

Este trabajo de tesis es presentado a la Escuela de Posgrado
de la FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Para obtener el título de:
Doctora en Ciencias Químicas

.....
MCs. Beatriz Viviana Lima

TEMA:
**ESTUDIO FITOQUÍMICO BIoguiado POR ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA, DE PLANTAS DE LA FLORA DE SAN JUAN**

.....
Directora por UNSJ
Dra Gabriela E. Feresin

.....
Director por la UNC
Dr. Julio Zygado

Miembros de la Comisión:

.....
Dr. José Luis Cabrera
(UNC)

.....
Dr. Héctor Rubinstein
(UNC)

.....
Dr. Alejandro Tapia
(UNSJ)

Este trabajo se desarrollo en:

- Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, UNSJ, bajo la dirección de la Dra. Gabriela E. Feresin.
- Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, UNC, bajo la dirección del Dr. Julio Zygadlo.

Contribuyeron además Estadías de investigación en los siguientes**Laboratorios e Instituto:**

- Laboratorio de Farmacognosia, Facultad de Bioquímica y Farmacia, UNR, bajo la dirección de la Dra. Susana Zacchino.
- Laboratorio de Química Orgánica, Unidad de Microanálisis Y Métodos Físicos Aplicados a la Química Orgánica (UMYMFOR), CONICET- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA, bajo la dirección del Dr. Jorge Palermo y la dra. Marianela Sánchez.
- Instituto de Química de Recursos Naturales. Universidad de Talca, Talca, Chile, bajo la dirección del Dr. Guillermo Schmeda Hirschmann.



Universidad Nacional de Córdoba



Universidad Nacional de San Juan

Estudio Fitoquímico Bioguiado por Actividad Antifúngica, de Plantas de la Flora de San Juan

MCs. Beatriz Viviana Lima

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CÓRDOBA

Directores:

Dra. Gabriela E. Feresin
UNSJ

Dr. Julio Zygodlo
UNC

2013

A mis amores:
Marina y Pablo,
Alicia
y a toda mi familia

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Córdoba, por el convenio que existe con otras Universidades, que nos brinda la oportunidad de seguir aprendiendo y mejorando.
- A la Universidad Nacional de San Juan por seguir siendo mi casa de estudio.
- A mi directora Dra. Gabriela E. Feresin por todo su apoyo, tiempo, dedicación y por enseñarme que la excelencia y el positivismo es necesario en todo desafío.
- A mi director Dr. Julio Zygodlo, por su optimismo, colaboración y apoyo para realizar este trabajo de tesis.
- Al Dr. Alejandro Tapia, por su gran ayuda, colaboración y enseñanza. Por permitirme cumplir el sueño de ser una profesora de Química y Doctora. Gracias!
- A la Dra Susana Zacchino y a todo su equipo de trabajo (Marcela, Sandra, Maximiliano, Laura, Marco...) del laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Bioquímica y Farmacia, UNR; por su solidaridad y hospitalidad.
- Al Dr. Jorge Palermo y su equipo de trabajo, especialmente a la Dra. Marianela Sánchez por su colaboración, ayuda y solidaridad; esenciales llevar a cabo una parte importante de esta tesis. Infinitas Gracias!
- Al Dr. Guillermo Schmeda-Hirschmann por estar siempre colaborando con nuestro grupo. Muchas gracias!
- A los Profesores Dres. José Luis Cabrera y Héctor Rubinstein de la Universidad Nacional de Córdoba, por sus consejos, sugerencias, colaboración y dedicación que permitieron que este trabajo culmine de la mejor manera posible. Gracias por tanta disponibilidad.
- A la Profesora Dra. Sandra Martín del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas (UNC) por su gran apoyo en esta última etapa de mí doctorado.
- A las Dras. María Eugenia Chiari y Soledad del Corral, por brindarme sus hogares, compañía y diversión. Las quiero Mucho!
- A toda la gente del IBT por estar en cada momento brindándome su ayuda y presencia. Qué lindo es sentir que uno pertenece a un lugar...
- A Lorena, Belén, Sandra, Liza, Erica, Javier, Flavia, Silvia, Paula y Cecilia, por estar en cada momento que viví en el laboratorio. Muchas Gracias por tanto cariño y apoyo.

Agradecimientos

- A mi mamá, Gracias Ali, por acompañarme desde mi jardín de infantes hasta aquí, me has dado la mejor herencia que le puedes dar a un hijo...
- A mi papá, por respetar mis decisiones...Te amo viejo!
- A mi Gran Amor...Gracias Pablo por acompañarme y estar en este momento tan especial de mi vida...y a mi niña Marina, por darme el mejor título que puede tener una mujer.
- A mis hermanos y mis sobrinos, porque con el tiempo aprendimos a compartir momentos únicos y a mi Nueva Familia: Suegros, Tíos, Primos, Nonos, Gracias por tanto cariño y apoyo.
- A quienes me enseñaron a seguir a delante y a confiar en Dios.
- Y a Dios...fuente de toda sabiduría...sin ti nada de esto hubiese sido posible...TE AMO!

| Índice General | | Pág. |
|-----------------------|---|-------------|
| | Resumen | 1 |
| CAPÍTULO I | INTRODUCCIÓN | 3 |
| | 1. Infecciones microbianas | 4 |
| | 1.2. Micosis | 4 |
| | 2.1. Hongos oportunistas | 6 |
| | 2. Usos y limitaciones de las drogas antifúngicas | 8 |
| | 2.1. Antifúngicos comerciales | 10 |
| | 2.2. Mecanismos de Acción de los agentes antifúngicos | 10 |
| | 3. Búsqueda de moléculas bioactivas de origen natural | 12 |
| | 4. Combinación de drogas antifúngicas con productos naturales: Una nueva alternativa | 13 |
| | 5. Flora de San Juan | 15 |
| | 6. Objetivo General | 16 |
| | 6.1. Objetivos Específicos | 16 |
| CAPÍTULO II | MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| | 1. Material vegetal | 18 |
| | 2. Estudio Químico | 19 |
| | 2.1. Técnicas de separación | 19 |
| | 2.2. Elucidación estructural | 19 |
| | 2.3. Extracción de los aceites esenciales | 20 |
| | 2.3.1. Caracterización química de los aceites esenciales por análisis CG-EM | 20 |
| | 3. Actividad antimicrobiana | 21 |
| | 3.1. Microorganismos | 21 |
| | 3.2. Ensayo de actividad antifúngica: determinación de la CIM | 21 |
| | 3.2.1. Evaluación del efecto sinérgico de los aceites esenciales en combinación con antifúngicos conocidos. | 22 |
| | 3.2.2. Determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) y su índice (ICIF) | 24 |
| | 3.2.3. Isobologramas | 25 |
| | 3.3. Actividad antibacteriana: determinación de la CIM | 26 |
| | 4. Descripción botánica y antecedentes de las especies seleccionadas | 27 |
| | 4.1. <i>Artemisia mendozana</i> DC "Ajenjo" | 27 |
| | 4.2. <i>Azorella cryptantha</i> (Clos) Reiche | 28 |
| | 4.3. <i>Gymnophyton polycephalum</i> Gillies & Hook. Clos "Bio-bio" | 29 |
| | 4.4. <i>Gentianella multicaulis</i> (Gillies ex Griseb.) Fabris "Nencia" | 30 |
| | 4.5. <i>Tagetes mendocina</i> Phil. "Quinchihue" | 31 |
| CAPÍTULO III | Aceites esenciales: Caracterización química y Actividad antifúngica de | 32 |

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| | <i>Artemisia mendozaana, Azorella cryptantha, Gymnophyton poliycephalum</i> y <i>Tagetes mendocina</i> | |
| | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| | 1. Introducción | 33 |
| | 2. Extracción de los Aceites esenciales | 33 |
| | 2.1. Composición química de los aceites esenciales | 34 |
| | 3. Actividad antifúngica de los aceites esenciales | 42 |
| | 4. Conclusiones | 45 |
| CAPÍTULO IV | Estudio del efecto sinérgico de Aceites esenciales en combinación con antifúngicos comerciales | 46 |
| | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 47 |
| | 1. Introducción | 47 |
| | 2.- Estudio del efecto sinérgico | 48 |
| | 2.1 Aceite Esencial de <i>Artemisia mendozaana</i> : | 48 |
| | Combinación con fluconazol frente <i>Cryptococcus neoformans</i> | |
| | Combinación del AE con terbinafina frente a <i>Microsporium gypseum</i> | 49 |
| | Combinación con terbinafina frente a <i>Trychophyton rubrum</i> | 50 |
| | 2.2. Aceite Esencial de <i>A. cryptantha</i> -BAU y <i>A. cryptantha</i> -AN | 51 |
| | Combinación con fluconazol frente <i>Candida albicans</i> | |
| | Combinación con fluconazol frente <i>Cryptococcus neoformans</i> | 53 |
| | Combinación con terbinafina frente a <i>Microsporium gypseum</i> | 55 |
| | Combinación con terbinafina frente a <i>T. rubrum</i> | 56 |
| | 2.3.-Aceite esencial de <i>Tagetes mendocina</i> : | 57 |
| | Combinación con fluconazol frente <i>C. neoformans</i> . | |
| | Combinación con terbinafina frente a <i>Microsporium gypseum</i> | 58 |
| | Combinación con terbinafina frente a <i>T. rubrum</i> | 59 |
| | 3. Conclusiones | 61 |
| CAPÍTULO V | <i>Azorella cryptantha</i> (Clos) Reiche: Aislamiento Bioguiado por Actividad Antimicrobiana | 63 |
| | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 64 |
| | 1. Introducción | 64 |
| | 2. Preparación de extractos seriados de <i>A. cryptantha</i> -BAU | 65 |
| | 3. Actividad antimicrobiana de los extractos seriados | 65 |
| | 4. Aislamiento bioguiado del extracto EP de <i>A. cryptantha</i> | 66 |
| | 5. Actividad antimicrobiana de fracciones y compuestos aislados | 79 |
| | 6. Conclusiones | 82 |

| | | |
|----------------------|---|------------|
| CAPÍTULO VI | <i>Gentianella multicaulis</i> (Gillies ex Griseb.) Fabris (Gentianaceae): Aislamiento Bioguiado por Actividad Antifúngica | 83 |
| | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 84 |
| | 1. Introducción | 84 |
| | 2. Preparación de extractos de <i>G. multicaulis</i> | 85 |
| | 3. Actividad antifúngica de extractos seriados | 85 |
| | 4. Aislamiento bioguiado de <i>G. multicaulis</i> | 86 |
| | 5. Actividad antifúngica de los compuestos aislados | 89 |
| | 6. Conclusiones | 92 |
| CAPÍTULO VII | <i>Tagetes mendocina</i> Phil. (Asteraceae): Aislamiento bioguiado por Actividad antifúngica | 93 |
| | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 94 |
| | 1. Introducción | 94 |
| | 2. Preparación de extractos de <i>T. mendocina</i> | 94 |
| | 3. Actividad antimicrobiana de extractos seriados | 94 |
| | 4. Aislamiento bioguiado de extractos activos | 95 |
| | 5. Actividad antifúngica de los compuestos aislados | 99 |
| | 6. Conclusiones | 100 |
| CAPÍTULO VIII | CONCLUSIONES | 101 |
| | Aceites esenciales | 102 |
| | Aislamiento Bioguiado: <i>G. multicaulis</i> | 103 |
| | Aislamiento Bioguiado: <i>T. mendocina</i> | 104 |
| | PROYECCIONES | 105 |
| | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 106 |
| | PRODUCCIÓN CIENTÍFICA | 116 |

| Índice de Tablas | | Pág. |
|---------------------|--|-----------|
| | Resumen | 1 |
| CAPÍTULO I | INTRODUCCIÓN | 3 |
| | Tabla 1: Sitio de acción, actividad e implicancias clínicas de los grupos de agentes antifúngicos comerciales | 11 |
| CAPÍTULO II | .MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| | Tabla 2. Especies seleccionadas, nombre vulgar y código de herbario | 18 |
| CAPÍTULO III | Aceites esenciales: Caracterización química y Actividad antifúngica de <i>Artemisia mendoza</i>, <i>Azorella cryptantha</i>, <i>Gymnophyton polycephalum</i> y <i>Tagetes mendocina</i> | 32 |
| | Tabla 3. Especies colectadas en el departamento Iglesia, en la provincia de San Juan (especie, familia, nombres científico y común, rendimiento de los AEs y sus propiedades físicas. | 34 |
| | Tabla 4. Composición química (%) del AE de <i>Artemisia mendoza</i> , índice de retención y modo de identificación | 35 |
| | Tabla 5. Composición química del aceite esencial de la especie <i>Azorella cryptantha</i> colectada en Bauchaceta (BAU) y <i>A. cryptantha</i> colectada en Agua Negra (AN), índice de retención y modo de identificación | 36 |
| | Tabla 6. Composición química del AE de <i>Gymnophyton polycephalum</i> , índice de retención y modo de identificación | 40 |
| | Tabla 7. Composición química del AE de <i>Tagetes mendocina</i> , índice de retención y modo de identificación | 41 |
| | Tabla 8. Actividad antifúngica de los AE frente a hongos levaduriformes, filamentosos y dermatofitos. El ensayo se realizó por duplicado. Los resultados se muestran como valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$) | 43 |
| CAPÍTULO IV | Estudio del efecto sinérgico de Aceites esenciales en combinación con antifúngicos comerciales | 46 |
| | Tabla 9. Actividad antifúngica de los AEs solos y en combinación con fluconazol, frente a hongos levaduriformes. Los resultados se muestran como valores de CIM ₈₀ , CIF (expresados en $\mu\text{g/ml}$), ICIF y efecto producido | 60 |
| | Tabla 10: Actividad antifúngica de los AEs solos y en combinación con terbinafina, frente a hongos dermatofitos. Los resultados se muestran como valores de CIM ₁₀₀ , CIF (expresados en $\mu\text{g/ml}$), ICIF y efecto producido | 61 |
| CAPÍTULO V | <i>Azorella cryptantha</i> (Clos) Reiche: Aislamiento Bioguiado por Actividad Antimicrobiana | 63 |

| | | |
|---------------------|--|-----------|
| | Tabla 11. Actividad antifúngica de los extractos seriados de <i>A. cryptantha</i> (Bauchaceta). Los valores de CIM se expresan en µg/ml. | 66 |
| | Tabla 12. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuestos azurellolido | 70 |
| | Tabla 13. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto mulinol | 71 |
| | Tabla 14. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto stachytriol | 72 |
| | Tabla 15. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY, HMBC y NOESY en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto 1α, 10β, 4β, 5α-diepoxi-7β-germacran-6β-ol | 73 |
| | Tabla 16. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto 1 β, 10α, 4β, 5α-diepoxi-7β-germacran-6β-ol | 74 |
| | Tabla 17. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC del compuesto en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto 1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-dimetilazuleno-3a,8a-diol | 75 |
| | Tabla 18. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC del compuesto en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto madreporanona | 76 |
| | Tabla 19. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto yaretol | 77 |
| | Tabla 20. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC en Cl ₃ CD (δ en ppm) del compuesto chrysotol | 78 |
| | Tabla 21. Actividad antimicrobiana de las fracciones y los compuestos aislados de <i>A. cryptantha</i> . Los valores de la CIM se expresan en µg/ml. | 81 |
| CAPÍTULO VI | <i>Gentianella multicaulis</i> (Gillies ex Griseb.) Fabris (Gentianaceae): Aislamiento Bioguiado por Actividad Antifúngica | 83 |
| | Tabla 22. Actividad antifúngica de los extractos seriados de <i>A. cryptantha</i> (Bauchaceta). Los valores de CIM se expresan en µg/ml. | 86 |
| | Tabla 23: Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, COSY y HMBC de los compuestos swerchirina (3) y bellidina (4) en MeOD-d ₄ (δ en ppm) | 89 |
| | Tabla 24. Datos espectroscópicos de ¹ H, ¹³ C, HMBC y NOESY de los compuestos bellidifolina (5) e isobellidifolina (6) en MeOD-d ₄ (δ en ppm). | 90 |
| | Tabla 25. Actividad antifúngica de los extractos y compuestos aislados de <i>Gentianella multicaulis</i> (valores de CIM expresados en µg/mL). | 91 |
| CAPÍTULO VII | <i>Tagetes mendocina</i> Phil. (Asteraceae): Aislamiento bioguiado por Actividad antifúngica | 92 |

Tabla 26. Actividad antifúngica de los extractos seriados de *T. mendocina*. 94
Los valores de CIM se expresan en µg/ml.

Tabla 27. Actividad antifúngica de los compuestos aislados de *T. mendocina*. Los valores de la CIM se expresan en µg/ml. 100

| Índice de Figuras | | Pág. |
|---------------------|---|-----------|
| | Resumen | 1 |
| CAPÍTULO I | INTRODUCCIÓN | 1 |
| | Figura 1: Esquema general de las dianas de algunos agentes antifúngicos | 12 |
| CAPÍTULO II | MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |
| | Figura 2: Modelo de la organización de la microplaca en la metodología utilizada | 23 |
| | Figura 3: Isoblograma o Líneas de aditivismo (a), de sinergismo (b) y de antagonismo (c). | 25 |
| | 4. Descripción botánica y antecedentes de las especies seleccionadas | 27 |
| | Figura 4: <i>A. mendozana</i> (San Juan) | 27 |
| | Figura 5: <i>A. cryptantha</i> (Bauchaceta, San Juan) | 28 |
| | Figura 6: <i>A. cryptantha</i> (Agua Negra, San Juan) | 28 |
| | Figura 7: <i>Gymnophyton polycephalum</i> (San Juan). | 29 |
| | Figura 8: <i>G. multicaulis</i> (San Juan) | 30 |
| | Figura 9: <i>T. mendocina</i> (San Juan) | 31 |
| CAPÍTULO III | Aceites esenciales: Caracterización química y Actividad antifúngica de <i>Artemisia mendozana</i> , <i>Azorella cryptantha</i> , <i>Gymnophyton poliycephalum</i> y <i>Tagetes mendocina</i> | 32 |
| | Figura 10: Composición de terpenos del AE de <i>A. cryptantha</i> -BAU y de <i>A. cryptantha</i> -AN | 38 |
| CAPÍTULO IV | Estudio del efecto sinérgico de Aceites esenciales en combinación con antifúngicos comerciales | 46 |
| | Figura 11: Isoblograma del efecto de los AEs de <i>A. mendozana</i> versus concentración De fluconazol, frente a <i>C. neoformans</i> | 49 |
| | Figura 12: Isoblograma del efecto del AE de <i>A. mendozana</i> versus concentración de terbinafina frente a <i>M. gypseum</i> | 50 |
| | Figura 13: Isoblograma del efecto del AE de <i>A. mendozana</i> versus concentración de terbinafina frente a <i>T. rubrum</i> . | 51 |

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| | Figuras 14 y 15: Isobogramas del efecto de los AEs de <i>A. cryptantha</i> -BAU y AN versus la concentración de fluconazol, frente a <i>C. albicans</i> | 53 |
| | Figuras 16 y 17: Isobogramas del efecto de los AEs de <i>A. cryptantha</i> (de ambas zonas de colecta) versus concentración de fluconazol, frente a <i>C. neoformans</i> | 54 |
| | Figuras 18 y 19: Isobogramas del efecto de los AEs de <i>A. cryptantha</i> BAU y AN versus concentración de terbinafina, frente a <i>M. gypceum</i> | 56 |
| | Figuras 20 y 21: Isobogramas del efecto del AE de <i>A. cryptantha</i> BAU y AN versus concentración terbinafina, frente a <i>T. rubrum</i> | 57 |
| | Figura 22: Isobograma del efecto del AE de <i>T. mendocina</i> versus concentración de fluconazol, frente a <i>C. neoformans</i> | 58 |
| | Figura 23: Isobograma del efecto de los AEs de <i>T. mendocina</i> versus concentración de terbinafina, frente a <i>M. gypceum</i> | 59 |
| | Figura 24. Isobograma del efecto del AE de <i>T. mendocina</i> versus concentración de terbinafina frente a <i>T. rubrum</i> | 60 |
| CAPÍTULO V | <i>Azorella cryptantha</i> (Clos) Reiche: Aislamiento Bioguiado por Actividad Antimicrobiana | 63 |
| | Figura 25: Aislamiento bioguiado del extracto EP de <i>A. cryptantha</i> -BAU (San Juan) | 69 |
| CAPÍTULO VI | <i>Gentianella multicaulis</i> (Gillies ex Griseb.) Fabris (Gentianaceae): Aislamiento Bioguiado por Actividad Antifúngica | 83 |
| | Figura 26: Aislamiento bioguiado mediante actividad antifúngica del EEP de <i>G. multicaulis</i> (San Juan) | 88 |
| CAPÍTULO VII | <i>Tagetes mendocina</i> Phil. (Asteraceae): Aislamiento bioguiado por Actividad antifúngica | 93 |
| | Figura 27: Aislamiento bioguiado por actividad antifúngica de <i>T. mendocina</i> (San Juan) | 97 |

RESUMEN

La incidencia de las infecciones micóticas en los seres humanos, en particular las relacionadas con la piel y las mucosas; aumentan considerablemente. A pesar de los progresos en la medicina humana, nuevos agentes antifúngicos (más seguros, eficaces y menos tóxicos, con amplio espectro de actividades) son necesarios, así como también la búsqueda de estrategias, para mejorar el efecto, como es el uso de combinaciones.

La provincia de San Juan cuenta amplia variedad de plantas de uso medicinal. Algunas de ellas son reconocidas por su contenido de aceites esenciales y moléculas bioactivas, que poseen propiedades tales como efecto antioxidante, antifúngica y antibacteriana.

El objetivo de este trabajo de tesis fue contribuir al conocimiento en la química y la actividad biológica de los Productos Naturales de la provincia de San Juan con énfasis en la actividad antifúngica.

La composición química y la actividad antifúngica de los aceites esenciales de las especies *Artemisia mendozaana*, *Azorella cryptantha* (de Bauchaceta y Agua Negra), *G. polycephalum* y *T. mendocina* colectadas en el departamento Iglesia, provincia de San Juan fue determinada. La proporción de los constituyentes mayoritarios del aceite esencial de las dos poblaciones de *A. cryptantha* fue similar, sin embargo se presentaron diferencias en los constituyentes minoritarios, el AE de *A. cryptantha*-AN presentó monoterpenos oxigenados. Todos los AEs fueron activos frente a los dermatofitos: *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* con valores de CIM de 250 y 500 µg/ml. Los AEs de *A. mendozaana*, *A. cryptantha* y *T. mendocina* fueron activos frente a *C. albicans* y *C. neoformans*. La combinación de los AEs con antifúngicos comerciales mostró efecto aditivo y redujo considerablemente la dosis del antifúngico, esto permite reducir la toxicidad del antifúngico comercial. Solamente la combinación de AE de *A. cryptantha*-AN con fluconazol mostró efecto sinérgico frente a *C. albicans*.

Se realizó el aislamiento bioguiado de *A. cryptantha* (de Bauchaceta), *G. multicaulis* y *T. mendocina*.

De *A. cryptantha* se aislaron nueve compuestos: azorellolido, mulinol, stachytriol, 1 α , 10 β , 4 β , 5 α -Diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol, 1 β , 10 α , 4 β , 5 α -Diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol, 1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-

dimetilazuleno-3a,8a-diol, madreporanona, yaretol, chrysotol. Chrysotol y madreporanona presentarn la mejor actividad antimicrobiana.

De la especie *G. multicaulis* se aislaron cuatro xantonas oxigenadas y dos triterpenos. Los extractos seriados y las xantonas aisladas presentaron efecto antifúngico frente a los hongos dermatofitos *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Los compuestos bellidina, bellidifolina e isobellidifolina presentaron actividad antifúngica frente a *M. gypseum* como así también frente a las dos especies de *Trichophyton* (*T. rubrum* y *T. mentagrophytes*) con valores de CIM de 50 µg/ml, mientras que swerchirina resultó el compuesto menos activo (CIM = 100 µg/ml).

De la especie *T. mendocina* se aislaron compuestos característicos de este género, tipo tiofenos, hidroxiacetofenonas y furanos. Los tiofenos BBTOAc y BBTOH fueron activos frente a *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Los aportes realizados durante este trabajo de tesis, relacionados al estudio químico de aislamiento e identificación de compuestos, caracterización de aceites esenciales y la actividad antifúngica, así como el estudio del efecto sinérgico de la combinación de aceites esenciales con fármacos conocidos, de cinco especies colectadas en la provincia de San Juan, contribuyen al conocimiento científico del potencial de estas especies como fuente de productos bioactivos y a la conservación de la biodiversidad de la flora de la región.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

I.1.-Infecciones microbianas

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos, a pesar de los enormes avances en la medicina humana, aun son una amenaza significativa para la salud pública. El uso inadecuado e irracional de los antibióticos crea condiciones favorables para la aparición, propagación y persistencia de microorganismos (enfermedades de origen fúngico y bacteriano). Esto ocurre, por ejemplo, cuando los pacientes interrumpen el tratamiento. Actualmente, las infecciones causadas por microorganismos resistentes no responden a tratamientos habituales, lo que trae como consecuencia enfermedades prolongadas, incluso en algunas con riesgo de muerte (OMS, 2012).

I.1.2.-Micosis

Las infecciones fúngicas invasoras son el mayor desafío que enfrentan actualmente los micólogos de todo el mundo. La incidencia de las infecciones micóticas en los seres humanos, en particular las relacionadas con la piel y las mucosas; aumentan considerablemente, sobre todo en los países tropicales y subtropicales, donde los patógenos más frecuentes son los dermatofitos y candidas (Pfaller y Diekema, 2007).

En América Latina, la incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas varían considerablemente. Por ejemplo, un amplio estudio realizado en Brasil reveló una frecuencia de candidemias de 3 a 15 veces mayor en comparación con las referidas en América del Norte y Europa. Aunque diversos programas de vigilancia aportan información sobre la epidemiología de la infección por candida en el mundo, las características epidemiológicas para Latinoamérica se conocen poco (Nucci y col., 2010).

La prevalencia de las micosis superficiales y onicomicosis ha aumentado rápidamente en los últimos años debido al uso de fármacos inmunosupresores, enfermedades sistémicas (diabetes, SIDA, colagenosis), insuficiencia venosa y arterial, asistencia asidua a gimnasios y al envejecimiento de la población. En los diabéticos, el 7% de las amputaciones de las extremidades inferiores se asocian a una infección fúngica subyacente. Los individuos con un órgano sólido trasplantado también tienen un riesgo incrementado de sufrir micosis superficiales debido al uso de esquemas farmacológicos inmunosupresores. Cerca del 70% de los trasplantados renales presenta alguna dermatomicosis como, por ejemplo,

candidiasis oral y pitiriasis versicolor (Weitzman y Summerbell 1995; Freixa y col., 1998; Gulec y col. 2003, Monk y Goffeau, 2008).

En la Argentina se evidencia un notable incremento en la frecuencia de las infecciones emergentes. Por otra parte, las micosis profundas localizadas y las sistémicas endémicas, así como las asociadas al SIDA, siguen siendo motivo frecuente de consulta y diagnóstico en distintos centros del país (Arechaval, 2008). A modo de ejemplo, Davel y Canteros (2007), informaron sobre micosis diagnosticadas, entre enero y diciembre de 2004 con datos provistos por 72 laboratorios de 19 provincias y la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Se diagnosticaron 23.600 casos de micosis: 11.107 (47%) superficiales, 10.830 (46%) candidiasis de las mucosas y 1.663 (7%) profundas. Del total de micosis profundas, las más frecuentes fueron fungemia causadas por levaduras (2,52%), criptococosis (1,54%), aspergilosis broncopulmonar (0,98%), histoplasmosis (0,84%), paracoccidioidomicosis (0,63%) y neumocistosis (0,5%).

López Moral y col. (2012) Informaron sobre la incidencia de las fungemias en hospitales de la ciudad de Buenos Aires. Para establecer si hubo modificaciones en el curso de 4 años, registraron datos desde enero de 2005 a diciembre 2008. Los parámetros analizados fueron los agentes fúngicos involucrados; el tiempo de desarrollo en los hemocultivos; consignaron el sexo, edad y enfermedad de base de los pacientes. Además evaluaron en los episodios de candidemias, el tiempo transcurrido desde el ingreso del paciente hasta su desarrollo, la complejidad de la unidad de hospitalización, el antecedente de catéteres venosos centrales y la antibioticoterapia previa. La incidencia se mantuvo estable en el período estudiado, predominó las fungemia por *Candida* spp. *C. albicans* estuvo implicada en menos de la mitad de los episodios. Además, la recuperación de *Cryptococcus* spp e *Histoplasma capsulatum* estuvo fuertemente asociada a pacientes VIH reactivos, respecto a las candidemias se concluyo que se producen en su mayoría durante la hospitalización del paciente. Este estudio indicó que es prioridad, en el área de la salud en Argentina, el desarrollo de estrategias de control para que estas infecciones no continúen en aumento.

Otro aspecto que contribuye a las recidivas fúngicas es la administración de antimicrobianos de amplio espectro y de pautas profilácticas difundidas mundialmente para prevenir las infecciones por microorganismos más comunes, las cuales muchas veces no alcanzan a prevenir las infecciones fúngicas. Su frecuencia es baja y afectan a poblaciones muy concretas de pacientes, pero su morbilidad y mortalidad se mantienen elevadas (Auberger y col., 2008; Sipsas y

Kontoyiannis, 2008). Ambas circunstancias, han generado que las micosis emergieran como una complicación muy importante en estos procesos, por lo que se piensa que existe en la Argentina, un número indeterminado de nuevas infecciones de elevada morbimortalidad (Dictar y col., 2000, Quindós, 2011; Zaragoza y Pemán, 2012).

I.1.3.-Hongos oportunistas

Los hongos oportunistas son un grupo de patógenos responsables de causar infecciones, en un grupo cada vez mayor de pacientes vulnerables, como los tratados con inmunosupresores, los que presentan infección por VIH u otras condiciones de inmunodeficiencia adquirida y los pacientes con tratamiento quimioterápico (Mishra, 2007; Pappas 2010).

En la actualidad se observa un incremento en la variedad y el número de infecciones producidas por otros micomicetos, tales como *Candida* (no *C. albicans* y otras levaduras), por diferentes especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces*, y por otros agentes de hialohifomicosis, así como de infecciones por hongos pigmentados y *Zygomycetes* (Alexande y Pfaller, 2006).

El género *Candida* se refiere a especies patógenas comunes y oportunistas, encontradas en animales de sangre caliente, incluyendo a los seres humanos. Coloniza en las superficies mucosas de las cavidades orales, del tracto digestivo o genitourinario de las personas sanas y causa una variedad de infecciones, según la susceptibilidad del huésped (Mishra y col., 2007). Las candidiasis son la causa más común de infecciones fúngicas invasivas en los seres humanos y el origen de las infecciones intrahospitalarias del torrente sanguíneo (candidemia intranosocomial). En los Estados Unidos y otros países desarrollados, la candidemia es la cuarta causa más común de infección nosocomial del torrente sanguíneo (Fridkin 2005). Estas infecciones tienen lugar, especialmente, en los enfermos graves internados en unidades de cuidados intensivos, en los pacientes neutropénicos, en personas sometidas a procedimientos quirúrgicos y también en los neonatos prematuros (Nucci y col., 2010; López Moral y col., 2012).

La terapia para las infecciones por *Candidas*, se ha convertido en un desafío, se debe considerar que el tratamiento para combatirla estas es difícil debido a que se trata de células eucariotas (Mukherjee y col., 2005).

Otro grupo de hongos, son los dermatofitos pertenecientes a los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, que tienen la capacidad de invadir el tejido queratinizado (piel, uñas y pelo) produciendo infecciones, llamadas

dermatofitosis o conocidas como “tiñas”. Este tipo de infección es generalmente cutánea con presencia del hongo en la capa córnea de la piel, o en la cutícula del pelo, raras veces es sintomática, por lo que la infección se torna crónica. Las dermatofitosis pueden variar de leves a grave como consecuencia de las reacciones del huésped a los productos metabólicos del hongo, de la virulencia de la infección, cepa o especie, de la localización anatómica de la infección, y de factores ambientales locales (Weitzman y Summerbell, 1995).

Las micosis superficiales propiamente dichas incluyen enfermedades donde la respuesta celular del huésped está reducida. En los pacientes inmunosuprimidos, estas pueden ser graves, conduciendo a fungemia, y comprometiendo los órganos internos. Incluyen la Pitiriasis Versicolor, Piedra Blanca, Piedra Negra y Tiña Negra. La aparición de estas micosis depende de factores tales como el calor, la humedad, la maceración, los microtraumatismos cutáneos, y otros de orden general como la genética, edad, raza, sexo, profesión e inmunidad mediada por células. Las dermatofitosis son más frecuentes en hombres que en mujeres con una relación 3:1. Las tiñas de cuero cabelludo son más frecuentes en la infancia y muy raras en la edad adulta. Al contrario, la dermatofitosis de pies se inicia en la pubertad y aumenta su incidencia hasta los treinta o cuarenta años. Las enfermedades que alteran la inmunidad celular como los linfomas, SIDA, corticoterapia oral y local en forma prolongada y extensa, antineoplásicos, diabetes etc. favorecen la extensión de las dermatofitosis y las tornan más crónicas en su evolución (Galimberti y González Ramos, 2001).

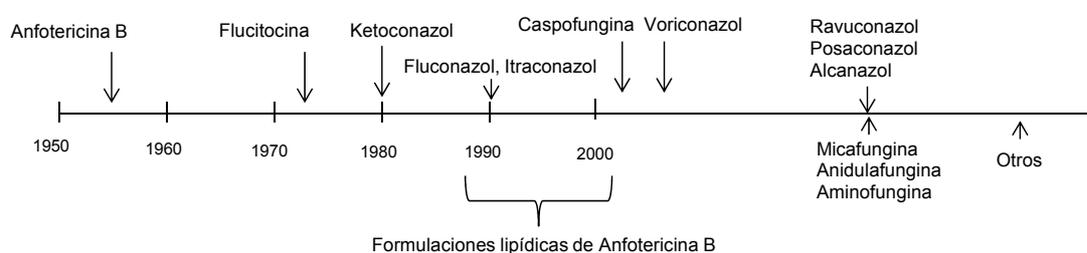
Los miembros del género *Trichophyton* se encuentran entre los dermatofitos que con mayor frecuencia están implicados en las infecciones cutáneas superficiales. Las especie *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* son responsables de aproximadamente el 90% de las infecciones crónicas causadas por dermatofitos, muestran un patrón común de asociación en las tiñas en la ingle, pies, manos, barba, y onicomicosis. La especie *T. rubrum* (aislados predominantemente de uñas), seguido por *T. mentagrophytes*; es con frecuencia el agente etiológico de la tiña pedis (conocido como “pie de atleta”), y tiene demostrada su elevada resistencia a antifúngicos comerciales (Campbell y col., 2004; Loo, 2007; Iorizzo y col. 2007; Havlickova y col., 2008).

En las últimas décadas, se ha observado un aumento de onicomicosis debido diversos factores: longevidad de la población general, aumento en el uso de terapias inmunosupresoras, mayor exposición a los agentes fúngicos e incremento en la realización de actividades deportivas (Nazar y col., 2012).

I.2.-Usos y limitaciones de las drogas antifúngicas

De acuerdo a lo informado por Rapp, (2004) y Catalán y Montejo, (2006), los agentes antimicóticos comerciales conocidos se pueden clasificar, de acuerdo a su estructura, en cinco grupos principales: **polienos** (Nistatina y Anfotericina B), **pirimidinas fluoradas** (5- Fluocitosina), **azoles**: imidazoles (Ketoconazol y Miconazol) y los triazoles (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol), **alilaminas** (Naftifina y Terbinafina) y los **lipopéptidos**, conocidos como equinocandinas recientemente introducidos en el mercado (Caspofungina, Micafungina y Anidulafungina).

A continuación se presenta un esquema de la evolución histórica de los fármacos antifúngicos más conocidos:



A pesar de la gran variedad de antimicóticos, los hongos patógenos tienen la capacidad de superar la acción inhibitoria del antifúngico utilizando mecanismos de resistencia específicos. Durante los últimos años, los estudios se basaron en el análisis de la resistencia a los fármacos antifúngicos, mediante la comprensión de la base molecular del hongo en cuestión. Así, por ejemplo, de los antifúngicos de tipo azoles se aislaron diversos alelos del gen que codifica su diana, correlacionando la aparición de resistencia con distintas mutaciones (Sanglard, 2002, Walker y col., 2010).

La adquisición de resistencia a los azoles se ha observado principalmente en el género *Candida*, con importancia decreciente, en *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y, con menor frecuencia, en *Cryptococcus neoformans* en los casos de meningitis (Kontoyiannis y Lewis, 2002).

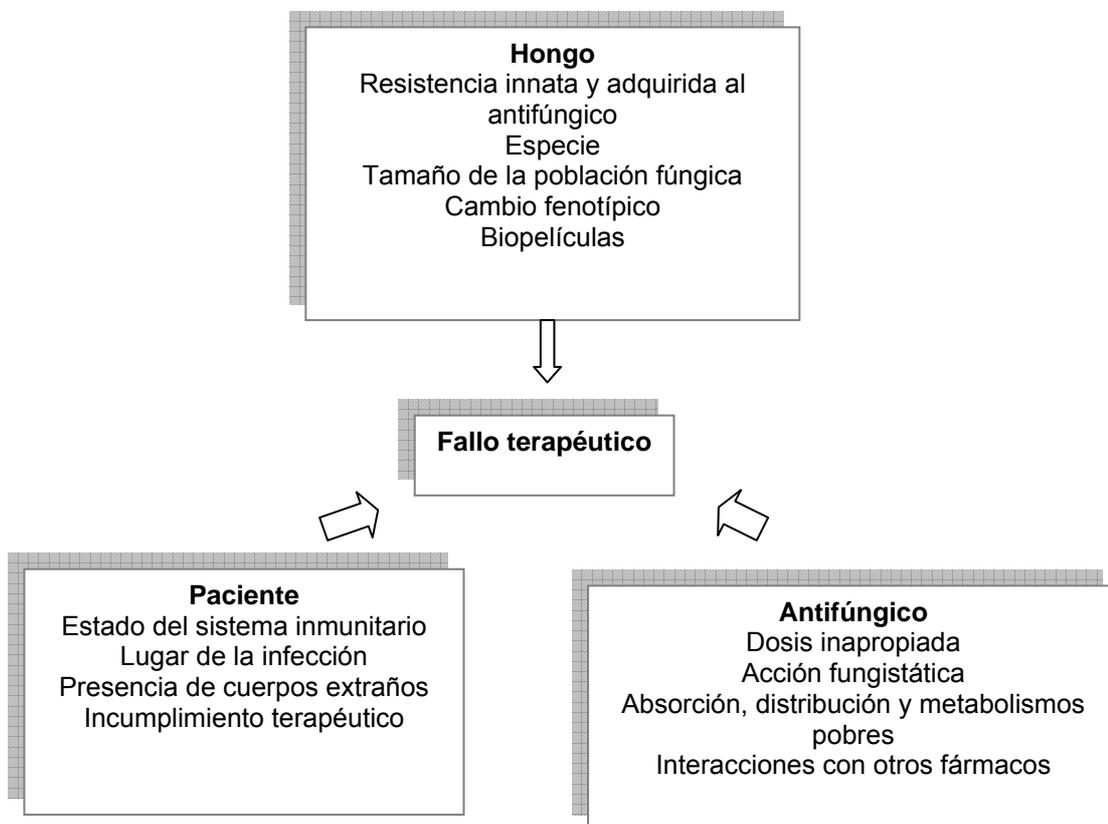
Por otra parte, existen factores que limitan el uso de fármacos antimicóticos tales como la baja potencia y solubilidad, toxicidad del fármaco y la aparición de cepas resistentes debido a su uso profiláctico intensivo (Isham y col., 1999; Mukherjee y col., 2003). A pesar de los progresos en la medicina humana, hay una clara necesidad que impulsa al descubrimiento de nuevos agentes antifúngicos, más

seguros, eficaces, menos tóxicos; tanto de uso tópico como sistémico, con más amplio espectro de actividades (Abad y col., 2007).

La falta de éxito en las terapias antifúngicas se debe principalmente a la resistencia observada *in vitro* (resistencia que puede ser intrínseca a la cepa o adquirida durante el tratamiento) o a la resistencia clínica asociada con numerosos factores relacionados con el huésped, el agente antifúngico o la cepa responsable de la infección (Espinel-Ingroff, 2008).

