* fueron registrados como especialidad farmacéutica para su uso en el tratamiento de HBP, siendo el primer fitofármaco registrado en el país [3,4]. Hoy en día se comercializan extractos para su uso como automedicamento en forma de infusión. Las especies más comunes incluyen *E. parviflorum*, *E. hirsutum* y *E. angustifolium* [1]. Se ha reportado que extractos de *Epilobium* presentan diversas actividades in vitro, incluyendo antibiótica, antiinflamatoria, antioxidante, antitumoral y efectos antiandrogénicos [1-13]. Dentro de estos extractos los compuestos con actividad biológica conocida consisten en flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y derivados de beta-sitosterol. Es importante destacar que la oenoteína B (OeB) ha sido señalada como la principal responsable de las actividades biológicas atribuidas a los extractos polares [1-2,14-15]. Esto ha generado que se evalúe la actividad in vitro de OeB en distintos blancos terapéuticos.

Dentro de los diferentes blancos terapéuticos de la OeB la hiperplasia benigna de próstata (HBP) se ha estudiado la capacidad inhibitoria de este tanino frente a la actividad de las enzimas 5-alfa-reductasa ($IC_{50} = 0.44 \text{ microM}$) y aromatasa (33% inhibición a 50 microM), enzimas claves para la progresión de HBP [16]. Adicionalmente se ha relacionado su actividad con la reducción en la proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata como PC-3 (de cáncer de próstata), LNCaP (de cáncer de próstata hormono-dependiente) y PZ-HPV-7 (de cáncer de próstata transformada con HPV-18), sin afectar la proliferación de fibroblastos humanos normales (NHDFs) [17-18]. Recientemente mediante ensayos in vitro se ha determinado que OeB también es capaz de inhibir la proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón A549 [19].

A pesar del amplio conocimiento de la actividad de OeB en diversos blancos terapéuticos, poco se conoce acerca de su metabolismo y biodisponibilidad, lo que genera complicaciones al extrapolar los resultados de la actividad biológica en ensayos in vitro a estudios in vivo utilizando extractos enriquecidos en OeB [2,18]. Cabe destacar que este tipo de tanino de elevado peso molecular presenta una biodisponibilidad limitada en sistemas biológicos debido a su baja solubilidad en medios biológicos, estabilidad y permeabilidad de membrana [20].

Actualmente, se han realizado esfuerzos para conocer más acerca de la biodisponibilidad de OeB, se ha intentado determinar qué tipo de metabolitos genera una vez que es expuesto a la microbiota intestinal mediante ensayos ex-vivo [16,20]. En estos estudios se determinó que la mayoría de los taninos generan como producto final de metabolismo estructuras denominadas urolitinas, teniendo como excepción a OeB.

En base a esta discusión acerca del desconocimiento de la biodisponibilidad de OeB surgió el tema central del presente proyecto en el cual se pretendía identificar mediante ensayos in vitro si se generan nuevas moléculas a partir de OeB en su paso por el tracto gastrointestinal, y de generarse nuevas moléculas si presentan actividad en los blancos terapéuticos de OeB.

Para esto se pretende estudiar cuáles serían las transformaciones químicas y enzimáticas que sufre OeB en su paso por el tracto gastrointestinal. Se estudiarían las transformaciones químicas, teniendo en cuenta el medio al cual se someten en la fase gástrica, para esto se realiza el estudio de los compuestos derivados de OeB generados en condiciones ácidas. Adicionalmente se pretenden estudiar tanto las transformaciones químicas como enzimáticas de OeB cuando atraviesa el tracto gastrointestinal. Para esto se simularía la fase gástrica e intestinal teniendo en cuenta las condiciones del estómago e intestino (temperatura, pH, tiempo, composición química del ambiente y enzimas). Para simular el pasaje se realizaría un modelo estático y otro basado en una aproximación al modelo dinámico. A su vez se estudiaría la metabolización tanto de OeB como de los compuestos derivados del pasaje por la fase gástrica e intestinal. Debido a que los datos de la metabolización en ratones no son extrapolables a humanos se realizaría el ensayo de metabolización in vitro empleando la fracción S9 humana.

Las eventuales nuevas moléculas obtenidas de las transformaciones y metabolización de OeB serán aisladas e identificadas para posteriormente evaluar su actividad biológica en los blancos terapéuticos conocidos para OeB.