Asimismo, los métodos estandarizados provenientes de la Comisión Europea sobre las pruebas de sensibilidad antibiótica de antifúngicos y el Instituto de Laboratorios Clínicos Estandarizados (CLSI) detectaron un incremento en la resistencia de cepas de levaduras y hongos filamentosos frente a agentes antifúngicos (es decir, altos valores de concentraciones inhibitorias mínimas, CIM). Asimismo, los datos sobre cepas resistentes, son utilizados en modelos experimentales para obtener parámetros farmacocinéticos que permitan predecir la respuesta clínica (Rodríguez-Tudela y col., 2008).

En el siguiente esquema (Portón y col., 2006) se muestran algunos factores que afectan la resistencia antifúngica dependiendo del tipo de hongo, el paciente y el antifúngico utilizado:



Sanglard (2002), informó la resistencia que presentan ciertos hongos a fármacos antifúngicos convencionales como los polienos, los análogos de pirimidina (5-fluorocitosina) y a los azoles, estos últimos son los que presentaron el mayor número de casos clínicos de resistencia antifúngica.

I.2.1.-Antifúngicos comerciales

El polieno anfotericina B fue desde su desarrollo en 1955, el único fármaco activo disponible para tratar la mayoría de las infecciones fúngicas invasoras graves. Sin embargo, debido a la toxicidad de este medicamento, en la década de los 90, la industria farmacéutica desarrolló formulaciones lipídicas de anfotericina B tales como Anfotericina B en dispersión coloidal, Complejo lipídico de Anfotericina B y Anfotericina B liposómica, mejor toleradas y con menores efectos adversos (Boucher y col., 2004).

En 1990, surgió el fluconazol, posteriormente itraconazol y ketoconazol, del tipo azoles. El ketoconazol, es una droga antifúngica administrada en forma oral, utilizada para el tratamiento de infecciones profundas y superficiales causadas por *Trichophyton*. Sin embargo, genera efectos secundarios desagradables incluyendo náuseas, dolor abdominal, picazón y su toxicidad en muchos casos limita su uso terapéutico (Sugar y col., 1987). Además, la respuesta terapéutica puede ser leve y hasta inapropiada para el tratamiento de pacientes con micosis severa o progresiva, su eficacia es pobre en pacientes inmunosuprimidos (Craven y col., 1984).

Posteriormente, en el año 2000, surgieron caspofungina y voriconazol, revolucionando el tratamiento para las infecciones fúngicas, principalmente de la aspergilosis invasora. A estos le sucedieron las nuevas generaciones de antifúngicos como ravuconazol, posaconazol, albaconazol, micafungina, anidulafungina y aminofungina (Bennet, 2005; Wenzel y Bennet, 2005).

El uso de Icofungipen, un derivado sintético de la cispentacina, sigue aún en fase de investigación II y III, con la ventaja de no presentar resistencia cruzada con otros antimicóticos. Otro antifúngico es Mycograb, es un fragmento de un anticuerpo humano genéticamente recombinante contra la proteína de shock térmico de 90 kDa (HSP90) de la célula fúngica. Este anticuerpo contra HSP90, está estrechamente asociado con la recuperación en pacientes con candidiasis invasiva que están recibiendo la anfotericina B (Allevato y col., 2007).

I.2.3.-Mecanismos de Acción de los agentes antifúngicos

Los antifungicos conocidos presentan diferentes mecanismos de acción por ejemplo, inhibición de la epóxido escualeno, unión al ergosterol (molécula esencial en la membrana fúngica), intervienen en la biosíntesis de ácido fólico y proteínas, inhibición de la replicación de DNA, o de la β -(1,3)-glucano sintasa (Kocsis, y col., 2009). No obstante, en términos de número de clases de agentes que se pueden utilizar para tratar la micosis, los objetivos se centran, en gran medida, directa o indirectamente, en la envoltura celular (pared y membrana plasmática), y particularmente en la membrana fúngica: esteroides, ergosterol, y su biosíntesis. Determinar otros objetivos en la célula sería una innovación de bienvenida para agentes antifúngicos sistémicamente biodisponibles (Old y col., 2003; Petrikos y Skiada, 2007). En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se resumen los mecanismos de acción de los cinco grupos principales de drogas antimicóticas.

Tabla 1: Sitio de acción, actividad e implicancias clínicas de los grupos de agentes antifúngicos comerciales

| Agente | Sitio de acción | Actividad | Implicancias clínicas |
|----------------|--------------------------|---|---|
| | en | | |
| Polienos | Membrana | Se une al ergosterol causando la muerte celular | Potente actividad antifúngica, amplio espectro |
| Azoles | Membrana | Inhibe la enzima CYP 450 responsable de la síntesis de ergosterol, daña la membrana citoplasmática | Actividad fungistática de potencia y espectro variable |
| Alilaminas | Pared celular y membrana | Inhiben la biosíntesis del ergosterol y la escualeno epoxidasa, paso importante en la vía, con consecuencias fungicidas en especies susceptibles. | Espectro restringido. Activos frente a muchos hongos filamentosos, pero pocas levaduras patógenas |
| Fluocitosina | Núcleo | Interfiere en la síntesis del ADN al inhibir el timidilato sintetasa | Espectro restringido. Actividad antifúngica sumatoria en combinación con Anfotericina B |
| Equinocandinas | Pared celular | Inhiben la síntesis de glucanos, destruye la estructura de la pared celular causando lisis fúngica | Potente actividad antifúngica de amplio espectro. Potencial efecto aditivo en terapias combinadas |

(Old y col., 2003; Sanglard, 2003; Espinel-Ingroff, 2009)

En la **Figura 1** se representa las distintas dianas o sitios de acción.

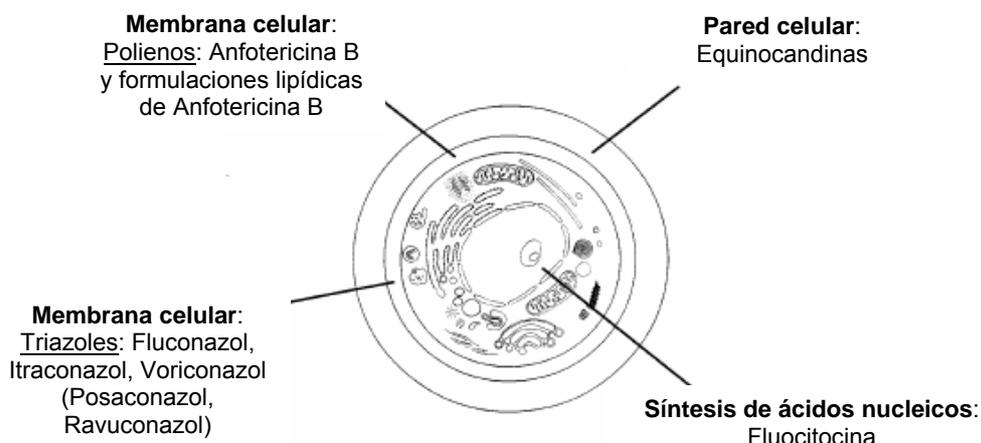


Figura 1: Esquema general de las dianas de algunos agentes antifúngicos

I.3.-Búsqueda de moléculas bioactivas de origen natural

Desde la antigüedad, el hombre utiliza las plantas para el tratamiento de enfermedades infecciosas comunes y algunas de estas medicinas tradicionales siguen siendo incluidas como parte del tratamiento habitual de diversas enfermedades (Ríos y Recio, 2005).

Comenzando con el descubrimiento de la penicilina, la industria farmacéutica utiliza los recursos provenientes de los productos naturales como fuente inigualable de pequeñas moléculas bioactivas adecuadas para el desarrollo de antibióticos.

Los productos naturales son una fuente de inspiración para gran parte de la farmacopea actual. Newman y Cragg (2007), en su revisión sobre nuevos medicamentos provenientes de productos naturales en los últimos 25 años, indican que casi el 50% de los nuevos *medicamentos*, introducidos durante este período, tiene su origen en un producto natural. Asimismo, indicaron que de 29 drogas antifúngicas conocidas (desde enero de 1981 a junio de 2006), veintidós son sintéticas, tres derivan de productos naturales, tres provienen de una subclase denominada “imitación de un producto natural” y una de origen biológico, por esto, el uso de los productos naturales como fuentes de nuevas estructuras sigue vigente.

Numerosos trabajos presentan las oportunidades ilimitadas que proporcionan las plantas para el aislamiento de nuevos compuestos antifúngicos y esto se debe, en gran parte a la disponibilidad sin precedentes de la diversidad química (Koroishi y col., 2008, Svetaz y col., 2009; Agüero y col., 2010; 2011; Kurdelas y col., 2012). Con la consideración de conservar a los productos naturales como una diversa y

única fuente de moléculas bioactivas que permite el descubrimiento de nuevas drogas (Kingston, 2011).

Otro aspecto que justifica la búsqueda de nuevos compuestos de origen natural con actividad antimicrobiana es la creciente incidencia de microorganismos patógenos, resistentes a medicamentos clásicos, su toxicidad y los costos necesarios (Silva y col., 2011).

I.4.-Combinacion de drogas antifúngicas con productos naturales:

Una nueva alternativa

El valor terapéutico de las interacciones sinérgicas se conoce desde la antigüedad, y existen diversos sistemas culturales que se basan en el concepto que la terapia de combinación puede mejorar la eficacia de moléculas o conjunto de moléculas bioactivas (van Vuuren y Viljoen, 2011).

La combinación de fármacos es el método más ampliamente utilizado en el tratamiento de la mayoría de las enfermedades graves, como el cáncer y el SIDA. Los principales objetivos son: lograr un efecto terapéutico sinérgico en la dosis, reduciendo la toxicidad, y minimizar o retrasar la inducción de la resistencia a la droga (Chou, 2006).

Esta estrategia para las terapias son consideradas especialmente por la falta de nuevas clases de fármacos o diferentes dianas moleculares, donde se aprovecha la multiplicidad de los "target" contra los que los agentes actuales son eficaces (Mukherjee y col., 2003).

Las interacciones de fármacos pueden resultar en un efecto sinérgico, aditivo o indiferente y antagónico. El sinergismo, en un sentido amplio, se define como el efecto potenciador que se produce por la interacción entre dos o más elementos, fuerzas o compuestos en un contexto dado (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009).

La búsqueda de la sinergia ha seguido tortuosos caminos durante los últimos 100 años, y especialmente durante los últimos 50 años. La confirmación del efecto sinérgico, tanto en el tratamiento terapéutico como tóxico; de combinaciones de drogas, se presenta en varias áreas, entre ellas en el campo de la Biomedicina. Por encima de 20.000 artículos en la literatura biomédica, desde 1981 hasta 1987, incluyó el "sinergismo" como palabra clave (Greco y Lawrence, 1988).

Una ventaja de utilizar combinaciones es el efecto sinérgico, en el que actividad antifúngica es mayor que la contribución individual de cada agente. Los beneficios

incluyen un espectro más amplio de la eficacia, mejora la seguridad y la tolerabilidad y una reducción en resistencia antifúngica. Estas pruebas de interacción con otros medicamentos podrían proporcionar una valiosa orientación para la selección de la terapia de combinación (Borisy y col., 2003; Biavatti y col., 2009).

Se han desarrollado terapias donde se combinan distintos tipos de agentes antifúngicos comerciales, como por ejemplo Amfotericina B, considerado una de las principales moléculas para el tratamiento de infecciones fúngicas, se ha utilizado combinado con otras drogas antifúngicas tales como los azoles (Rosato y col., 2007).

Serena y col., (2005) informaron sobre las interacciones in vitro de la micafungina, ya sea con la amfotericina B, fluconazol, itraconazol o voriconazol frente a diferentes cepas de *Cryptococcus spp.* La combinación de amfotericina B y micafungina mostró sinergismo. Asimismo, la misma combinación en estudios experimentales para tratar aspergillosis, (Denis y col., 2006) presento resultados similares. Pai y col. (2008), informaron que la combinación entre micafungina y flucitosina mejoro la actividad fungicida en cepas de *Candida endocarditis* que cuando se utilizaron individualmente.

Zaas (2008), informó sobre las mezclas de equinocandinas con triazoles y formulaciones lipídicas en ensayos clínicos aleatorios. Además, la combinación de caspofungina con estos últimos agentes en su mayoría ha proporcionado resultados favorables. También se han probado diversas combinaciones de drogas antifúngicas (micafungina con anfotericina B y flucitocina; y por otro lado, micafungina y voriconazol) tratando de evitar la resistencia y los efectos tóxicos de las drogas cuando actúan solas.

Por otra parte, las combinaciones de antifúngicos permiten combatir la formación de biopelículas de las especies de *Candida*, mejorando así el tratamiento de estas infecciones. Chatzimoschou y col., (2011) informaron las combinaciones simultáneas o secuenciales de dos triazoles, voriconazol y posaconazol, con dos equinocandinas, anidulafungina y caspofungina, en contra de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

Ante la necesidad de desarrollar nuevos antifúngicos potentes y más seguros que los existentes actualmente (con baja toxicidad), en la bibliografía, existen numerosos trabajos referidos al uso de antimicrobianos de origen natural combinados con antibióticos comerciales (Giordani y col. 2004; Hemaiswarya y col.

2008; Rosato y col. 2008, 2009, Bassolé y Juliani, 2012). El uso de aceites esenciales obtenidos de especies aromáticas de uso medicinal en combinación con antifúngicos comerciales ha cobrado relevancia, como por ejemplo aceites esenciales con amfotericina B contra *Candida* spp. (Rosato y col., 2008), con nistatina (Rosato y col., 2009); la combinación de aceites esenciales con Ketoconazol contra *Trichophyton* spp (Pyum y Shin, 2006); aceites esenciales que potencian la acción antifúngica de Amp B y fluconazol para el tratamiento de la candidiasis (Saad y col., 2010). El aceite de *Coriandrum sativum* y amfotericina B contra *C. albicans* y *C. tropicalis* (Silva y col., 2011).

I.5.-Flora de San Juan

La provincia de San Juan está situada en las laderas de los Andes en el centro-oeste de Argentina (31° de latitud Sur, 69° de longitud Oeste). Las montañas a lo largo de la frontera con la provincia, son de más de 4000 m s.n.m., y los valles van desde las zonas bajas, cubiertas de nieve, a abandonar las zonas con escasas lluvias. Así, la flora comprende un gran número de especies distribuidas a lo largo de diferentes ecosistemas. La provincia cuenta con una medicina tradicional basada en su amplia variedad de plantas medicinales (Bustos y col., 1996). Algunas de las especies, que crecen en esta región, pertenecen a las familias Asteraceae, Apiaceae, Verbenaceae y Lamiaceae.

Existen numerosos trabajos que informan sobre los aceites esenciales y sus componentes mayoritarios, muchos de ellos usados en la medicina popular, tales como alimentos, cosmética, o como conservantes, y en las industrias de perfumería y farmacéutica (Bakkali y col., 2008, Bassolé y Juliani, 2012). Adicionalmente, en la bibliografía, se informa sobre propiedades de los aceites esenciales como antimicrobianos, frente a numerosas bacterias y hongos oportunistas como los dermatofitos que causan infecciones recurrentes (Koroch y col, 2007; Luna y col., 2008; Lima y col. 2008; Tavares y col., 2010; Al-Ja'fari y col., 2011; Kurdelas y col. 2012, Jamaliana y col., 2012).

La información química y farmacológica que se dispone sobre las propiedades medicinales de plantas de la provincia de San Juan es limitada, considerando el potencial químico y posibilidades farmacológicas que ella ofrece. Sobre la base de la necesidad de encontrar productos bioactivos, este trabajo de tesis está orientado a la búsqueda de moléculas con actividad antifúngica a partir de la flora autóctona de la provincia de San Juan.

I.6.-OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento en la química y la actividad biológica de los Productos Naturales de la provincia de San Juan con énfasis en la actividad antifúngica, priorizando la utilización responsable de los recursos naturales y la conservación de la biodiversidad de la región.

I.6.1.-Objetivos Específicos

- 1- Colectar e identificar las especies de la flora autóctona de la Provincia de San Juan con uso potencial en el tratamiento de micosis.
- 2- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos seriados (éter de petróleo, diclorometano y metanol) de *Azorella cryptantha*, *Gentianella multicaulis*, y *Tagetes mendocina* y de los aceites esenciales de *Artemisia mendozana*, *Azorella cryptantha* (de dos zonas de colecta), *Gymnophyton polycephalum*, y *Tagetes mendocina*, frente a un panel de hongos filamentosos, dermatofitos y levaduras estandarizados.
- 3- Determinar la composición química de los aceites esenciales por CG-EM
- 4- Realizar el fraccionamiento bioguiado de los extractos activos. Aislar y purificar los metabolitos presentes en los extractos activos y elucidar la estructura de los metabolitos bioactivos mediante un completo estudio espectroscópico.
- 5- Determinar el espectro de actividad de los compuestos antifúngicos naturales identificados.
- 6- Evaluar la potencialidad clínica preliminar, a través de pruebas *in vitro* realizados con cepas fúngicas aisladas de materiales clínicos.
- 7- Determinar la CIM (concentración inhibitoria mínima) de drogas antifúngicas comerciales: ketoconazol y terbinafina
- 8- Evaluar el efecto sinérgico de los aceites, con drogas antifúngicas comerciales frente a un panel de hongos dermatofitos y levaduras.
- 9- Contribuir a validar o a desalentar el uso de ciertas plantas empleadas para combatir infecciones fúngicas en la medicina popular.

CAPÍTULO II:

MATERIALES Y MÉTODOS

II.-MATERIALES Y MÉTODOS

II.1.-Material Vegetal

En este capítulo, se presenta una descripción de los materiales utilizados así como también las técnicas aplicadas para su desarrollo.

Las especies seleccionadas fueron: *Artemisia mendozana*, *Azorella cryptantha*, *Gentianella multicaulis*, *Gymnophyton polycephalum* y *Tagetes mendocina*. Todas las muestras se colectaron en la zona de Bauchaceta en el departamento Iglesia (San Juan), en la época de floración, en el periodo 2007-2008. La especie *A. cryptantha* fue colectada de dos zonas diferentes del departamento Iglesia, una muestra de la localidad de Bauchaceta aproximadamente a 1800 m s.n.m (*A. cryptantha*-BAU) y una segunda muestra de la localidad de Agua Negra aproximadamente a 4000 m s.n.m (*A. cryptantha*-AN).

Un ejemplar de herbario de cada especie, se depositó en el Museo Botánico de Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba. Las plantas fueron identificadas por el Dr. Luis Ariza Espinar, y por la MCs Eva Filippa (Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, IMBIV, CONICET-UNC).

A continuación, en **Tabla 2** se presentan las especies seleccionadas para este estudio, su nombre científico, nombre vulgar y código de ejemplar de herbario.

Tabla 2. Especies seleccionadas, nombre vulgar y código de herbario.

| Nombre científico | Nombre vulgar | Código de herbario |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|
| <i>Artemisia mendozana</i> | Ajenjo | BT6 |
| <i>Azorella cryptantha</i> (BAU) | Yerba del soldado | CORD 1193 |
| <i>Azorella cryptantha</i> (AN) | Cuerno de cabra | CORD 1092 |
| <i>Gymnophyton polycephalum</i> | Bio-bio | CORD 1188 |
| <i>Gentianella multicaulis</i> | Nencia | CORD 101 |
| <i>Tagetes mendocina</i> | Quinchihue | BT5 |

Las plantas una vez colectadas, se desecaron al abrigo de la luz a temperatura ambiente. Luego fueron molidas y utilizadas para preparar los diferentes extractos. Los aceites esenciales de las especies aromáticas se extrajeron a partir del material fresco.

II.2.-Estudio Químico

II.2.1.-Técnicas de separación

Para el aislamiento de los compuestos bioactivos, a partir de los extractos de las especies seleccionadas, se emplearon técnicas cromatográficas convencionales como: columnas rápidas secas en sílica gel 60 Merck, tamaño de partícula 0,063-0,200 mm (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, USA), de media presión (CCMP) y preparativas (CCDP) eluidas utilizando gradientes de solventes con polaridad creciente (éter de petróleo, acetato de etilo y metanol) e isocráticamente con metanol o mezclas de solventes. Adicionalmente, se empleó permeación en Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals), estabilizada con la siguiente mezcla de solventes: éter de petróleo:cloroformo:metanol (2:1:1) o con metanol, según las características de la fracción que se iba a permear.

Para las cromatografías en capa delgada (CCD) se utilizaron placas comerciales de aluminio cubiertas con sílica gel Merck (60 GF254), se desarrollaron con solventes apropiados para cada caso. Luego se observaron con lámpara UV (254 y 365 nm), se rociaron y revelaron con *m*-fenilbórico en metanol, o *p*-anisaldehído (ácido acético:ácido sulfúrico:etanol, 1,5:20:10:170), calentando a 110°C por 3 min.

También se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) semipreparativa con sistema de termo-separaciones usando una bomba P100 con series de espectros (Waltham, USA), un Refracto-monitor IV, detector IR (Waltham, USA), y un detector con serie de espectro de UV100 (Waltham, USA), UV simultáneos (220 nm) y detección IR. Se utilizó columna de fase reversa YMC RP-18 (5 mm, 20 mm x 250 mm) con un flujo de velocidad de 5 mL/min. Los solventes utilizados fueron de grado HPLC, se usó como fase móvil agua/metanol o acetonitrilo/agua en diferentes proporciones, de acuerdo a la fracción que se estaba trabajando.

II.2.2.-Elucidación estructural

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C se realizaron en un instrumento Brüker Avance II de 500 MHz (Karlsruhe, Germany). Los espectros de RMN de ^1H se midieron a 500,13 MHz y los de RMN de ^{13}C a 125,13 MHz. Los compuestos puros se disolvieron en CDCl_3 y se utilizó como compuesto estándar tetrametilxilano (TMS). Las correlaciones homonuclear ^1H se determinaron mediante experimentos de correlación espectroscópica (COSY). También se utilizaron experimentos de correlación heteronuclear, acoplado a detección cuántica única (DEPT-HSQC), para determinar las multiplicidades de los carbonos y se

determinó el número de protones unidos a carbonos mediante experimentos de correlación heteronuclear de enlaces múltiples (HMBC).

Para establecer los patrones de sustitución en los anillos aromáticos, se utilizó experimento NOESY. Los experimentos RMN en dos dimensiones, se realizaron usando secuencias de pulsos estándar. Los espectros de masa de alta resolución (HRESI) se registraron usando un espectrómetro de masa MicrOTOF QII Brüker (Billerica, MO, USA). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresaron en ppm y los valores de la constante de acoplamiento (J) en Hz. Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un equipo de etapa Kofler caliente (electrotérmica 9100). Los espectros IR se registraron en un instrumento Nicolet Nexus FT-IR.

II.2.3.-Extracción de los Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AEs) se obtuvieron mediante hidrodestilación en un equipo tipo Clevenger, durante 1h, según establece la Farmacopea Europea (2005). El rendimiento porcentual fue calculado utilizando el peso seco del material vegetal de partida.

Los aceites esenciales se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenaron en oscuridad a -18° en microtubos herméticos tipo eppendorf hasta su estudio. El análisis de la composición de los aceites esenciales se hizo mediante cromatografía de gaseosa acoplado a espectrometría de masas (CG/EM).

II.2.3.1.-Caracterización química de los aceites esenciales por análisis CG-EM

Los aceites esenciales se analizaron por cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas (CG/EM). Los espectros se obtuvieron con un equipo Perkin Elmer Clarus 600, acoplado directamente a un cromatógrafo gaseoso Perkin Elmer Series Clarus 600, equipado con una columna capilar DB-5, fase 5% de fenil-metil-siloxano de 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de fase. Se usó Helio como gas portador (49,6 psi). La relación de *Split* seleccionada fue 1:5.

El programa de temperatura de horno que se utilizó temperatura inicial de 60°C durante 5 min, luego a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 240°C , isotérmico durante 10 min. La presión sobre la cabeza de columna fue de 15 psi y la temperatura del inyector y del detector FID fue de 250°C .

Materiales y Métodos

La línea de transferencia del CG se mantuvo a 200°C. La ionización se llevó a cabo en un espectrómetro bajo vacío con impacto de electrones, la energía de ionización fue de 70-eV. Los cromatogramas se obtuvieron en el modo 'barrido' del cuadrupolo de 50m/z a 300m/z. Se utilizó un tiempo de exploración de 0,2 s y 0,1 s entre tiempos de exploración.

La identificación de los compuestos se estableció por comparación: de sus índices de retención (IR), referido a la serie homóloga de n-alcenos (C₉-C₂₅), de sus espectros de masa con datos reportados en la literatura, con los estándares de las librerías computacionales Wiley y Adams, y por co-inyección con compuestos auténticos cuando fue posible (Adams, 2001).

II.3.-Actividad Antimicrobiana

II.3.1.-Microorganismos

Para el estudio de la actividad antifúngica, se utilizaron las siguientes levaduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicales* C 131 2000, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Hongos filamentosos: *Aspergillus flavus* ATCC 9170, *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *Aspergillus niger* ATCC 9029. Dermatofitos: *Trichophyton rubrum* C113, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972 y *Microsporum gypseum* C115, provistos por CEREMIC, Centro de Referencia Micológica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Para la evaluación del efecto antibacteriano, las cepas que se usaron fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*-LM1, *Salmonella enteritidis*-IM. Se utilizaron cepas de Colección de Cultivos Tipificados Americanos (ATCC) Rockville, MD (USA), Instituto Malbrán (IM) y Laboratorio de Microbiología (LM, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina).

II.3.2.-Ensayo de actividad antifúngica: determinación de la CIM

La CIM de cada extracto o compuesto fue determinada usando el método de microdilución en caldo recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2002) de acuerdo a lo establecido en los documentos M27-A2 para levaduras y M 38 A para hongos filamentosos (CLSI, 2008). El medio de cultivo usado fue RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, EEUU) tamponado a pH 7.0 con ácido 3-[N-morfolino propano sulfónico MOPS].

Para el ensayo, se prepararon soluciones stock de los extractos, AE y/o de los compuestos en el medio RPMI-1640, para obtener concentraciones desde 1000 a

Materiales y Métodos

0,98 µg/mL en el caso de los extractos, mientras que para los AEs y/o, compuestos puros se prepararon diluciones entre 250 a 0,98 µg/mL (volumen final = 100 µl). Las muestras se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) y la concentración de este fue ≤ 1% en todos los casos. El inóculo de las células o suspensión de esporas fue ajustado a $1-5 \times 10^4$ células/esporas formadoras de colonias por mililitro (CFU)/ml. Un volumen de 100 µl de suspensión de inóculo se agregó a cada pocillo con la excepción del pocillo de control de esterilidad, donde se colocó agua en lugar de la muestra. Los antifúngicos Ketoconazol (Sigma Chem. Co.) y Anfotericina B (Sigma Chem. Co.). Se usaron como controles positivos para levaduras y *Aspergillus*. Se usó Terbinafina (Novartis, Argentina) como control positivo para los dermatofitos. Las placas se incubaron a 35 °C para levaduras y *Aspergillus*, mientras que fue 28-30 °C para dermatofitos utilizando una cámara oscura y húmeda. La lectura se realizó a las 48 h para levaduras y para los hongos filamentosos fue en un tiempo acorde con el control de crecimiento de hongo.

La CIM₁₀₀ se definió como la menor concentración de extracto, AEs y/o compuesto, que produjo la inhibición total del crecimiento visible, comparado con el crecimiento en los pocillos controles, (sin muestra o antifúngico). Los ensayos se hicieron por duplicado. Las CIM₈₀ se definió como la menor concentración de un compuesto que mostró 80% de reducción del crecimiento del control. Estos fueron leídos a 405 nm espectrofotométricamente en un lector de microplacas VERSA Max (Molecular Devices, USA)

II.3.2.1.-Evaluación del efecto sinérgico de los aceites esenciales en combinación con antifúngicos conocidos.

Para evaluar el efecto de los AEs en combinación con los antibióticos comerciales, se aplicó el método “Tablero de ajedrez” (Borisy y col., 2003). Los valores de la CIM de los AEs y de los antifúngicos comerciales se utilizaron como control positivo. Se prepararon las soluciones stock de los AEs y los antifúngicos disueltos en DMSO (a una concentración ≤ 1%). El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos. A continuación se presenta un modelo de la organización de la microplaca en la metodología utilizada (**Figura 2**).

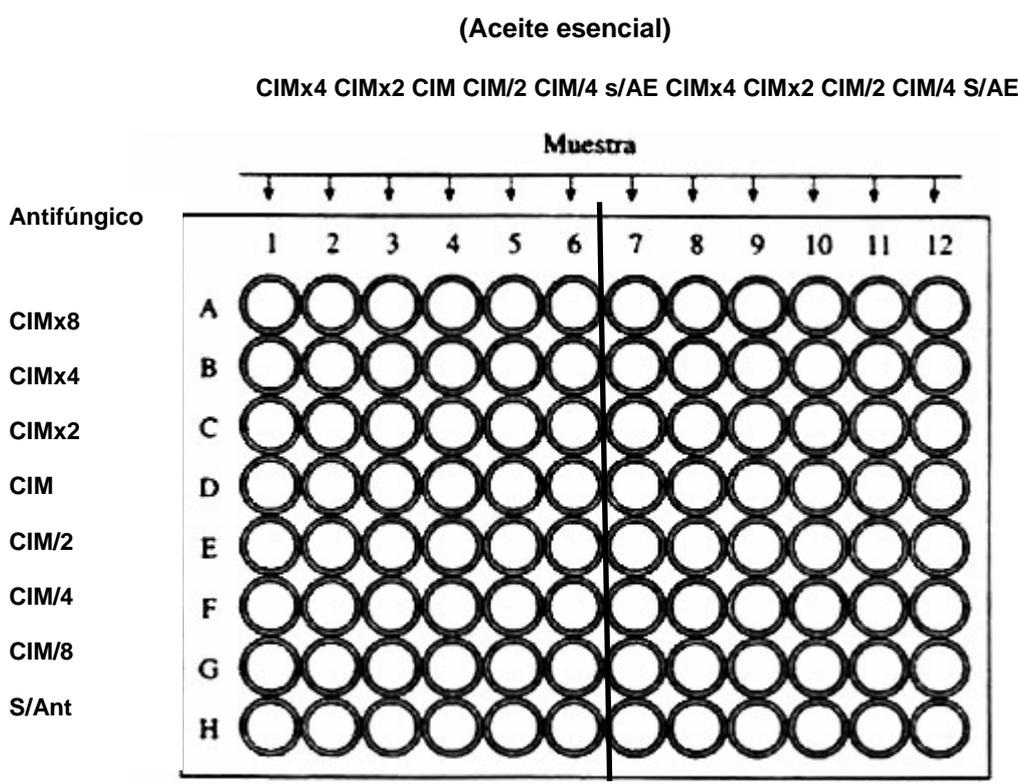


Figura 2: Modelo de la organización de la microplaca en la metodología utilizada

El ensayo se realizó por duplicado, la microplaca se dividió en dos (desde la columna 1 a la 6 y desde la columna 7 a la 12). Las soluciones de los AEs, se añadieron al medio de cultivo (Columnas 1 al 5). En la columna 3 se añadió la concentración correspondiente al valor de la CIM, mientras que en la columna 1 se colocó el valor de la CIM por cuadruplicado (CIMx4) y en la 2 por duplicado (CIMx2). En la columna 6 no se agregó AE, con el objeto de obtener el valor de la CIM del antifúngico en el tablero. A lo largo de las filas de la microplaca (A hasta G) se adicionaron las diluciones en serie de los antibióticos.

El rango de las concentraciones de los antifúngicos se diseñó de la siguiente manera: la concentración correspondiente al valor de la CIM del antifúngico en la fila D, en la fila A se colocó ocho veces el valor de la CIM (CIMx8), en la fila B: el cuádruple del valor de la CIM (CIMx4), y en la fila C: el doble del valor de la CIM (CIMx2). Del mismo modo en las filas E se colocó la mitad del valor de la CIM (CIM/2), en la fila F 4 y en la fila G se colocó la octava parte del valor de la CIM (CIM/8). A la fila H no se añadió antifúngico, para obtener con el valor de la CIM del AE en experimento del tablero.

Finalmente se adicionaron 100 µl de inóculo en cada pocillo, para obtener un inóculo de 5×10^4 CFU/ml. Las microplacas se incubaron durante de 24 a 48 hs a la

temperatura correspondiente para cada hongo. Para el caso de los hongos levaduriformes, el desarrollo en cada pocillo se determinó en lector de microplaca a 405 nm.

El porcentaje de desarrollo reducido en un 80% (CIM₈₀) en cada pocillo fue calculado como sigue:

$$CIM_{80} = 100 \times (\text{DO de la muestra sola} \times 100 / \text{DO control})$$

DO: densidad óptica

Para determinar la CIM en los pocillos en combinación se utilizó la misma ecuación reemplazando la DO de la muestra sola por la DO de la muestra en combinación.

Para determinar la actividad antifúngica frente a los hongos dermatofitos se evaluó la CIM₁₀₀ y se indicó el crecimiento del hongo como (+) y la inhibición completa del crecimiento visible como (-).

Para analizar el efecto de la combinación de los AEs con los antifúngicos comerciales, frente a los hongos levaduriformes ensayados, se consideró el valor de CIM₈₀, es decir la mínima concentración del AE que inhibe en un 80% el desarrollo del hongo y frente a hongos dermatofitos se evaluó el valor de las CIM₁₀₀, es decir la mínima concentración del AE que inhibe en un 100% el desarrollo del dermatofito.

Los resultados se interpretan de la siguiente forma: teniendo en cuenta que el ensayo se realiza por duplicado (ver Figura 1), los valores de absorbancia a lo largo de la última fila (Fila H) indicaron el valor de la CIM del aceite esencial (sin combinar) y los valores de absorbancia de las últimas columnas (columnas 6 y 12) indicaron el valor de la CIM del antifúngico comercial. El resto de las filas y columnas mostraron los valores de absorbancia de las combinaciones entre el AE de cada especie aromática y el antifúngico comercial fluconazol o terbinafina, dependiendo del hongo evaluado.

II.3.2.2.-Determinación de la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF) y su índice (ICIF)

Para determinar si la combinación de los AEs con los antifúngicos conocidos genera aditivismo (no se modifica la actividad), sinergismo (aumenta la actividad, es decir reduce los valores de las CIM) o antagonismo (disminuye la actividad), se calcularon los ICFI (índices de concentración fraccionarias inhibitorias) (Rand y col 1993). El ICFI representa la suma de las CIFs (concentraciones inhibitorias fraccionarias) para cada muestra testada. Las CIFs se calcularon como el cociente

de las CIM de cada muestra en combinación con las CIM de cada muestra sola. Según la siguiente expresión:

$$CIF = (\text{CIM muestra en combinación} / \text{CIM muestra sola})$$

$$ICIF = (\text{CIF de la muestra A} + \text{CIF de la muestra B})$$

Para la interpretación de los resultados se siguió lo informado por Robisy y col. (2003), que indicaron que si el valor de ICIF es menor o igual a 0,5, el efecto se considera sinérgico, y cuando los valores del ICIF están comprendidos entre 0,5 y 4, el efecto se considera aditivismo, mientras que cuando el ICIF es mayor que 4 el efecto es considerado antagónico.

II.3.2.3.-Isobologramas

Para representar los resultados del análisis del efecto sinérgico de los aceites esenciales en combinación con los antifúngicos comerciales, se construyeron las gráficas conocidas como isobologramas (*iso* = equivalente y *bol* = efecto).

Así, el análisis isobolográfico ofrece una base fundamental para evaluar si las respuestas biológicas inducidas por mezclas de agentes son mayor, igual o menor que la que se habría esperado sobre la base de las actividades individuales de los agentes, además permite analizar e incluir el concepto de dosis de aditividad (Gessner, 1995). Los gráficos representan el efecto de los AEs versus las dosis (CIM en combinación) de los antifúngicos comerciales. En general, una línea recta que conecta la relación de 1,0 en la ordenada y 1,0 en el eje de abscisas indica la línea de aditividad. Si la ubicación de los puntos de la combinación está muy por debajo de esta línea, indica que el efecto es sinérgico y por encima de la línea indica que el efecto es antagónico, los puntos cercanos a la línea indican aditivismo (**Figura 3**).

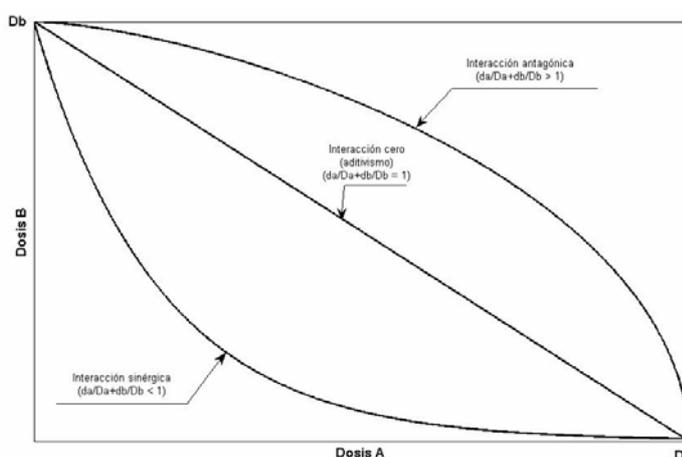


Figura 3: Isoblograma o Líneas de aditividad (a), de sinergismo (b) y de antagonismo (c).

II.3.3.-Actividad antibacteriana: determinación de la CIM

Para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y/o compuestos se utilizó el método de microdilución en caldo recomendado por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2008). Para el ensayo, se prepararon soluciones stock de los extractos y/o de los compuestos a ensayar y fueron diluidas en el medio para obtener concentraciones finales de 1000 a 0,98 µg/mL para extractos, AEs y/o compuestos puros de 100 a 0,98 µg/mL (volumen final = 100 µl) en dimetilsulfoxido (DMSO) una concentración ≤ 1%. Se incluyó como control positivo el agente antimicrobiano cefotaxima (Argentia Farmacéutica) a una concentración de 5 µg/mL. Las bacterias se mantuvieron en agar Müller-Hinton por 24 h a 37 °C. Las suspensiones celulares se ajustaron en agua destilada estéril a una concentración final de $5 \cdot 10^5$ UFC/mL utilizando como referencia de turbidez el valor 0,5 de la escala Mac Farland. Las microplacas se incubaron por 24 h a 37°C. La CIM se definió como la menor concentración de extracto y/o compuesto, que no mostró desarrollo visible luego del tiempo de incubación.

II.4.-Descripción Botánica y Antecedentes de las Especies Seleccionadas

La descripción botánica de las especies seleccionadas se presenta sobre la base de los estudios etnobotánicos disponibles, del uso asignado por los pobladores en la provincia de San Juan y de una exhaustiva búsqueda bibliográfica.

II.4.1.-Artemisia mendozana DC “Ajenjo”

La especie *Artemisia mendozana* se desarrolla como un arbusto común. En general, son hierbas perennes, es decir viven durante varias temporadas y rara vez se desarrollan como hierbas con menos frecuencia anual o bienal.



En la familia Asteraceae, Artemisia, es uno de los géneros más grande. La distribución de *Artemisia mendozana* en San Juan, fue reportada por primera vez por Márquez (1999). Sus hojas, flores y raíces son usadas en la medicina tradicional como infusos para tratar problemas hepáticos y dolores estomacales (Bustos y col., 1996). La actividad antiviral y el compuesto mayoritario del aceite esencial fueron informados por Duschatzky (2005). Asimismo, la actividad antibacteriana de su aceite esencial se evaluó frente a bacterias tipificadas ATCC, tales como *Staphylococcus aureus* (resistente y sensible a meticilina) y frente a *Echerichia coli* (Lima y col., 2008).

Figura 4: Especie *A. mendozana*

(San Juan)

II.4.2.-*Azorella cryptantha* (Clos) Reiche

La especie *A. cryptantha*, colectada en Bauchaceta, departamento Iglesia, crece como arbusto a una altura aproximadamente de 1800 m s.n.m.



Figura 5: Especie *A. cryptantha*
(Bauchaceta, San Juan)

A. cryptantha (**Figura 6**) colectada en la zona de Agua Negra crece como un “cojín” leñoso a una altura cercana a los 4000 m s.n.m. Las plantas “cojín” se caracteriza por una alta densidad de ramificado semiesférica, una forma de crecimiento similar a las esteras, pero se diferencia por la presencia de su raíz pivotante central. Este tipo de fenotipo se debe a las condiciones climáticas a las que está expuesta dicha

La familia Apiaceae cosmopolita está comprendida por 480 géneros y 2600 especies (Martínez, 1989). El género *Azorella* Lam. comprende 30 especies que crecen en las montañas de los Andes y la Patagonia argentina. Solamente 15 especies son reconocidas en Argentina. Esta especie crece en los Andes de Argentina y Chile (Lucerna y col., 2001). En San Juan, a *A. cryptantha* los pobladores le llaman según la zona donde se desarrolla “**yerba del soldado**” o “**cuerno de cabra**”, se utiliza en decocción como colagogo, depurativo de la sangre, expectorante y antigonorreica (Barboza, 2009).