Con el presente proyecto se espera aportar información relevante para comprender y mejorar el uso de extractos de *Epilobium* como fitofármaco contra la HBP, uno de los usos más relevantes en nuestro país. Al conocer la efectividad in vitro de OeB y sus derivados en este blanco terapéutico se podrá proponer formas de optimizar el uso del fitofármaco en esta dolencia.

También se espera aportar información acerca de la actividad tanto de OeB como sus derivados en los demás blancos terapéuticos propuestos y que los resultados obtenidos aporten información para desarrollar distintas estrategias para el desarrollo de fitofármacos derivados de OeB lo que permitirá potenciar su actividad en los distintos blancos terapéuticos abordados.

Metodología/Diseño del estudio

-Optimización de la obtención de Oenoteína B a partir de *Epilobium parviflorum*:

Se propusieron distintos métodos:

E1 - maceración de 20 g de material vegetal en 400 mL (acetona:agua 70:30) con agitación mecánica por 16 hs. (metodología previa en el grupo de trabajo)

E2 - maceración de 20 g de material vegetal en 400 mL (acetona:agua 30:70) con agitación mecánica por 16

hs.

E3 - maceración de 10 g de material vegetal en 200 mL (acetona:agua 70:30) sometido a ultrasonido por 20 min a temperatura ambiente.

E4 - maceración de 10 g de material vegetal en agua (1:20) incubado a 40 °C en un baño de ultrasonido por 1 h

E5 - maceración de 10 g de material vegetal 70 % metanol (1:20) incubado a 40 °C en un baño de ultrasonido por 1 h

-Purificación del extracto acetónico mediante de cromatografía semi-preparativa:

La purificación se realizó en dos pasos, primero se realiza un pasaje del extracto en una columna de mayor calibre se aíslan las fracciones seleccionadas, se rotaevapora el solvente orgánico y se liofiliza. Posteriormente se resuspende el sólido liofilizado y se inyecta en una columna de menor calibre, las fracciones aisladas de este procedimiento se identifican como OeB de alta pureza.

Cromatógrafo: HPLC preparativo WATERS 2545 empleando una fase móvil isocrática H₂O:ACN y como fase estacionaria C18.

1- Pasaje de extracto crudo de OeB por columna preparativa

? Se utilizaron 10 g de extracto acetónico. Para cada corrida se pesó 1 g del extracto el cual se suspendió en agua al 0.1 % TFA y se centrifugó por 3 minutos a 1350 rpm.

? Las fracciones recolectadas se seleccionaron según el resultado de ensayo con FeCl₃. Las fracciones positivas se analizaron por TLC y se reunieron las fracciones con igual perfil cromatográfico.

? Se colectaron las fracciones seleccionadas, se rotaevaporó el ACN y se liofilizó.

2- Pasaje de fracciones seleccionadas por columna semipreparativa

? Materia prima: aproximadamente 1,5 g del producto obtenido en la etapa anterior

? Se realizaron 8 corridas sembrando aproximadamente 150 mg por corrida

? Las fracciones se analizaron y reunieron empleando la misma técnica que en la etapa anterior.

? Las fracciones seleccionadas se reunieron, se rotaevaporó el ACN y se liofilizó el producto.

- Digestión ácida de OeB

? Degradación ácida de OeB a 100 °C en bloque térmico: Se disolvieron 5 mg de OeB en 6 mL agua destilada en presencia de 10 µL de HCl 1 M. La mezcla se agitó en vortex durante 1 minuto. La mezcla se colocó en bloque seco a 100 °C. Se tomaron alícuotas de 0.6 mL a 1, 2, 4 y 24 horas. Luego de alcanzar temperatura ambiente se ajustó el pH a 3.0. A cada alícuota se le agregaron 0.4 mL de fase móvil. Se filtró por PDVF 0.45 mm.

? Degradación ácida de OeB a 37 °C en bloque térmico: Se disolvieron 5 mg de OeB en 6 mL agua destilada en presencia de 10 µL de HCl 1 M. La mezcla se agitó en vortex durante 1 minuto. La mezcla se colocó en bloque seco a 37 °C 100 °C. Se dejó que la solución alcance la temperatura ambiente, y ajustó el pH a 3.0. Seguidamente, se llevó a 10 mL con fase móvil. Se filtró por PDVF 0.45 mm.

? Las muestras obtenidas de los ensayos de degradación se analizaron por TLC y HPLC, adicionalmente a

estas muestras se analizaron muestras de OeB sin degradar, ácido gálico (posible producto de degradación de la OeB) y ácido tánico como referencia de una muestra de tanino.

? Análisis por HPLC: HPLC Thermo Dionex 3000 series (Thermo Corporation). Condiciones de análisis: gradiente de ácido fórmico acuoso (0.1%): acetonitrilo. Columna Zorbax C18 25 cm x 5 mm x 4.6 mm. Flujo: 1.0 mL/min. V: 10 µL. detección: 270 nm y 335 nm.

- Simulación a través del tracto gastrointestinal utilizando el modelo INFOGEST [21]

Con esta simulación se pretende conocer mediante una simulación in vitro si se obtienen compuestos relacionados a la OeB cuando se la somete a condiciones similares a las esperadas en su pasaje por el tracto gastrointestinal.

Preparación de reactivos y muestras

Preparación de reactivos:

Las actividades de todas las enzimas digestivas y la concentración de sales biliares se determinaron experimentalmente previo a realizar la digestión. Para ello se utilizaron ensayos estandarizados recomendados para amilasa, pepsina, lipasa y pancreatina [22].

Preparación de muestras:

- Blanco: la solución de OeB fue sustituida por 1 mL de agua destilada.
- OeB: se disuelven 10 mg de OeB en 10 mL de solvente mediante agitación por vortex.

Muestras evaluadas:

Se trabajó con muestras de control (blanco de solvente y estándar de OeB) así como también muestras de OeB sometidas a diferentes condiciones de digestión:

- ? Blanco (agua destilada)
- ? OeB 1
- ? OeB 2
- ? OeB sin pancreatina
- ? OeB sin bilis
- ? OeB sin bilis y pancreatina (efecto del pH)

? Se estudió la cinética de digestión de la fase intestinal, dos muestras de OeB fueron expuestas sólo a la fase intestinal, se tomaron alícuotas a tiempo 0, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos.

? Estabilidad de OeB en buffer a pH 7.0 (buffer SIF vs. buffer fosfato). Se evaluaron las siguientes muestras:

- ? Blanco buffer fosfato pH 7.0
- ? Blanco buffer SIF
- ? OeB digerida en buffer fosfato pH 7.0 durante 120 minutos a 37°C (seguido de inactivación térmica): 10 mg

de OeB disueltos en 10 mL de buffer fosfato pH 7.0.

? OeB digerida en buffer SIF durante 120 minutos a 37°C (con ausencia de inactivación térmica): 10 mg de OEB disueltos en 10 mL de buffer SIF. Con posterior calentamiento de la muestra durante 2 horas a 37 °C.

? OeB digerida en buffer SIF durante 120 minutos a 37°C (con inactivación térmica): 10 mg de OeB disueltos en 10 mL de buffer SIF.

Procedimiento de digestión

El proceso de digestión de las muestras fue realizado según protocolo de Infogest 2.0 [21].

Se tomaron alícuotas de 500 uL la cuales se inactivaron por tratamiento térmico al final de la etapa oral (SSF) y de la etapa gástrica (SGF). La inactivación final en la etapa SIF fue realizada por tratamiento térmico sobre todo el volumen acumulado. De este modo, se alcanzó una concentración de OeB en la fase oral, gástrica e intestinal de 5.0; 2.25; 1.25 mg/mL respectivamente.

Estudio cinético de la fase intestinal, las muestras preparadas fueron sometidas a digestión intestinal únicamente. Se extrajeron alícuotas de 200 uL a tiempo: 0(T0), 10(T10), 30(T30), 60(T60), 90(T90) y 120(T120) minutos. Luego de cada extracción la alícuota tomada fue inactivada por tratamiento térmico.

Tratamiento de la muestra y posterior análisis por HPLC y TLC

Luego de llegar a temperatura ambiente las muestras fueron filtradas (0.22 um) y se inyectaron inmediatamente en el cromatógrafo HPLC Agilent 1100. Columna Nucleodur RP C18 250mmx4,6mmx5um, fase móvil 84:16 agua milliq (0.1% ácido trifluoroacético):acetonitrilo (0.1% ácido trifluoroacético), flujo de 1 mL/min, inyección de 10 uL y registro de cromatogramas a 270 nm. Los datos fueron recopilados y procesados utilizando el software Chemstation de Agilent technologies.