Las especies de *Azorella* son conocidas comúnmente como ‘yareta’ o ‘llareta’. Varios autores han reportado sobre la composición química de las especies chilenas *A. madreporica*, *A. yareta* (Loyola y col., 1997a, 1997b, 1997c, 1998a, 1998b, 2001b, 2002, 2004) y *A. compacta* (Wachter y col, 1999).



Figura 6: Especie *A. cryptantha* (Agua Negra, San Juan)

población (Alonso-Amelot, 2008).

II.4.3.-*Gymnophyton polycephalum* Gillies & Hook. Clos “Bio-bio”

Esta especie se desarrolla como un arbusto de 30-80 cm de altura. Presenta ramas basales espinosas, distales flexuosas, finamente estriadas. Sus hojas basales enteras son lineares de hasta 3 cm de longitud y umbelas de 10-25 floras. Su fruto es oblongo-elíptico 4,5-6,5 mm longitud x 3-4 mm lat. con alas poco más angostas que el cuerpo del mericarpo (Martínez, 1999; 2003).



Figura 7: Especie *Gymnophyton polycephalum*

(San Juan).

Gymnophyton polycephalum pertenece a la familia Apiaceae (Umbelliferae), se desarrolla en la Cordillera, desde Salta a Neuquén, a 1200 a 3200 m s.n.m. Crece en todos los departamentos de la provincia de San Juan (Martínez, 1999; 2003). Esta especie, colectada en la provincia de San Luis, fue incluida en un estudio de evaluación antifúngica de 327 especies seleccionadas sobre la base de su uso etnobotánico de siete países de Latinoamérica (Svetaz y col., 2009).

II.4.4.- *Gentianella multicaulis* (Gillies ex Griseb.) Fabris “Nencia”

Esta especie es muy variable tanto en sus caracteres vegetativos como florales. El rango de variación se observa en el número, grosor y altura de los tallos, en la presencia y cantidad de hojas basales, en la cantidad de flores por inflorescencia y en el color de la corola. Son plantas de hábito generalmente herbáceo y muy pocas leñosas; presentan distintas estrategias metabólicas, siendo la gran mayoría de las especies autotróficas y solamente 30 son aclorófilas y micoheterotróficas (Smith y Read, 2008).



Figura 8: Especie *Gentianella multicaulis* (San Juan)

La familia Gentianeaceae está constituida por varias especies con propiedades químicas interesantes. Estas especies son ampliamente utilizados en la medicina tradicional y como constituyentes amargos y brebajes. La especie *Gentianella multicaulis* es una hierba pequeña que se encuentra distribuida en las regiones noroeste y central de Argentina y crece a 1500-2700 m s.n.m de latitud en la región de la Pre-Cordillera de los Andes.

En la provincia de San Juan, la infusión de las partes aéreas de *G. multicaulis*, conocida localmente como ‘pasto amargo’, ‘hierba amarga’ o ‘nencia’; es usada como tónico estomacal amargo para tratar problemas digestivos y hepáticos (Bustos y col., 1996).

II.4.5.-*Tagetes mendocina* Phil. “Quinchihue”

El género *Tagetes* L. (Asteraceae, Helenieae) comprende especies ornamentales y aromáticas, conocidas popularmente como “caléndulas” (Abdala, 1999). Sus partes aéreas son usadas como plantas ornamentales, medicinales y para rituales (Soule, 1996).



Figura 9: Especie *Tagetes mendocina* (San Juan)

El género *Tagetes* (Asteraceae) comprende 12 especies en la Argentina, crecen desde el noroeste del país hasta el sudoeste de la provincia de San Juan (Abdala, 1999; Ariza Espinar, 1967). En la Argentina, la especie *Tagetes mendocina* Phil. “Quinchihue” es utilizada en infusión, como diurético, (Bustos y col, 1996). En la literatura hay trabajos previos de *Tagetes* spp., de Argentina que informan su distribución quimiotaxonómica, y su actividad como captador de radicales libres (Abdala y col., 1983, 1991, Shmeda-Hirschmann y col., 2004). Feresin y col., 2000, Tereschuk, 2000; 2003; 2004 informaron el efecto antimicrobiano de diferentes especies de *Tagetes* spp. de Argentina

CAPÍTULO III

Aceites Esenciales: Caracterización química y Actividad antifúngica de

Artemisia mendozana

Azorella cryptantha

Gymnophyton poliycephalum

Tagetes mendocina

III.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1.-Introducción

La industria de los productos naturales está en constante búsqueda de agentes y compuestos que reemplacen a los sintéticos, para ser usados como antibióticos, como terapéuticos o como conservantes naturales (Bakkali y col., 2008).

Adicionalmente, se conoce que las plantas producen una alta diversidad de metabolitos secundarios con propiedades biocidas con el fin de protegerse de depredadores, de patógenos microbianos o de herbívoros. Algunos de estos metabolitos también están implicados en mecanismos de defensa contra el estrés abiótico (por ejemplo, la radiación UV), además cumplen un rol importante en la interacción de las plantas con otros organismos, como por ejemplo la atracción de los polinizadores (Schafer y Wink, 2009).

Los aceites esenciales (AEs) son una mezcla compleja de moléculas orgánicas biosintetizadas por las plantas aromáticas. El tipo de compuestos incluidos en ellos, son terpenos hidrocarbonados y oxigenados, terpenoides, caracterizados en general, por su bajo peso molecular. Algunas de las propiedades atribuidas desde hace tiempo, son las relacionadas a la actividad antimicrobiana, antivirales, insecticidas, antioxidantes entre otras (Koroch y col, 2007; Tavares y col., 2010; Al-Ja'fari y col., 2011; Kurdelas y col. 2012, Jamaliana y col., 2012). Otro aspecto relevante es que estas mezclas (los AEs), es que han mostrado, en reiteradas ocasiones, más actividad biológica en su conjunto que sus componentes por separado, esto podría indicar que la actividad que presentan se debe al efecto combinado de sus componentes, ya sea los mayoritarios o minoritarios presentes en el mismo (Bassolé y Juliani, 2012). El objetivo de este capítulo fue caracterizar químicamente y estudiar la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Artemisia mendozaana* DC conocida como "Ajenjo", *Azorella cryptantha* (Clos) Reiche (de dos poblaciones distintas); *Gymnophyton polycephalum* Gillies & Hook. Clos y *Tagetes mendocina* Phil.

III.2.- Extracción de los Aceites esenciales

Las especies aromáticas seleccionadas para este estudio, *Artemisia mendozaana*, *Azorella cryptantha*, *Gymnophyton poliycephalum* y *Tagetes mendocina* tienen diferentes usos, (ver antecedentes Capítulo II) como condimentos, en infusiones o

decocciones para tratar problemas hepáticos, desordenes estomacales, úlceras, infecciones en la piel, y enfermedades domésticas (Bustos y col., 1996).

De las partes aéreas de las especies (500 g), se realizó la extracción de los AEs por hidrodestilación como se describe en el Capítulo II. A continuación en la **Tabla 3** se presentan las especies estudiadas (nombre científico y vulgar), el rendimiento porcentual de los AEs obtenidos y las propiedades físicas de los mismos.

Tabla 3. Especies colectadas en el departamento Iglesia, en la provincia de San Juan (especie, familia, nombres científico y común, rendimiento de los AEs y sus propiedades físicas.

| Familia | Especie | Rend. % (p/v) | Propiedades físicas | | |
|------------|---------------------------|---------------|--------------------------|------------|--------------------------------------|
| | | | δ^{25} [mg/ml] | n_D^{25} | $[\alpha]_D^{25}$ |
| Asteraceae | <i>A. mendozana</i> | 0,62 | 0,670 | 1,4840 | – |
| Apiaceae | <i>A. cryptantha</i> -BAU | 1,0 | Ni | Ni | Ni |
| Apiaceae | <i>A. cryptantha</i> -AN | 0,4 | Ni | Ni | Ni |
| Apiaceae | <i>G. polycephalum</i> | 1,15 | 0,870 | 1,4770 | +41,82 (c=0,416 MeOH) |
| Asteraceae | <i>T. mendocina</i> | 0,81 | 0,940 | 1,4990 | 2,70 (c=0,074 CH ₃ Cl) |

Ni: no identificado, δ^{25} : densidad medidos; n_D^{25} : índice de refracción $[\alpha]_D^{25}$: ángulo de rotación, a 25°C.

III.3.-Composición química de los aceites esenciales

La composición química de los AEs se analizó mediante CG-EM (descrito en el Capítulo II). En las siguientes tablas (2-5) se presentan los constituyentes y el porcentaje relativo de cada uno, obtenidos mediante análisis por CG y CG-EM para los AEs de *Artemisia mendozana*, *Azorella cryptantha* (de ambas zonas de colecta), *Gymnophyton polycephalum* y *Tagetes mendocina*.

La composición porcentual de los AEs fue calculada a partir de las áreas de los picos sin corrección, obtenidos del factor de respuesta de la FID, y los índices de retención (IR) se calcularon usando las series homólogas de *n*-alcanos C₈-C₁₈. A continuación, en la **Tabla 4** se muestra la composición química del AE de *Artemisia mendozana*.

Tabla 4. Composición química (%) del AE de *Artemisia mendozaana*, índice de retención y modo de identificación

| IR | Compuestos | Composición [%] | Identificación |
|------|---------------------------|-----------------|----------------|
| 873 | Santolina trieno | 4,4 | EM, IR |
| 894 | Artemisia trieno | 0,1 | EM, IR |
| 998 | α -Tujeno | 0,2 | EM, IR, co-CG* |
| 908 | α -Pino | 2,4 | EM, IR, co-CG |
| 928 | Canfeno | 1,3 | EM, IR, co-CG |
| 935 | Verbeneno | 0,2 | EM, IR |
| 963 | Artemisol | 11,1 | EM, IR, |
| 96 | β -Pino | 0,3 | EM, IR, co-CG |
| 1002 | Alcohol Yomogi | 3,6 | EM, IR |
| 1013 | α -Terpino | 0,4 | EM, IR, co-CG |
| 1020 | <i>p</i> -Cimeno | 0,8 | EM, IR, co-CG |
| 1023 | Limoneno | 0,4 | EM, IR, co-CG |
| 1025 | 1,8-Cineol | 2,6 | EM, IR, co-CG |
| 1042 | Santolina- epoxido | 2,0 | EM |
| 1047 | γ - Terpineno | 4,4 | EM, IR, co-CG |
| 1056 | Hidrato de cis-Sabineno | 0,3 | EM, IR |
| 1064 | 2-isobutil-Norbonano | 0,5 | EM |
| 1072 | Alcohol Artemisia | 10,8 | EM, IR |
| 1086 | Hidrato de trans-Sabineno | 0,2 | EM, IR |
| 1092 | α -Tujona | 3,4 | EM, IR |
| 1103 | β -Tujona | 1,0 | EM, IR |
| 1112 | Crisantenona | 0,6 | EM, IR |
| 1135 | Alcanfor | 22,4 | EM, IR |
| 1154 | Pinocarvona | 0,5 | EM, IR |
| 1162 | Borneol | 7,2 | EM, IR |
| 1174 | Terpinen-4-ol | 2,1 | EM, IR, co-CG |
| 1191 | α -Terpineol | 0,2 | EM, IR, co-CG |
| 1208 | Verbenona | 1,3 | EM, IR |
| 1281 | Acetato de Bonil | 3,5 | EM, IR |
| 1411 | Trans-Cariofileno | 0,3 | EM, IR |
| 1468 | δ -Selineno | 0,1 | EM, IR |
| 1489 | Biclogermacreno | 1,4 | EM, IR |
| 1519 | δ -Cadineno | 0,2 | EM, IR |

Estudio Fitoquímico Bioguiado por Actividad Antifúngica, de Plantas de la Flora de San Juan

| | | Aceites esenciales: Caracterización química y Actividad antifúngica | |
|-------|------------|--|--------|
| 1573 | Spatulenol | 2,3 | EM, IR |
| 1579 | Globulol | 0,3 | EM, IR |
| TOTAL | | 92,8 | |

*co-CG: co-inyección con las muestras auténticas.

En el AE de *A. mendozana*, se identificaron y cuantificaron treinta y seis componentes que representan el 92,8 %. Los compuestos mayoritarios fueron: alcanfor (22,4 %), artemisol (11,1 %), alcohol artemisia (10,8 %) y borneol (7,2 %).

En 2006, Shatar y col. informaron la composición química del aceite esencial de once especies de *Artemisia* colectadas en el Desierto Gobi Mongolia, en este estudio, el alcanfor fue el componente mayoritario en seis de las especies de Artemisias evaluadas, coincidiendo con los resultados del AE de *Artemisia mendozana*, colectada en San Juan.

En la **Tabla 5** se presenta la composición química del AE de la especie *Azorella cryptantha*, para la muestra colectada en la zona de Bauchaceta (BAU) y la de Agua Negra (AN), en el Departamento Iglesia

Tabla 5. Composición química del aceite esencial de la especie *Azorella cryptantha* colectada en Bauchaceta (BAU) y *A. cryptantha* colectada en Agua Negra (AN)

| IR | Compuestos | Composición [%] ^b | | Identificación |
|------|-----------------------------------|------------------------------|-----|---------------------|
| | | BAU | AN | |
| 931 | α-Tujeno | 12,5 | 5,7 | Co. EM ₁ |
| 940 | α-Pineno | 21,9 | 9,6 | Co. EM ₁ |
| 950 | Canfeno | 1,8 | 0,8 | EM ₂ |
| 974 | Sabineno | 6,4 | - | EM ₂ |
| 980 | β-Pineno | 1,5 | 5,9 | Co. EM ₁ |
| 992 | β -Mirceno | 1,0 | 0,7 | EM ₂ |
| 1011 | α -Felandreno | - | 0,1 | EM ₂ |
| 1018 | α -Terpineno | - | 1,0 | EM ₂ |
| 1028 | <i>o</i> -Cimeno | 0,1 | - | EM ₂ |
| 1029 | Limoneno ^d | 1,1 | 1,6 | EM ₂ |
| 1035 | β -Felandreno | 0,6 | 2,5 | EM ₂ |
| 1038 | β - <i>cis</i> -Ocimeno | 0,5 | 0,9 | EM ₂ |
| 1051 | β - <i>trans</i> -Ocimeno | 0,5 | 0,5 | EM ₂ |
| 1091 | α -Terpinoleno | 0,4 | - | EM ₂ |

Estudio Fitoquímico Bioguiado por Actividad Antifúngica, de Plantas de la Flora de San Juan

| | | | | Aceites esenciales: Caracterización química y Actividad antifúngica |
|--------------|--|-------------|-------------|--|
| 1145 | cis- β -Terpineol | - | 0,8 | EM ₂ |
| 1164 | Isoborneol | - | 1,1 | EM ₂ |
| 1170 | Borneol | - | 1,1 | Co.EM ₁ |
| 1350 | α -Cubebeno | - | 0,4 | EM ₂ |
| 1409 | α -Gurjuneno | - | 0,4 | EM ₂ |
| 1418 | β -Cariofileno | 1,9 | 1,1 | EM ₂ |
| 1433 | β -Gurjuneno | - | 3,7 | EM ₂ |
| 1478 | γ -Gurjuneno | Tr | 0,7 | EM ₂ |
| 1479 | α -Humuleno | Tr | 0,6 | EM ₂ |
| 1487 | Germacreno D | - | 0,2 | EM ₂ |
| 1494 | γ -Muuroleno | 0,6 | - | EM ₂ |
| 1499 | α -Muuroleno | 2,0 | 1,6 | EM ₂ |
| 1506 | α -Farneseno | - | 2,4 | EM ₂ |
| 1512 | γ-Cadineno | 3,6 | 4,0 | EM ₂ |
| 1522 | δ-Cadineno | 8,6 | 6,3 | EM ₂ |
| 1552 | α -Cadineno | 0,6 | - | EM ₂ |
| 1558 | α -Calacoreno | Tr | - | EM ₂ |
| 1592 | β-trans-Guaieno | 6,2 | - | EM ₂ |
| 1596 | Viridiflorol | - | 2,5 | EM ₂ |
| 1623 | β -cis-Guaieno | 3,2 | - | EM ₂ |
| 1640 | π-Cadinol^d | 1,8 | 4,6 | EM ₂ |
| 1642 | π-Muurolol^d | 8,5 | 5,0 | EM ₂ |
| 1647 | Cubenol | - | 0,2 | EM ₂ |
| 1719 | δ-Cadinol | 6,7 | - | EM ₂ |
| | Ni | - | 22,7 | |
| Total | | 92,3 | 88,7 | |

a) IR: índices de retención relativos a la serie homóloga de n-alcanos; b) Porcentajes fueron calculados del área los picos sin corrección; c) Modo de identificación: EM₁: identificados con compuestos puros de referencia; EM₂: identificación con datos publicado; Co: co-inyección con compuestos auténticos; d) Co elución crítica en columna DB-5, se resolvieron mediante la adición de una separación de polaridad de segunda dimensión, en la columna Supelcowax-10. tr: trazas <0.1%; Ni; no identificado

El AE de la especie de *A. cryptantha*-BAU presentó un total de 26 compuestos (representando el 92,3 %). En el AE de *A. cryptantha*-AN se identificaron 30 (representando el 88,7 %). La composición química fue similar para ambas

poblaciones de *Azorellas*, sin embargo hubo algunas variaciones en las proporciones relativas de los componentes mayoritarios.

En el AE de *A. cryptantha*-BAU, los compuestos dominantes en la fracción de los monoterpenos hidrocarbonados fueron: α -tujeno (12,5 %), α -pineno (21,9 %), sabineno (6,4 %), δ -cadineno (8,6 %), β -trans-guaieno (6,2 %), δ -cadinol (6,7 %) y τ -muurolol (8,5 %) mientras que el AE de *A. cryptantha*-AN presentó un contenido menor de este clase de terpenos. Los compuestos mayoritarios fueron: α -tujeno (5,7 %), α -pineno (9,6 %), β -pineno (5,9 %), γ -cadineno (4,0 %), τ -cadinol (4,6 %), τ -muurolol (5,0 %) y δ -cadineno (6,3 %). Solamente el AE de *A. cryptantha*-AN presento monoterpenos oxigenados, cis- β -terpineol (0,8 %), isborneol (1,1 %), y borneol (1,1 %).

A continuación, a modo comparativo se muestran los gráficos que representan el contenido (expresado en porcentaje) del tipo de terpenos que componen el AE de *A. cryptantha*-BAU y AN (Figura 10).

Composición química porcentual de terpenos

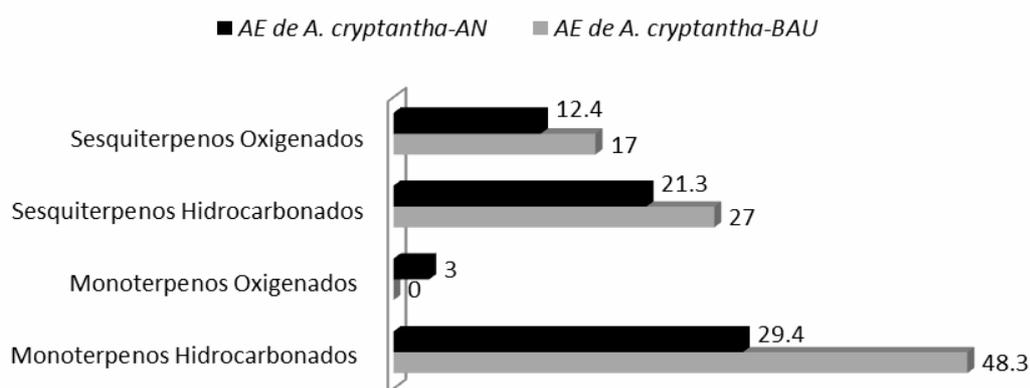


Figura 10-. Composición de terpenos del AE de *A. cryptantha*-BAU y de *A. cryptantha*-AN

En general, el contenido de terpenos hidrocarbonados presentes en los AEs fue diferente para ambas poblaciones. El AE de *A. cryptantha*-BAU mostró un porcentaje del 48,3 %, mientras que el AE de *A. cryptantha*-AN presentó el 29,4 %. Las diferencias más notables estuvieron presentes en el contenido de los compuestos minoritarios, como los terpenos oxigenados. Una diferencia menor, pero relativamente importante, se observó en el contenido total de sesquiterpenos hidrocarbonados (21,3% para *A. cryptantha*-BAU y 27% y *A. cryptantha*-AN, y de sesquiterpenos oxigenados fue 17% y 12,4%, respectivamente.

Las diferencias observadas con respecto a la composición química de los AEs de ambas muestras de *A. cryptantha* (BAU: 1800 y AN: 4000 m s.n.m.) podrían explicarse, si se considera lo informado por Alonso-Amelot, (2008) en su capítulo “Plantas de altitud, química de aclimatación y adaptación”, donde indica que las especies que comprenden el género *Azorellas*, son capaces de desarrollarse favorablemente, aún a alturas elevadas, poniendo en funcionamiento procesos fisiológicos especializados a tal punto que modifican su respuesta química.

Adicionalmente, podría deberse a la puesta en funcionamiento de algunas de las estrategias que utilizan estas especies es la biosíntesis de lípidos de las membranas celulares que permitan amortiguar cambios en la flexibilidad y permeabilidad frente al agua, o en habilidades como su desarrollo en forma de “cojín”, como *A. cryptantha*-AN, para reducir el estrés hídrico y por frío que puede sufrir la especie a diferencia de las especies que se encuentran a alturas menores (Kleir y Rundel, 2009).

A continuación, en **Tabla 6**, se presenta la composición porcentual y la identificación de sus componentes, en el AE de de *Gymnophyton polycephalum*.

Tabla 6. Composición química del AE de *Gymnophyton polycephalum*

| IR | Compuestos | Composición [%] | Identificación ^{a)} |
|-------|------------------------|-----------------|------------------------------|
| 931 | α -tujeno | 0,82 | EM ₂ |
| 940 | α -pineno | 1,63 | Co, EM ₁ |
| 950 | Canfeno | 31,84 | Co, EM ₁ |
| 992 | β -mirceno | 2,06 | Co, EM ₁ |
| 1005 | α -felandreno | 10,2 | Co, EM ₁ |
| 1018 | α -terpineno | 0,5 | EM ₂ |
| 1025 | <i>p</i> -cimeno | 3,55 | Co, EM ₁ |
| 1029 | Limoneno | 9,40 | Co, EM ₁ |
| 1038 | β -cis-ocimeno | 12,60 | EM ₂ |
| 1051 | β -trans-ocimeno | 15,34 | Co, EM ₁ |
| 1061 | γ -terpineno | 5,5 | EM ₂ |
| 1088 | Terpinoleno | 0,87 | EM ₂ |
| 1177 | terpinen-4-ol | 1,11 | Co, EM ₁ |
| 1418 | β -cariofileno | 0,65 | EM ₂ |
| 1499 | α -muuroleno | 0,45 | EM ₂ |
| 1578 | Spatulenol | 0,22 | EM ₂ |
| Total | | 96,74 | |

^{a)}Modo de identificación: EM₁: identificados con compuestos puros de referencia; EM₂: identificación con datos publicados; Co: co-inyección con compuestos auténticos; tr: trazas <0.1%; Ni: no identificado

La composición química del AE de *G. polycephalum*, se caracterizó por un elevado contenido de canfeno (31,84%), α -felandreno (10.2%), β -cis-ocimeno (12,60%), y β -trans-ocimeno (15,34%). El 94,31% del aceite esencial de *Gymnophyton polycephalum* presentó monoterpenos hidrocarbonados. En este trabajo, se informa por primera vez la composición del AE de esta especie. A continuación, en la **Tabla 7**, se presenta la composición química del AE de *Tagetes mendocina*.

Tabla 7. Composición química del AE de *Tagetes mendocina*

| IR | Compuestos | Composición(%) ^a | Identificación |
|-------|----------------------|-----------------------------|--------------------|
| 939 | α -pineno | 5,5 | EM ₁ Co |
| 975 | sabineno | 3,7 | EM ₁ |
| 979 | β -pineno | 1,0 | EM ₁ Co |
| 1002 | δ -2-careno | Tr | EM ₁ |
| 1017 | α -terpineno | 1,1 | EM ₁ Co |
| 1030 | β -felandreno | Tr | EM ₁ |
| 1037 | (Z) β -ocimeno | Tr | EM ₁ |
| 1050 | (E) β -ocimeno | 28,6 | EM ₁ Co |
| 1053 | dihidrotagetona | 2,7 | EM ₁ |
| 1060 | γ -terpineno | Tr | EM ₁ |
| 1089 | terpinoleno | 0,5 | EM ₁ |
| 1144 | (E)-tagetona | 11,7 | EM ₁ |
| 1150 | mircenona | 0,2 | EM ₁ Co |
| 1152 | (Z)-tagetona | 28,0 | EM ₁ Co |
| 1153 | citronelal | Tr | EM ₁ |
| 1162 | isoborneol | 1,2 | EM ₁ |
| 1169 | borneol | 0,5 | EM ₁ Co |
| 1196 | dihidrocitronelol | 1,8 | EM ₂ |
| 1229 | (Z)-ocimenona | 7,3 | EM ₁ Co |
| 1238 | (E)-ocimenona | 4,7 | EM ₁ Co |
| 1267 | geranial | 0,1 | EM ₁ Co |
| Total | | 97,3 | |

EM₁: identificación con los compuestos puros de referencia. EM₂: identificación con datos publicados. Co: co-inyección con compuestos auténticos. tr: trazas < 0,1%.

Se identificaron en el AE de *T. mendocina* 21 constituyentes (lo que representa el 97,3% del total). Los componentes mayoritarios en concentraciones >3,5 % fueron: β -trans-ocimeno, cis-tagetona, trans-tagetona, cis-ocimenona, α -pineno, y trans-ocimenona. Estos compuestos son los más reconocidos en este género (Del Rey y col., 1999; Margl y col., 2002; Misra y col., 1991).

III.4.-Actividad antifúngica de los aceites esenciales

La actividad antifúngica de los aceites esenciales se evaluó mediante microdilución, de acuerdo a la metodología que se describe en el Capítulo II. En la **Tabla 8** se presentan los valores de la concentración inhibitoria mínima (CIM), expresados en $\mu\text{g/ml}$, de los AEs y los antifúngicos de referencia ensayados frente a un panel de hongos levaduriformes, filamentosos y dermatofitos.

De acuerdo a Ríos y Recio (2005), la actividad antimicrobiana de extractos y/o aceites esenciales se considera activos para valores de $\text{CIM} \leq 1000\mu\text{g/ml}$ y para compuestos $\text{CIM} \leq 50\mu\text{g/ml}$. Los resultados indicaron que el AE de *A. mendozana* presentó efecto antifúngico frente a *C. neoformans* ($\text{CIM} = 31,25 \mu\text{g/ml}$) y fue moderadamente activo frente a *Candida albicans* con valores de CIM de $500 \mu\text{g/ml}$. Asimismo, frente a los dermatofitos, este aceite fue activo con valores de CIM de 250 y $500 \mu\text{g/ml}$.

La susceptibilidad de las levaduras se presentó frente al AE de *A. cryptantha*-AN, donde el hongo *C. neoformans* fue sensible con valores de $\text{CIM} = 250 \mu\text{g/ml}$, mientras que las especies *Candida albicans* ($\text{MIC} = 500 \mu\text{g/ml}$), *C. tropicalis*, y *S. cerevisiae* ($\text{MIC} = 1000 \mu\text{g/ml}$) fueron menos sensibles. El AE *A. cryptantha*-BAU fue activo solo frente a las especies *C. neoformans* y *Candida albicans* ($\text{CIM} = 500 \mu\text{g/ml}$).

Asimismo, los aceites esenciales de ambas poblaciones de *Azorella cryptantha* BAU y AN (Bauchaceta y Agua Negra), presentaron efecto antifúngico relevante frente a los dermatofitos ensayados con valores de $\text{CIM} = 250 \mu\text{g/ml}$ frente a *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* y *M. gypseum* fue menos sensible ($\text{CIM} = 500 \mu\text{g/ml}$). Estos resultados sugieren el potencial de esta especie para tratar infecciones fúngicas superficiales tales como las que ocasionan los dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Con respecto a los hongos filamentosos del género *Aspergillus*, solamente el AE de *A. cryptantha*-BAU inhibió a *A. niger* a valores de CIM de $1000 \mu\text{g/ml}$. Mientras que el resto de los *Aspergillus* no fueron sensibles al AE de *A. cryptantha* independientemente de la zona de colecta.

Tabla 8. Actividad antifúngica de los AE frente a hongos levaduriformes, filamentosos y dermatofitos. El ensayo se realizó por duplicado. Los resultados se muestran como valores de CIM ($\mu\text{g/ml}$)

| Aceites esenciales | <i>C. a</i> | <i>C. t</i> | <i>S. c</i> | <i>C. neo</i> | <i>A. fl</i> | <i>A. ni</i> | <i>A. fu</i> | <i>M. g</i> | <i>T. r</i> | <i>T. m</i> |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>A. mendozana</i> | 500 | >1000 | >1000 | 31,25 | >1000 | >1000 | >1000 | 500 | 250 | 250 |
| <i>A. cryptantha-BAU</i> | 500 | >1000 | >1000 | 500 | >1000 | 1000 | >1000 | 500 | 250 | 250 |
| <i>A. cryptantha-AN</i> | 500 | 1000 | 1000 | 250 | >1000 | >1000 | >1000 | 500 | 250 | 250 |
| <i>G. polycephalum</i> | >1000 | >1000 | 62,5 | >1000 | 500 | >1000 | 1000 | 1000 | 500 | 500 |
| <i>T. mendocina</i> | >1000 | >1000 | >1000 | 31,25 | >1000 | >1000 | >1000 | 250 | 250 | 250 |
| Itraconazol | 0,0035 | - | - | 0,0035 | - | - | - | 0,12 | 0,24 | 0,24 |
| Fluconazol | 1,95 | - | - | 50 | - | - | - | >200 | >200 | >200 |
| Terbinafina | - | - | - | - | - | - | - | 0,016 | 0,004 | 0,004 |
| Anfotericina B | 1 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,125 | 0,075 | 0,075 |

C. a: *Candida albicans* ATCC 10231, *C. t*: *Candida tropicalis* C 131, *S. c*: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *C. neo*: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *A. fl*: *Aspergillus flavus* ATCC 9170, *A. ni*: *Aspergillus niger* ATCC 9029, *A. fu*: *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *M. g*: *Microsporium gypseum* C 115, *T. r*: *Trichophyton rubrum* C 110, *T. m*: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972

La actividad biológica que presentan los aceites esenciales podría deberse, en general a la presencia de compuestos oxigenados y en muchas ocasiones, a la presencia de componentes minoritarios, a los que suele atribuirse que actúan en sinergia (Bakkali y col., 2008). La variación en el espectro de la actividad antifúngica que mostró el AE de *A. cryptantha* según la zona de colecta, podría deberse a las diferencias observadas en sus constituyentes, las que probablemente sean una consecuencia de las condiciones ambientales en las que se desarrolla cada población (*A. cryptantha* BAU: 1800 y *A. cryptantha* AN: 4000 m s.n.m.) si se considera lo informado por Alonso-Amelot, (2008), que dispara diferentes procesos fisiológicos como respuesta ante las condiciones adversas de su entorno.

El AE de *G. polycephalum* presentó el mayor efecto antifúngico frente a la levadura *S. cerevisiae* (CIM = 62,5 µg/ml). Mientras que los dermatofitos *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* fueron sensibles, con valores de CIM de 500 µg/ml, adicionalmente la especie *M. gypseum* fue la más resistente frente a este aceite (CIM = 1000 µg/ml). Con respecto a la actividad antifúngica del AE de *T. mendocina*, la especie *C. neoformans* presentó valores de CIM de 31,25 µg/ml, que resultó ser la más sensible. Además fue activo frente a los tres hongos dermatofitos ensayados con valores de CIM de 250 µg/mL. Si se considera que fue informado que las especies *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* son las responsables de más del 93% de las infecciones fúngicas superficiales en todo el mundo y muy difíciles de erradicar (Campbell y col., 2004; Loo, 2007; Havlickova y col., 2008). Desde hace más de dos décadas, las infecciones son la mayor causa de morbilidad y con frecuencia mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Patterson y col., 2005), sumado a las limitaciones en la eficacia y la alta toxicidad de las drogas antifúngicas disponibles (Ben Arfa y col., 2006) han evidenciado la necesidad de nuevos compuestos o mezclas de compuestos, de origen natural, con propiedades antifúngicas. Los resultados obtenidos sobre la actividad antimicótica a partir de los aceites esenciales de las especies estudiadas podrían ser una alternativa interesante para ser usados en el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales.

III.5.-Conclusiones

En este capítulo se presentó la composición química y la actividad antifúngica de los aceites esenciales de las especies *A. mendozana*, *Azorella cryptantha* (de Bauchaceta y Agua Negra), *G. polycephalum* y *T. mendocina* colectadas en el departamento Iglesia, provincia de San Juan.

Pudo establecerse que la proporción de los constituyentes mayoritarios del aceite esencial de las dos poblaciones de *A. cryptantha* fue similar, sin embargo se presentaron diferencias en los constituyentes minoritarios. Solamente el AE de *A. cryptantha*-AN presentó monoterpenos oxigenados, que podrían dar respuesta a la actividad antifúngica diferencial mostrada.

Los AEs de *A. mendozana*, *A. cryptantha* y *T. mendocina* fueron activos frente a los dermatofitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *M. gypseum* y los hongos levaduriformes *C. albicans* y *C. neoformans*.

Estos resultados indicarían que los aceites esenciales obtenidos de las especies seleccionadas en este estudio, colectadas en la zona cordillerana de la provincia de San Juan, podrían considerarse como una fuente promisorio de moléculas con posible aplicación en el tratamiento de infecciones fúngicas superficiales, especialmente aquellas provocadas por dermatofitos o algunos hongos oportunistas.

CAPITULO IV

Estudio del Efecto Sinérgico de Aceites Esenciales en Combinación con Antifúngicos Comerciales

IV.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1.-Introducción

Es sabido que en varias ocasiones, la falta de éxito en las terapias antifúngicas se debe principalmente a la resistencia observada *in vitro*, propia de la cepa o adquirida durante el tratamiento, o a la resistencia clínica, la cual está asociada con factores relacionados con el huésped, el agente antifúngico o la cepa responsable de la infección (Espinell-Ingroff, 2008).

La gran mayoría de los casos clínicos de resistencia antifúngica han sido informados para los antifúngicos de la clase azoles. La adquisición de la tolerancia a azoles por parte de los diferentes patógenos fúngicos es probablemente por el uso repetido (especialmente fluconazol) en los tratamientos a pacientes con infecciones fúngicas que padecen VIH (Kontoyiannis y col., 2002). El incremento de la resistencia a las drogas clásicas, su toxicidad, los costos implicados o la falta de nuevas clases de fármacos, junto con la aparición de diferentes dianas moleculares, justifican la búsqueda de nuevas moléculas que superen estas restricciones (Silva y col., 2011).

En los últimos años, surgieron una serie de fármacos antifúngicos para el tratamiento de infecciones fúngicas graves, que presentan ciertas características distintivas respecto a los antifúngicos tradicionales, como por ejemplo la eficacia, biodisponibilidad, y modo de penetración en el tejido (Chaturvedi y col., 2011).

De acuerdo a Mukherjee y col., (2005) las razones más comunes para utilizar como estrategia la terapia de combinación se basan en (i) mecanismos de acción, la combinación de agentes con objetivos complementarios dentro de las células fúngicas (polienos más azoles o equinocandinas, antifúngicos más factores inmunológicos, etc), (ii) espectro de acción (agentes potentes contra diferentes organismos combinación), y (iii) características de estabilidad, de la farmacocinética y de la farmacodinámica.

Como fuente de productos naturales, las plantas que se usan en medicina tradicional, son una alternativa inagotable de moléculas biológicamente activas que podrían permitir la reducción de la resistencia de los hongos a los fármacos o la disminución de la dosis de los antibióticos utilizados.

IV.2.- Estudio del efecto sinérgico

Los aceites esenciales de las especies estudiadas en el Capítulo III, que presentaron valores de CIM $\leq 1000 \mu\text{g/ml}$ en los ensayos de actividad antifúngica, se seleccionaron para determinar el efecto sinérgico en combinación con antifúngicos comerciales conocidos, utilizando el método “Tablero de ajedrez” (Borisy y col., 2003).

Por lo tanto para evaluar el efecto sinérgico frente a los hongos levaduriformes *C. albicans* y *C. neoformans* y los dermatofitos *M. gypseum* y *T. rubrum* se seleccionaron los AEs de *A. mendozana*, *A. cryptantha* (BAU y AN) y *T. mendocina*.

IV.2.1.- Aceite esencial de *Artemisia mendozana*

- **Combinación con fluconazol frente *Cryptococcus neoformans*:**

El AE de *A. mendozana* sin combinar presentó un valor de CIM₈₀ de 1000 ($\mu\text{g/ml}$) y para el valor para fluconazol solo, fue de 8 ($\mu\text{g/ml}$). Según los datos del tablero (Anexo I), los valores de las CIM₈₀ del aceite esencial en combinación con fluconazol disminuyeron en relación a los valores de las CIM₈₀ individuales frente a *C. neoformans*. Con estos datos, a continuación se calculó la CIF (concentración inhibitoria fraccionaria) para el AE de *A. mendozana* y fluconazol

$$\text{CIF}_{\text{AE}} = \text{CIM}_{\text{comb}} / \text{CIM}_{\text{AE solo}}$$

$$\text{CIF}_{\text{AE}} = 125 / 1000 = 0,125$$

$$\text{CIF}_{\text{Antif}} = \text{CIM}_{\text{comb}} / \text{CIM}_{\text{Antif. solo}}$$

$$\text{CIF}_{\text{Antif}} = 4 / 8 = 0,5$$

Luego con los valores de CIF, se calculó el ICIF (índice de concentración inhibitoria fraccionaria):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{\text{AE}} + \text{CIF}_{\text{Antif}}$$

$$\text{ICIF} = 0,125 + 0,5 = 0,625$$

El valor obtenido de la combinación del AE de *A. mendozana* con fluconazol fue de 0,625 frente a *C. neoformans*, sobre la base de la interpretación de este resultado se puede inferir que esta combinación produce un efecto de **aditivismo** ($0,5 < \text{ICIF} < 4$). Donde se destaca que al combinarse el fluconazol con el AE de *A. mendozana*, su valor de CIM se reduce a la mitad para lograr el mismo efecto que cuando se utiliza solo. Esta estrategia, sería interesante puesto que como

fluconazol exhibe efectos tóxicos indeseables y reducir su concentración a la mitad al combinarse con un producto natural, contribuye positivamente.

En la **Figura 11**, se presenta el isoblograma del efecto del AE de *A. mendozaana*, versus la concentración del antifúngico fluconazol, frente a *C. neoformans*.

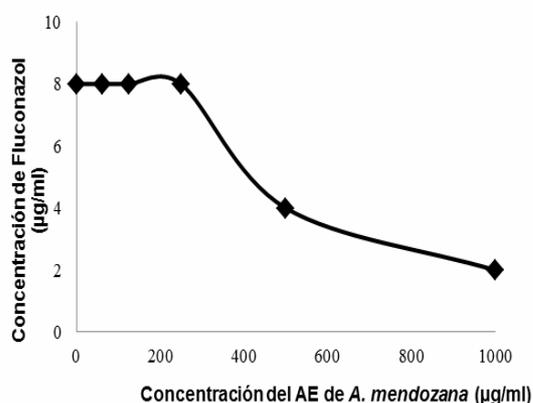


Figura 11: Isoblograma del efecto de los AEs de *A. mendozaana* versus concentración de fluconazol, frente a *C. neoformans*

De acuerdo a lo descrito en el capítulo II (**Figura 3**), en las representaciones mediante isobogramas, la línea recta que conecta la relación de 1,0 en el eje de la ordenada y 1,0 en el eje de abscisas, indica la línea de aditividad. En este gráfico la combinación del AE de esta especie con fluconazol, frente a *C. neoformans*, produjo una respuesta cercana a la línea de aditividad.

- **Combinación con terbinafina frente a *Microsporum gypseum***

Para determinar el efecto de la combinación del AE con el antifúngico, frente a los dermatofitos, se trabajó con los valores de CIM₁₀₀ (de AEs y del antifúngico comercial) estableciendo el signo (+) si hubo desarrollo visual del hongo y signo (-) si no hubo desarrollo durante el tiempo de incubación transcurrido. Ver Anexo I.

La combinación del AE de *A. mendozaana* con terbinafina, fue ensayado frente a *M. gypseum* siguiendo el protocolo previamente descrito en Capítulo II: Materiales y Métodos. Se determinó los valores de CIF y se calculó el ICIF (índice de concentración inhibitoria fraccionaria):

$$CIF_{AE} = 500 / 500 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 0,002 / 0,032 = 0,0625$$

$$ICIF = 1 + 0,0625 = 1,0625$$

El valor de ICIF (1,0625) indicó que la combinación del AE de *A. mendozaana* con terbinafina, frente a *M. gypseum* produjo efecto **aditivo**, favoreciendo la de la concentración del antifúngico en una octava parte.

A continuación se presentan el isoblograma del efecto del AE de *A. mendozaana*, respecto a la concentración del antifúngico terbinafina, frente a *M. gypseum* (Figura 12).

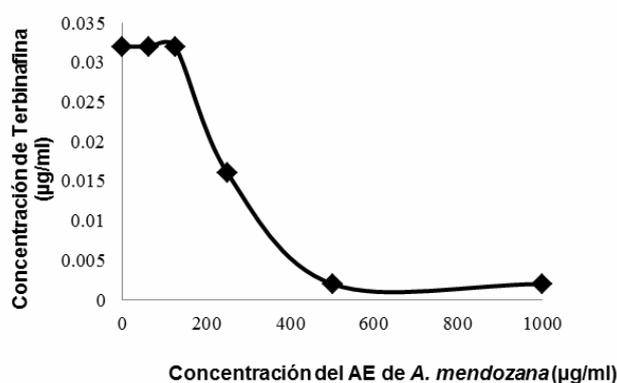


Figura 12. Isoblograma del efecto del AE de *A. mendozaana* versus concentración de terbinafina frente a *M. gypseum*

La figura anterior indicó que la combinación del AE de *A. mendocina* con terbinafina, frente *M. gypseum* presenta una línea de respuesta muy por debajo de la línea de aditividad, representando la reducción de la concentración del antifúngico).

- **Combinación con terbinafina frente a *Trychophyton rubrum***

La determinación de los valores de CIF del AE y de terbinafina, se realizó del mismo modo que la combinación frente al dermatofito *M. gypseum*. Con los datos del tablero (Ver Anexo I). Se calculó el ICIF (índice de concentración inhibitoria fraccionaria):

$$CIF_{AE} = 250 / 250 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 0,002 / 0,032 = 0,0625$$

$$ICIF = 1 + 0,06 = 1,06$$

Los resultados indicaron que la combinación del AE *A. mendozana* con terbinafina frente a *T. rubrum*, generó un efecto **aditivo**, mostrando una reducción de ocho veces el valor de la CIM del antifúngico utilizado.

La siguiente figura presenta el isoblograma del efecto del AE de *A. mendozana* versus la concentración del antifúngico terbinafina, frente a *T. rubrum*.

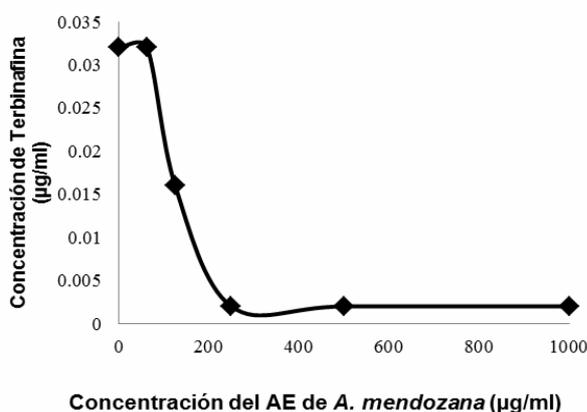


Figura 13. Isoblograma del efecto del AE de *A. mendozana* versus concentración de terbinafina frente a *T. rubrum*.

La combinación del AE de *A. mendocina* con terbinafina, frente *T. rubrum* fue muy similar al efecto que presentó frente *M.gypseum*. Los puntos están muy por debajo de la respuesta de la aditividad.

IV.2.2.-Aceite esencial de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN

- **Combinación con fluconazol frente *Candida albicans*:**

De la especie *Azorella cryptantha* se estudió el efecto de la combinación para las dos muestras según zonas de colecta. A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada muestra.

***A. cryptantha*-BAU**

Con los datos del tablero (Anexo I) calculó CIF, luego con los valores de se calculo la ICIF, los resultados fueron:

$$CIF_{AE} = CIM_{comb} / CIM_{AE \text{ solo}}$$

$$CIF_{AE} = 500 / 500 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 0,12 / 3,9 = 0,031$$

$$ICIF = 1 + 0,031 = 1,031$$

Asimismo, la combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU con el antifúngico fluconazol mostró **aditivismo**, mientras que el valor de la CIM del antifúngico comercial, se redujo ocho veces su valor.

***A. cryptantha*-AN**

Con los datos del tablero (Anexo I) calculó CIF, luego con los valores de se calculo la ICIF, los resultados fueron:

$$CIF_{AE} = 250 / 1000 = 0,25$$

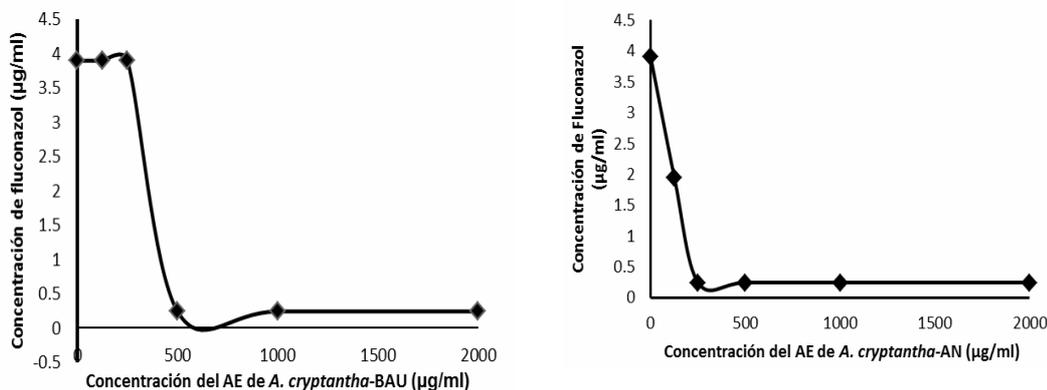
$$CIF_{Antif} = 0,12 / 1,95 = 0,06$$

$$ICIF = 0,25 + 0,06 = 0,31$$

La combinación del AE de *A. cryptantha*-AN con fluconazol (ICIF=0,31) mostró efecto **sinérgico**, cuando la concentración del antifúngico comercial se redujo una octava parte. El AE de la muestra de *A. cryptantha* BAU presentó efecto aditivo.

El efecto diferencial en la combinación del AE de *A. cryptantha* colectada en dos zonas diferentes, aditivismo para la muestra de Bauchaceta y sinergismo para la de Agua Negra, podría atribuirse a la variación en la composición de su AE en relación a las condiciones ambientales de cada lugar. Sobre la base de este análisis comparativo de una misma especie colectada en dos zonas diferentes, puede concluirse que sería más apropiado la obtención del AE de la especie *A. cryptantha* que crece en Agua Negra.

A continuación en las **Figuras 14 y 15**, se presentan los isobogramas construidos a partir de los datos experimentales del efecto de los AEs de *A. cryptantha* BAU y *A. cryptantha* AN versus la concentración del antifúngico fluconazol, frente a *C. albicans*.



Figuras 14 y 15: Isobogramas del efecto de los AEs de *A. cryptantha*-BAU y AN versus la concentración de fluconazol, frente a *C. albicans*

Aunque la combinación del AE de la especie *A. cryptantha* BAU, con fluconazol frente a *C. albicans*, dio efecto aditivo, el **Figura 14** indicó una línea de respuesta por debajo de la línea de aditividad, reflejando la reducción de la concentración del antifúngico utilizado, mientras que en el **Figura 15** mostró claramente el efecto **sinérgico** que presentó la combinación del AE de *A. cryptantha* AN con fluconazol, frente a *C. albicans*, mostrando una línea de respuesta muy por debajo de la línea de aditividad (línea convexa).

- **Combinación con fluconazol frente *Cryptococcus neoformans*:**

Del mismo modo que para *Candida albicans* se evaluó el efecto de la combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con fluconazol respectivamente frente a *C. neoformans*.

***A. cryptantha*-BAU**

Con los datos del tablero (Anexo I), se calculó el valor de las CIF, y se calculó la ICIF, los resultados fueron:

$$CIF_{AE} = 125 / 250 = 0,5$$

$$CIF_{Antif} = 6,25 / 25 = 0,25$$

$$ICIF = 0,5 + 0,25 = 0,75$$

La combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU con el antifúngico fluconazol frente a *C. neoformans*, mostró un efecto **aditivo**, y la CIM del antifúngico se redujo ocho veces su valor al combinar con este AE.

A. *cryptantha*-AN

Con los datos del tablero (Anexo I), se calculó el valor de las CIF, y se calculó la ICIF. Los resultados de las CIF y del ICIF fueron:

$$CIF_{AE} = 62,5 / 125 = 0,5$$

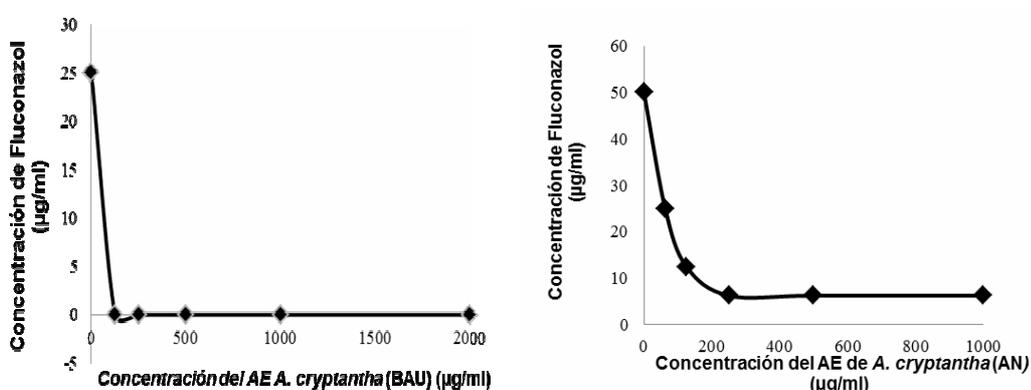
$$CIF_{Antif} = 25 / 50 = 0,5$$

$$ICIF = 0,5 + 0,5 = 1$$

Estos resultados indican que el AE de *A. cryptantha*-BAU combinado con fluconazol frente a *C. neoformans*, mostró un efecto **aditivo**, mientras que la CIM del antifúngico se redujo solamente a la mitad.

La combinación del AE de *A. cryptantha* con fluconazol frente a *C. neoformans* en ambos casos dio **aditivismo**, con la consideración que la CIM del antifúngico se redujo ocho veces cuando se combinó con *A. cryptantha*-BAU mientras que se redujo a la mitad la CIM combinado con AE de *A. cryptantha*-AN.

A continuación, se presentan los isoblogramas obtenidos a partir de la combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con fluconazol (**Figuras 16 y 17**).



Figuras 16 y 17: Isoblogramas del efecto de los AEs de *A. cryptantha* (de ambas zonas de colecta) versus concentración de fluconazol, frente a *C. neoformans*

El AE de *A. cryptantha* de BAU y AN al combinarse con fluconazol, frente *C. neoformans* mostraron efecto **aditivo**, aunque el gráfico mostró una línea de respuesta muy por debajo de la línea de aditividad, debido a la reducción de la concentración del antifúngico.

- **Combinación con terbinafina frente a *Microsporium gypseum***

A. *cryptantha*-BAU

Con los datos del tablero (Anexo I), del AE de *A. cryptantha*-BAU y de terbinafina, frente al dermatofito *M. gypseum* se calculó el valor de la CIF y del ICIF

$$CIF_{AE} = 250 / 250 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 2 \cdot 10^{-3} / 0,064 = 0,03$$

$$ICIF = 1 + 0,03 = 1,03$$

A. *cryptantha*-AN

Con los datos de a combinación del AE con *A. cryptantha*-AN con terbinafina (tablero Anexo I), frente al dermatofito *M. gypseum* se calculó el valor de la CIF y del ICIF

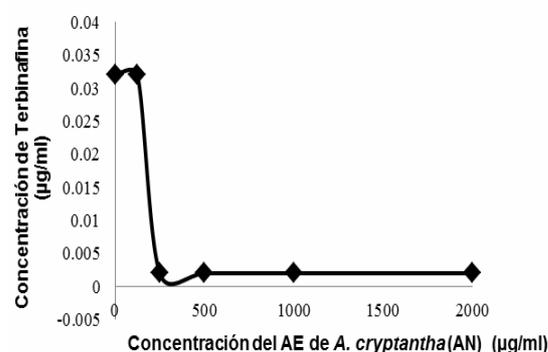
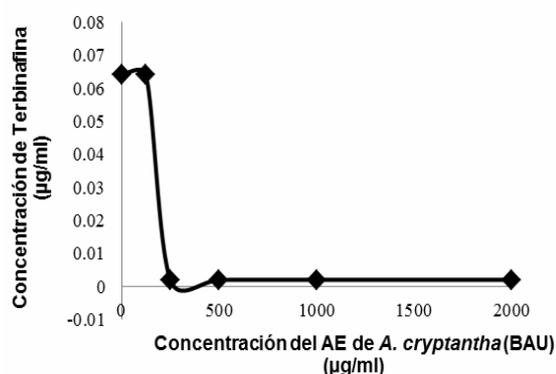
$$CIF_{AE} = 1000 / 1000 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 2 \cdot 10^{-3} / 0,064 = 0,06$$

$$ICIF = 1 + 0,06 = 1,06$$

La combinación del AE de *A. cryptantha*-AN con terbinafina (ICIF=1,06) mostró efecto de **aditivismo**, donde la concentración del antifúngico comercial se redujo una octava parte al combinarlo con el AE.

A continuación se presentan, se presentan los isobogramas obtenido de la combinación de los AEs de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con terbinafina (**Figuras 18 y 19**) frente a *M. gypseum*.



Figuras 18 y 19: Isobogramas del efecto de los AEs de *A. cryptantha*-BAU y AN versus concentración de terbinafina, frente a *M. gypseum*

El AE de *A. cryptantha* BAU y AN combinados con terbinafina, contra *M. gypseum* mostró efecto de **aditivismo**, se observa sin embargo que la línea de respuesta es muy similar a la línea característica de un efecto sinérgico, debido a la reducción de la concentración del antifúngico utilizado.

- **Combinación con terbinafina frente a *T. rubrum***

***A. cryptantha*-BAU**

Con los datos del tablero (Anexo I), se calcularon los valores de CIF del AE de *A. cryptantha*-BAU y de terbinafina, frente al dermatofito *T. rubrum*, con estos se calculó el ICIF (índice de concentración inhibitoria fraccionaria):

$$CIF_{AE} = 500 / 500 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 5 \cdot 10^{-4} / 8 \cdot 10^{-3} = 0,06$$

| |
|--------------------------|
| $ICIF = 1 + 0,06 = 1,06$ |
|--------------------------|

***A. cryptantha*-AN**

Con los datos del tablero (Anexo I), se calcularon los valores de CIF del AE de *A. cryptantha*-AN y de terbinafina, frente al dermatofito *T. rubrum*, con estos se calculó el ICIF (índice de concentración inhibitoria fraccionaria):

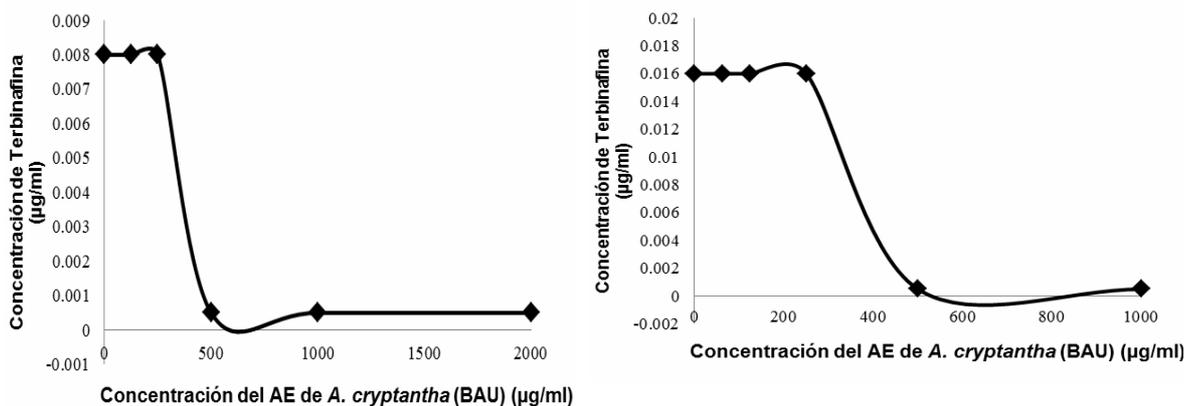
$$CIF_{AE} = 500 / 500 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 5 \cdot 10^{-4} / 8 \cdot 10^{-3} = 0,06$$

| |
|--------------------------|
| $ICIF = 1 + 0,06 = 1,06$ |
|--------------------------|

La combinación del AE de ambas poblaciones de *A. cryptantha* (BAU y AN) con terbinafina, frente a *T. rubrum*, fue similar, indistintamente del lugar de colecta. Ambas muestras presentaron efecto **aditivo** ($0,5 < ICIF < 4$), con un efecto de reducción de ocho veces su valor de la CIM de terbinafina sola.

A continuación, se presentan las figuras correspondientes a la combinación de los AE de *A. cryptantha* BAU y AN con terbinafina frente a *T. rubrum* (**Figuras 20 y 21**).



Figuras 20 y 21: Isobogramas del efecto del AE de *A. cryptantha*-BAU y AN versus concentración terbinafina, frente a *T. rubrum*

Aunque la combinación del AE de *A. cryptantha* de las dos poblaciones con terbinafina presentó efecto **aditivo**, el gráfico mostró que el AE de *A. cryptantha*-BAU combinado con el antifúngico fue más efectivo puesto que su línea de respuesta está muy por debajo de la línea de aditividad, frente a este dermatofito.

IV.2.3.-Aceite esencial de *Tagetes mendocina*

- **Combinación con fluconazol frente *C. neoformans*.**

El AE de *T. mendocina* se ensayó en combinación con fluconazol frente a *C. neoformans*. El efecto de la combinación del AE de *T. mendocina* con fluconazol se evaluó, se calcularon con las CIF (con los resultados del tablero Anexo I), y luego se calculó el ICIF

$$CIF_{AE} = 62,5 / 500 = 0,125$$

$$CIF_{Antif} = 16 / 8 = 2$$

$$ICIF = 0,125 + 2 = 2,125$$

El valor de ICIF obtenido indica que la combinación del AE de *T. mendocina* con fluconazol presentó un efecto **aditivo** cuando se ensayo contra *C. neoformans*. A continuación se presenta el isoblograma (**Figura 22**) obtenido, aquí se observa que el efecto de la combinación del AE de esta especie y fluconazol, frente a *C. neoformans* es aditivo.

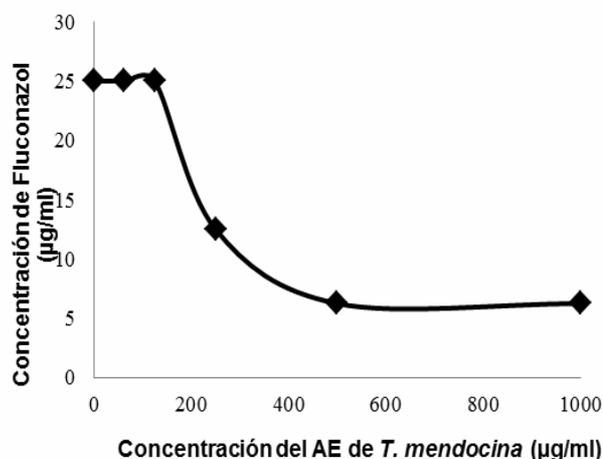


Figura 22. Isoblograma del efecto del AE de *T. mendocina* versus concentración de fluconazol, frente a *C. neoformans*

En este gráfico la combinación del AE de *T. mendocina* con fluconazol, frente *C. neoformans* mostró algunos puntos muy por debajo de la respuesta de aditividad (indicando reducción de la concentración del antifúngico comercial).

- **Combinación con terbinafina frente a *Microsporum gypseum***

De la combinación del AE de *T. mendocina* con terbinafina, frente a *M. gypseum* se calcularon las CIF y el ICIF. Los resultados fueron:

$$CIF_{AE} = 1000 / 1000 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 0,002 / 0,032 = 0,06$$

$$ICIF = 1 + 0,06 = 1,06$$

Al combinar el AE de *T. mendocina* con terbinafina, frente a *M. gypseum* se observó un efecto de **aditivismo**, sin embargo esta combinación permitió la reducir la concentración con terbinafina ocho veces su valor.

A continuación, la **Figura 23** muestra la combinación del AE de esta especie con terbinafina, frente a *M. gypseum*.

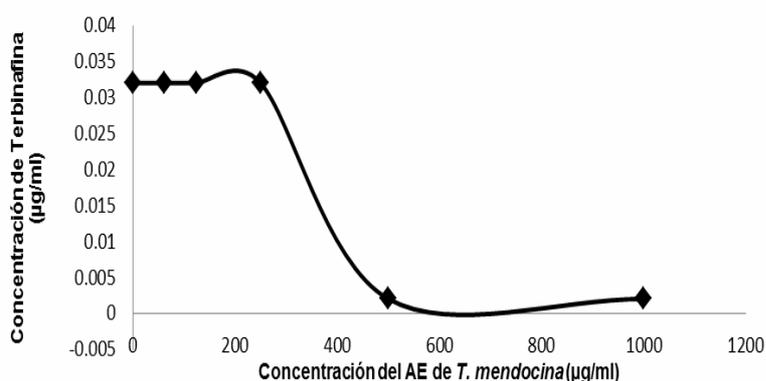


Figura 23. Isoblograma del efecto de los AEs de *T. mendocina* versus concentración de terbinafina, frente a *M. gypseum*

El AE de *T. mendocina* combinado con terbinafina, frente *M. gypseum* mostró efecto **aditivo**, se presenta la grafica como una línea de respuesta característica al efecto que produjo esta combinación.

- **Combinación con terbinafina frente a *Trychophyton rubrum***

De la combinación del AE de *T. mendocina* con terbinafina, frente a *T. rubrum* se obtuvieron las CIF y se calcularon los ICIF. Los resultados fueron:

$$CIF_{AE} = 500 / 500 = 1$$

$$CIF_{Antif} = 0,002 / 0,032 = 0,0625$$

$$ICIF = 1 + 0,06 = 1,06$$

La combinación del AE de *T. mendocina* con terbinafina frente a *T. rubrum*, mostró un efecto de **aditivismo**, mostrando una reducción de ocho veces que el valor de la concentración del antifúngico solo.

A continuación, la **Figura 24** muestra la combinación del AE de esta especie con terbinafina, frente a *T. rubrum*.

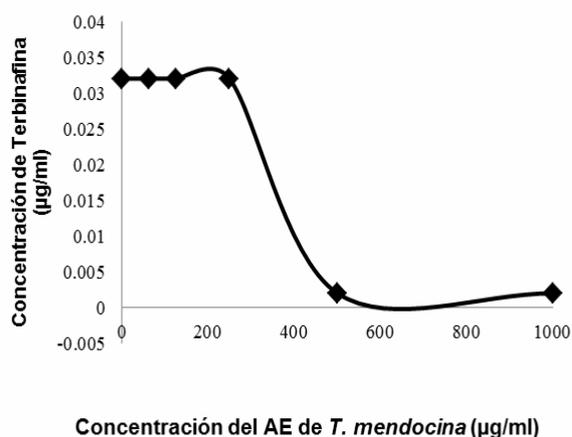


Figura 24. Isoblograma del efecto del AE de *T. mendocina* versus concentración de terbinafina frente a *T. rubrum*

La combinación del AE de *T. mendocina* con terbinafina, frente *T. rubrum* fue muy similar al efecto que presentó frente *M. gypseum*, con línea de respuesta característica del efecto aditivo.

A continuación, en **Tabla 9** se resumen los resultados obtenidos con la combinación de cada AEs con fluconazol frente a levaduras.

Tabla 9. Actividad antifúngica de los AEs solos y en combinación con fluconazol, frente a hongos levaduriformes. Los resultados se muestran como valores de CIM₈₀, CIF (expresados en µg/ml), ICIF y efecto producido.

| Combinación de Aceite esencial y antifúngico comercial | <i>C. albicans</i> | | | | <i>C. neformans</i> | | | |
|--|--------------------|------|------|------------|---------------------|-------|------|------------|
| | CIM ₈₀ | CIF | ICIF | Efecto | CIM ₈₀ | CIF | ICIF | Efecto |
| <i>A. mendozana</i> | >1000 | nd | nd | - | 125 | 0,125 | 0,63 | aditivismo |
| Fluconazol | 1,95 | nd | | - | 8 | 0,5 | | |
| <i>A. cryptantha</i> (BAU) | 500 | 1 | 1,06 | aditivismo | 250 | 0,5 | 0,75 | aditivismo |
| Fluconazol | 3,9 | 0,06 | | | 25 | 0.25 | | |
| <i>A. cryptantha</i> (AN) | 1000 | 0,25 | 0,31 | sinérgico | 125 | 0,5 | 1 | aditivismo |
| Fluconazol | 1,95 | 0,06 | | | 50 | 0,5 | | |
| <i>T. mendocina</i> | >1000 | nd | nd | - | 500 | 0,125 | 2,03 | aditivismo |
| Fluconazol | 16 | nd | | | 8 | 2 | | |

Estos resultados indican que la combinación de los AEs de las especies seleccionadas con fluconazol, frente a *C. albicans* y *C. neoformans*, resultan ser una alternativa para mejorar la actividad antifúngica de los aceites esenciales, reducir la dosis y por lo tanto reducir el efecto tóxico del antifúngico comercial como fluconazol. Mientras que el AE de *A. cryptantha* AN fue el único que presentó efecto sinérgico.

En la siguiente tabla (Tabla 10) que resume los resultados de la combinación de los AEs con terbinafina frente a los dermatofitos.

Tabla 10. Actividad antifúngica de los AEs solos y en combinación con terbinafina, frente a hongos dermatofitos. Los resultados se muestran como valores de CIM₁₀₀, CIF (expresados en µg/ml), ICIF y efecto producido.

| Combinación de Aceite esencial y antifúngico comercial | <i>M. gypseum</i> | | | | <i>T. rubrum</i> | | | |
|--|-------------------|------|------|------------|------------------|------|------|------------|
| | MIC | CIF | ICIF | Efecto | MIC | CIF | ICIF | Efecto |
| <i>A. mendozana</i> | 500 | 1 | 1,06 | aditivismo | 250 | 1 | 1,06 | aditivismo |
| TERB | 0,032 | 0,06 | | | 0,032 | 0,06 | | |
| <i>A. cryptantha</i> (BAU) | 250 | 1 | 1,03 | aditivismo | 500 | 1 | 1,06 | aditivismo |
| TERB | 0,032 | 0,03 | nd | | 0,008 | 0,06 | nd | |
| <i>A. cryptantha</i> (AN) | 250 | 1 | 1,03 | aditivismo | 500 | 1 | 1,06 | aditivismo |
| TERB | 0,016 | nd | | - | 0,016 | nd | | - |
| <i>T. mendocina</i> | 1000 | 1 | 1,06 | aditivismo | 500 | 1 | 1,06 | aditivismo |
| TERB | 0,032 | 0,06 | | | 0,032 | 0,06 | | |

TERB: terbinafina, nd: no determinado

Estos resultados están de acuerdo con numerosos trabajos que informan el efecto que se logra cuando se combinan AEs con antifúngicos comerciales, en general muestran que el tipo de efecto más frecuente es aditivismo y sinergia (Pyun, y col., 2006; Rosato y col., 2008; Iten y col., 2009; Saad y col., 2010; Silva, y col., 2011; Basolé y Juliani, 2012).

IV.3.-Conclusiones

En este capítulo se presenta el efecto que se produce cuando se combinan los aceites esenciales con los antimicóticos conocidos, frente a hongos levaduriformes (*C. albicans* y *C. neoformans*) y los dermatofitos (*M. gypseum* y *T. rubrum*). Solamente la combinación de AE de *A. cryptantha*-AN con fluconazol mostró **efecto sinérgico** frente a *C. albicans* (ICIF= 0,31).

Los AE de las especies *A. mendozana*, *A. cryptantha* BAU y de *T. mendocina*, aunque mostraron efecto aditivo ($0,5 < \text{ICFI} < 4$) combinados con fluconazol frente a *C. albicans* y *C. neoformans*, todas las combinaciones produjeron la reducción de la concentración del fármaco utilizado.

Frente a los dermatofitos (*M. gypseum* y *T. rubrum*), todos los AEs de las especies evaluadas, presentaron efecto aditivo y reducción de la concentración de terbinafina (sin combinar) en la mitad y octava parte de su valor.

Sobre la base de estos resultados, la combinación de AEs de las especies que crecen en la provincia de San Juan, con antifúngicos comerciales generan efecto principalmente aditivo, considerando que reducen la dosis del antifúngico para lograr el mismo efecto, lo que podría reducir la toxicidad del antifúngico comercial, por otra parte mejora el espectro de actividad antifúngica de los aceites esenciales.

CAPITULO V

***Azorella cryptantha* (Clos) Reiche**

Aislamiento Bioguiado

por Actividad Antimicrobiana

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.-INTRODUCCIÓN

La familia Apiaceae comprende los géneros *Azorella*, *Bolax*, *Laretia* y *Mulinum*, se caracteriza porque sus especies producen metabolitos bioactivos, como azorelanos y mulinanos. El género *Azorella* Lam. Incluye cerca de 30 especies que se desarrollan en las montañas de los Andes y la Patagonia, en Argentina, son reconocidas solamente quince especies (Molina-Salinas, 2010).

De las especies como *Azorella madreporica*, *A. yareta* y *A. compacta*, se conocen numerosos trabajos que informan sobre el aislamiento e identificación de compuestos tipo diterpenos, azorelanos y mulinanos (Loyola y col., 1997a,b,c; 1998a,b; 2001b, 2002), así como también sobre sus propiedades biológicas como: antiplasmódica, triconomicidal, antituberculosis, antimalaria y antibacteriana de diterpenos aislados de diferentes especies del género *Azorella* (Loyola y col., 2004, Loyola y col., 2001b, Wächter y col., 1998, Wächter y col., 1999; Areche, y col., 2010, Molina-Salinas, 2010, Quesada y col., 2012).

La especie *Azorella cryptantha* (Clos) Reiche crece en los Andes centrales, de la provincia de San Juan, a una altura entre 2700-4500 m s.n.m. (Martinez, 1989; Kiesling, 2003). En el departamento de Iglesia, en la localidad de Bauchaceta, esta especie, es conocida como “yerba del soldado”; crece como arbusto, a hasta una altura cercana a los 1800 m s.n.m. Mientras que en la zona de Agua Negra, a una altura aproximada de 4000 m s.n.m., los pobladores la llaman “cuerno de cabra”, y se desarrolla en forma de cojín, Estas características morfológicas, son propias del género *Azorella* como consecuencia de las condiciones ambientales diferentes a las que están expuestas. Colloca y col. (2004), informaron el aislamiento de compuestos tipo diterpenos de esta especie, colectada en Bauchaceta, en la provincia de San Juan.

En la medicina popular de la provincia de San Juan, esta especie, se utiliza para tratar problemas digestivos asociados con la ingesta excesiva o por alimentos contaminados por bacterias, mientras que desde el punto de vista del uso veterinario, la decocción de sus partes aéreas, es utilizada para eliminar hongos de la piel (dermatofitos) de las patas de aves domésticas.

V.2.-Preparación de extractos de *A. cryptantha*-BAU

La especie *A. cryptantha* colectada en Bauchaceta, conocida como “Yerba del soldado”, se seleccionó para el estudio de aislamiento bioguiado por actividad antimicrobiana.

La preparación de los extractos seriados (de polaridad baja, media y alta) se realizó a partir de la planta completa (1000 g) siguiendo la metodología descrita en Capítulo II, se obtuvieron los extractos éter de petróleo (EEP), diclorometano (EDCM) y metanol (EM). Se calculó el rendimiento de los extractos seriados, en términos de material seco de partida: EEP: 8,9%, EDCM: 3,3 % y para el EMeOH: 17,4 % (p/v).

V.3.-Actividad antimicrobiana de los extractos seriados

La actividad antimicrobiana de los extractos seriados a diferentes concentraciones por el método de microdilución (Capítulo II), fue ensayada frente a las levaduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* C 131 2000, *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Hongos filamentosos: *Aspergillus flavus* ATCC 9170, *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934, *Aspergillus niger* ATCC 9029. Dermatofitos: *Trichophyton rubrum* C113, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972 y *Microsporum gypseum* C115 y bacterias Gram (-): *Escherichia coli* de aislados clínicos (*E. coli* LM-1, *E. coli* LM-2) y *Salmonella enteritidis*-IM.

En la **Tabla 11**, se presentan los resultados obtenidos. El extracto menos polar (EP) de *A. cryptantha* fue el más activo y selectivo frente a los dermatofitos *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y, *T. mentagrophytes* con valores de CIM = 125 µg/ml, mientras que el resto de los extractos no presentó efecto antifúngico frente a las cepas ensayadas (CIM > 1000 µg/ml). Los hongos levaduriformes y los hongos filamentosos no fueron sensibles a los extractos seriados de esta especie (estos resultados no se muestran).

Respecto a las bacterias, el extracto EP mostró la mejor acción inhibitoria frente a la bacteria Gram (-) *S. enteritidis*-IM con un valor de CIM de 125 µg/ml, mientras que frente a los aislados clínicos de *E. coli* (ambas cepas ensayadas) fue menos efectivo con valores de CIM de 125 µg/ml. El extracto DCM mostró menor espectro de acción con respecto al extracto EP frente a *S. enteritidis*-IM (CIM = 500 µg/ml).

Tabla 11. Actividad antifúngica de los extractos seriados de *A. cryptantha* (Bauchaceta). Los valores de CIM se expresan en µg/ml.

| | Extractos seriados de <i>A. cryptantha</i> (Bauchaceta) | | | Antimicrobianos comerciales | |
|---------------------------------------|--|-------|-------|--------------------------------|------|
| | EP | DCM | MeOH | Terb. | Cef. |
| Dermatofitos | | | | | |
| <i>M. gypseum</i> C 115 2000 | 125 | >1000 | >1000 | 0,04 | - |
| <i>T. rubrum</i> C 113 2000 | 125 | >1000 | >1000 | 0,003 | - |
| <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9972 | 125 | >1000 | >1000 | 0,04 | - |
| Bacterias Gram (-) | | | | | |
| <i>E. coli</i> -LM ₁ | 500 | 1000 | >1000 | - | 5 |
| <i>E. coli</i> -LM ₂ | 500 | 1000 | >1000 | - | 0,5 |
| <i>S. enteritidis</i> -IM | 125 | 500 | >1000 | - | 12,5 |

Terb: terbinafina, **Cef:** cefotaxima

V.4.-Aislamiento bioguiado de extracto EP de *A. cryptantha*

A partir del extracto EP, que mostró mejor efecto antimicrobiano (ver **Tabla 11**) se selecciono para el aislamiento bioguiado por actividad antimicrobiana.

A partir de 20 g de EP, se sometió a permeación isocrática en una columna Sephadex LH-20, (largo: 35 cm, diámetro: 4 cm) equilibrada con la mezcla éter de petróleo-metanol-cloroformo (2:1:1). Se obtuvieron once fracciones de 50 ml cada una. Las mismas se sembraron en CCD, se desarrollaron utilizando como fase móvil acetato de etilo-éter de petróleo (2:8); fueron reveladas con detección de luz UV y rociadas con *p*-anisaldehído, posteriormente se compararon y se agruparon por su similitud de corrida en CCD, en ocho grupos: **I** (3080 mg); **II** (1052 mg), **III** (2410 mg); **IV** (4813 mg); **V** (5608 mg); **VI** (1992 mg); **VII** (750 mg); **VIII** (176 mg).

Los grupos **IV** y **V** que presentaron mejor actividad (ver **Tabla 21**) (9,6 g), se reunieron y purificaron utilizando una columna de media presión (CCMP), de largo: 70 cm y diámetro: 5 cm, conteniendo 300 g de silica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60), equilibrada en EP y eluída con una mezcla de EP-AcOEt, con polaridad creciente. Se obtuvieron 12 fracciones, (600 ml cada una), por comparación en CCD utilizando como fase móvil de acetato de etilo : éter de petróleo (2:8); aquellas con patrones similares, se reunieron en 12 grupos: **1** (22,3 mg), **2** (12,3 mg); **3** (30,4 mg), **4** (512,4 mg); **5** (2181,2 mg); **6** (721,8 mg); **7** (1355mg); **8** (1444 mg); **9** (595 mg); **10** (729 mg); **11** (395 mg), **12** (1160 mg).

El **grupo 4** (512,4 mg); se purificó mediante CCMP (largo: 70 cm, diámetro: 5 cm, con 100 g de sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60)) y se eluyó con EP-AcOEt, con polaridad creciente. Se obtuvieron, 10 fracciones (200 ml c/u). A partir de la fracción 4 (32,1 mg) mediante cromatografía de alta resolución (HPLC) fase reversa, usando como fase móvil agua-metanol (2:8); se obtuvo el **compuesto 1: Azorellolido** (0,7 mg), ver **Figura 25**. Los datos de RMN coinciden con la literatura (Colloca y col., 2004). Ver **Tabla 12**.

El **grupo 6** (721,8 mg) fue permeado isocráticamente con metanol en columna Sephadex LH-20 (largo: 35 cm, diámetro: 4 cm) equilibrada con metanol. Se obtuvieron 58 fracciones de 50 ml cada una. Por comparación en CCD, desarrolladas con acetato de etilo:éter de petróleo (3:7) como fase móvil, luego bajo detección de luz UV y rociadas con *p*-anisaldehído, las fracciones con patrones similares se reunieron en quince grupos: **1** (1,7mg); **2** (2,7mg); **3** (10,2mg); **4** (109,1mg), **5** (195,4mg); **6** (302,5mg); **7** (95mg); **8** (40mg); **9** (7mg); **10** (2mg); **11** (2,7mg), **12** (2,5mg); **13** (1,6mg), **14** (4,4mg); **15** (2mg).

El Grupo **6** (302,5mg), proveniente de la permeación anterior, fue prepurificado mediante HPLC preparativo, usando como fase móvil agua-metanol (2:8); y luego, se purificó utilizando cromatografía en placa preparativa (CCDP), usando como eluyente ciclohexano-AcOEt (7:3), se obtuvo **compuesto 2: mulinol** (11,6 mg) y el **compuesto 3: stachytriol** (4,6 mg), ver **Figura 25**. Los datos de RMN H^1 y C^{13} fueron coincidentes con los de la literatura (**Tablas 13 y 14**), (Loyola y col. 1997; Soliman y col., 2007, respectivamente).

El **grupo 7** (1355mg) proveniente de la primera CCMP, se suspendió en metanol, y se filtró, y la fracción soluble en metanol fue permeada en columna Sephadex LH-20 (largo: 35 cm, diámetro: 4 cm) equilibrada en metanol. Se obtuvieron 24 fracciones se reunieron en **doce grupos** con patrones similares de CCD bajo las mismas condiciones que se mencionaron antes.

Los **grupos 5 y 6** (289 mg), provenientes de la permeación anterior se reunieron y se purificó mediante HPLC preparativo usando como fase móvil agua-metanol (4:6); se aisló e identificó el **compuesto 4: 1 α ,10 β ,4 β ,5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol** (23 mg) y el **compuesto 5: 1 β ,10 α ,4 β ,5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol** (20,6 mg) y una mezcla compleja (88,6 mg). Esta fue sometida nuevamente por HPLC utilizando como fase móvil MeOH-H₂O 7:3, y se obtuvo e identificó 0,5 mg del **compuesto 6: 1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-dimetilazuleno-3a,8a-diol**.