Se reservaron 10 uL de las mismas y se analizaron por TLC, fase estacionaria: gel de sílice 60 F 254, fase móvil: acetato de etilo: ácido acético: agua (3:1:1), siembra 10 uL, revelado por: luz uv a 254 y 356 nm además de asperjado con solución de FeCl3 1%.

- Metabolización in vitro con fracción subcelular S9

Para conocer si la OeB era metabolizada por las enzimas del complejo de las enzimas citocromo P450, se utilizó la fracción subcelular S9.

Se siguió el siguiente protocolo:

1- Se incuba fracción subcelular S9 en buffer fosfato pH con el compuesto a 37 C

183 uL buffer fosfato 0.1 M pH 7.2

2uL compuesto

5 uL S9 20 mg/mL

2- Se adiciona 10 uL de NADPH a 20 mM (volumen final del ensayo 200 uL)

3- Incubar por 60 min a 37 C con agitación suave

4- Agregar 2 volúmenes de ACN

5- Filtrar y analizar por HPLC

- Inhibición enzimática de la 5-alfa reductasa

1- Obtención de un homogenizado de próstata

Para la obtención del homogenizado de próstata de rata se siguió el siguiente protocolo (las próstatas fueron administradas por el bioterio de la Facultad de Medicina bajo el protocolo número 070151-000032-22 [23])

1- Las próstatas son tomadas de las ratas 5 minutos después de la muerte y son puestas en una solución agua-hielo 0.9 % de NaCl.

2- Se le quita a la próstata la grasa y el tejido conectivo, se corta y se pesa (la manipulación se realiza de 0-4 C)

3- Por cada gramo de próstata se agregan 3 mL de buffer fosfato 20 mM pH 6.5 conteniendo 0.32 mM de sacarosa y 1mM de DTT.

4- El tejido se homogeniza con strokes de 10 seg a 20500 rpm en un ultraturrax (IKA) en intervalos de 60 seg.

5- El homogenizado se filtra con una estopilla y se centrifuga por 60 min a 105000 g.

6- El pellet obtenido se resuspende con buffer fosfato y se repite la centrifugación.

7- El pellet final es resuspendido con un mínimo volumen de buffer fosfato almacenado en alícuotas de 300 mL a -70 C.

8- Se calcula la cantidad de proteína mediante un método de dosificación de proteínas, valor estimado (15-25 mg/mL).

2- Ensayo de inhibición de la enzima 5-alfa reductasa

Método para cuantificar la progesterona a partir de HPLC: cromatógrafo HPLC Agilent 1100 se utilizó una columna Nucleodur RP C18 250mmx4,6mmx5um, fase móvil 80:20 acetonitrilo:agua milliQ, flujo de 1 mL/min, inyección de 10 uL, tiempo de corrida de 10 minutos y registro de cromatogramas a 254 nm. Los datos fueron recopilados y procesados utilizando el software Chemstation de Agilent technologies.

Protocolo de inhibición de 5-alfa-reductasa [23]

1- Realizar mezcla de incubación, conteniendo homogenizado de próstata (cantidad de proteínas 250 ug), la OeB a 100 uM y 250 uM de NADPH.

2- La mezcla se incuba a 37 C por 30 minutos.

3- La reacción comienza con el agregado del sustrato progesterona (0.2 uM), volumen final del ensayo 250 uL.

4- La reacción se corta con la adición de 50 uL de una solución 5mM de HgCl y se extraen los esteroides con 0.5 mL de dietiléter. La fase orgánica se rotaevapora y se resuspende en FM para analizar por HPLC.

5- Se realizan muestras blanco, sin el agregado de inhibidor y con inhibidor

6- El porcentaje de inhibición se calcula como: %inh = $\frac{\text{area test} - \text{área blanco}}{\text{área test} + \text{área blanco}} \times 100$

Resultados, análisis y discusión

-Optimización de la extracción: para seleccionar la metodología que nos permitiera una mejora en el método empleado en el grupo de trabajo (E1) se determinó el porcentaje de rendimiento de las metodologías evaluadas en términos de rendimiento respecto a la masa seca de material vegetal (Tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de rendimiento de cada método utilizado para la extracción de OeB.