Adicionalmente, se aisló e identificó el **compuesto 7: madreporanona** (2,7 mg) utilizando CCD preparativa desarrollada con DCM-MeOH (8:2), ver **Figura 25**. Los datos de RMN fueron coincidentes con los de la literatura, ver **Tablas 15-18**; (Colloca y col., 2004; Sanz y Marco, 1991; Anh y col., 1996; Loyola y col., 2002, respectivamente).

A partir de **grupo 7 y 8**, (provenientes de la permeación del **grupo 7**), se reunieron (131 mg) se sometió a purificación mediante CCMP (largo de columna: 47 cm, diámetro: 2.5 cm) conteniendo 50 g de sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60) y eluída con una mezcla de EP-AcOEt, con polaridad incrementada, se obtuvieron 210 fracciones de 100 ml cada una. Mediante comparación por CCD se obtuvieron ocho grupos (**1-8**): (**1**: 7 mg, fracciones 1-40 (**2**: 16 mg, fracciones 41-61), (**3**: 22 mg, fracciones 68-86); (**4**: 51 mg, fracciones 87-100), (**5**: 12 mg, fracciones 101-110), (**6**: 10 mg, fracciones 141-159), (**7**: 12 mg, fracciones 160-176); (**8**: 10 mg, fracciones 177-210).

El grupo **4** (fracciones 87-100), se purificó por HPLC preparativo usando como fase móvil agua-metanol (3:7). Se identificó el **compuesto 8: yaretol** (17 mg), tiempo de retención (Tr) de 90 min, ver **Figura 25**. Los datos de RMN fueron similares a los de la literatura (Loyola y col., 2002). Ver **Tabla 19**.

Otro grupo que presentó buena actividad (ver **Tabla 21**) fue el **grupo 8** (1444 mg), el cual fue permeado en columna de Sephadex LH-20 (largo: 35 cm, diámetro: 4 cm), equilibrada con metanol. Se obtuvieron cien fracciones (50 ml). Por comparación en CCD, desarrolladas con acetato de etilo:éter de petróleo (3:7) como fase móvil, luego detección bajo luz UV y rociadas con *p*-anisaldehído, las fracciones con patrones similares se reunieron en diez grupos: **1** (15mg); **2** (17mg); **3** (35mg); **4** (22,5 mg), **5** (75,5 mg); **6** (344,7mg); **7** (451,5 mg); **8** (294,6 mg); **9** (37,2mg); **10** (10mg).

El grupo **8** (294 mg) proveniente de la permeación anterior, se purificó en una CCMP (largo de columna: 24 cm, diámetro: 3 cm) con 100 g sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60) y eluída con una mezcla de EP-AcOEt, con incremento de polaridad. Se obtuvieron 86 fracciones (20 ml), fueron desarrolladas utilizando como fase móvil EP-AcOEt (8:2) luego detección bajo luz UV y rociadas con *p*-anisaldehído, por comparación por CCD, se reunieron en doce fracciones: **1** (5,5 mg); **2** (18,3 mg); **3** (59,03 mg); **4** (23,4 mg), **5** (12,5 mg); **6** (6,2 mg); **7** (59,12 mg); **8** (60,19 mg); **9** (60,31mg); **10** (58,81 mg); **11** (59,19 mg); **12** (53,5 mg). Las fracciones **7 y 8** (118 mg) se reunieron y purificaron mediante HPLC preparativo

usando como fase móvil agua-metanol (3:7), se obtuvo una mezcla de compuestos, que fue purificada mediante CCDP con Ciclohexano:AcOEt (8:2) para obtener el **compuesto 9: chrysotol** o **6 β ,10 β -epoxi-4 α -hidroxiguaiano** (0,1 mg) ver **Figura 25**. Los datos de RMN H^1 y C^{13} fueron coincidentes con los de la literatura (Ahmed y col., 2006). Ver **Tabla 20**.

A continuación en el **Figura 25**, se presenta el aislamiento bioguiado de *A. cryptantha*.

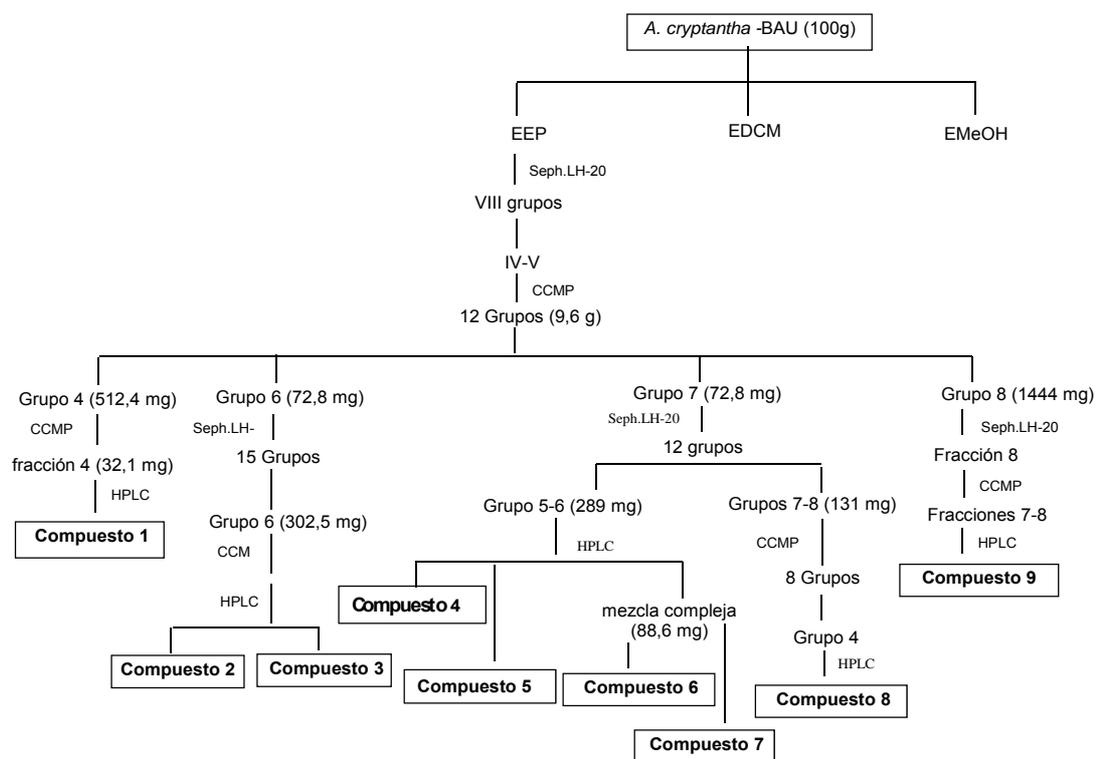


Figura 25: Aislamiento bioguiado del extracto EP de *A. cryptantha*-BAU (San Juan) Compuestos Aislados e Identificados de *Azorella cryptantha* colectada en Bauchaceta (San Juan)

Compuesto 1:

Nombre común: Azorellolido

Cantidad obtenida: 0.7 mg

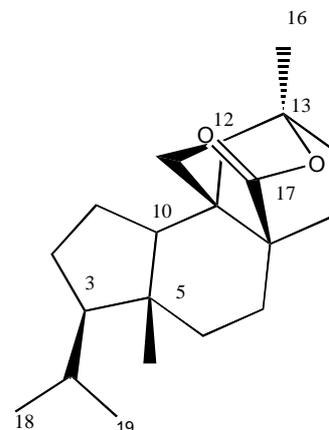


Tabla 12: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto Azorellolido

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|----|-----------------|-------------------------------|---|--|
| 1 | 21.2 | 1.13 0.96 | 1.32, 1.85, 1.93 | |
| 2 | 27.8 | 1.85 1.31 | | |
| 3 | 58.2 | 1.10 | 0.74, 0.85, 1.51 | 11.3, 27.8, 31.0, 35.6, 43.4 1.85, 1.31, 0.95, 0.85, 0.74 |
| 4 | 31.0 | 1.51 | 0.84, 0.95, 1.10 | 0.84, 0.95, 1.10 |
| 5 | 42.8 | - | - | |
| 6 | 35.6 | 1.99 1.32 | 0.74, 1.44, 2.26 | 2.26, 1.10, 0.95, 0.74 |
| 7 | 25.7 | 2.26 1.44 | 0.74, 1.32, 1.44, 1.99 | 25.3, 35.6, 42.8 |
| 8 | 43.4 | - | - | |
| 9 | 18.7 | - | - | 2.42, 1.93, 1.44, 1.26, 0.71, 0.62, 0.39 |
| 10 | 45.6 | 1.93 dd (7.3, 12.6) | 0.39, 0.62, 0.74, 0.95 (O 0.96), 1.13 | |
| 11 | 5.2 | 0.62 0.39 | 0.71, 0.95, 1.26, 1.93 | 11.3, 18.7, 20.1, 42.8, 45.6 |
| 12 | 20.1 | 0.71 dd (3.7, 7.9) | 0.39, 0.62, 1.46 | 5.2, 18.7, 45.6, 77.8 1.85, 1.73, 1.46, 0.62, 0.39 |
| 13 | 77.8 | - | - | 1.85, 1.46, 0.71, 0.62, 0.39 |
| 14 | 32.8 | 1.85 1.73 | | 2.42, 1.46 77.8 |
| 15 | 25.3 | 2.42 1.26 | 1.26, 1.73, 1.85 | |
| 16 | 24.6 | 1.46 s CH_3 | 0.39, 0.71, 1.85, 2.42 | 176.4, 77.8, 32.8, 20.1 |
| 17 | 176.4 | - | - | 2.42, 2.26, 1.46 |
| 18 | 23.1 | 0.85 d (6.6) CH_3 | 0.74, 0.95, 1.10, 1.51 | |
| 19 | 22.6 | 0.95 d (6.5) CH_3 | 0.62, 0.85, 1.51, | |
| 20 | 11.3 | 0.74 s CH_3 | 0.85, 0.95, 1.10, 1.32, 1.46, 1.93, 1.99, 2.26 | 35.6, 43.4, 58.2 |

s: singulete, d: doblete, dd: doble doblete

Compuesto 2:

Nombre común: Mulinol

Cantidad obtenida: 11,6 mg

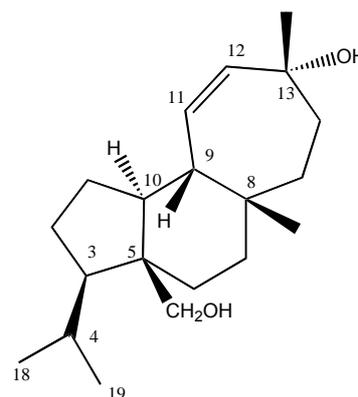


Tabla 13: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto mulinol

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|----|-----------------|--------------------------------------|------------------|--|
| 1 | 24.2 | 1.51 m 1.05 m | | |
| 2 | 28.3 | 1.88 m 1.38 m | 1.17, 1.05 | |
| 3 | 57.9 | 1.17 d (10.0) | 1.88, 1.38 | 3.76, 3.54, 1.88, 1.68, 1.51, 1.38, 1.05, 0.87 59.8, 47.3, 31.7, 28.3, 23.2 |
| 4 | 31.7 | 1.68 m | 1.17, 1.05, 0.87 | |
| 5 | 47.6 | - | | |
| 6 | 29.5 | 2.16 dt (13.3, 3.3) 1.39 m | 1.51, 1.39, 1.29 | |
| 7 | 39.9 | 1.51 m 1.29 m | 2.16 | 2.16, 1.39, 0.97 35.7 |
| 8 | 35.7 | - | | |
| 9 | 47.3 | 2.01 dd | 5.43, 1.88 | 136.2, 133.7, 50.8 |
| 10 | 50.8 | 1.88 m | | 5.56, 5.43, 3.76, 2.16, 2.01 |
| 11 | 133.7 | 5.43 dd (12.4, 8.1) | 5.56, 2.01 | 2.01, 1.31 |
| 12 | 136.2 | 5.56 dd (12.4, 1.4) | 5.43, 1.61 | 2.01, 1.61, 1.31 |
| 13 | 71.2 | - | - | 5.56, 5.43, 2.64, 1.61, 1.31, 0.97 |
| 14 | 36.0 | 1.85 m 1.61 m | 2.64 | 1.31 |
| 15 | 30.1 | 2.64 dd (12.9, 2.1) 0.97 m | 1.85, 1.61 | 71.2, 35.7, 27.5 |
| 16 | 33.4 | 1.31 s | | 136.2, 71.2, 36.0, 30.1 |
| 17 | 27.5 | 0.97 s | | 50.8, 47.3, 39.9, 35.7, 30.1 2.64, 2.01 |
| 18 | 23.3 | 0.87 d (6.6) | 1.68 | |
| 19 | 23.2 | 1.05 d (6.5) CH ₃ | 1.68 | |
| 20 | 59.8 | 3.76 dd (11.6, 1.2) 3.54 d (11.6) | 1.17 | 57.9, 50.8, 47.6, 29.5 |

s: singulete, d: doblete, m: multiplete, dt: doble triplete

Compuesto 3:

Nombre común: Stachytriol

Cantidad obtenida: 4,6 mg

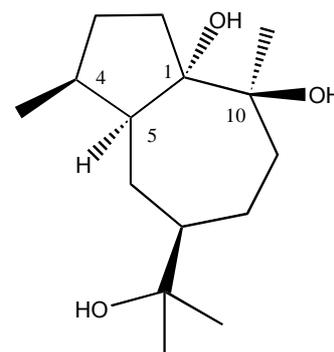


Tabla 14: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto stachytriol

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|----|-----------------|--------------|------------------|------------------------------|
| 1 | 75.7 | - | | 47.9, 24.5, 15.1 |
| 2 | 32.4 | 2.48, 1.30 | | 90.7, 75.7, 35.4, 29.6 |
| 3 | 29.6 | 1.86, 1.36 | 2.48 | |
| 4 | 35.4 | 2.60 | 0.95, 1.86, 1.36 | 47.9, 32.4, 24.5, 15.1 |
| 5 | 47.9 | 1.83 | 1.54 | 1.86, 1.68, 1.54, 1.44, 0.95 |
| | | | | 24.5, 29., 32.4, 90.7 |
| 6 | 24.5 | 1.54, 1.44 | 1.83, 1.68 | |
| 7 | 36.4 | 1.68 | 1.44 | 2.07, 1.93, 1.44, 1.29, 1.19 |
| 8 | 19.2 | 1.93, 1.68 | | |
| 9 | 26.2 | 2.07, 1.65 | 1.93 | |
| 10 | 90.7 | - | | |
| 11 | 73.6 | - | | |
| 12 | 29.3 | 1.29 | | 73.6, 36.4, 29.2 |
| 13 | 29.2 | 1.19 | | 73.6, 36.4, 29.3 |
| 14 | 26.7 | 1.11 | | 90.7, 75.7, 26.2, 19.3 |
| 15 | 15.1 | 0.95 | 2.60 | 47.9, 35.4, 29.6 |

Compuesto 4:

Nombre común: no posee

IUPAC: 1 α , 10 β , 4 β , 5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol

Cantidad obtenida: 23 mg

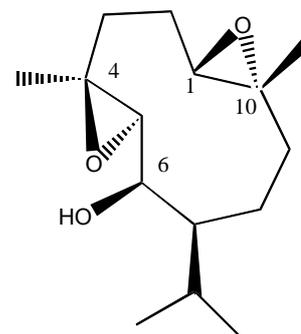


Tabla 15: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY, HMBC y NOESY en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto 1 α , 10 β , 4 β , 5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC | NOESY |
|----|-----------------|-----------------------|---------------------------|------------------------|------------------|
| 1 | 61.5 | 2.95 d (10.7) | 2.08, 1.52 | | |
| 2 | 23.8 | 2.08 1.52 | 2.95, 2.20, 1.31 | | |
| 3 | 36.7 | 2.20 1.31 | 2.08, 1.52 | | |
| 4 | 59.5 | - | - | 3.03, 2.20, 1.27 | |
| 5 | 68.4 | 3.03 d (7.2) | 3.70 | 71.5, 59.5, 36.7 | |
| 6 | 71.5 | 3.70 dd (7.2, 2.0) | 3.03, 1.23 | 68.5, 44.7, 31.3, 25.4 | 3.03, 1.27, 0.96 |
| 7 | 44.7 | 1.23 m | 3.70, 1.91, 1.76, 1.47 | | |
| 8 | 25.4 | 1.91 1.47 | 2.06, 1.64, 1.23 | | |
| 9 | 37.1 | 2.06 1.64 | 1.91, 1.47 | | |
| 10 | 61.9 | - | - | 1.46 | |
| 11 | 31.3 | 1.76 | 1.23, 1.03, 0.96 | | |
| 12 | 20.8 | 0.96 d (6.7) | 1.76 | | |
| 13 | 21.1 | 1.03 d (6.7) | 1.76 | | |
| 14 | 23.1 | 1.46 | | 61.9 | |
| 15 | 16.5 | 1.27 | | 59.5 | |

Compuesto 5:

Nombre común: no posee

IUPAC: 1 β , 10 α , 4 β , 5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol

Cantidad obtenida: 20,6 mg

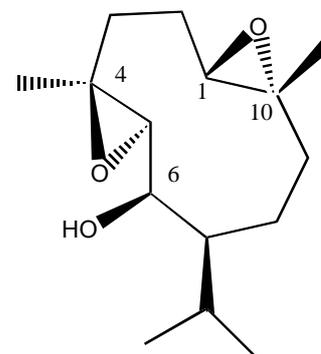


Tabla 16: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto 1 β , 10 α , 4 β , 5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol

| . | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|----|-----------------|--------------|------------------------|------------------------------|
| 1 | 60.0 | 3.00 | 2.28, 1.52, 1.33 | 60.0, 41.0, 24.7 |
| 2 | 24.7 | 2.28, 1.52 | 3.00, 2.13, 1.20 | |
| 3 | 34.5 | 2.13, 1.20 | 2.28, 1.52 | |
| 4 | 59.9 | - | | 1.39 |
| 5 | 68.0 | 2.89 | 3.68, 1.39 | 3.68, 2.13, 1.20 |
| 6 | 70.6 | 3.68 | 2.89, 0.89 | 2.89, 2.13, 1.91, 1.69, 0.93 |
| 7 | 49.6 | 0.89 | 3.68, 1.91, 1.69, 1.45 | 1.69 |
| 8 | 22.8 | 1.91, 1.45 | 2.27, 1.01 | 60.0 |
| 9 | 41.0 | 2.27, 1.01 | | |
| 10 | 60.0 | - | | |
| 11 | 32.0 | 1.69 | 0.95, 0.93 | |
| 12 | 20.9 | 0.95 | 1.69 | 49.6 |
| 13 | 20.7 | 0.93 | 1.69 | 49.6 |
| 14 | 16.7 | 1.33 | | 60.0, 41.0 |
| 15 | 16.6 | 1.39 | | 68.0, 59.9, 34.5 |

Compuesto 6:

Nombre común: no posee

IUPAC: 1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-

Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-
dimetilazuleno-3a,8a-diol

Cantidad obtenida: 0,5 mg

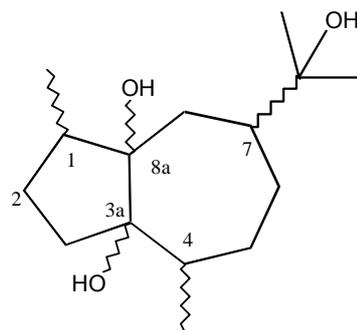


Tabla 17: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto 1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-dimetilazuleno-3a,8a-diol

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|---------------------|-----------------|--------------|------------|------------------|
| 1 | 40.3 | 2.13 | 1.65, 0.92 | |
| 1-Me | 16.9 | 0.92 d (7) | 2.13 | 72.5, 40.3, 27.1 |
| 2 | 29.3 | 1.99 | 2.31 | |
| | | 1.65 | | |
| 3 | 27.1 | 1.64 | 1.99, 1.65 | |
| | | 1.07 | | |
| 3a | 73.6 | - | - | 1.07 |
| 4 | 32.2 | 2.37 | | |
| 4-Me | 16.1 | 1.07 d (7) | 2.37 | 73.6 |
| 5 | 31.2 | 1.71 | | |
| | | 1.49 | | |
| 6 | 24.8 | 1.68 | | |
| | | 0.99 | | |
| 7 | 47.2 | 1.53 | 0.99 | |
| 8 | 29.2 | 2.31 | 1.53 | |
| 8a | 72.5 | - | - | 0.92 |
| Me ₂ COH | 27.6 | 1.20 | - | 1.17//73.3, 47.2 |
| | 26.6 | 1.17 | - | 1.20//73.3, 47.2 |
| | 73.3 | - | - | 1.20, 1.17 |

d: doblete

Compuesto 7:

Nombre común: Madreporanona

Cantidad obtenida: 2,7 mg

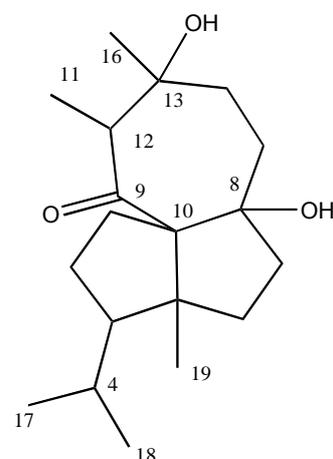


Tabla 18: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC del compuesto en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto madreporanona

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|----|-----------------|--------------|------------|--|
| 1 | 33.5 | 1.69 1.46 | 1.67, 1.29 | |
| 2 | 28.6 | 1.67 1.29 | | 1.71 |
| 3 | 59.3 | 1.29 | | 1.63, 1.46, 1.38, 1.29, 1.18 , 0.94, 0.89 |
| 4 | 28.4 | 1.71 | 0.94, 0.89 | 1.18, 0.94, 0.89 |
| 5 | 53.4 | - | | 1.63, 1.38, 1.18 |
| 6 | 38.0 | 1.63 1.38 | | 2.01, 1.18 |
| 7 | 40.8 | 2.01 1.58 | 1.63, 1.38 | 1.80, 1.63, 1.38 |
| 8 | 79.4 | - | - | 2.30, 2.01, 1.80, 1.63 |
| 9 | 212.2 | - | - | 3.57, 1.69, 1.46, 1.06 |
| 10 | 74.5 | - | - | 1.80, 1.68, 1.63, 1.18 |
| 11 | 12.1 | 1.06 d (7) | 3.57 | 3.57 |
| 12 | 52.6 | 3.57 q (7) | 1.06 | 1.06, 1.04 |
| 13 | 72.8 | - | - | 3.57, 2.30, 1.80, 1.68, 1.06, 1.04 |
| 14 | 39.2 | 2.30 1.69 | 1.04, 1.69 | 3.57, 1.80, 1.68, 1.04 |
| 15 | 35.5 | 1.80 1.68 | | 2.01, 1.69, 1.63 |
| 16 | 21.9 | 1.04 s | | 3.57, 2.30 |
| 17 | 23.5 | 0.94 d (6) | 1.71 | 59.3, 28.4, 22.9 |
| 18 | 22.9 | 0.89 d (7) | 1.71 | 23.5, 28.4, 59.3 |
| 19 | 22.8 | 1.18 s | | 74.5, 59.3, 53.4 |

q: cuarteto

Compuesto 8:

Nombre común: yaretol

Cantidad obtenida: 17 mg

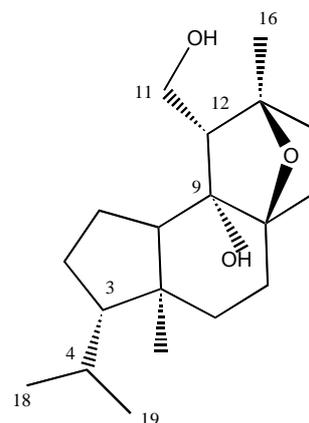


Tabla 19: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto yaretol.

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|----|-----------------|--------------------------------------|------------------|---------------------------|
| 1 | 18.7 | 1.61 m 1.32 m | 1.88, 1.74 | 1.74 |
| 2 | 27.3 | 1.88 m 1.32 m | 1.61 | 1.05 |
| 3 | 58.1 | 1.05 dd (18.8, 9.2) | 1.88, 1.49, 1.32 | 0.92, 0.84 |
| 4 | 30.6 | 1.49 m | 1.05, 0.92, 0.84 | 0.92, 0.84 |
| 5 | 41.9 | - | - | 0.84 |
| 6 | 36.2 | 1.84 m 1.47 m | 1.94 | 1.94, 0.84 |
| 7 | 26.6 | 1.94 m 1.80 m | 1.84 | 1.84, 1.47, 1.39 |
| 8 | 86.5 | - | - | 2.29, 1.39 |
| 9 | 85.2 | - | - | 3.71, 3.55, 1.68, 1.36 |
| 10 | 56.5 | 1.74 m | 1.61, 1.32 | 0.84 |
| 11 | 61.1 | 3.71 t (10.4) 3.55 dd (10.7, 4.3) | 1.69 | 1.69 |
| 12 | 58.0 | 1.69 m | 3.71 | 3.71, 1.36 |
| 13 | 80.0 | - | - | 3.71, 3.55, 1.39 |
| 14 | 30.4 | 2.29 m 1.39 m | 1.68, 1.39 | 1.39 |
| 15 | 32.6 | 1.68 m 1.39 m | 2.29, 1.39 | 2.29, 1.39, 1.36 |
| 16 | 21.9 | 1.36 s | - | 1.39, 1.68 |
| 18 | 23.0 | 0.84 d (6.4) | 1.49 | 0.92 |
| 19 | 22.4 | 0.92 d (6.4) | 1.49 | 0.84 |
| 20 | 12.3 | 0.84 s | - | 1.74, 1.47, 1.05 |

m: multiplete, dd: doble doblete, t: triplete, s: singulete, d: doblete

Compuesto 9:

Nombre común: Chrysotol

IUPAC: 6β,10β-epoxi-4α-hidroxiguaiano

Cantidad obtenida: 0,1 mg

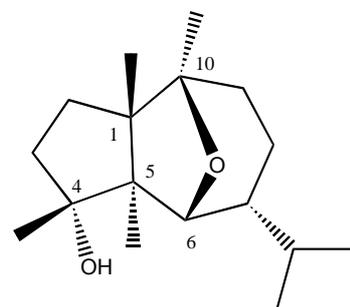


Tabla 20: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC en Cl_3CD (δ en ppm) del compuesto chrysotol.

| | ^{13}C | ^1H | COSY | HMBC |
|----|-----------------|-----------------------------|------------|------------------------|
| 1 | 53.3 | 2.33 m CH | 4.01, 1.53 | 4.01, 2.33, 1.72, 1.19 |
| 2 | 23.8 | 1.53 m CH_2 | 2.33, 2.11 | |
| 3 | 48.2 | 2.18, 2.11 CH_2 | | |
| 4 | 74.6 | | | |
| 5 | 68.1 | 2.33 m CH | 4.01, 1.53 | |
| 6 | 75.8 | 4.01 d (1.85) CH | 2.33 | |
| 7 | 38.5 | 1.39 m CH | 1.57 | 20.2 |
| 8 | 20.2 | 1.80, 1.57 CH_2 | 1.40 | |
| 9 | 37.5 | 1.74, 1.40 CH_2 | | |
| 10 | 74.6 | - | - | |
| 11 | 32.6 | 1.72 m CH | 0.94, 0.95 | |
| 12 | 20.9 | 0.95 d (1.42) CH_3 | 1.72 | 38.5, 32.6, 20.2 |
| 13 | 20.2 | 0.94 d (1.42) CH_3 | 1.72 | 38.5, 32.6, 20.9 |
| 14 | 21.9 | 1.19 s CH_3 | - | 74.6, 53.3, 37.5, 20.2 |
| 15 | 25.7 | 1.43 s CH_3 | - | 74.6, 68.1, 48.2 |

m: multiplete, d: doblete, s: singulete

Algunos de los compuestos descritos en este capítulo, se aislaron por primera vez de otras especies de *Azorellas*, como el terpeno **mulinol (2)** aislado de *A. compacta* (Loyola y col., 1997), mientras que **madreporanona (7)** fue identificado en *A. madreporica* (Loyola y col., 2002). Frecuentemente, los compuestos aislados del género *Azorella* son diterpenos o sesquiterpenos del tipo azorellanos y mulinanos (Loyola y col., 1997a,b,c, 1998a,b, 2001, 2004, Areche y col., 2010, Molina-Salinas y col., 2010), aunque de acuerdo a lo informado por Bohlmann y col., (1971) es posible obtener compuestos poliacetilénicos, como los aislados de *A. trifurcata*.

En un trabajo previo de Colloca y col., (2004), informaron para la *A. cryptantha* (Clos) Reiche, colectada en la provincia de San Juan el aislamiento de los terpenos **azorellolido**, **yaretol**, **1 α ,10 β ,4 β ,5 α -diepoxi-7 α -germacran-6 β -ol** y dihidroazorellolido. En este estudio se aislaron e identificaron tres de esos compuestos a excepción del hidroazorellolido, y otros seis terpenos (**mulinol**, **stachytriol**, **1 β ,10 α ,4 β ,5 α -diepoxi-7 α -germacran-6 β -ol**, **1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-dimetilazuleno-3a,8a-diol**, **madreporanona** y **chrysotol**).

Los compuestos aislados de *A. cryptantha* fueron identificados previamente de especies vegetales de otros géneros, el compuesto 3 **stachytriol** fue obtenido de *Stachys yemenensis* (Soliman y col., 2007). El compuesto 4, **1 α , 10 β , 4 β , 5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol**, fue aislado de *Pallenis spinosa* (Sanz y Marco, 1991), el sesquiterpeno **1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-dimetilazuleno-3a,8a-diol (6)** obtenido de *Caryodaphnopsis tonkinensis* (Anh y col., 1996), mientras que el compuesto 9, **chrysotol** fue aislado de la especie *Chrysothamnus viscidiflorus* (Ahmed y col., 2006).

De los nueve compuestos aislados, cuatro de ellos (**compuestos 3, 5, 6 y 9**) fueron obtenidos por primera vez de *A. cryptantha* colectada en la provincia de San Juan, en este caso se indica además que fue colectada en el departamento Bauchaceta, donde la especie crece a unos 1800 m s.n.m.

V.5.-Actividad Antimicrobiana de las fracciones y Compuestos aislados

Los compuestos aislados de *A. cryptantha* podrían considerarse débilmente activos frente a los dermatofitos ensayados los valores de CIM fueron mayores a 50 μ g/ml. Bajo este concepto y de acuerdo a lo informado por Ríos y Recio (2005), los resultados obtenidos indican que el efecto antifúngico del extracto EP de *A. cryptantha* (CIM = 125 μ g/ml) se debería al conjunto de los compuestos presentes en la especie, y no se podría asumir que la actividad se deba a un compuesto en particular. Esto también coincide con lo observado en el estudio del aceite esencial de esta especie (Capítulo III y Capítulo IV) y al efecto de la combinación del AE con antifúngicos comerciales, donde se mostró que el aceite esencial de la especie presenta actividad antifúngica (si se considera que el mejor efecto esta en el extracto menos polar, podría inferirse que la combinación de sus compuestos es la

responsable de su actividad y valida su uso eficiente en la medicina tradicional para tratar infecciones ocasionadas por hongos de la piel.

Adicionalmente, para completar el estudio de la especie *A. cryptantha* se consideró analizar la actividad antimicrobiana en relación a su uso tradicional para tratar malestares digestivos de tipo intestinales asociados a diarreas ocasionadas por alimentos contaminados. Así pues, se evaluó su actividad antibacteriana frente a bacterias Gram (-), de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos (capítulo II).

Del mismo modo que las fracciones del extracto más activo fueron evaluadas por actividad antifúngica, permitiendo el aislamiento bioguiado, se determinó el efecto antibacteriano de las fracciones del extracto activo de EP de *A. cryptantha* (ver **Tabla 11**).

Los resultados mostraron un efecto similar al observado en los estudios de la actividad antifúngica, los grupos IV y V fueron los más activos frente a las bacterias evaluadas. Además el efecto antibacteriano se presentó en el grupo IV hasta el VIII (con valores de CIM de 250 y 500 µg/ml) (ver **Tabla 21**).

Cuando se ensayaron los compuestos puros, el compuesto 9: **chrysotol** presentó la mejor actividad antibacteriana con valores de CIM de 50 µg/ml. La actividad del compuesto **7**, madreporanona resulto interesante, puesto que inhibió el 100% de las bacterias a una concentración de 100 µg/ml (ver **Tabla 21**).

Estos resultados obtenidos sobre la actividad antibacteriana de los extractos (EP y DCM), fracciones y compuestos aislados (**chrysotol** y **madreporanona**) de *A. cryptantha* dan un sustento desde el punto de vista etnobotánico, al uso de la especie para tratar infecciones bacterianas relacionadas al tracto gastrointestinal, producidas por bacterias tales como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. *Escherichia coli*, entre otras.

Tabla 21. Actividad antimicrobiana de las fracciones y los compuestos aislados de *A. cryptantha*. Los valores de la CIM se expresan en µg/ml.

| Grupos del EEP <i>A. cryptantha</i> -BAU | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------|-------------|------------|------------|---------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|-----------|
| Dermatofitos | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | Terb | Cef |
| <i>M. gypseum</i> C115 | >1000 | >1000 | >1000 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | | |
| 2000 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T. rubrum</i> C113 2000 | >1000 | >1000 | >1000 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | 0,04 | - |
| <i>T. mentagrophytes</i> | >1000 | >1000 | >1000 | 250 | 250 | 250 | 250 | 250 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | 0,03 | - |
| ATCC 9972 | | | | | | | | | | | | | | |
| Grupos del EEP <i>A. cryptantha</i> -BAU | | | | | | | | | | | | | | |
| Bacterias | I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | Terb | Cef |
| <i>E. coli</i> -LM ₁ | >1000 | >1000 | 250 | 125 | 250 | 250 | 500 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | - | 5 |
| <i>E. coli</i> -LM ₂ | >1000 | >1000 | 500 | 125 | 250 | 500 | 500 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | - | 0,5 |
| <i>S. enteritidis</i> -IM | >1000 | >1000 | 250 | 125 | 125 | 125 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | >1000 | - | 12,5 |
| Fracciones del Grupo IV-V | | | | | Compuestos aislados | | | | | | | | | |
| | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) |
| <i>E. coli</i> -LM ₁ | 62,5 | 62,5 | 100 | 100 | 100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 100 | 50 |
| <i>E. coli</i> -LM ₂ | 125 | 50 | 100 | 100 | 100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 100 | 50 |
| <i>S. enteritidis</i> -IM | 50 | 31,2 | 50 | 100 | 100 | >100 | >100 | 100 | >100 | >100 | >100 | >100 | 100 | 50 |

(1): Azorellorido (2): Mulinol, (3): Stachytriol, (4): 1 α , 10 β , 4 β , 5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -o, (5): 1 β , 10 α , 4 β , 5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol, (6): 1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-dimetilazuleno-3a,8a-diol, (7): madreporanona, (8): yaretol, (9): chrysotol, **Terb**: Terbinafina, **Cef**: Cefotaxima

V.6.-Conclusiones

Este es el primer estudio de aislamiento bioguiado por la actividad antimicrobiana (antifúngica y antibacteriana) de extractos, fracciones y compuestos (diterpenos, sesquiterpenos y nor-diterpenos) de *Azorella cryptantha* colectada en la provincia de San Juan. Del mismo modo que la caracterización química de su aceite esencial (Capítulo III).

El EEP de *A. cryptantha* y sus fracciones, resulto efectivo frente a dermatofitos, estos resultados indican que este extracto es fuente de compuestos antifúngicos para el tratamiento de infecciones micóticas generada por dermatofitos. Los resultados de la actividad antibacteriana frente a enterobacterias presentes frecuentemente en infecciones gastrointestinales (como *E. coli* de aislados clínicos y *S. enteritidis*) del extracto EP, podría ser utilizado para tratar infecciones bacterianas.

CAPITULO VI

***Gentianella multicaulis* (Gillies ex
Griseb.) Fabris (Gentianaceae)**

**Aislamiento Bioguiado por
Actividad Antifúngica**

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1.-Introducción

La familia cosmopolita Gentianaceae comprende 1690 especies que habitan, por lo general, en regiones templadas, subtropicales y tropicales (Struwe y col., 2002). Una clasificación moderna de sus tribus y subtribus basada, en gran parte, en estudios filogenéticos derivados de datos moleculares, reconoce a 6 tribus y 87 géneros (Struwe y col., 2002). Esta familia, se caracteriza por presentar moléculas bien conocidas por sus principios amargogénicos (en la industria alimenticia, como bebidas) Rosella y col., 2009, y su uso como colorantes en la farmacéutica (Jensen y Schripsema 2002). De los 47 géneros nativos que se encuentran en la región tropical de América Central y del Sur, 36 son endémicos (Struwe y col., 2002).

En Argentina, las especies *Gentianella multicaulis* y *G. parviflora* fueron estudiadas fitoquímica y farmacológicamente (Nadinic, 1997; Rosella y col., 2009). Sin embargo con la posibilidad de que estas especies convivan con otras del mismo género, y que por sus similitudes morfológicas, (por compartir el mismo hábitat) numerosas especies tengan el mismo nombre vulgar e iguales propiedades terapéuticas (Rosella y col., 2009) surgieron trabajos que informan sobre los caracteres micrográficos (patrón de distribución de los estomas, espaciamiento de las estrías cuticulares, estructura de las exina y diámetro polar y ecuatorial, cálculo de los índices de estomas y empalizada) para identificar especies del género *Gentianella*, como por ejemplo diferenciar *G. multicaulis* de otras especies como *G. parviflora*, *G. florida* y *G. cosmantha*.

En la provincia de San Juan, la infusión de las partes aéreas de *G. multicaulis*, conocida popularmente como 'pasto amargo', 'hierba amarga' o 'nencia'; es usada como tónico estomacal amargo, para tratar problemas digestivos y hepáticos (Bustos, y col., 1996).

Con respecto a sus compuestos, las moléculas características del género *Gentianella* son los monoterpenos iridoides, xantonas y flavonas C-glicosidadas, las cuales presentan propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobianas. (Nadinic y col., 1999; Jensen y Schripsema, 2002).

Las *xantonas*, pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, son una clase de metabolitos secundarios con variedad estructural y patrones de oxidación característicos. Este tipo de compuestos suelen utilizarse como marcadores

quimiotaxonómicos en los niveles de infra y super-género en la familia Gentianaceae (Massias y col., 1982; Jensen y Schripsema, 2002).

VI.2.-Preparación de los extractos de *G. multicaulis*

En este capítulo se presenta el aislamiento bioguiado mediante actividad antifúngica de los extractos activos de *G. multicaulis* colectada en la provincia de San Juan. La elucidación estructural y el efecto antifúngico de las xantonas aisladas del extracto activo DCM.

La preparación de los extractos seriados (de polaridad baja, media y alta) se realizó a partir de la planta completa (310 g) mediante extracciones sucesivas a reflujo (tres veces x 30 min) con éter de petróleo, diclorometano y metanol. Posteriormente se filtraron y se llevaron a sequedad en evaporador rotatorio obteniéndose los extractos éter de petróleo (EEP), diclorometano (EDCM) y metanol (EM), respectivamente.

El rendimiento de los extractos seriados, en términos de material seco de partida, fue para el EEP: 0,45 %, EDCM: 2,58 % y para el EMeOH: 4,34 % (p/v).

Por otra parte, una porción representativa del EMeOH (12 g) se disolvió en agua y se sonicó, esta fase acuosa se sometió a extracciones con dietil éter (Et₂O; 3 x 300 mL) y con acetato de etilo (AcOEt; 3 x 300 mL), obteniéndose los extractos de EE (4,23 g, 35,25%) y de AcOEt (3,01 g, 25,08%) respectivamente.

V.3.-Actividad antifúngica de los extractos seriados

La actividad antifúngica se evaluó utilizando la metodología descrita en el Capítulo II. Los EEP, EDCM, y EMeOH se ensayaron frente a un panel de hongos que incluye hongos levaduriformes y hongos filamentosos (*Aspergillus* y dermatofitos).

Los extractos seriados fueron activos frente a los hongos dermatofitos con valores de CIM entre 125 y 250 µg/mL. Por otra parte, las levaduras y los hongos del género *Aspergillus* evaluados resultaron menos sensibles, con valores de CIM entre 250 y 1000 µg/mL (datos que no se muestran).

En la **Tabla 22** se presentan las actividades frente a los hongos que resultaron sensibles frente a los extractos y compuestos aislados.