Método % Rendimiento

E1 19.6

E2 24.2

E3 10.4

E4 18.1

E5 13.4

Dentro de los métodos utilizados se obtuvo que el método E2 con las proporciones de solvente orgánico modificadas respecto a E1 (método de referencia), permite una mejora importante en el porcentaje de rendimiento.

-Purificación del extracto acetónico mediante de cromatografía semi-preparativa:

El procedimiento en ambos pasos se siguió mediante los cromatogramas a 270 nm para la selección de las fracciones se realizaron TLC sin desarrollar como se detalla en metodología. Se deja un ejemplo para el cromatograma y TLC (Figura 1).

A partir de la metodología descrita anteriormente fue posible obtener unos 800 mg de OeB de alta pureza, obteniendo un porcentaje de recuperación respecto a la masa de extracto acetónico igual al 0.08 %.

-Degradación ácida de OeB

A partir del análisis de la degradación ácida a 100 °C por 24 hs se pudo determinar que la OeB no sufre degradación significativa, ya que no se generaron nuevos compuestos de degradación hasta el tiempo de muestreo 4 horas a 100°C, pero si se observan nuevos productos luego de 24 hs (Figura 2).

A su vez, mediante el análisis de la degradación ácida 37°C-2H, tampoco se observó una degradación significativa de OeB para el tiempo analizado (Figura 3).

Dentro de los nuevos picos que se observan en la degradación a 100 °C (Figura 2) fue posible identificar un pico con un tiempo de retención (tr) igual a 5.983 min (tr del ácido gálico en estas condiciones de trabajo es 5.967 min) cual se corresponde con el tr del ácido gálico obtenido con la misma metodología. Por tanto, mediante el análisis es posible concluir que el ácido gálico podría ser uno de los compuestos de descomposición de la OeB, lo cual es coherente teniendo presente la estructura de la OeB. A su vez en la degradación ácida de OeB 100°C-24H se obtuvieron otros picos correspondientes a compuestos degradados nuevos. Los compuestos nuevos no fueron identificados, esto se debe a que los mismos se obtuvieron en condiciones muy extremas las cuales no se corresponden con los que podría suceder en el tracto gastrointestinal.

No se observaron manchas de compuestos degradados en las concentraciones de trabajo en las bandas sembradas para: ST OEB, OEB H+/1H, OEB H+/2H, OEB H+/4H y OEB H+/24H correspondientes a: soluciones de OeB (sin degradar) y soluciones de OeB (degradación ácida 100°C-1, 2, 4 y 24 horas) respectivamente

(Figura 4).

- Simulación a través del tracto gastrointestinal con el protocolo INFOGEST

Muestras SSF (fase oral), se apreció un leve descenso de OeB con respecto a la cantidad de partida (95,8 %A/A), la misma no es significativa y no puede deberse a las enzimas que constituyen esta fase debido a que OeB no es sustrato de la misma. Resta por determinar el efecto que puedan tener el pool de sales que constituyen el buffer de esta etapa, además de la no generación de degradados luego de la inactivación térmica .

Muestras SGF (fase gástrica): por HPLC se evidenció que el blanco SGF presentaba al menos cuatro compuestos con un tr de: 2,384; 2,655; 3,431 y 7,122 minutos, respectivamente. Los resultados obtenidos para todas las muestras: OeB 1, OeB 2, OeB SIN BILIS, OeB SIN PANCREATINA, OeB SIN BILIS-PANCREATINA son comparables entre sí. No se evidenciaron nuevos compuestos relacionados a los detectados en la fase SSF. La ausencia de compuestos relacionados en la etapa SGF, podría deberse a la estabilidad que tiene la OeB en pH levemente ácido. Este comportamiento es coincidente con los estudios de digestión ácida.

Muestras SIF (fase intestinal): por HPLC se evidenció que el blanco SIF presentaba al menos cinco compuestos con un tr de: 2,384; 2,659; 2,933; 3,444 y 7, 047 minutos, respectivamente. Los resultados obtenidos para todas las muestras: (OeB 1, OeB 2, OeB SIN BILIS, OeB SIN PANCREATINA, OeB SIN BILIS-PANCREATINA son comparables debido a que en todos los casos se evidencia la degradación casi total de OeB una vez culminada la etapa. Cabe destacar que ni los ácidos biliares, ni la pancreatina son las responsables de la degradación de OeB. Esto se concluye al observar la muestra en que ambas sustancias están ausentes en la muestra: OeB SIN BILIS-PANCREATINA-EFECTO DEL pH). En este marco, se podría decir que el pH básico de la etapa SIF es el principal responsable de la degradación de la OEB.