Tabla 22. Actividad antifúngica de los extractos seriados de *A. cryptantha* (Bauchaceta). Los valores de CIM se expresan en µg/ml.

| Dermatofitos | Extractos seriados de <i>G. multicaulis</i> (Bauchaceta) | | | Antimicrobianos comerciales | |
|------------------------------------|--|-----|------|-----------------------------|------|
| | EP | DCM | MeOH | Terb. | Ket |
| <i>M. gypseum</i> C 115 2000 | 250 | 125 | 250 | 0,04 | 0,05 |
| <i>T. rubrum</i> C 113 2000 | 250 | 125 | 125 | 0,003 | 0,03 |
| <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9972 | 125 | 125 | 125 | 0,04 | 0,03 |

Terb: Terbinafina, **Ket:** Ketoconazol

Con respecto a la bioactividad de extractos de otras especies de *Gentianella* frente a cepas fúngicas, Rojas y col. (2004) informaron la actividad antifúngica del extracto etanólico y fracciones de *Gentianella nítida* frente a *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Microsporum gypseum*.

VI.4.-Aislamiento bioguiado de *Gentianella multicaulis*

El extracto bioactivo de DCM (5 g), fue permeado isocráticamente en columna Sephadex LH-20 (largo de columna: 47cm, diámetro: 3,8 cm) equilibrada con éter de petróleo:metanol:cloroformo (2:1:1), se obtuvieron 80 fracciones de 25 ml cada una. Las mismas se desarrollaron en CCD utilizando como fase móvil acetato de etilo: éter de petróleo (3:7); se observaron bajo luz UV y se rociaron con *p*-anisaldehído. Luego se compararon, las fracciones con patrones similares de CCD se reunieron en **XVI grupos: I** (169,4mg, fracciones 1-2); **II** (424mg, fracciones 3-5); **III** (281,5mg, fracciones 6-9); **IV** (221 mg, fracciones 10-12), **V** (296,8 mg, fracciones 13-17); **VI** (23,1mg, fracción 18); **VII** (16,6mg, fracciones 19-20); **VIII** (15,5mg, fracción 21); **IX** (14,2mg, fracciones 22-23); **X** (37mg, fracción 24); **XI** (18,7mg, fracciones 25-26); **XII** (221,6mg, fracciones 27-31); **XIII** (75,4 mg, fracciones 32-33); **XIV** (3,8mg, fracción 34); **XV** (103,3 mg, fracciones 35-40); **XVI** (142 mg, fracciones 41-80).

A partir del grupo **IV** (221 mg), por permeaciones sucesivas en columna de Sephadex LH-20 (columna de 20 cm y 2,5 cm de diámetro) y eluida isocráticamente con metanol, se aislaron los **compuestos 1: ácido oleanólico** (10 mg) y el **compuesto 2: ácido ursólico** (12 mg). Ambos compuestos se identificaron por espectroscopia de RMN H¹ y C¹³. Adicionalmente, se compararon por CCD con patrones de referencia (Markham, 1964; 1965).

El grupo **XII** (221,6 mg) se suspendió en metanol, y la fracción soluble (13 mg) se purificó por HPLC preparativa utilizando como fase móvil H₂O-MeOH (1:9). Se obtuvo el **compuesto 3: swerchirina o metilbellidifolina o 1,8-dihidroxi-3,5-dimetoxi-9H-xanten-9-ona** (5 mg) cuyo Tr (tiempo de retención) fue de 40 min. Los espectros de RMN H¹ y C¹³ fueron comparados con los datos de la literatura (ver **Tabla 23**) (Hajimehdipour y col., 2003).

A partir de la fracción soluble en metanol (30 mg) del grupo **XIV** (38,8 mg) mediante HPLC preparativa utilizando como eluyente H₂O-MeOH (3:7), se obtuvo el **compuesto 4: bellidina o demetilbellidifolina o 1,3,5,8-tetrahidroxi-9H-xanten-9-ona** (6 mg) con Tr = 50 min. Los datos espectroscópicos de RMN H¹ y C¹³ fueron coincidentes con los informados por Markham, (1964), ver **Tabla 23**.

El grupo **XV** (103,3 mg) se purificó en una columna cromatográfica de media presión en silica gel (largo de columna 23 cm; 2 cm diámetro) utilizando como solvente de corrida CH₂Cl₂-AcOEt-MeOH. Las fracciones fueron desarrolladas en CCD, observadas con UV y rociadas con p-anisaldehído, luego comparadas y se reunieron en seis grupos (**1-6**). La fracción soluble en metanol del grupo **1** (29,2 mg) se purificó mediante HPLC preparativo utilizando como eluyente H₂O-MeOH (8:2). Y luego con una segunda purificación por HPLC utilizando como fase móvil acetonitrilo-H₂O (7:3) se obtuvo el **compuesto 5: bellidifolina o 1,5,8-trihidroxi-3-metoxi-9H-xanten-9-ona** (2,2 mg) con Tr = 25 min. Los datos de RMN H¹ y C¹³ se compararon con la literatura (Markham, 1964), ver **Tabla 24**.

El grupo **XVI** (30 mg) se purificó mediante sucesivas columnas en HPLC preparativo utilizando como fase móvil acetonitrilo-H₂O (7:3). Se obtuvieron 3 mg del **compuesto 6: isobellidifolina o swertianol o 1,3,8-trihidroxi-5-metoxi-9H-xanten-9-ona** con Tr= 18 min. Los datos de RMN H¹ y C¹³ fueron similares a los informados en la literatura (Markham, 1965), ver **Tabla 24**.

El extracto EEE (4 g) fue permeado en columna Sephadex LH-20 (largo de columna, 43 cm; 3,5 cm diámetro), equilibrada con metanol. Se obtuvieron 42 fracciones de 25 mL, las cuales fueron desarrolladas usando como fase móvil acetato de etilo-éter de petróleo (3:7), se observaron bajo la detección de luz UV, y se rociaron con ácido difenilbórico, reveladas y luego comparadas en CCD, se reunieron en **18** grupos. Los grupos **10-14** (590 mg) se permearon columna Sephadex LH-20 (largo de columna, 24 cm; 2.5 cm de diámetro) equilibrada con

metanol. Se reunieron en **once** grupos por comparación con CCD. A partir del grupo **10** (72,3 mg) se aisló nuevamente el **compuesto 4: bellidina** (60 mg).

En la **Figura 26**, se resume el aislamiento bioguiado del EDCM de *G. multicaulis*.

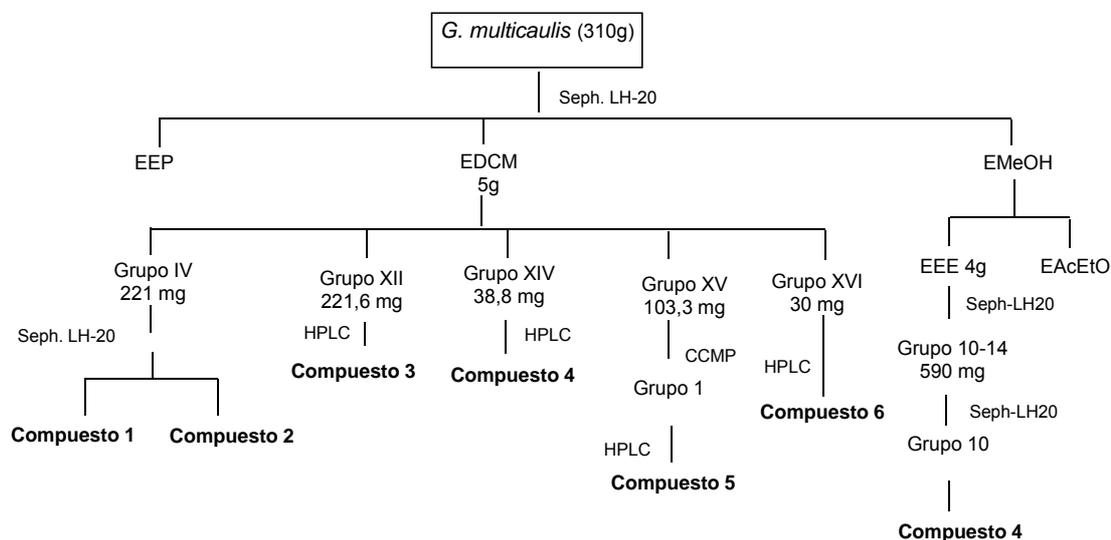


Figura 26: Aislamiento bioguiado mediante actividad antifúngica del EEP de *G. multicaulis* (San Juan)

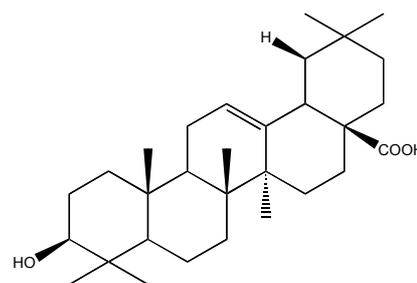
Compuestos Identificados de *Gentianella multicaulis* colectada en Bauchaceta (San Juan)

Compuesto 1:

Nombre común: ácido oleanólico

IUPAC: ácido 3β-hidroxiolean-12-en-28-oico

Cantidad obtenida: 10 mg

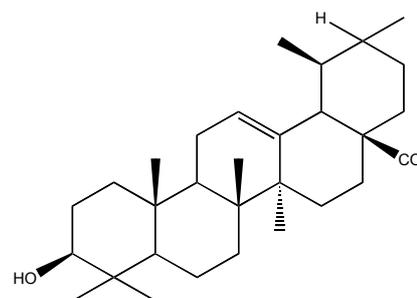


Compuesto 2:

Nombre común: ácido ursólico

IUPAC: ácido 3β-hidroxiurs-12-en-28-oico

Cantidad obtenida: 12 mg



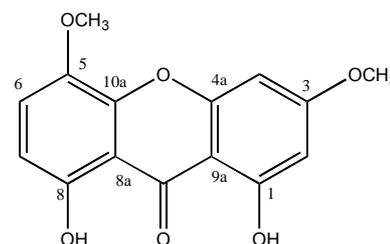
Gentianella multicaulis (Gillies ex Griseb.) Fabris (Gentianaceae)
Aislamiento Bioguiado por Actividad Antifúngica

Compuesto 3:

Nombre común: swerchirina o metilbellidifolina

IUPAC: 1,8-dihidroxi-3,5-dimetoxi-9*H*-xanten-9-ona

Cantidad obtenida: 5 mg



Compuesto 4:

Nombre común: bellidina o demetilbellidifolina

IUPAC: 1,3,5,8-tetrahidroxi-9*H*-xanten-9-ona

Cantidad obtenida: 6 mg

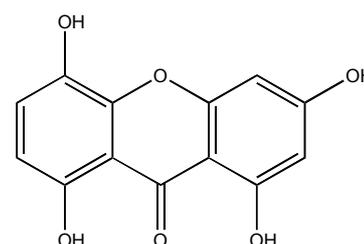


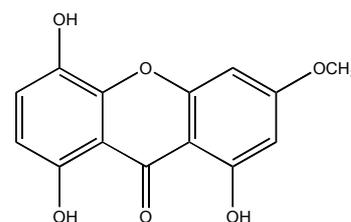
Tabla 23: Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , COSY y HMBC de los compuestos swerchirina (3) y bellidina (4) en MeOD- d_4 (δ en ppm).

| | swerchirina (3) | | | | bellidina (4) | | |
|----------------|-----------------|--------------|----------------------|-------|-----------------|--------------|--------|
| | ^{13}C | ^1H | HMBC | NOESY | ^{13}C | ^1H | HMBC |
| 1 | 162.5 | - | - | - | 162.7 | - | - |
| 2 | 98.3 | 6.44 d | 167.7, 162.5, 102.8, | - | 99.0 | 6.24 d (2.2) | 162.7, |
| 3 | 167.7 | - | 6.77, 6.70, 3.93 | - | 167.6 | - | - |
| 4 | 93.5 | 6.70 d | 184.8, 167.7, 157.8, | - | 94.8 | 6.43 d (2.2) | 167.6, |
| 4a | 157.8 | - | - | - | 157.9 | - | - |
| 5 | 140.1 | - | - | - | 137.7 | - | - |
| 6 | 121.9 | 7.51 d | 153.5, 145.0, 140.1, | - | 124.0 | 7.27 d (8.8) | 152.4, |
| 7 | 110.3 | 6.77 d | 184.3, 153.5, 145.0, | - | 109.8 | 6.66 d (8.8) | 184.1, |
| 8 | 153.5 | - | - | - | 152.4 | - | - |
| 8a | 108.1 | - | 6.77, 6.70 | - | 107.9 | - | - |
| 9 | 184.8 | - | - | - | 184.1 | - | - |
| 9 ^a | 102.8 | - | - | - | 101.5 | - | - |
| 10 | 145.0 | - | - | - | 143.2 | - | - |
| 3-OMe* | 57.6 | 3.93s | 167.7 | 6.70, | - | - | - |
| 5-OMe* | 57.6 | 3.92s | 140.1 | 7.51 | - | - | - |

d: doblete, s: singulete

Compuesto 5: bellidifolina (1,5,8-trihidroxi-3-metoxi-9H-xanten-9-ona)

Cantidad obtenida: 2,2 mg



Compuesto 6: isobellidifolina o swertianol (1,3,8-trihidroxi-5-metoxi-9H-xanten-9-ona)

Cantidad obtenida: 3 mg

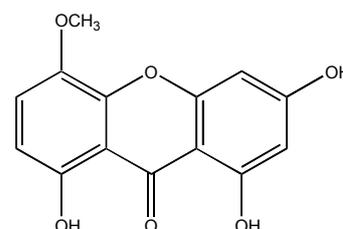


Tabla 24. Datos espectroscópicos de ^1H , ^{13}C , HMBC y NOESY de los compuestos bellidifolina (5) e isobellidifolina (6) en MeOD- d_4 (δ en ppm).

| | bellidifolina (5) | | | | isobellidifolina (6) | | | |
|----------------|-------------------|--------------|------|--------|----------------------|--------------|--------------|-------|
| | ^{13}C | ^1H | HMBC | NOESY | ^{13}C | ^1H | HMBC | NOESY |
| 1 | 162.4 | - | - | - | 164.3 | - | 6.15 | - |
| 2 | 97.8 | 6.45 | d | 167.3, | - | 95.9 | 6.32 d (2.2) | - |
| 3 | 167.3 | - | - | - | - | 171.2 | - | 6.32, |
| 4 | 93.3 | 6.66 | d | 167.3, | - | 100.5 | 6.15 d (2.2) | - |
| 4a | 157.4 | - | - | - | - | 159.6 | - | 6.32 |
| 5 | 137.5 | - | - | - | - | 141.5 | - | 7.33, |
| 6 | 124.3 | 7.30 | d | 152.2, | - | 121.5 | 7.33 d (9.0) | - |
| 7 | 109.9 | 6.69 | d | 184.5, | - | 109.8 | 6.65 d (9.0) | - |
| 8 | 152.2 | - | - | - | - | 155.4 | - | 6.65, |
| 8a | 107.9 | - | - | - | - | 108.7 | - | 6.65, |
| 9 | 184.5 | - | - | 6.69 | - | 185.6 | - | 6.65, |
| 9 ^a | 102.1 | - | - | - | - | 102.1 | - | 6.32, |
| 10 | 143.8 | - | - | - | - | 146.3 | - | 6.32, |
| 3-OMe | 56.9 | 3.94 s | - | 167.3 | 6.66, | - | - | - |
| 5-OMe | - | - | - | - | - | 57.5 | 3.92 s | 141.5 |

d: doblete, s: singulete

Con respecto a los compuestos aislados de *G. multicaulis* colectada en la provincia de San Juan, las cuatro xantonas 1,3,5,8-tetraoxigenadas: swerchirina, bellidifolina, isobellidifolina, y demetilbellidifolina, junto con los triterpenos ácidos ursólico y oleanólico fueron previamente obtenidos a partir del extracto DCM de *G. florida* (Nadinic y col., 1997).

Tres de las xantonas aisladas (demetilbellidifolina, bellidifolina, isobellidifolina) junto a swertianina, fueron informadas como constituyentes de *G. achalensis*, colectada en la provincia de Córdoba, a 1200 m s.n.m (Nadinic y col., 1999, 2002).

Asimismo, Rosella y col., (2007), informaron sobre los parámetros micrograficos de dos especies de *Gentianella* que crecen en Argentina: *G. parviflora* y *G. multicaulis*, y la identificación de las cuatro xantonas: swerchirina (3), bellidina (4), bellidifolina (5) e isobellidifolina (6) mediante HPLC.

VI.5.-Actividad antifúngica de los compuestos aislados

Las xantonas bellidina (4), bellidifolina (5) e isobellidifolina (6) presentaron actividad antifúngica frente a *M. gypseum* como así también frente a las dos especies de *Trichophyton* (*T. rubrum* y *T. mentagrophytes*) con valores de CIM de 50 µg/ml, mientras que swerchirina (3) resultó el compuesto menos activo (CIM = 100 µg/ml), ver **Tabla 25**.

Los ácidos ursólico (1) y oleanólico (2) son abundantes en el reino vegetal y de baja significancia quimiotaxonómica (Li-Juan y Min-Hui, 2009). Algunas de las propiedades antifúngicas fueron informadas por Shai y col., (2008); frente a *C. albicans* y *C. neoformans* con valores de CIM= 32 µg/ml, y frente al hongo *A. fumigatus* (CIM = 24 µg/ml). A continuación se presenta los resultados de actividad antifúngica de los xantonas aisladas de *G. multicaulis*.

Tabla 25. Actividad antifúngica de los extractos y compuestos aislados de *Gentianella multicaulis* (valores de CIM expresados en µg/mL).

| Xantonas aisladas de <i>G. multicaulis</i> | | | | | |
|--|-----|-----|----|----|-------|
| Dermatofitos | 3 | 4 | 5 | 6 | Terb. |
| <i>M. gypseum</i> C 115 2000 | 100 | 100 | 50 | 50 | 0,04 |
| <i>T. rubrum</i> C 113 2000 | 100 | 50 | 50 | 50 | 0,003 |
| <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9972 | 100 | 50 | 50 | 50 | 0,04 |

3: swerchirina, 4: bellidina, 5: bellidifolina, 6: isobellidifolina

Li y col. (2010), presentaron recientemente una revisión sobre el género *Gentianella* Moench allí exponen que sus propiedades más distintivas son: las actividades antioxidantes, radioprotectivas, antimicrobianas, antiinflamatorias, hipoglucemicas y anticolinérgicas. Indicando que en muchas ocasiones, las xantonas son las moléculas activas presentes en este género.

En general, las propiedades farmacológicas de las xantonas son asignadas principalmente, a sus anillos heterocíclicos oxigenados y la diversidad de sus grupos funcionales (Peres y col., 2000).

La propiedad de las xantonas más descrita está se refiere a la capacidad de captura de radicales libres (Jiang y col., 2004; Franklin y col., 2009). Recientemente, Singh y col., (2012) informaron el aislamiento de **bellidifolina** e **isobellidifolina** bioguiado por la actividad antioxidante de *Swertia chirayita*.

Adicionalmente, se ha informado de xantonas otras actividades biológicas como la inhibición de la acetilcolinesterasa (Urbain y col., 2008) y la inhibición de la enzima monoamina oxidasa, MAO (Mitsunaga, 2004).

Con respecto a la antimicrobiana, Šavikin y col., (2009) informaron sobre la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y compuestos aislados de *Gentiana lutea*.

En relación a la actividad biológica de los compuestos aislados, la xantona **bellidifolina** fue informada como potente agente hipoglucemiante en ratas diabéticas inducidas (Basnet y col., 1994). Asimismo, Li y col. (2011) informaron, para el mismo compuesto, la actividad de inhibición de la proliferación y activación de células “estrelladas” hepáticas.

De acuerdo a lo informado por Urbain y col. (2008), las xantonas **bellidina** y **bellidifolina**, presentaron una interesante actividad inhibitoria de la monoamina oxidasa (MAO) y fueron menos activas frente a la enzima acetilcolinesterasa.

VI.6.-Conclusiones

De la especie *G. multicaulis* colectada en la provincia de San Juan, se aislaron e identificaron cuatro xantonas oxigenadas y dos triterpenos. Los extractos seriados y las xantonas aisladas presentaron efecto antifúngico frente a los hongos dermatofitos *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. La actividad antifúngica frente a dermatofitos permite concluir que esta especie colectada en la provincia de San Juan podría ser fuente de compuestos antifúngicos para tratar infecciones fúngicas superficiales, producidas por *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, siendo estos dermatofitos las principales especies responsables de aproximadamente el 80 – 93% de este tipo de infecciones recurrentes y crónicas. Este es el primer estudio concerniente a la actividad antifúngica de xantonas aisladas en *Gentianella multicaulis*.

CAPITULO VII

***Tagetes mendocina* Phil.**
(Asteraceae)

Aislamiento Bioguiado por
Actividad Antifúngica

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1.-Introducción

El género *Tagetes*, perteneciente a la familia Asteraceae, comprende cerca de 55 especies distribuidas en todo el mundo (Rondon y col., 2006). Algunas especies de *Tagetes* son usadas en la medicina tradicional para tratar distintas afecciones, incluyendo enfermedades digestivas, gastrointestinales e infecciones de la piel (Aquino y col., 2002; Tereschuk y col., 1997). Adicionalmente, se han informado propiedades tales como antioxidantes, antimicrobianas, insecticidas, herbicidas, antimalarica (Parejo y col., 2005; Faizi y col., 2008; Gupta y Vasudeva, 2010; López, y col., 2011; Xu y col., 2012).

En la Argentina, el género *Tagetes* (Asteraceae) comprende 12 especies, que se distribuyen desde el noroeste del país hasta el sudeste de la provincia de San Juan (Abdala, 1999; Ariza Espinar, 1967). En la medicina tradicional de la provincia de San Juan, *Tagetes mendocina* Phil. (Asteraceae), conocida comúnmente como “quinchiue”, es recomendada como diurético (Bustos, y col., 1996).

Con respecto a especies del género *Tagetes* que crecen en Argentina, se informó sobre estudios de su quimiotaxonomía y distribución (Abdala, y col., 1983; 1991), actividad antimicrobiana (Feresin, y col., 2000; Tereschuk, y col., 2003; 2004) y actividad de captura de radicales libres (Schmeda-Hirschmann y col., 2004).

Con respecto a la presencia de constituyentes característicos, el género *Tagetes* presenta una variedad de moléculas que incluyen desde compuestos derivados fenólicos como los flavonoides, alcaloides, fenilpropanoides, derivados de tiofenos y benzofuranos, terpenos y esteroides, entre otros (Tereschuk y col., 1997; Gil y col., 2002; Schmeda-Hirschmann y col., 2004; Xu y col., 2012).

De la especie *T. mendocina* colectada en la provincia de San Juan, Schmeda-Hirschmann y col. (2004) informaron el aislamiento bioguiado por actividad antioxidante de los flavonoides patuletina, quercetagetina 7-O- β -D-glucosido, patuletina 7-O- β -D-glucosido, axillarina 7-O- β -D-glucosido, la 4-hidroxiacetofenona y los ácidos protocatechuico y siríngico. En este trabajo de tesis, la especie *Tagetes mendocina* colectada en la provincia de San Juan, se seleccionó para identificar mediante aislamiento bioguiado los compuestos responsables de la actividad antifúngica.

VII.2.-Preparación de extractos seriados de *T. mendocina*

La preparación de los extractos seriados (polaridad baja, media y alta) a partir de una muestra representativa del material vegetal seco (1000 g) se realizaron extracciones sucesivas a reflujo, siguiendo la metodología descrita en Capítulo II. Se obtuvieron los extractos éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) y metanólico (MeOH) y su rendimiento porcentual se calculó en términos de material seco de partida como: EEP: 1,28%; EDCM: 0,59% y EMeOH: 6,0% (p/v). Adicionalmente, el extracto acuoso resultante de la hidrodestilación del aceite esencial de *T. mendocina*, se extrajo con acetato de etilo (AcEtO; 3 x 500 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se llevó a sequedad bajo presión reducida. Se obtuvieron 3,5 g del EAcOEt con un 7% de rendimiento.

VII.3.-Actividad antifúngica de los extractos seriados

La actividad antifúngica de los extractos obtenidos de *T. mendocina* a diferentes concentraciones, se evaluó mediante el método de dilución (Capítulo II) frente a hongos levaduriformes (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* y *S. cerevisiae*) filamentosos (*A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger*) y dermatofitos (*M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*). Los extractos de polaridad media y baja, EP, DCM y EAcOEt mostraron actividad antifúngica frente a los dermatofitos evaluados. El extracto más activo fue el EAcOEt frente a *T. mentagrophytes* con un valor de CIM de 125 µg/ml. Los hongos levaduriformes y los del género *Aspergillus* no fueron sensibles frente a los extractos seriados de *T. mendocina* (MIC >1000 µg/ml). Los resultados se presentan en la **Tabla 26**.

Tabla 26. Actividad antifúngica de los extractos seriados de *T. mendocina*. Los valores de CIM se expresan en µg/ml.

| Dermatofitos | Extractos de <i>T. mendocina</i> | | | | Antifúngicos comerciales | |
|------------------------------------|----------------------------------|-----|-------|-------|--------------------------|--------|
| | EP | DCM | MeOH | AcOEt | Ket. | Terb. |
| <i>M.gypseum</i> C 115 2000 | 250 | 250 | >1000 | 250 | 0,05 | 0,04 |
| <i>T. rubrum</i> C 113 2000 | 500 | 250 | >1000 | 250 | 0,0025 | 0,0025 |
| <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9972 | 250 | 250 | >1000 | 125 | 0,0025 | 0,04 |

Ket: ketoconazol; Terb: Terbinafina

VII.4.-Aislamiento bioguiado de los extractos activos

Los extractos que fueron activos, se seleccionaron para el aislamiento bioguiado. El extracto EP (15 g) se sometió a fraccionamiento utilizando CCMP (largo de columna: 70 cm; diámetro 5 cm) con 500 g sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60). Se eluyó con una mezcla de EP-AcEtO con polaridad creciente. Se obtuvieron 130 fracciones de 150 ml cada una. Por comparación en CCD, utilizando como fase móvil EP-AcOEt (95,5:0,5), luego detección bajo luz UV, rociadas y reveladas con *p*-anisaldehído, las fracciones con patrones de corrida similares se reunieron en diecisiete grupos. Los grupos más activos fueron **XI**, **XIV** y **XV**.

A partir del **grupo XI** (187 mg), se fraccionó utilizando CCMP (largo de columna: 24 cm; diámetro 3 cm), conteniendo 100 g sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60), se eluyó con una mezcla de EP-AcEtO con polaridad creciente. Se obtuvo el **compuesto 1: 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitienil, BBTAcO** (5 mg). EMHR *m/z* (rel. int.%): 234.340 (calc. por C₁₂H₁₀OS₂: 234,017), ver **Figura 27**.

Los **grupos XIV** y **XV** (840 mg) se fueron permeados isocráticamente, en una columna Sephadex LH-20, (largo: 26 cm, diámetro: 2,5 cm) equilibrada con la mezcla éter de petróleo-metanol-cloroformo (2:1:1). Se obtuvo el **compuesto 2: β-sitosterol** (50 mg). EI-MS: C₂₉H₅₀O *m/z* 414.3792 (M⁺) calc. for C₂₉H₅₀O: 414.3792 (52), 396 (35) (M-H₂O), 381 (21), 329 (22), 303(32), 273 (20), 255 (39), 218 (100), 203 (40), 189 (22), 81

(72), 69 (61), 55 (80). Los datos espectroscópicos y de masas están de acuerdo a un reporte previo de Feresin y col. (2002). Ver **Esquema 27**.

Adicionalmente, el extracto DCM (7,5 g) fue permeado en una columna con Sephadex LH-20 (largo 33 cm, 5,5 cm de diámetro), equilibrada con MeOH. Se obtuvieron 25 fracciones de 35 ml cada una. Por similitud en CCD, utilizando como fase móvil EP-AcOEt (95,5:0,5), luego detección bajo luz UV, rociadas y reveladas con *p*-anisaldehído, las fracciones se reunieron en cuatro grupos: **1** (3 mg; fracciones 1-9), **2** (100 mg: fracciones 10-16), **3** (700 mg: fracciones 17-21), **4** (3 mg, fracciones 22-25).

El **grupo 3** (300 mg) se fraccionó por CCMP en sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60); con largo de columna: 50 cm, diámetro: 3,5 cm, se eluyó con una mezcla de EP-AcEtO con polaridad creciente, se obtuvieron el 217 fracciones de 10 ml cada

una. Por comparación y por patrones similares de corrida en CCD utilizando como fase móvil EP-AcOEt (9:1), luego detección bajo luz UV y reveladas con *p*-anisaldehído, las fracciones se reunieron en diez grupos: 1 (22,3 mg, fracciones 1-14), 2 (12,3 mg, fracciones 15-25); 3 (20,4 mg, fracciones 26-48), 4 (12,4 mg, fracciones 49-64); 5 (81,2 mg, fracciones 65-83); 6 (21,8 mg, fracciones 84-102); 7 (25mg, fracciones 103-149); 8 (24 mg, fracciones 150-180); 9 (12 mg, fracciones 181-200); 10 (19 mg, fracciones 201-217).

A partir del **grupo 5** (81,2 mg) mediante CCMP en sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60); con largo de columna: 30 cm, diámetro: 3,5 cm, eluida con una mezcla de EP-AcEtO con polaridad creciente y se obtuvo el **compuesto 1: 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bithienil, BBTAcO** (5 mg), EM *m/z* (rel. int.%): 276 [M]⁺ (C₁₄H₁₂O₂S₂), 217 (15), 216 (100), 203 (14), 43 (21), el **compuesto 3: 5-(4-hidroxi-1-butinil)-2,2'-bitienil, BBTOH** (3 mg). EM *m/z* (rel. int.%): 234 [M]⁺ (C₁₂H₁₀OS₂), 203 (100) 234 (76) 204 (14) 171 (21) 235 (11) y el **compuesto 4: 4-hidroxiacetofenona** (15 mg). EM *m/z* (% Intensidad relativa): 136 (48) [M]⁺, 121 (100) [M-CH₃]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): s 12.2 (OH), 7.92 (2H, d, J = 8.0, H-2', H-6'), 6.96 (2H, d, J = 8.0, H-3', H-5'), 2.60 (3H, s, CH₃). 13C-RMN: 198.68s (C=O), 161.39 s (C-5), 131.22 d (C-2 y C-6), 129.47 s (C-1), 115.53 d (C-3 y C-5), 59.137 t (C-6), 34.202 t (C-7), 25.926 q (C-8), 18.027 q (C-9), 26.218 q (C-CH₃). Ver **Figura 27**. Los datos espectroscópicos de los compuestos **1** y **3** fueron coincidentes con los informados por Margl, (2002) y Gil y col. (2002) para los tiofenos aislados e identificados mediante análisis por CG-EM en la especie *Tagetes patula*.

El extracto EAcoEt (756 mg) se fraccionó mediante CCMP en sílica gel (0,063-0,2 mesh, Merck 60); con largo de columna a: 55 cm, diámetro: 2 cm, se eluyó con una mezcla de EP-AcEtO-MeOH con polaridad creciente. Se obtuvieron 200 fracciones de 15 ml cada una. Las fracciones con patrones similares de CCD se reunieron. Se obtuvo el **compuesto 5: 2-hidroxiacetofenona** (45 mg). EM *m/z* (% Intensidad relativa): 136 (44) [M]⁺, 121 (100) [M-CH₃]⁺, 93 (23) [M-CH₃CO]⁺, 65 (35) [C₅H₅]⁺. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): s 12.2 (OH), 7.70 (1H, dd, J = 8.0, H-6'), 7.40 (1H, td, J = 8.0, J = 2.0, H-4'), 6.80-7.00 (2H, m, H-3' y 5'), 2.60 (3H, s). ¹³C-RMN 198.27s (C=O), 161.10 s (C-2), 137.35 d (C-4), 129.81 s (C-6), 120.97 s (C-5), 115.40 d (C-3 y C-1), 26.218 q (C-CH₃). y el **compuesto 6: dihidrorosefurano** (51 mg, ver **Figura 27**.) EM *m/z* (rel.int.%): 152 [M]⁺ (C₁₀H₁₆O) (8), 137 [M-Me]⁺(15), 112 [M-Me]⁺ (24), 83 [M-C₅ H₉]⁺ (20), 69 [C₅ H₉]⁺ (100), 1H-NMR: 5.66 t (8) (H-3), 5.13 t (8) (H-4), 4.03 t (8) (H-5), 4.21 dd (H-6), 2.24 m (H-7), 1.75 s (H-8), 1.66 s (H-9), 1.69 s (H-10). 13C-NMR: 140.427 s (C-1), 135.300 s (C-2), 124.523 d (C-3), 119.737 d (C-4), 76.382 d

(C-5), 59.137 t (C-6), 34.202 t (C-7), 25.926 q (C-8), 18.027 q (C-9), 12.218 q (C-10). $[\alpha]_D$: -2.2, (c=0.09; CHCl₃). Los datos espectroscópicos de **6** están de acuerdo con los reportados por Misra y col (1991). Mientras que los datos del compuesto **5** son coincidentes con reportes de Bentley y col. (1984).

En el siguiente esquema se resume el aislamiento bioguiado de *T. mendocina* colectada en la provincia de San Juan.

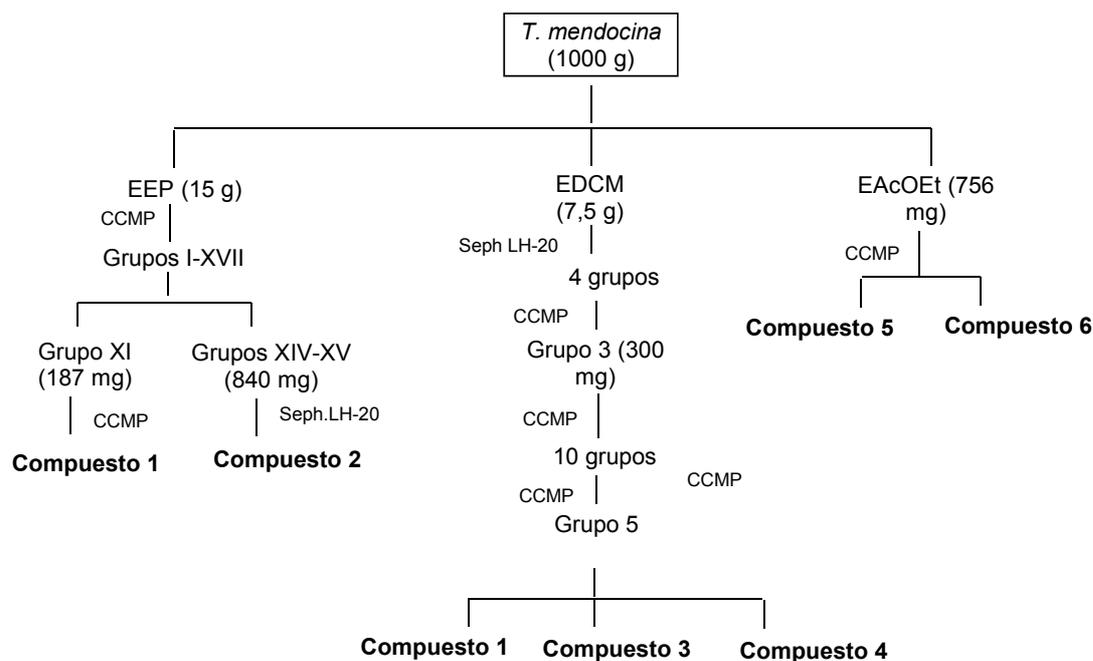


Figura 27: Aislamiento bioguiado por actividad antifúngica de *T. mendocina* (San Juan).

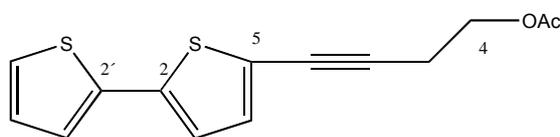
A continuación se presentan las estructuras de los compuestos aislados de *T. mendocina*

Compuesto 1:

Nombre IUPAC: 5-(4-acetoxi-1-butinil)-2,2'-bitienil, BBAcO

Cantidad obtenida: 10 mg

Aspecto: oleoso incoloro

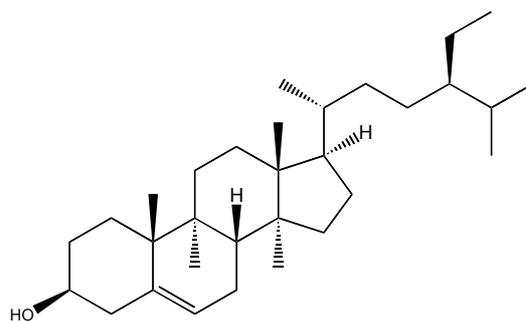


Compuesto 2:

Nombre común: β -sitosterol

Cantidad obtenida: 50 mg

Aspecto: sólido blanco

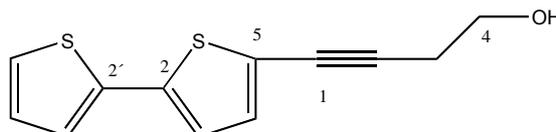


Compuesto 3:

Nombre IUPAC: 5-(4-hidroxi-1-butilil)-
2,2'-bitienil, BBTOH

Cantidad obtenida: 3 mg

Aspecto: oleoso incoloro



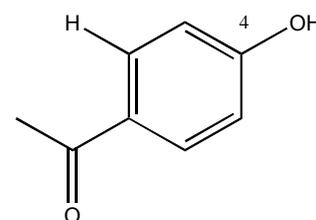
Compuesto 4:

Nombre común: *p*-hidroxiacetona

IUPAC: 4-hidroxiacetofenona

Cantidad obtenida: 15 mg

Aspecto: polvo cristalino beige



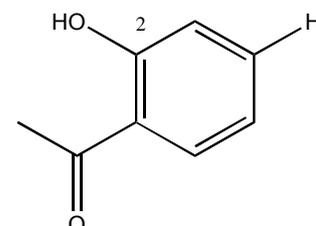
Compuesto 5:

Nombre común: *o*-hidroxiacetona

IUPAC: 2-hidroxiacetofenona

Cantidad obtenida: 45 mg

Aspecto: sólido blanco



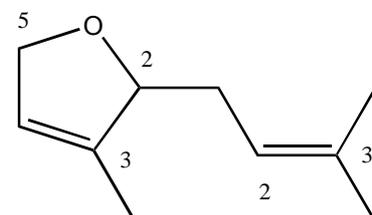
Compuesto 6:

Nombre común: Dihidrorosefurano

IUPAC: 2 β -(3-metilbut-2-enil)-3-metil-
2,5-dihidrofurano

Cantidad obtenida: 51 mg

Aspecto: oleoso incoloro



Los tiofenos 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (**1**) y 5-(4-hidroxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (**2**) se informaron como constituyentes de *Tagetes spp*, mientras que dihidrorosefurano (**6**) fue aislado previamente de *Artemisia pallens* (Misra, y col.,

1991; Margl, y col., 2002). La composición química y la cuantificación de tiofenos de la especie *T. minuta*, colectada en la provincia de Mendoza, se informó donde el principal compuesto identificado fue el compuesto **2 BBTOH** (Gil y col., 2002). Este compuesto (**BBTOH**) también fue informado como constituyente en los géneros *Tagetes*, *Porophyllum* y *Echinops*, mientras que su acetato (**1**) correspondiente se aisló de especies del género *Berkheya*, *Dyssodia*, *Echinops* y *Tagetes* (Dictionary Natural Products, 2007).

VII.5.-Actividad Antifúngica de los compuestos aislados de la especie *T. mendocina*

Una vez aislados, los compuestos fueron ensayados frente a dermatofitos. El tiofeno 5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (**1**) fue muy activo frente a los dermatofitos *M. gypseum* y *T. rubrum* con valores de CIM de 3,12 µg/ml mientras que se obtuvo un valor de CIM de 6,25 µg/ml frente a *T. mentagrophytes*. El compuesto 5-(4-hidroxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (**2**), presentó un efecto antifúngico similar con valores de CIMs de 3,12 y 6,25 µg/ml frente a los dermatofitos del género *Trychophyton*. Mientras que *M. gypseum* fue menos sensible a este compuesto (CIM = 25 µg/ml). Ver **Tabla 27**. Estos resultados son de considerable interés debido a que los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *T. rubrum*, son agentes etiológicos de onicomiosis, y dermatofitosis (Koc, y col., 2005). El resto de los compuestos no resultaron activos frente al panel de hongos ensayados (CIM > 250 µg/ml), datos que no se muestran.