- Estudio cinético de la digestión intestinal de OeB: reveló que a tiempo T0 la mayor parte de la OeB se había degradado. En tiempos posteriores (10 y 90 minutos) la cantidad de OEB permaneció relativamente constante, hasta llegar a un valor al finalizar la fase intestinal correspondiente con los valores obtenidos anteriormente en la primera instancia de trabajo. Cabe señalar que el compuesto con tr de 19,091 minutos es detectado en esta prueba (Figura 5). Dado que la prueba involucra solamente a sustancias que constituyen la fase intestinal, y por la tanto no contiene el pool de sustancias que aportan las fase oral y gástrica, y habiendo detectado el compuesto en la fase oral (no se detectó en la gástrica) podemos afirmar que su señal es producida o por una sustancia presente en el buffer pH 7.0 (oral e intestinal) o que la misma es un compuesto relacionado de OeB que se genera en condición de pH 7.0.

-Estudio de estabilidad de solución de OeB digerida en buffer fosfato pH 7.0 durante 120 minutos a 37oC: La solución de OeB digerida no presenta coloración ámbar más intensa que el estándar, así como tampoco partículas en suspensión. Del análisis cromatográfico se aprecia que la OeB no sufre degradación significativa al ser digerida en buffer fosfato pH 7.0 durante 120 minutos a 37oC. El área obtenida para la OEB es comparable con el área de OEB encontrada en el estándar..

-Estudio de estabilidad de solución de OeB digerida en buffer SIF durante 120 minutos a 37oC (con ausencia o presencia de inactivación térmica): La solución de OeB digerida presenta coloración ámbar más intensa que el estándar tanto en ausencia como en presencia de inactivación térmica. La OeB sufre degradación

significativa al ser digerida en buffer SIF pH 7.0 durante 120 minutos a 37°C. Esto queda revelado al presentar un área correspondiente a OeB que es aproximadamente la mitad (6771 mUA/s) para la concentración de trabajo (14000 mUA/s). La OeB sufre una degradación mucho más significativa al ser digerida en buffer SIF pH 7.0 durante 120 minutos a 37°C seguido de inactivación térmica. Esto queda revelado al presentar un área correspondiente a OeB de 1771 mUA/s frente a la esperada de 14000 mUA/s.

-Digestión de OeB medio biorrelevante (pH 4.5): tras realizar las diferentes etapas del protocolo INFOGEST 2.0 para determinar disponibilidad para la absorción de OeB en diferentes regiones del tracto gastrointestinal se había arribado a la conclusión de que la OeB es estable y no presenta degradación significativa en la etapa bucal ni en la estomacal. En lo que respecta al pasaje por el intestino, con el protocolo INFOGEST 2.0, la OeB y/o sus compuestos relacionados se encontraron asociados al componente insoluble del medio de ensayo, y no fue encontrada en el sobrenadante, lo cual indicaría que la misma no estaría disponible para la absorción en la región media o distal del intestino. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y las simulaciones de digestión ensayadas, se analizó el grado de ionización de OeB a un pH 4.5 característico del intestino proximal, mediante el uso del software Chemicalize, cuyos resultados sugirieron que a dicho pH el compuesto se encontraría en un estado de ionización que le permitiría ser absorbido. Se obtuvo que el porcentaje de OeB no ionizada a pH 4,5 sería un 99%. Dado los resultados anteriores obtenidos usando protocolo INFOGEST 2.0 etapa SIF (pH 7 en la que no se evidencian taninos en las aguas, pero si en el precipitado) y lo reflejado por la simulación fisicoquímica realizada con Chemicalize se decidió simular la etapa SIF a pH 4,5. Cabe destacar que este es el pH que posee el intestino proximal, zona donde potencialmente podría ser absorbida la OeB hacia la circulación sistémica. Se logró evidenciar visualmente la presencia de taninos (OeB o compuestos relacionados) por desarrollo de color azul en los tubos de ensayo. En este caso se usaron como controles positivos alícuotas de solución estándar de OeB y ácido tánico las cuales desarrollaron un color azul intenso luego del agregado del revelador FeCl_3 %.