En general, fue informado que los tiofenos son utilizados para tratar malezas y plagas. Existen en la literatura, trabajos respecto al mecanismo de acción de un tiofeno, α -tertienil, de estructura similar a los identificados en este trabajo, el cual es fotoactivado, que bajo la luz UV promueve la generación de O₂ singlete, molécula extremadamente tóxica para las membranas fúngicas (Bakker, y col., 1979; Romagnoli y col., 1998; Nivsarkar, 1999).

Tabla 27. Actividad antifúngica de los compuestos aislados de *T. mendocina*. Los valores de la CIM se expresan en µg/ml.

| Dermatofitos | Compuestos aislados | | | | | | Antifúngicos comerciales | |
|------------------------------------|---------------------|------|-----|-----|-----|-----|--------------------------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | Ket. | Terb. |
| <i>M.gypseum</i> C 115 2000 | 25 | 3,12 | >50 | >50 | >50 | >50 | 0,05 | 0,04 |
| <i>T. rubrum</i> C 113 2000 | 3,12 | 3,12 | >50 | >50 | >50 | >50 | 0,003 | 0,003 |
| <i>T. mentagrophytes</i> ATCC 9972 | 6,25 | 6,25 | >50 | >50 | >50 | >50 | 0,003 | 0,04 |

5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (1), 5-(4-hidroxi-1-butilil)-2,2'-bitienil (2), β-sitosterol (3), 4-hidroxiacetofenona (4), 2-hidroxiacetofenona (5), dihidrorosefurano (6), Ket.: Ketoconazol, Terb: Terbinafina.

VII.3.-CONCLUSIONES

Este es el primer estudio de aislamiento bioguiado por la actividad antifúngica de extractos seriados de *T. mendocina* colectada en Bauchaceta, provincia de San Juan. El extracto EP fue el más efectivo frente a dermatofitos. Se aislaron compuestos característicos de este género, del tipo tiofenos, hidroxiacetofenonas y furanos; a partir del extracto activo de EP. Con respecto a la actividad antifúngica que presentaron los tiofenos BBTOAc (1) y BBTOH (2) aislados de *T. mendocina*, frente a *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, aunque fueron muy activos, estos son compuestos fotosensibilizantes, por lo que las dosis deben ser muy cuidadosas para no generar efectos fototóxicos sobre las células, por esta razón resultaría interesante continuar con los estudios de citotoxicidad, para establecer dosis terapéutica efectiva evitando efectos adversos.

CAPÍTULO VIII

Conclusiones

VIII. CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis, se trabajó en la búsqueda de moléculas o grupo de moléculas con actividad antifúngica a partir de especies que crecen en la Provincia de San Juan, Argentina.

Las especies se seleccionaron sobre la base de los antecedentes del uso tradicional, las propiedades que caracterizan a las especies que crecen bajo condiciones climáticas extremas y la aplicación potencial como fuente de compuestos antifúngicos, se realizaron estudios químicos y de actividad antifúngica.

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales de las especies *Artemisia mendozaana*, *Azorella cryptantha* colectada en Bauchaceta y en Agua Negra, *Gymnophyton polucephalum* y *Tagetes mendocina* fueron caracterizados.

- Se corrobora que la composición química de los AEs, para ambas poblaciones de *Azorellas* (BAU: 1800 y AN: 4000 m s.n.m.), fueron diferentes. Algunas variaciones se observaron en las proporciones relativas de los componentes mayoritarios, y en la presencia de terpenos oxigenados en la muestra colectada en Agua Negra, sin embargo la actividad antifúngica fue prácticamente similar.
- Los aceites esenciales fueron activos frente a los dermatofitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *M. gypseum* a excepción del de *A. mendozaana*. Mientras que solamente los AEs de *A. mendozaana*, *A. cryptantha* y *T. mendocina* fueron activos frente a los hongos levaduriformes *C. tropicalis* y *C. neoformans*.
- Los AEs de *A. mendozaana*, *A. cryptantha* (BAU y AN) y *T. mendocina*, se seleccionaron para evaluar el efecto sinérgico frente a los hongos levaduriformes *C. albicans* y *C. neoformans* y los dermatofitos *M. gypseum* y *T. rubrum*.
- Solamente la combinación de AE de *A. cryptantha*-AN con fluconazol mostró efecto sinérgico frente a *C. albicans*, el resto de las combinaciones de los aceites esenciales con los antifúngicos comerciales (fluconazol y terbinafina), produjeron la reducción de la concentración del fármaco antifúngico utilizado.

- Frente a los dermatofitos (*M. gypseum* y *T. rubrum*), todos los AEs de las especies evaluadas, presentaron efecto aditivo. La combinación redujo a la mitad y octava parte en algunos casos el valor de la CIM del antifúngico terbinafina sin combinar.

Aislamiento Bioguiado

A. *cryptantha*-BAU

- El extracto EP fue activo frente al panel de hongos dermatofitos: *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.
- Del extracto apolar EP se aislaron e identificaron:

Compuesto 1: *Azorellolido*

Compuesto 2: *Mulinol*

Compuesto 3: *Stachytriol*

Compuesto 4: *1 α , 10 β , 4 β , 5 α -Diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol*

Compuesto 5: *1 β , 10 α , 4 β , 5 α -Diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol,*

Compuesto 6: *1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahidro-7-(1-hidroxi-1-metiletil)-1,4-dimetilazuleno-3a,8a-diol*

Compuesto 7: *Madreporanona*

Compuesto 8: *Yaretol*

Compuesto 9: *Chrysotol*

- El compuesto **chrysotol** presentó la mejor actividad antibacteriana frente a las enterobacterias *E. coli* de aislados clínicos y *S. enteritidis* mientras que el compuesto **madreporanona** mostró menor efecto antifúngico. Los compuestos aislados no fueron activos frente al panel de hongos evaluados.

Gentianella multicaulis

- Los tres extractos seriados mostraron efecto antifúngico frente al panel de hongos dermatofitos *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.
- Cuatro xantonas oxigenadas y dos triterpenos fueron aislados del extracto activo DCM. Los compuestos identificados fueron:

Compuesto 1: *Ácido oleanólico*

Compuesto 2: *Ácido ursólico*

Compuesto 3: *Swerchirina*

Compuesto 4: *Bellidina*

Compuesto 5: *Bellidifolina*

Compuesto 6: *Isobellidifolina*

- Las xantonas bellidina, bellidifolina e isobellidifolina presentaron actividad antifúngica frente a los dermatofitos *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* mientras que *swerchirina* resultó menos activo.

Tagetes mendocina

- Los extractos EP y DCM fue activos frente al panel de hongos dermatofitos: *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.
- Los seis compuestos aislados de los extractos activos EP, DCM y el AcOEt e identificados fueron:

Compuesto 1: *5-(4-acetoxi-1-butilil)-2,2'-bitienil* (BBTOAc)

Compuesto 2: *5-(4-hidroxi-1-butilil)-2,2'-bitienil* (BBTOH)

Compuesto 3: *β-sitosterol*

Compuesto 4: *4-hidroxiacetofenona*

Compuesto 5: *2-hidroxiacetofenona*

Compuesto 6: *dihidrorosefurano*

De los seis compuestos aislados de *T. mendocina*, los tiofenos fueron muy activos frente a *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*.

Los aportes realizados durante este trabajo de tesis, relacionados al estudio químico de aislamiento e identificación de compuestos, caracterización de aceites esenciales, la actividad antifúngica, y el estudio del efecto sinérgico de la combinación de aceites esenciales con fármacos conocidos, de cinco especies colectadas en la provincia de San Juan, contribuyen al conocimiento científico del potencial de estas especies como fuente de productos bioactivos tendientes a la conservación de la biodiversidad de la región.

PROYECCIONES

Sobre la base de los objetivos alcanzados en relación a las especies estudiadas, de la flora de la provincia de San Juan, y sus metabolitos bioactivos, permiten vislumbrar proyecciones a futuro.

El potencial de los resultados obtenidos, podría enfocarse en profundizar en el estudio del efecto de la combinación de los aceites esenciales de las especies mas activos entre si y/o la combinación de estos con sus compuestos mayoritarios.

Otro aspecto relevante seria estudiar el mecanismo de acción de los aceites y/o moléculas activas. Además iniciar estudios de citotoxicidad para establecer dosis terapéutica y de este modo dar provecho a los resultados obtenidos en este trabajo, con una posible aplicación a mediano plazo en el desarrollo de un producto tópico antifúngico.

Por otra parte, a partir de los compuestos con efecto antifúngico identificados se podría plantear el diseño de derivados obtenidos por semi-síntesis para realizar estudios de actividad en sitios blanco específicos para analizar relación estructura-actividad.

CAPÍTULO IX

Referencias Bibliográficas

- Abad, M.J.; Ansuategui, M.; Bermejo, P. (2007). Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC* (vii) 116-145
- Abdala de Israilev, L.R.A.; Seeligmann, P. (1983). Distribution of flavonoids from leaves of three species of *Tagetes* Compositae and their chemosystematics significance (in Spanish). *Lilloa* **36**, 5-14.
- Abdala, L.R.; Martinez, M.; Seeligmann, P. (1991). Myricetin in *Tagetes*: chemosystematic significance *Phytochemistry* **30**, 4037-4038.
- Abdala, L.R. (1999). Caracterización quimiosistemática de las especies argentinas del género *Tagetes* (Asteraceae) *Bol. Soc. Argent. Bot.* **34**, 3-9.
- Adams, R.P. (2001). In 'Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy', 3rd edn. Allured Publ. Corp., Carol Stream, Illinois.
- Agüero, M.B.; Gonzalez, M. Lima, B. Svetaz, L.; Sánchez, M.; Zacchino, S. Feresin, G.E.; Schmeda-Hirschmann, G.; Palermo, J. Wunderlin, D.; Tapia, A. (2010). Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 194–201.
- Agüero, M.B.; Svetaz, L.; Sánchez, M.; Luna, L.; Lima, B.; López, M.L.; Zacchino, S.; Palermo, J.; Wunderlin, D.; Feresin, G.E.; Tapia, A. (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 1970–1978.
- Ahmed, A.A.; Hegazy, M.E.; Hassan, N.M.; Wojcinska, M.; Karchesy, J.; Pare, P.W. Mabry, T.J. (2006). Constituents of *Chrysothamnus viscidiflorus*. *Phytochemistry* **67**, 1547-1553.
- Alexander B. y Pfaller M.A. (2006). Contemporary tools for the diagnosis and management of invasive mycoses. *Clin Infect Dis* **43** (Suppl 1), S15-27.
- Al-Ja'fari, A.; Vila, R.; Freixa, B.; Tomi, F.; Casanova, J.; Costa, J.; Cañigueral, S. (2011). Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytochemistry* **72**, 1406–1413.
- Alonso-Amelot, M.E. (2008). In 'Studies in Natural Products Chemistry', Ed. Atta-ur-Rahman, **34**, 883-981.
- Allevato MA, Negroni R, Galimberti R. Antifúngicos. Ayer, hoy y mañana. (2007). *Act Terap Dermatol*; **30**, 8-17
- Anh N.H.; Ripperger H.; Sung T.V.Y; Adam, G. (1996). Neolignans and a sesquiterpene from *Caryodaphnosis tonkinensis*. *Phytochemistry* **42**, (4): 1167-1169.
- Aquino, R.; Cáceres, A.; Morelli, S.; Rastrelli, L. (2002). An Extract of *Tagetes lucida* and Its Phenolic Constituents as Antioxidants. *J. Nat. Prod.* **65**, 1773-1776.
- Arechaval, A.I. (2008). Nuevas herramientas para el diagnóstico micológico ¿Contamos con micólogos preparados para usarlas? *Revista Argentina de Microbiología* **40**, 1-2.
- Areche, C.; Vaca, I.; Loyola, L.A.; Borquez, J.; Roviroso, J.; San-Martín, A. *Planta Med.* **2010**, **76**, (15), 1749.
- Ariza Espinar, L. (1967). Las especies de *Tagetes* (Compositae) de la región central Argentina. *Kurtziana* **4**, 51-71.
- Auberger, J.; Lass-Flörl, C.; Ulmer, H.; Nogler-Semenitz, E.; Clausen, J.; Gunsilius E. (2008). Significant alterations in the epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Int J Hematol.* **88**, 508-515.
- Bakker, J.; Gommers, F.J.; Nieuwenhuis, I.; Wynberg, H. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 1841,
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 446-475.

Referencias Bibliográficas

- Barboza, G.E.; Cantero, J.J.; Núñez, C.; Pacciaroni, A.; Ariza Espinar, L. (2009). Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana* **34**, (1-2), 7-365.
- Basnet P., Kadota S., Shimizu M., Namba, T. (1994), Bellidifolin a potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from *Swertia japonica*. *Planta Med.* **60**, 507–511.
- Bassolé, I.H.N.; Juliani, H.R. (2012). *Review*. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* **17**, 3989-4006.
- Ben Arfa, A.; Combes, S., Preziosi-Belloy, L.; Gontard, N.; Chalier. P. (2006). *Lett. Appl. Microbiol.* **43**, 149-154.
- Bennett, J.E. (2005). Salvage therapy for aspergillosis. *Clin Infect Dis*; **41** (Suppl 6): S387-S388.
- Bentley M.D., Brackett S. R., Chapy A. (1984). *J. Nat. Prod.* **47** (6), 1056–1057.
- Biavatti, M. (2009). Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Braz J Pharmac Sci* **45**, 371-378.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Trenal, J., Haenel, P., Grenz, M., (1971) Uber weitere Polyine aus Umbelliferen. *Chem. Ber.* **140**, 1322–1328.
- Borisy, A.A.; Elliott, P.J.; Hurst, N.W.; Lee, M.S.; Lehár, J.; Price, E.R., Serbedzija, G.; Zimmermann, G.R.; Foley, M.A.; Stockwell B.R.; Keith, C.T. (2003). Systematic discovery of multicomponent therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, **100**, (13) 7977–7982.
- Boucher, H.W.; Groll, A.H.; Chiou, C.C.; Walsh, T.J. (2004). Newer systemic antifungal agents: pharmacokinetics, safety and efficacy. *Drugs*; **64**, 1997-2020.
- Bustos, D.; Tapia, A.; Feresin, G. E.; Ariza Espinar, L. (1996). Ethnopharmacobotanical survey of Bauchaceta district, San Juan Province, Argentina. *Fitoterapia*, **67**, 411-415.
- Campbell, A.W.; Anyanwu, E.C.; Morad, M. (2004) .Evaluation of the drug treatment and persistence of onychomycosis. *Sci. World J.* **4**, 760-777.
- Catalán, M.; Montejo, J.C. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol*; **23**, 39-49.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, (2002). Methods for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard, 3rd ed. CLSI document M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, (2008), Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous Fungi; Approved Standard M38, A2. CLSI, Wayne, PA, USA.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, (2008). 'Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 8th Informational Supplement, Document M100-S18', Wayne, PA, USA.
- Colloca, C. B.; Pappano, D. B.; Bustos, D. A.; Sosa, V. E. (2004). Azorellane diterpenes from *Azorella cryptantha*. *Phytochemistry*, **65**, 2085.
- Craven, P.C.; Graybill, J.R. (1984). Combination of oral flucytosine and ketoconazole as therapy for experimental cryptococcal meningitis. *J. Infect. Dis.* **149**, 584–590.
- Chaturvedi, V.; Ramani, R.; Andes, D.; Diekema, D.J.; Pfaller, M.A.; Ghannoum, M.A.; Knapp, C.; Lockhart, S.R.; Ostrosky-Zeichner, L.; Walsh, T.J.; Marchillo, K.; Messer, S.; Welshenbaugh, A.R.; Bastulli, C.; Iqbal, N.; Paetznick, V.L.; Rodriguez, J. and Sein, T. (2011). *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and Combinations of Antifungals against. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, (4), 1543-1548.
- Chatzimoschou, A.; Katragkou, A.; Simitsopoulou, M.;1 Antachopoulos, Ch.; Georgiadou, E.; Walsh, T.J.; Roilides, E. (2011). Activities of Triazole-Echinocandin Combinations against *Candida* Species in Biofilms and as Planktonic Cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **55**, (5), 1968–1974.

Referencias Bibliográficas

- Chou, T.C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*, **68**, 621–681.
- Davel, G.; Canteros, C.E. (2007). Situación de las micosis en la República Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **39**, (1), 28-34.
- Del Rey, B.; Ramos, A.C.; Caballero, E.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Medarde, M.; Rojas de Arias, A.; San Feliciano, A. (1999). Leishmanicidal activity of combretastatin analogues and heteroanalogues. *Bioorg. Med. Chem Lett* **9**, 2711-2714.
- Dennis, C.G.; Greco, W.R.; Brun, Y.; Youn, R.; Slocum, H.K.; Bernacki, R.J.; Lewis, R.; Wiederhold, N.; Holland, S.M.; Petraitiene, R.; Walsh, T.J.; Segal, B.H. (2006). Effect of amphotericin B and micafungin combination on survival, histopathology, and fungal burden in experimental aspergillosis in the p47*phox*⁻/mouse model of chronic granulomatous disease. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 422-427.
- Dictionary of Natural Products on CDROM 2007. Chapman and Hall. CRC, Boca Ratón, FL, U.S.A.
- Dictar, M.O.; Maiolo, E.; Alexander, B.; Jacob, N.; Verón, M.T. (2000). Mycoses in the transplanted patient. *Med Mycol*, **38**, 1, S251-258.
- Duschatzky, C.B.; Possetto, M.L.; Talarico, L.B.; García, C.C.; Michis, F.; Almeida, N.V.; Lampasona, M.P.; de, Schuff, C.; Damonte, E.B. (2005). Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants. *Antiviral, Chemistry & Chemotherapy*, **16**, 247-251.
- Espinel-Ingroff, A. (2008). Revisión: Mecanismos de resistencia a los antifúngicos: levaduras y hongos filamentosos. *Revista Iberoamericana de Micología* **25**, (2), 101–106.
- Espinel-Ingroff, A. (2009). Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009). *Revista Iberoamericana de Micología*, **26**, (1), 15-22.
- European Pharmacopeia, Strasbourg, Council of Europe (COE)–European Directorate for the Quality of Medicines. (2005). 5 th ed., **1**, 217.
- Faizi, S.; Siddiqi, H.; Bano, S.; Naz, A.; Lubna, M.K.; Nasim, S.; Riaz, T.; Kamal, S.; Ahmad A.; Khan, S.A. (2008). Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tagetes patula*: Preparation of patuletin derivatives. *Pharmaceut Biol* **46**, (5), 309-320.
- Feresin, G.E.; Tapia, A.; Bustos, D. (2000) Antibacterial activity of some medicinal plants from San Juan, Argentina. *Fitoterapia* **71**, 429-432.
- Feresin, G.; Tapia, A.; Gutierrez Ravelo, A.; Delporte, C.; Backhouse Erazo, N.; Schmeda Hirschmann, G. (2002). Free radical scavengers, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acaena magellanica*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **54**, 835-844.
- Freixa, B.; Vila, R.; Vargas, L.; Lozano, N.; Adzet, T.; Cañigual, S. (1998). Screening for antifungal activity on nineteen Latin American plants. *Phytotherapy Research* **12**, 427–431.
- Fridkin, S.K. (2005). The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin. Infect. Dis.* **41**, 1455–1460.
- Galimberti R.L.; González Ramos, M.C. (2001). Dermatofitosis. En: *Temas Dermatológicos: Pautas Diagnósticas y Terapéuticas* Editor A.J. Rondón Lugo. Impreso en Caracas – Venezuela, 65-70.
- Gil, A.; Ghera, C.M.; Perelman, S. (2002). Root thiophenes in *Tagetes minuta* L. accessions from Argentina: genetic and environmental contribution to changes in concentration and composition. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**, 1-13.
- Giordani, R.; Regli, P.; Kaloustian, J.; Mikail, C.; Abou, L.; Portugal, H. (2004). Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res* **18**, 990–995.
- Gulec, A.T.; Demirbilek, M.; Seckin, D.; Can, F.; Saray, Y.; Sarifakioglu, E.; Haberal, M. (2003) Superficial fungal infections in 102 renal transplant recipients: a case-control study. *J Am Acad Dermatol.* **49**, 187-192.

Referencias Bibliográficas

- Gupta, P.; Vasudeva, N. (2010). *In vitro* antiplasmodial and antimicrobial potential of *Tagetes erecta* roots. *Pharmaceut Biol* **48**,(11), 1218-1223.
- Hajimehdipour H.; Amanzadeh, Y., Sadat Ebrahimi, S.E.; Mozaffarian, V. (2003), Three tetraoxygenated xanthenes from *Swertia longifolia*. *Pharm. Biol.* **41**, 497 – 499.
- Havlickova, B.; Viktor, A.C.; Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, **51**, 2-12.
- Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A.K.; Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* **15**, 639–652.
- Isham, N., Bradley, M., Ghannoum, M., (1999). Susceptibility profile of dermatophytes shows no development of terbinafine resistance. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 549.
- Jamaliana, A.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Jaimand, K.; Pashootan, N.; Amani, A.; Razzaghi-Abyaneha, M. (2012). Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. *Journal de Mycologie Médicale* **22**, 308-315
- Jensen, S.R.; Schripsema, J. (2002), Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. En: L. Struwe and V.A. Albert, Eds. *Gentianaceae - systematics and natural history*. Cambridge University Press, Cambridge. 573–631.
- Jiang, D.J., Dai, Z., Li, Y.J. (2004). Pharmacological effects of xanthenes as cardiovascular protective agents. *Cardiovasc. Drug Rev.* **22**, 91–102.
- Kiesling, R. (2003). Flora de San Juan, República Argentina. Vol. II. Estudio Sigma. Buenos Aires.
- Kingston, D.G.I. (2011). Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. *J. Nat. Prod.* **74**, 496–511.
- Kleier, C.; Rundel, P. (2009). Energy balance and temperature relations of *Azorella compacta*, a high-elevation cushion plant of the central Andes. *Plant Biology* **11**, 351- 358.
- Koc, A. N.; Silici, S.; Ayangil, D.; Ferahbas, A.; Cankaya, S. (2005). *Mycoses* **23**. **48**, 205,
- Kocsis, B. Kustos, I.; Kilár, F.; Nyul, A.; Jakus, P.B.; Kerekes, S.; Villarreal, V.; Prókai, L.; Lóránd, T. (2009). Antifungal unsaturated cyclic Mannich ketones and amino alcohols: study of mechanism of action. *Eur J Med Chem.* **44**, (5),1823-1829.
- Kontoyiannis, D.P.; Lewis, R.E. (2002). Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet* **359**, 1135-1144.
- Koroch, A.R.; Juliani, R.H.; Zygadlo, J.A. (2007). Bioactivity of essential oils and their components in: flavours and fragrances. Ed. Springer Berlin Heidelberg, Chap. 5, 87-115.
- Koroishi, A.M.; Foss, S.R.; Cortez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T.; Vataru Nakamurad, C. Benedito P. Dias Filho, B.P. (2008). *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology* **117**, 270–277.
- Kurdelas, R.R.; Lopez, S.; Lima, B.; Feresin, G.E.; Zygadlo, J.; López, M.L.; Zacchino, S.; Tapia, A.; Freile, M.L. (2012). Chemical Composition, Anti-Insect and Antimicrobial Activity of the *Baccharis darwinii* Essential Oil from Argentine Patagonia. *Industrial Crops and Products*, **40**, 261-267.
- Langeveld, W.T.; Veldhuizen; E.J.; A., Burt, S.A. (2013). REVIEW. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol*, 1-19.
- Li, J.F.; Lu G.F.; Zou Y.Y. (2011), Demethylbellidifolin inhibits proliferation and activation of hepatic stellate cells. *J. Invest. Surg.* **24**, 171–177.
- Li M., Li L., Yang Y., Zhang N., Song X., and Xiao P. (2010). Genus *Gentianella* Moench: A phytochemical and ethnopharmacological review. *Chin. Herbal Med.* **2**, 262 – 271.
- Li-Juan, L.; Min-Hui, L. Terpenoids, flavonoids and xanthenes from *Gentianella acuta* (Gentianaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **37** (2009) 497–500.

Referencias Bibliográficas

- Lima, B.; P. de Lampasona, M.; Schuff, C.; Tapia, A.; Bomben, R.; Duschatzky, D.; Feresin, G.E. (2008). Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Artemisia mendozana* D.C. Essential Oil, *JEOBP* **11**, (5), 496 – 502.
- López, S.B.; López, M.L.; Aragón, L.M.; Tereschuk, M.L.; Slanis, A.C.; Feresin, G.E.; Zygadlo, J.A.; Tapia, A.A. (2011). Composition and Anti-insect Activity of Essential Oils from *Tagetes* L. Species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5286-5292.
- López Moral, L.; Tiraboschi, I.N.; Schijman, M.; Bianchid, M.; Guelfande, L.; Cataldi Rev, S. (2012). Fungemias en hospitales de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina. *Iberoam Micol*, **29** (3), 140-149.
- Loo, D.S. (2007). Onychomycosis in the elderly: drug treatment options. *Drugs Aging*, **24**, 293-302.
- Loyola, L.A.; Borquez, J.; Morales, G.; San Martín, A. Diterpenoids from *Azorella compacta* (1997a) *Phytochemistry*, **44**, 649-641.
- Loyola, L.A.; Borquez, J.; Morales, G.; San Martín, A. (1997b), Mulinol, a diterpenoid from *Azorella compacta*. *Phytochemistry* **45**, 1465-1467.
- Loyola, L.A.; Borquez, J.; Morales, G.; San Martín, A. (1997c). New diterpenoid from *Mulinum crassifolium*. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, **42**, 311-315.
- Loyola, L.A.; Borquez, J., Morales, G.; San Martín, A.; Manríquez, V.; Wittke, O. (1998a) Azorellanol a diterpenoid with a new carbon skeleton from *Azorella compacta*. *Tetrahedron* **54**, 15533-15540.
- Loyola, L.A.; Borquez, J.; Morales, G.; San Martín, A. (1998b). Epoxy-mulin-13-3n-20-oic acid, a diterpenoid from *Azorella compacta*. *Phytochemistry*, **49**, 1091-1093.
- Loyola, L.A.; Borquez, J.; Morales, G.; Araya, J.; Gonzalez, J.; Neira, I.; Sagua, H.; San-Martin, A. (2001b) Diterpenoids from *Azorella yareta* and their trichonomicidal activities. *Phytochemistry*, **56**, 177-180.
- Loyola, L.A.; Borquez, J.; Morales, G.; San Martín, A.; Manríquez, V.; Boys, D.; Darias, J. (2002), Yaretol, a norditerpenoid from *Azorella madreporica*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1678-1680.
- Loyola, L.A.; Borquez, J.; Morales, G.; San-Martín, A.; Darias, J.; Flores, N.; Gimenez, A. (2004). Mulinane-type diterpenoids from *Azorella compacta* display antiplasmodial activity. *Phytochemistry* **65**, 1931-1935.
- Lucena, D.; Novara, L.J.; Cuezco, A.R. (2001). Aportes Botánicos De Salta – Serie Flora. 6, (10), 1-60. Massias M., Carbonnier J. and. Molho D. (1982), Chemotaxonomy of Gentianopsis: xanthonos, C-glycosylflavonoids and carbohydrates. *Biochem. Syst. Ecol.* **10**, 319–327.
- Luna, L.; Lima, B.; Tapia, A.; Feresin, G.E.; Duschatzky, C.; Possetto, M. (2008). Chemical composition and antibacterial activity of *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling essential oil. *Jeobp.* **11**,(1),106-111.
- Margl L.; Tei, A.; Gyurjanc, I.; Wink, M. (2002). GLC and GLC-MS Analysis of Thiophene Derivatives in Plants and in in vitro Cultures of *Tagetes patula* L. (Asteraceae) *Z. Naturforsch.* **57c**, 63-71
- Markham K.R. (1964), Gentian pigments-I: Xanthonos from *Gentiana bellidifolia*. *Tetrahedron* **20**, 991-997.
- Markham K.R. (1965), Gentian pigments-II: Xanthonos from *Gentiana bellidifolia*. *Tetrahedron* **21**, 1449-1452.
- Márquez, J. (1999). Las Áreas Protegidas de la Provincia de San Juan. *Multequina*, **8**, 1-10.
- Martínez, S. (1989). El género *Azorella* (Apiaceae-Hydrocotyloideae) en la Argentina. *Darwiniana*, **29**, 1-4, 139-178.
- Martínez, S. (1999). Apiaceae, en F. O. Zuluaga and O. Morrone (eds.). catálogo de las plantas Vasculares de la República Argentina. II. Dicotyledoneae. Monogr. Syst. Bot. *Missouri Bot. Gard.* **74**: St. Louis.
- Martínez, S. (2003). Umbelliferae, en R. Kiesling (ed), Flora de San Juan II: 214-234.

Referencias Bibliográficas

- Massias, M.; Carbonnier, J.; Molho, D. (1982), Chemotaxonomy of Gentianopsis: xanthonenes, C-glycosylflavonoids and carbohydrates. *Biochem. Syst. Ecol.* **10**, 319–327.
- Mishra, N.N., Prasad, T., Sharma, N., Payasi, A., Prasad, R., Gupta, D.K., Singh, R. (2007). Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **54**, 201-235.
- Misra, N.; Chandra, A.; Thakur, R.S., (1991). 2-Hydroxyacetophenone: Principal Root Volatile of the East African Medicinal Plant, *Carissa edulis* *Phytochemistry* **18**, (30), 549.
- Mitsunaga, M.; Tang, H.C. (2004). *Jpn Kokai. Tokio. Kaoho.7*.
- Molina-Salinas, G.M.; Bórquez J.; Said-Fernández, A.; Ardiles, S.; Loyola, L.A.; Yam-Puc, P. Becerril-Montes, A.; Escalante-Erosa, F.; San-Martin, A.; González-Collado, I.; Peña-Rodríguez, L.M. (2010). Bioactive metabolites from the Andean flora. Antituberculosis activity of natural and semisynthetic azorellane and mulinane diterpenoids *Phytochem Rev* **9**, 271–278.
- Monk, B.C.; Goffeau, A. (2008). Outwitting multidrug resistance to antifungals. *Science* **321**, 367–369.
- Mukherjee, P.K.; Saritha, G.S.; Suresh, B. (2002). Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India. *Phytotherapy Research* **16** (7), 692–695.
- Mukherjee, P.K.; Leidich, S.D.; Isham, N.; Leitner, I.; Ryder, N.S.; Ghannoum, M.A. (2003). Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 82–86.
- Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., Ghannoum, M.A., (2005). Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 163-194.
- Nadinic, E.L.; Saavedra, C.L.; Lira, P.; Bandoni, A.L.; Debenedetti, S.L. (1997), Tetraoxygenated xanthonenes from *Gentianella florida*. *Pharm Biol*, **35**,379-381.
- Nadinic, E.; Gorzalczany, S.; Rojo, A.; van Baren, C.; Debenedetti, S.; Acevedo C. (1999), Topical anti-inflammatory activity of *Gentianella achalensis*. *Fitoterapia*. **70**, 166-171.
- Nadinic E.L., Penna C., Saavedra C. L., Coussio J. D., Gutking G., and Debenedetti S. L. (2002). Aislamiento de los Compuestos con Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). *Acta Farm Bonaerense*. **21**, 123-130.
- Nazar, J.R.; Gerosa, P.E. Díaz, O.A. (2012). Onicomicosis: epidemiología, agentes causales y evaluación de los métodos diagnósticos de laboratorio. *Rev. Argent. microbiol.* **44**, (1),. 21-25.
- Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **70**, 461-477.
- Nivsarkar, M. (1999). Identification of alpha-terthienyl radical in vitro: a new aspect in alpha-terthienyl phototoxicity. *Current Science*, **76**, (10), 1391-1393.
- Nucci, M.; Queiroz-Telles, F.; Colombo, A. (2010). Revisan las Características Epidemiológicas de las Infecciones Fúngicas Oportunistas en América. *Latin Clinical Infectious Diseases* **51** (5):561-570.
- Odds, F.C. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* **52**, 1.
- OMS www.msal.gov.ar/estadísticas/
- Pai, M.P.; Samples, M.L.; Mercier, R.C.; Spilde, M.N. (2008). Activities and ultrastructural effects of antifungal combinations against simulated *Candida endocardial* vegetations. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2367-2376.
- Pappas, P.G. (2010). Opportunistic fungi: a view to the future. *Am. J. Med. Sci.* **340**, 253–257.
- Patterson, T. (2005). Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet*, **366**, 1013-1025.

Referencias Bibliográficas

- Peres, V.; Nagem, T.J.; de Oliveira, F.F. (2000) Review. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. *Phytochemistry* **55**, 683-710.
- Petrikkos, G.; Skiada, A. (2007). Recent advances in antifungal chemotherapy. *Int J Antimicrob Agents*. 30 (2):108-17.
- Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**, 133-163.
- Pyun, M.S.; Shin, S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* **13**, 394–400.
- Quesada, L.; Areche, C.; Astudillo, L.; Gutierrez, M.; Sepúlveda, B.; San-Martín, A. (2012). Biological activity of isoflavonoids from *Azorella madreporica*. *Nat Prod Commun.* **7** (9),1187-1188.
- Quindós, R. (2011). Revisión: Candidiasis, aspergilosis y otras micosis invasoras en receptores de trasplantes de órgano sólido. *Rev Iberoam Micol.* **28**, (3), 110-119.
- Rand, K.; Houck, H.; Brown, P. (1993). Reproducibility of the microdilution checkerboard method for antibiotic synergy. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 613-615
- Rapp, R.P. (2004). Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacotherapy* **24**, 4-28.
- Ríos, J.L.; Recio, M.C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* **100**, 80-84.
- Rodríguez-Tudela, J.L.; Alcazar-Fuoli, L.; Cuesta, I Alastruey-Izquierdo, A.; Monzon, A., Mellado, E.; Cuenca-Estrella, M. (2008). Clinical relevance of resistance to antifungals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 32 Suppl. 2 S111–S113.
- Romagnoli, C.; Mares, D.; Sacchetti, G., Bruni, A. (1998). The photodynamic effect of 5-(4-hydroxy-1-butinyl)-2,2'-bithienyl on dermatophytes. *Mycological Research*, **102**, (12), 1519-1524.
- Rondón, M.; Velasco, J.; Hernández, J.; Pecheneda, M.; Rojas, J.; Morales, A.; Carmona, J., Díaz, T. (2006). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the essential oil of *Tagetes Patula* L. (Asteraceae) collected from The Venezuela Andes. *Rev. Latinoamer. Quím.* **34**, 1-3.
- Rojas R.; Doroteo V.; Bustamante B.; Bauerd J.; Lock O. (2004), Antimicrobial and free radical scavenging activity of *Gentianella nitida*. *Fitoterapia* **75**, 754 – 757.
- Rosato, A.; Vitali, C.; De Laurentis, N.; Armenise, M.; Milillo, M.A. (2007). Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomedicine* **14**, 727–732.
- Rosato, A.; Vitali, C.; Gallo, D.; Millillo, M. A.; Mallamaci, R. (2008). The inhibition of *Candida* species by selected oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, **15**, 635-638.
- Rosato, A.; Vitali, C.; Piarulli, M.; Mazzotta, M.; Argentieri, M.P.; Mallamaci, R. (2009). *In vitro* synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine* **16**, 972-975.
- Rosella, M.A.; Spegazzini, E.D.; Debenedetti, S.L. (2007). Micrographic and phytochemical parameters to identify two *Gentianella* species. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromaticas.* **6**, 384-385.
- Rosato, A.; Vitali, C.; Gallo, D.; Millillo, M.A.; Mallamaci, R. (2008). The inhibition of *Candida* species by selected oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*, **15**, 635-638.
- Rosella, M. A.; Debenedetti, S. L. y Spegazzini, E. D. (2009). Parámetros micrográficos para la identificación de cuatro especies de *Gentianella* Moench. (Gentianaceae). *Rojasiana* Nro. 8-2.
- Saad, A.; Fadli, M.; Bouaziz, M.; Benharref, A.; Mezrioui, N.E.; Hassani, L. (2010) Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii*

- and their synergism with amphotericin B and fluconazol, *Phytomedicine*, **17**, (13), 1057-1060.
- Sanglard, D. (2003). Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. *Mycologist*, **17**, (2) 74-78.
 - Sanz J.F.; Marco, J.A. (1991). A germacrane derivative from *Pallenis spinosa*. *Phytochemistry* **30**, 2788-2790.
 - Šavikin, K.; Menković, N.; Gordana, Z.; Stević, T.; Radanović, D.; Janković, T. (2009). Antimicrobial activity of *Gentiana lutea* L. extracts. *Z. Naturforsch.* **64c**, 339 – 342.
 - Schäfer H.; Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis *Biotechnol J.* **4**, (12):1684-703.
 - Schmeda-Hirschmann, G.; Tapia, A.; Theoduloz, C.; Rodriguez, J.A.; Lopez, S.; Feresin, G.E. (2004). Free radical scavengers and antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Z. Naturforsch.* **59c**, 345-353.
 - Serena, C.; Fernandez-Torres, B.; Pastor, F.J.; Trilles, L.; Dos Santos Lazera, M.; Nolard, N.; Guarro, J. (2005). In vitro interactions of micafungin with other antifungal drugs against clinical isolates of four species of *Cryptococcus*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 2994-2996.
 - Shai, L.J.; McGaw, L.J.; Aderogba, M.A.; Mdee, L.K.; Eloff, J.N. (2008). Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentate* (Burm.f) C.A. Sm. Leaves. *J.Ethnopharmacology*, **119**, 238–244.
 - Shatar, S.; Altantsetseg, S.; Darijima, S. (2006). Chemotypical character of the eleven *Artemisia* species from Gobi desert-Mongolia. *J. Essent. Oil Bearing Plants*, **9**, (1), 22-27.
 - Silva, F.; Ferreira, S.; Duarte, A.; Mendonça, D.I.; Dominguesa, F.C. (2011). Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* **19**, 42–47.
 - Singh P.; Ambika G.; Chauhan, S. (2012). Activity guided isolation of antioxidant xanthenes from *Swertia chirayita* (Roxb.) H. Karsten (Gentianaceae). *Nat. Prod. Res.* **26**, (18), 1682-1686.
 - Sipsas N.V.; Kontoyiannis, D.P. (2008). Occupation, lifestyle, diet, and invasive fungal infections. *Infection*.**36**, 515-25.
 - Smith, S.E. y Read, D.J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, London, New York, Boston, Sydney, Tokio, Toronto.
 - Soliman, H.S.M.; El-Dib, R.; Shalaby, N.M.M.; Duddeck, H.; Simon, A.; Tóth, G. (2007). Isolation and Structure Determination of Compounds from *Stachys yemenensis* Hedge. *Natural Product Communications* **2**, 977-980.
 - Soule, J.A. (1996). Novel annual and perennial *Tagetes*. In: Progress in New Crops. J Janick (ed). ASHS Press, Arlington, VA. 546–551.
 - Struwe L., Kadereit J.W., Klackenberg J., Nilsson S., Thiv M., Von hagen K.B. and. Albert V.A. (2002), Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new tribal and subtribal classification. En: L. Struwe and V.A: Albert, Eds. Gentianaceae – systematics and natural history. Cambridge University Press, Cambridge. 21–309.
 - Sugar, A.M.; Alsip, S.G.; Galgiani, J.N.; Graybill, J.R.; Dismukes, W.E.; Claud, G.A.; Craven, P.C.; Stevens, D.A. (1987). Pharmacology and toxicity of high-dose ketoconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 1874–1878.
 - Svetaz, L.; Zuljan, F.; Derita, M.; Petenatti, E.; Tamayo, G.; Cáceres, A.; Filho, V.C.; Giménez, A.; Pinzón, R.; Zacchino, S.; Gupt, M. (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries *Journal of Ethnopharmacology*, **127**, (1) 137-158.
 - Tavares, A.C.; Gon M.J.; Alves Cruz, M.T.; Cavaleiro, C.; Lopes, M.C.; Canhoto, J., Ribeiro Salgueiro, L. (2010). Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. *L. Journal of Ethnopharmacology* **130**, 593–598.