-En los análisis por HPLC se pudo observar que las muestras digeridas de OeB se pudo observar que la OeB presenta un tr de 21.642 minutos. En este caso la señal de la misma se ve disminuida respecto al estándar, lo que posiblemente indicaría que parte de la misma o se transformó a compuestos relacionados o se adhirió a los constituyentes del medio pH 4.5 quedando la misma en el precipitado. Luego de realizar la tinción de los precipitados se percibió desarrollo de coloración azul en los precipitados correspondientes a las digestiones de OeB. En marco podemos afirmar que parte OeB (o sus compuestos relacionados) se asocia a los constituyentes del medio pH 4,5 no solubilizados quedando no disponible para la absorción. Con estos resultados es posible concluir que la OeB se absorbe en el intestino proximal. En esta región (pH 4.5) su biodisponibilidad es máxima. En fracciones más alejadas del intestino (medio o distal) donde el pH se acerca más a la neutralidad, la biodisponibilidad de la misma baja considerablemente.

-Simulación de la metabolización de OeB con la fracción subcelular S9.

Mediante este procedimiento fue posible observar que la OeB presenta una amplia afinidad por las proteínas observándose su presencia en los pellet obtenidos luego de frenar las reacciones de metabolización con un solvente orgánico. Esto imposibilitaba evidenciar la presencia de OeB en los cromatogramas, estos resultados llevaron a buscar estrategias que permitieran seguir la reacción por HPLC. Se optó por acetonitrilo como solvente orgánico, por ser miscible con el agua. Esto permitió tomar las muestras, filtrarlas por 0.22 μm y posteriormente analizadas por HPLC. Luego de poner a punto el ensayo, se obtuvo que no se encontraron productos relacionados lo que se confirma realizando una co-siembra de OeB estándar y OeB metabolizada, donde no se evidencian compuestos relacionados (Figura 6).

Conclusiones y recomendaciones

En el presente trabajo fue posible obtener un procedimiento optimizado para la obtención de OeB a partir de *Epilobio parviflorum*. Se obtuvo una OeB de alta pureza con pocos pasos de purificación.

Mediante la digestión ácida fue posible concluir que la OeB es estable en medio ácido y solo se comienza a descomponer luego de 24 hs a pH 3.

El método INFOGEST permitió establecer que OeB no sufre una transformación significativa en su paso por la fase oral y por la fase gástrica. Además, la OeB resiste el estrés que es sometida la muestra durante la inactivación enzimática.

En la fase intestinal se obtiene una disminución en la cantidad de OeB recuperada luego de la inactivación, fue posible establecer que ni los ácidos biliares, ni la pancreatina son las responsables de la degradación de OeB. En este marco, se pudo concluir que el pH básico y las demás condiciones de la etapa SIF son el principal responsable de la degradación de la OeB. Asimismo con el análisis de los pellet fue posible determinar que en los mismos se encontraba OeB o compuestos relacionados.

En base a los resultados en la etapa intestinal, donde se demostró algo de degradación o depósito de OeB en los pellet, no dejándola disponible para la absorción, se optó por evaluar el comportamiento a un pH 4.5 (correspondiente al valor del pH del intestino proximal). A partir de estos resultados, fue posible concluir que la OeB se absorbe en el intestino proximal. En esta región (pH 4.5) su biodisponibilidad es máxima. En fracciones más alejadas del intestino (medio o distal) donde el pH se acerca más a la neutralidad, la biodisponibilidad de la misma baja considerablemente.

Según los datos obtenidos en el ensayo de metabolización in vitro fue posible determinar que la OeB no es metabolizada por dicha fracción, a su vez se analizaron propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de OeB empleando Software ADMET Predictor. Este análisis basado en la estructura de OeB mostró que la misma no sería sustrato de las enzimas presentes en esta fracción. Esto permite concluir que la OeB no sufriría una metabolización relevante por este pool enzimático, lo que no descarta que esta sustancia pueda ser ampliamente metabolizada por las enzimas de la fase II del metabolismo.

Respecto a los ensayos enzimáticos los mismos están siendo puestos a punto para determinar la inhibición de OeB frente a la enzima 5-alfa reductasa según el protocolo mencionado anteriormente.

Referencias bibliográficas

- [1] *Epilobium* spp: Pharmacology and phychemistry. *Phytother Res.* 2018, doi: 10.1002/ptr.6072
- [2] Granica, S. et al. Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of different *Epilobium* species (Onagraceae): A review 2014. *J Ethnopharmacol.* 156, 2014, 316-346.
- [3] Certificado de registro y autorizacio?n a la venta de Especialidad Farmaceutica, Nu?mero de registro 7908, expedido por el Ministerio de Salud Pu?blica, 3/4/2014, Montevideo, Uruguay.
- [4] Certificado de registro y autorizacio?n a la venta de Especialidad Vegetal, Nu?mero de registro 38537, expedido por el Ministerio de Salud Pu?blica, 21/11/17, Montevideo, Uruguay.
- [5] Improved and Validated HPTLC Method for Quantification of Oenothien B and its Use for Analysis of *Epilobium angustifolium* L. *J. Planar. Chromatogr.* 23, 2010, 70-74.
- [6] Hevesi, B.T. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Epilobium parviflorum*, Schreb. *Phytotherapy Research*, 23, 2009, 719-724
- [7] Vogl, S. et al. Ethnopharmacological in vitro studies on Austria's folk medicine- An unexplored lore in vitro anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J. Ethnopharmacol.* 149, 2013, 750-771.
- [8] Allkanjari, O. et al. What do we know about phytotherapy of bening prostatic hyperplasia? *Life Sci.* 126, 2015, 42-56.
- [9] Hiermann, A. et al. Studies of *Epilobium angustifolium* extracts on growth of accesory sexual organs in rats. *J. of Ethnopharmacol.* 53, 1997, 179-183.
- [10] Kosalec, I. et al. Antimicrobial activity of Willowherb (*Epilobium angustifolium*) leaves and flowers. *Curr. Drug Targets.* 14, 2013, 986-991.
- [11] Mukku, V. J. Antimicrobial activity of select Native American seeds. *J. Med. Plants Res.* 7, 2013, 2928-2932.
- [12] Vitalone, A. et al. Characterization of the effect of *Epilobium* extracts on human cell proliferation. *Pharmacology*, 69, 2003, 79-87
- [13] Stolarczyk, M. et al. Extracts from *Epilobium* sp. herbs, their components and gut microbiota metabolites of *Epilobium* ellagitannins, urolithins, inhibit hormone-dependent prostate cancer cells-(LNCaP) proliferation and PSA secretion. *Phytother Res.* 12, 2013 1842-1848
- [14] Santos, S. C. et al. Variable Temperature NMR and conformational analysis of Oenothien B. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 2014, 282-289.
- [15] Okuyama, S. et al. Oenothien B suppresses LPS induced inflammation in mouse brain. *Int J Mol Sci.* 14, 2013, 9767-9778.
- [16] Ducrey, B. et al. Inhibition of 5-𝛂 reductase and aromatase by Ellagitaninas Oenothien A and Oenothien B from *Epilobium* species. *Planta Med.* 63, 1997, 111-114.
- [17] Kiss, A. et al. Induction of neutral endopeptidase activity in PC-3 cell by aqueous extract of *Epilobium angustifolium* and Oenothien B. *Phytomedicine* 13, 2006, 284-289.
- [18] Piwowarski, J.P. Evaluation of the effect of *Epilobium angustifolium* aqueous extract and LNCaP cell proliferation in In vitro and In vivo models, *Planta Med.* 83, 2017, 1159-1168.
- [19] Pie, X, et al. Oenothien B inhibits human non-small cell lung cancer A549 cell proliferation by ROS-mediated PI3K/Akt/NF-κB signaling pathway, *Chemico-biological interaccions*, 298, 2019, 112-120.
- [20] Yoshida, T. et al. Chemical and Biological Significance of Oenothien B and Related Ellagitannin Oligomers

with Macrocyclic Structure. *Molecules*. 23, 2018, 552-573

[21] Brodkorb, A. et. al. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature products*. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.

[22] Minekus, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food Funct.* 5, 1113–1124 (2014).

[23] Hartmann, R. Novel 5 α -reductase inhibitors. Synthesis and structure-activity studies of 5-substituted 1-methyl-2-pyridones and 1-methyl-2-piperidones. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 29 (1994) 807-817.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)