Referencias Bibliográficas

- Tereschuk, M.L.; Baigorí, M.D.; Abdala, L.R. (2003). Antibacterial activity of *Tagetes terniflora* *Fitoterapia* **74**, 404-406.
- Tereschuk, M.L.; Baigorí, M.D., De Figueroa, L.I.; Abdala, L.R. (2004). Flavonoids from Argentine *Tagetes* (Asteraceae) with antimicrobial activity. *Methods. Mol. Biol.* **268**, 317-330.
- Urbain, A.; Marston, A.; Sintra Grilo, L.; Bravo, J.; Purev, O.; Purevsuren, B.; Batsuren, D.; Reist, M.; Carrupt, P.; Hostettmann, K. (2008). Xanthones from *Gentianella amarella* ssp. *acuta* with acetylcholinesterase and monoamine oxidase inhibitory activities. *J. Nat. Prod.* **71**, 895 – 897.
- Van Vuuren, S.F.; Viljoen, A.M. (2011). “Plant-based antimicrobial studies methods and approaches to study the interaction between natural products. *Planta Medica*, **77**, (11), 1168–1182.
- Wächter, G.A.; Franzblau, S.G.; Montenegro, G.; Suarez, E.; Fortunato, R.H.; Saavedra, E.; Timmermann, B.N.; 1998. A new antitubercular mulinane diterpenoid from *Azorella madreporica*. *Clos. J. Nat. Prod.* **61**, 965–968.
- Wächter, G.A.; Matoog, G.; Hoffmann, J.J.; Maiese, W.M.; Singh, M.P.; Montenegro, G.; Timmermann, B.N. (1999). Antibacterial diterpenoid acids from *Azorella madreporica*. *J Nat Prod* **62**, 1319–1321.
- Wagner, H.; Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* **16**, 97-110.
- Wenzel, R.P. (2005). John E Bennett Forum on Deep Mycoses Study Desing 2004: Candidiasis and salvage therapy for aspergillosis. *Clin Infect Dis*; **41** (Suppl 6): S369-S370.
- Weitzman, I.; Summerbell, R.C. (1995). The dermatophytes. *Clinical Microbiolog Reviews* **8**, 240–259.
- Xu Li-wei, Chen J., Huan-yang Q.; Yan-ping, S. (2012). Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicines*, **4**, (2), 103-117.
- Zaas, A.K. (2008) Echinocandins: a wealth of choice--how clinically different are they? *Curr Opin Infect Dis.* **21** (4):426-32.
- Zaragoza, R.; Pemánb, J. (2012). Micosis invasoras en el paciente crítico Invasive mycoses in the critically ill patient. *Rev Iberoam Micol.* **29**, (2), 69-70.

Producción científica

A continuación, se listan los trabajos que se publicaron relacionados a este trabajo de tesis, y otros que se realizaron como colaboración en el grupo de trabajo.

Publicaciones

Relacionadas al trabajo de Tesis:

1- Antimicrobial activity of extracts, essential oil metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. Beatriz Lima, María Belén Agüero, Julio Zygadlo, Alejandro Tapia, Carlos Solis, Antonieta Rojas De Arias, Gloria Yaluff, Susana Zacchino, Gabriela Egly Feresin, Guillermo Schmeda-Hirschmann. *Journal of Chilean Chemistry Society*, **2009**, 54 (5): 68-72,

2- Essential Oils of Medicinal Plants from the Central Andes of Argentina: Chemical Composition, and Antifungal, Antibacterial, and Insect-Repellent. Beatriz Lima, Sandra López, Lorena Luna, María B. Agüero, Liliana Aragón, Alejandro Tapia, Susana Zacchino, María L. López, Julio Zygadlo and Gabriela E. Feresin. *Chemistry & Biodiversity*. **2011**, 8, 924-936.

3- Antimicrobial and antioxidant activity of *Gentianella multicaulis* collected in Andean slopes of San Juan province, Argentina. Lima B, Sánchez M, Luna L, Agüero MB, Zacchino S, Filippa E, Palermo JA, Tapia A, Feresin GE. *Z. Naturforsch.* **2012**, 67C, 29-38.

4- Essential Oil of *Azorella cryptantha* Collected in Two Different Locations from San Juan Province, Argentine. Chemical Variability, Anti-Insect and Antimicrobial Activities. Sandra López, Beatriz Lima, Liliana Aragón, Luis Ariza Espinar, Alejandro Tapia, Susana Zacchino, Julio Zygadlo, Gabriela Egly Feresin and María Liza López. *Chemistry and Biodiversity*, **2012**, 9: 1452-1464.

En colaboración:

5- Argentinean Propolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinieae) Exudates: Phytochemical Characterization and Antifungal Activity. María Belén Agüero, Mariela Gonzalez, Beatriz Lima, Laura Svetaz, Marianela Sánchez, Susana Zacchino, Gabriela Egly Feresin, Guillermo Schmeda-Hirschmann, Jorge Palermo, Daniel Wunderlin and Alejandro Tapia. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 194–201.

6- Study of the antibacterial activity of phenylpropanoids derived from cinnamic acid. María I., Mascotti, Fabricio, Bisogno, Beatriz Lima, Marcela, Kurina-Sanz, Gabriela, E. Feresin, Ricardo D., Enriz, Fernando A., Giannini. *Latin American Journal of Pharmacy*. **2010**, 29 (6), 1035-1037.

7- Antifungal Activity of Extracts and Prenylated Coumarins Isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). Rita R. Kurdelas, Beatriz Lima, Alejandro Tapia, Gabriela Egly Feresin, Manuel Gonzalez Sierra, María Victoria Rodríguez, Susana Zacchino, Ricardo D. Enriz, Monica L. Freile. *Molecules*. **2010**, 15, 4898-4907.

8- Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. María Belén Agüero, Laura Svetaz, Marianela Sánchez, Lorena Luna, Beatriz Lima, María Liza López, Susana Zacchino, Jorge Palermo, Daniel Wunderlin, Gabriela Egly Feresin, Alejandro Tapia. *Food and Chemical Toxicology* **2011**, 49, 1970–1978.

9- Chemical Composition, Anti-Insect and Antimicrobial Activity of the *Baccharis darwinii* Essential Oil from Argentine Patagonia. Rita R. Kurdelas, Sandra Lopez, Beatriz Lima, Gabriela Egly Feresin, Julio Zygadlo, María Liza López, Susana Zacchino, Alejandro Tapia, Monica L. Freile. *Industrial Crops and Products* **2012**, 40, 261-267.

ABSTRACTS EN REVISTAS CIENTÍFICAS DE PUBLICACIÓN PERIÓDICA CON REFERATO (ACTAS PROCEEDING)

Relacionados al tema de tesis:

- I. Antifungal and antioxidant activities of extracts and compounds from *Gentianella multicaulis* collected in San Juan. Lima B, Sánchez M, Luna L, Agüero MB, Zacchino S, Filippa E, Palermo JA, Tapia A, Feresin GE. Abstract Biocell. 2011, 35 (1), Nº 139. Mendoza, Argentina. ISSN: 0327-9545.

En colaboración:

- II. Antifungal propolis asociated to San Juan medicinal flora, Argentina. Agüero Maria Belén, Lima Beatriz, Cabello R, Zacchino Susana, Wunderlin D, Schmeda-Hirschmann G, Feresin GE, Tapia Alejandro. XXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Diciembre de 2009. San Luis, Argentina. Abstract Biocell 34, (1) 2010. A 30, Nº 5. ISSN: 0327-9545.
- III. Argentinean propolis associated to *Larrea nitida* Cav.exudate. Agüero MB, Svetaz L, Sánchez M, Lima B, Zacchino S, Palermo J, Wunderlin DA, Feresin GE, Tapia A. Abstract Biocell. 2011, 35 (1), Nº 91. Mendoza, Argentina. ISSN: 0327-9545.
- IV. Antimicrobial and antioxidant activities of honey from Tudcum, San Juan province, Argentina. Aberastain E, Lima B, Luna L, Feresin GE, Tapia A. Biocell 35(3), 2011. pp A269, 260.FT55.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS Y EVENTOS CIENTÍFICOS

A continuación, se listan los trabajos que se presentaron en congresos nacionales e internacionales relacionados a este trabajo de tesis, y otros que se realizaron como colaboración en el grupo de trabajo.

Relacionados al tema de tesis:

XVII SIMPOSIO NACIONAL DE QUÍMICA ORGÁNICA (SAIQO) Guaymallen, Mendoza. 2009. ISBN 978-987-24002-1-7.

- 1- Aceites esenciales de especies de la provincia de San Juan, con actividad antifúngica contra dermatofitos. Beatriz Lima, María Belén Agüero, Alejandro Tapia, Susana Zacchino, Julio Zygodlo, Gabriela Egly Feresin. PN-64. SAIQO 2009.

XXVIII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Octubre de 2010. San Luis, Argentina.

- 2- Antifungal and antioxidant activities of extracts and compounds from *Gentianella multicaulis* collected in San Juan. Lima B, Sánchez M, Luna L, Agüero MB, Zacchino S, Filippa E, Palermo JA, Tapia A, Feresin GE. N° 24. SBC 2010.

X Simposio Argentino y XIII Latinoamericano de Farmacobotánica. Noviembre de 2010. Córdoba, Argentina.

- 3- Actividad antifúngica y antioxidante de *Gentianella multicaulis* (Gentianaceae) de San Juan, Argentina. Lima Beatriz, Marianela Sánchez, Lorena Luna, María Belén Agüero, Susana Zacchino, Eva Filippa, Jorge A. Palermo, Alejandro Tapia and Gabriela Egly Feresin.

III Congreso de Química de Productos Naturales Chileno-Argentino-Hispano: Diversidad Química y Biológica. Abril de 2012. Punta Arenas, Chile, pp 71.

- 4- Sesquiterpenos aislados de *Azorella cryptantha*. Beatriz Lima, Marianela Sánchez, María Belén Agüero, Jorge Palermo, Alejandro Tapia, Gabriela E. Feresin.

XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Diciembre 2012. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

- 5- Synergistic Effects between Essential Oils of Argentinean Andean Species And Conventional Antifungal Agents. Lima B, Agüero MB, Rodriguez, MV, Zacchino, S, Tapia A, Feresin GE.

XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Diciembre 2012. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

- 6- Antibacterial Activity of sesquiterpenes from *Azorella cryptantha* from San Juan, Argentina. Lima B, Sánchez M, Agüero MB, Tapia A, Palermo JA, Feresin GE.

En colaboración:

XVII SIMPOSIO NACIONAL DE QUÍMICA ORGÁNICA (SAIQO) Guaymallen, Mendoza. 2009. ISBN 978-987-24002-1-7.

- 7- Propóleos asociados a *Zuccagnia punctata* Cav. Química, Actividad Antifúngica Y Origen Botánico. María Belén Agüero, Mariela Gonzalez, Beatriz Lima, Laura Svetaz, Marianela Sánchez, Susana Zacchino, Gabriela E. Feresin, Guillermo Schmeda-Hirschmann, Jorge A. Palermo, Daniel A. Wunderlin, Alejandro Tapia. PN-1.
- 8- Actividad antibacteriana de un grupo de péptidos sintéticos. Mascoti, M., Lima B., Feresín, G. E., Csaba, S., Botond, P., Enriz, R. D., Giannini, F. PN-69.

XXVII Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Octubre de 2009. San Luis, Argentina.

- 9- Antifungal propolis asociated to San Juan medicinal flora, Argentina. Agüero Maria Belén, Lima Beatriz, Cabello R, Zacchino Susana, Wunderlin D, Schmeda-Hirschmann G, Feresín GE, Tapia Alejandro. Nº 141. Pág. 93
- 10-Argentinean propolis associated to *Larrea nitida* Cav.exudate. Agüero MB, Svetaz L, Sánchez M, Lima B, Zacchino S, Palermo J, Wunderlin DA, Feresin GE, Tapia A. Nº1.

XVIII SIMPOSIO NACIONAL DE QUÍMICA ORGÁNICA, Carlos Paz. Córdoba. 2011. ISBN 978-987-24002-1-7.

- 11-Composición química y actividades antimicrobiana e insecticida del aceite esencial de *Baccharis darwinii* Hook & Arn. Rita R. Kurdelas, López, S.; López, M.L.; Lima B.; Feresin G.E.; Zygadlo J.; Zacchino S.; Tapia A. and Freile M. PN 23.
- 12-Actividad antimicrobiana de extractos de *Xanthium spinosum* L. (Asteraceae) y xanthatina. Alvarez. María E., Lima Beatriz, Cianchino Valeria A., Feresin Gabriela E. Favier Laura S. y Tonn Carlos E. PN 4.

XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Agosto 2011. San Juan, Argentina.

- 13-Actividades antibacteriana y antioxidante de mieles de la provincia de San Juan, Argentina. Aberastain, E; Lima, B; Luna, L; Feresin, GE; Tapia A.

XXIX Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo. Diciembre 2012. Potrero de los Funes, San Luis, Argentina.

- 14- *Tagetes filifolia* lag essential oil. Chemical Composition and Antibacterial Activity. Lima B., López SB, Zygadlo JA, Caballero D., Petenatti E, Del vitto LA , Tapia A, Suero E.
- 15- *Azorella trifurcata* essential oil. Chemical composition, anti-insect and antibacterial activities. López SB, Aragón LM, Lima B, Zygadlo JA, Caballero D Stariolo R, Tapia A, Suero E.
- 16- Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de poblaciones silvestres de *Artemisia mendozana* (ASTERACEAE). Lima B, López SB, Haddad M, Zygadlo JA, Feresin G, Caballero D, Tapia A, Suero E.

Anexos

Anexo I

Aceites esenciales en combinación con antifúngicos comerciales frente a hongos levaduriformes

El diseño experimental para estudiar el efecto resultante de la combinación de los aceites con los antifúngicos comerciales se construyó a partir de los resultados de actividad (valores de CIM) obtenidos previamente con los AEs de las especies seleccionadas. Por un lado, se utilizaron los valores de las concentraciones reducidas a la mitad y a la cuarta parte del valor de la CIM (CIM/2, CIM/4, respectivamente), y por el otro al doble y al cuádruple del valor de la CIM (CIMx2, CIMx4) de los aceites esenciales. Del mismo modo, se trabajó con el valor de la CIM del antifúngico comercial y se utilizaron para el “tablero de ajedrez”, por un lado, concentraciones la mitad, la cuarta y la octava parte del valor de la CIM (CIM/2, CIM/4 y CIM/8), y por otro lado, el doble, cuádruple y hasta ocho veces el valor de la CIM (CIMx2, CIMx4 y CIMx8), para obtener el esquema en “tablero de ajedrez” como se muestra en la **Figura 3** (Capítulo II).

- **Combinación del AE de *A. mendozaana* con fluconazol frente *Cryptococcus neoformans*:**

A continuación se presenta el “tablero” (**Tabla**) con los valores de CIM del AE de *A. mendozaana* solo y combinado con fluconazol, frente a *C. neoformans* (cepa sensible a este aceite esencial CIM = 250 µg/ml).

Valores de absorbancia del AE de *A. mendozaana* a diferentes concentraciones, solo y en combinación con fluconazol, frente a *C. neoformans*

| Concentración de Fluconazol (µg/ml) | Concentración del aceite esencial de <i>A. mendozaana</i> (µg/ml) | | | | | Lectura de CIM _{FLU} |
|-------------------------------------|---|--------|------------------------|--------|--------|-------------------------------|
| | 1000 | 500 | CIM ₈₀ =250 | 125 | 62,5 | |
| 128 | 121,52 | 109,76 | 110,90 | 107,07 | 118,33 | 116,48 |
| 64 | 120,78 | 137,79 | 125,43 | 117,85 | 117,55 | 119,07 |
| 32 | 120,96 | 139,76 | 122,93 | 113,76 | 120,39 | 116,42 |
| CIM ₈₀ =16 | 127,16 | 130,84 | 114,39 | 109,43 | 111,22 | 103,58 |
| 8 | 126,30 | 131,94 | 96,45 | 97,94 | 88,87 | 88,84 |
| 4 | 126,75 | 109,28 | 53,55 | 80,54 | 46,00 | 59,04 |
| 2 | 142,36 | 58,12 | -21,55 | 55,34 | -51,64 | 49,94 |
| Lectura de CIM _{AE} | 127,79 | 72,72 | 17,73 | 20,33 | 5,37 | 0,06 |

▪ **Combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con fluconazol frente *Candida albicans*:**

En la siguiente tabla se presenta el tablero con los valores absorbancia y la CIM de la combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU (Bauchaceta) con el antifúngico fluconazol, frente a *C. albicans*.

Valores de absorbancia del AE de *A. cryptantha*-BAU a diferentes concentraciones, solo y en combinación con fluconazol, frente a *C. albicans*

| Concentración del aceite esencial de <i>A. cryptantha</i> - BAU (µg/ml) | | | | | | |
|---|--------|--------|------------------------|--------|--------|--------------------|
| Concentración de Fluconazol (µg/ml) | 2000 | 1000 | CIM ₈₀ =500 | 250 | 125 | CIM _{FLU} |
| 15,6 | 133,12 | 118,07 | 108,21 | 103,39 | 102,13 | 100,64 |
| 7,8 | 128,78 | 119,22 | 109,91 | 103,06 | 101,07 | 100,37 |
| 3,9 | 129,86 | 120,21 | 111,02 | 103,01 | 100,99 | 100,94 |
| CIM ₈₀ =1,95 | 121,10 | 116,41 | 105,52 | 37,94 | 23,466 | 13,24 |
| 0,975 | 120,09 | 124,11 | 107,26 | 49,01 | 15,23 | 9,94 |
| 0,24 | 127,26 | 120,88 | 106,23 | 25,92 | 11,50 | 7,16 |
| 0,12 | 126,17 | 125,30 | 112,10 | 27,49 | 7,04 | 4,89 |
| CIM AE | 154,77 | 134,86 | 117,12 | 76,88 | 43,59 | 0 |

En el siguiente tablero, se muestran los resultados obtenidos con *A. cryptantha*-AN.

Valores de absorbancia del AE de *A. cryptantha*-AN a diferentes concentraciones, solo y en combinación con fluconazol, frente a *C. albicans*

| Concentración del aceite esencial de <i>A. cryptantha</i> - AN (µg/ml) | | | | | | |
|--|--------|--------|------------------------|--------|--------|---------|
| Concentración de Fluconazol (µg/ml) | 2000 | 1000 | CIM ₈₀ =500 | 250 | 125 | CIM Flu |
| 15,6 | 147,46 | 153,95 | 145,56 | 165,09 | 166,48 | 162,11 |
| 7,8 | 153,78 | 155,97 | 176,59 | 174,65 | 163,69 | 165,28 |
| 3,9 | 146,68 | 153,84 | 147,38 | 148,29 | 163,67 | 167,06 |
| CIM ₈₀ =1,95 | 138,09 | 146,07 | 140,83 | 104,60 | 83,46 | 97,76 |
| 0,975 | 138,82 | 142,10 | 143,50 | 106,61 | 80,24 | 49,717 |
| 0,24 | 131,96 | 136,87 | 146,46 | 99,32 | 58,36 | 52,72 |
| 0,12 | 172,89 | 135,55 | 153,89 | 79,03 | 65,69 | 47,71 |
| CIM AE | 127,73 | 78,02 | 63,64 | 28,61 | 31,35 | 0 |

▪ **Combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con fluconazol frente *Cryptococcus neoformans*:**

Del mismo modo que para *Candida albicans* se evaluó el efecto de la combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con fluconazol respectivamente frente a *C. neoformans*. A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU con fluconazol.

Valores de absorbancia a diferentes concentraciones del AE de *A. cryptantha*-BAU, solo y en combinación con fluconazol, frente a *C. neoformans*.

| Concentración del aceite esencial de <i>A. cryptantha</i> - BAU (µg/ml) | | | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Concentración de Fluconazol (µg/ml) | 2000 | 1000 | 500 | 250 | 125 | CIM Flu |
| 400 | 92,23 | 149,64 | 152,38 | 167,59 | 174,77 | 106,95 |
| 200 | 35,97 | 87,60 | 120,52 | 156,58 | 173,25 | 97,08 |
| 100 | 61,54 | 78,82 | 124,37 | 133,56 | 173,25 | 134,07 |
| CIM ₈₀ =50 | 8,52 | 48,05 | 99,34 | 153,58 | 177,95 | 94,79 |
| 25 | 18,27 | 60,17 | 96,21 | 104,75 | 130,88 | 88,48 |
| 12,5 | 12,84 | 25,52 | 87,04 | 114,18 | 120,04 | 76,44 |
| 6,25 | 51,23 | 39,88 | 89,90 | 94,06 | 105,20 | 77,75 |
| CIM AE | 103,62 | 100,87 | 96,40 | 84,50 | 67,83 | 48,87 |

Adicionalmente el AE de *A. cryptantha* AN fue combinado con fluconazol, frente a *C. neoformans*. Los resultados del tablero se presentan a continuación.

Valores de absorbancia del AE de *A. cryptantha*-AN a diferentes concentraciones, solo y en combinación con fluconazol, frente a *C. neoformans*.

| Concentración del aceite esencial de <i>A. cryptantha</i> -AN (µg/ml) | | | | | | |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
| Concentración de Fluconazol (µg/ml) | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | CIM Flu |
| 400 | 177,80 | 161,83 | 122,11 | 106,97 | 106,93 | 106,44 |
| 200 | 165,58 | 159,16 | 124,80 | 106,82 | 103,70 | 105,27 |
| 100 | 204,79 | 157,46 | 121,74 | 107,75 | 103,93 | 105,20 |
| CIM ₈₀ =50 | 195,72 | 151,48 | 124,86 | 104,67 | 107,32 | 104,95 |
| 25 | 203,84 | 157,87 | 123,06 | 100,95 | 78,84 | -111,37 |
| 12,5 | 195,63 | 159,64 | 125,54 | 92,73 | 56,24 | 47,88 |
| 6,25 | 232,78 | 151,56 | 114,34 | 55,81 | 25,44 | 29,45 |
| CIM AE | 202,57 | 158,33 | 133,14 | 98,96 | 35,55 | 18,17 |

Aceites esenciales en combinación con antifúngicos comerciales frente a hongos dermatofitos

- **Combinación del AE de *A. mendozana* con terbinafina frente a *Microsporum gypseum***

Para determinar la actividad de los aceites esenciales (solos o en combinación), frente a los dermatofitos, se trabajó con los valores de CIM₁₀₀ (de aceites esenciales y del antifúngico comercial) estableciendo el signo (+) si hubo desarrollo visual del hongo y signo (-) si no hubo desarrollo durante el tiempo de incubación transcurrido.

La combinación del AE de *A. mendozana* con el antifúngico comercial terbinafina, fue ensayado frente a *M. gypseum* siguiendo el protocolo previamente descrito en Cap II .
Materiales y Métodos- En la siguiente tabla, se presentan los resultados que se obtuvieron:

Desarrollo visual positivo y negativo de *M. gypseum* frente al AE de *A. mendozana* a diferentes concentraciones, solo y en combinación con terbinafina

| Concentración del aceite esencial de <i>A. mendozana</i> (µg/ml) | | | | | | |
|--|------|-----|-----|-----|------|---------|
| Concentración de Terbinafina (µg/ml) | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | CIM Ter |
| 0,128 | - | - | - | - | - | - |
| 0,064 | - | - | - | - | - | - |
| 0,032 | - | - | - | - | - | - |
| CIM=0,016 | - | - | - | + | + | + |
| 0,008 | - | - | + | + | + | + |
| 0,004 | - | - | + | + | + | + |
| 0,002 | - | - | + | + | + | + |
| CIM AE | - | - | + | + | + | + |

▪ **Combinación del AE de *A. mendozana* con terbinafina frente a *Trychophyton rubrum***

A continuación se presenta el tablero con los resultados de la combinación del AE de esta especie.

Desarrollo visual positivo y negativo de *T. rubrum* frente al AE de *A. mendozana* a diferentes concentraciones, solo y en combinación con terbinafina

| Concentración del aceite esencial de <i>A. mendozana</i> (µg/ml) | | | | | | |
|--|------|-----|-----|-----|------|---------|
| Concentración de Terbinafina (µg/ml) | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | CIM Ter |
| 0,128 | - | - | - | - | - | - |
| 0,064 | - | - | - | - | - | - |
| 0,032 | - | - | - | - | - | - |
| CIM=0,016 | - | - | - | - | + | + |
| 0,008 | - | - | - | + | + | + |
| 0,004 | - | - | - | + | + | + |
| 0,002 | - | - | - | + | + | + |
| CIM AE | - | - | - | + | + | + |

▪ **Combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con fluconazol frente *M. gypseum*:**

La combinación de los AEs de *A. cryptantha*-BAU con terbinafina, se presentan a continuación.

Desarrollo positivo y negativo de *M. gypseum* frente al AE de *A. cryptantha*-BAU a diferentes concentraciones, solo y en combinación con con terbinafina

| Concentración del aceite esencial de <i>A. cryptantha</i> -BAU (µg/ml) | | | | | | |
|--|------|------|-----|-----|-----|---------|
| Concentración de Terbinafina (µg/ml) | 2000 | 1000 | 500 | 250 | 125 | CIM Ter |
| 0,064 | - | - | - | - | - | - |
| 0,032 | - | - | - | - | + | + |
| 0,016 | - | - | - | - | + | + |
| CIM=0,008 | - | - | - | - | + | + |
| 0,004 | - | - | - | - | + | + |
| 0,002 | - | - | - | - | + | + |
| CIM AE | - | - | - | - | + | + |

Desarrollo positivo y negativo de *M. gypseum* frente al AE de *A. cryptantha*-AN a diferentes concentraciones, solo y en combinación con con terbinafina

| Concentración del aceite de <i>A. cryptantha</i> -AN (µg/ml) | | | | | | |
|--|------|-----|-----|-----|------|---------|
| Concentración de Terbinafina (µg/ml) | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | CIM Ter |
| 0,128 | - | - | - | - | - | - |
| 0,064 | - | - | - | - | - | - |
| 0,032 | - | - | - | - | - | - |
| CIM=0,016 | - | + | + | + | + | + |
| 0,008 | - | + | + | + | + | + |
| 0,004 | - | + | + | + | + | + |
| 0,002 | - | + | + | + | + | + |
| CIM AE | - | + | + | + | + | + |

▪ **Combinación del AE de *A. cryptantha*-BAU y *A. cryptantha*-AN con fluconazol frente *T. rubrum***

La combinación de los AEs de *A. cryptantha*-BAU con terbinafina, se presentan a continuación.

Desarrollo positivo y negativo de *T. rubrum* frente al AE de *A. cryptantha*-BAU a diferentes concentraciones, solo y en combinación con con terbinafina

| Concentración del aceite esencial de <i>A. cryptantha</i> -BAU (µg/ml) | | | | | | |
|--|------|-----|-----|-----|------|---------|
| Concentración de Terbinafina (µg/ml) | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | CIM Ter |
| 0,016 | - | - | + | + | + | - |
| 0,008 | - | - | + | + | + | - |
| CIM= 0,004 | - | - | + | + | + | + |
| 0,002 | - | - | + | + | + | + |
| 0,001 | - | - | + | + | + | + |
| 5*10 ⁻⁴ | - | - | + | + | + | + |
| CIM AE | - | - | + | + | + | + |

La combinación de los AEs de *A. cryptantha*-AN con terbinafina, se presentan a continuación.

Desarrollo positivo y negativo de *T. rubrum* frente al AE de *A. cryptantha*-AN a diferentes concentraciones, solo y en combinación con con terbinafina

| Concentraciones del aceite de <i>A. cryptantha</i> -AN (µg/ml) | | | | | | |
|--|------|------|-----|-----|-----|---------|
| Concentraciones de Terbinafina (µg/ml) | 2000 | 1000 | 500 | 250 | 125 | CIM Ter |
| 0,064 | - | - | - | - | - | - |
| 0,032 | - | - | - | - | - | - |
| 0,016 | - | - | - | - | + | + |
| CIM=0,008 | - | - | - | - | + | + |
| 0,004 | - | - | - | - | + | + |
| 0,002 | - | - | - | - | + | + |
| CIM AE | - | - | - | - | + | + |

▪ **Combinación del AE de *T. mendocina* con fluconazol frente *M. gypseum***

La combinación de los AEs de *A. cryptantha*-BAU con terbinafina, se presentan a continuación.

Desarrollo positivo y negativo de *M. gypseum* frente al AE de *T. mendocina* a diferentes concentraciones, solo y en combinación con con terbinafina

| Concentraciones del aceite de <i>T. mendocina</i> (µg/ml) | | | | | | |
|---|------|-----|-----|-----|------|---------|
| Concentraciones de Terbinafina (µg/ml) | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | CIM Ter |
| 0,128 | - | - | - | - | - | - |
| 0,064 | - | - | - | - | - | - |
| 0,032 | - | - | - | - | - | - |
| CIM=0,016 | - | + | + | + | + | + |
| 0,008 | - | + | + | + | + | + |
| 0,004 | - | + | + | + | + | + |
| 0,002 | - | + | + | + | + | + |
| CIM AE | - | + | + | + | + | + |

▪ **Combinación del AE de *T. mendocina* con fluconazol frente *T. rubrum***

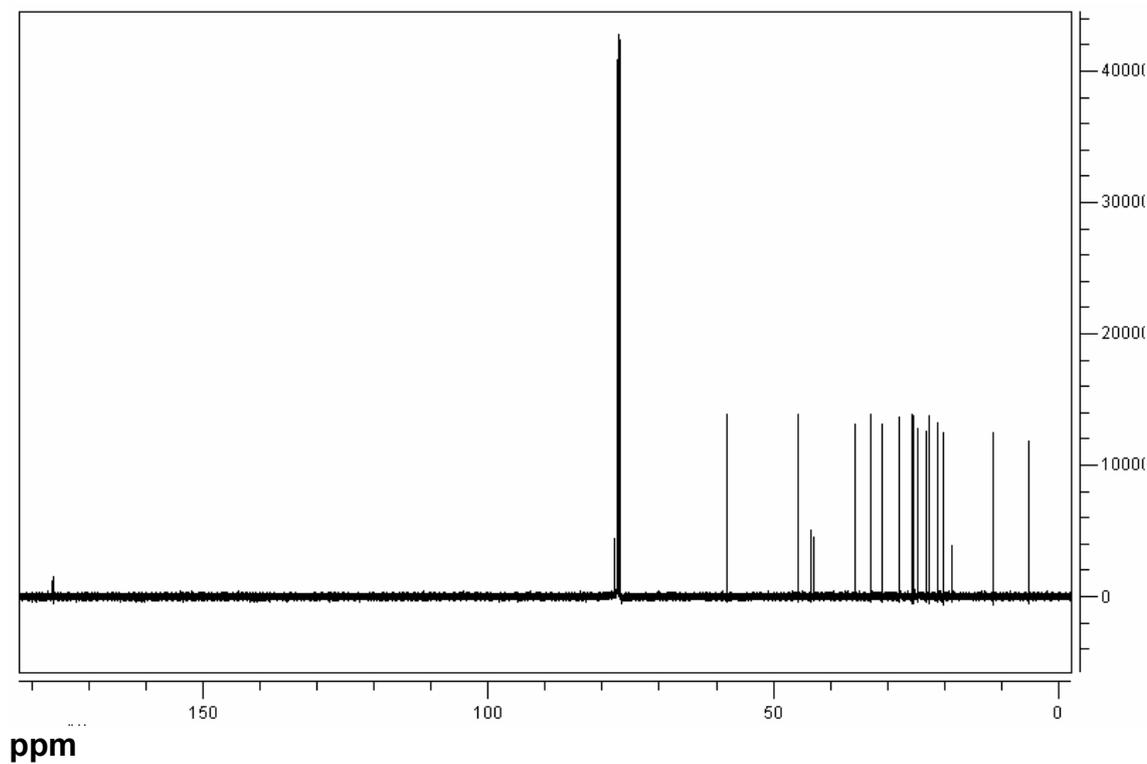
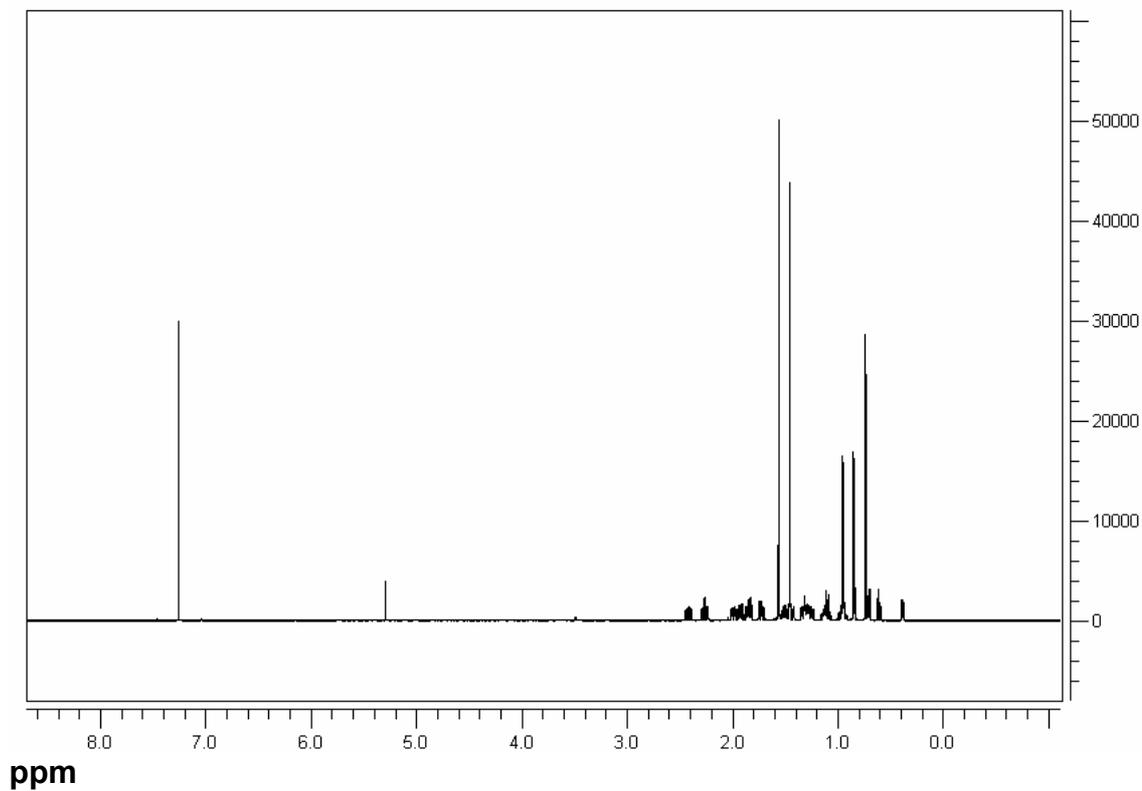
En la siguiente tabla se presenta el desarrollo de *T. rubrum* frente al AE de *T. mendocina* en combinación con terbinafina.

Desarrollo positivo y negativo de *T. rubrum* frente al AE de *T. mendocina* a diferentes concentraciones, solo y en combinación con con terbinafina

| Concentraciones del aceite de <i>T. mendocina</i> (µg/ml) | | | | | | |
|---|------|-----|-----|-----|------|---------|
| Concentraciones de Terbinafina (µg/ml) | 1000 | 500 | 250 | 125 | 62,5 | CIM Ter |
| 0.128 | - | - | - | - | - | - |
| 0.064 | - | - | - | - | - | - |
| 0.032 | - | - | - | - | - | - |
| 0.016 | - | - | + | + | + | + |
| 0.008 | - | - | + | + | + | + |
| 0.004 | - | - | + | + | + | + |
| 0.002 | - | - | + | + | + | + |
| CIM AE | - | - | + | + | + | + |

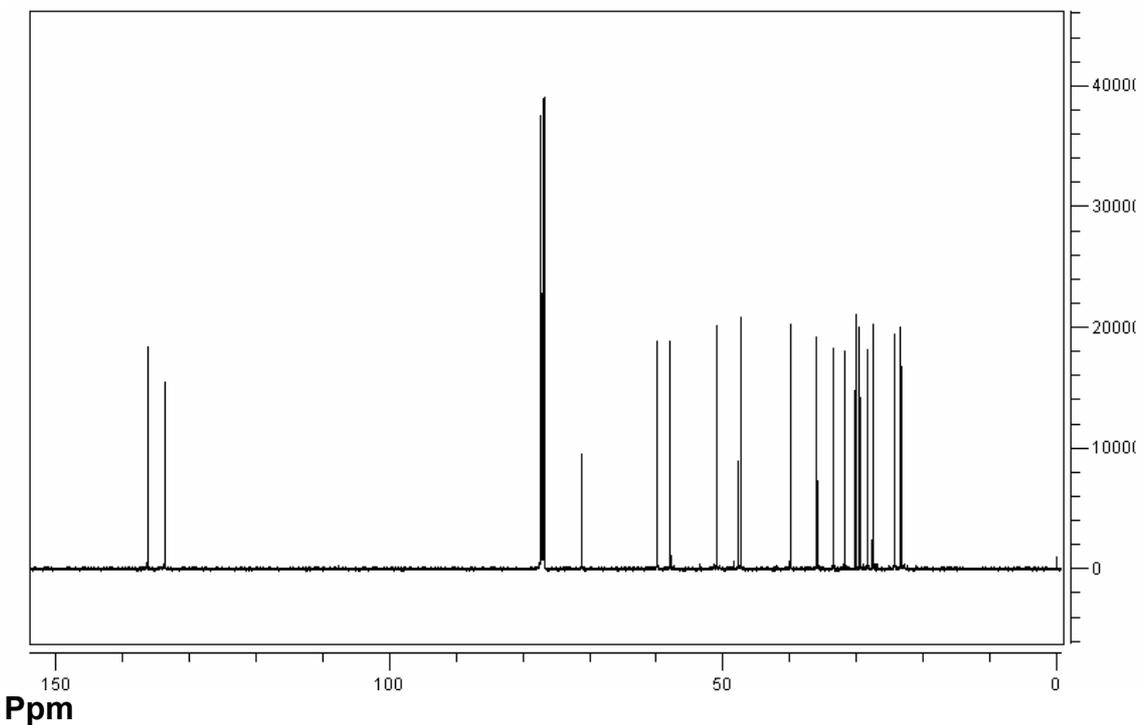
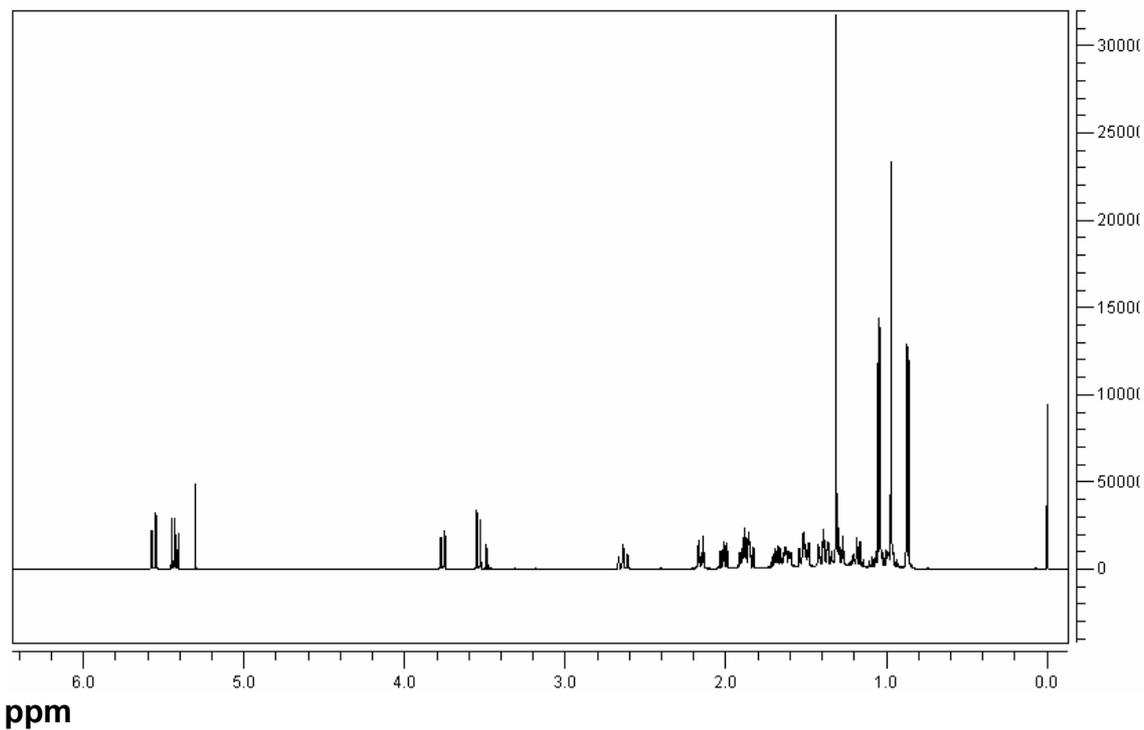
Anexo II

Compuesto 1: Azorellolido de *Azorella cryptantha*



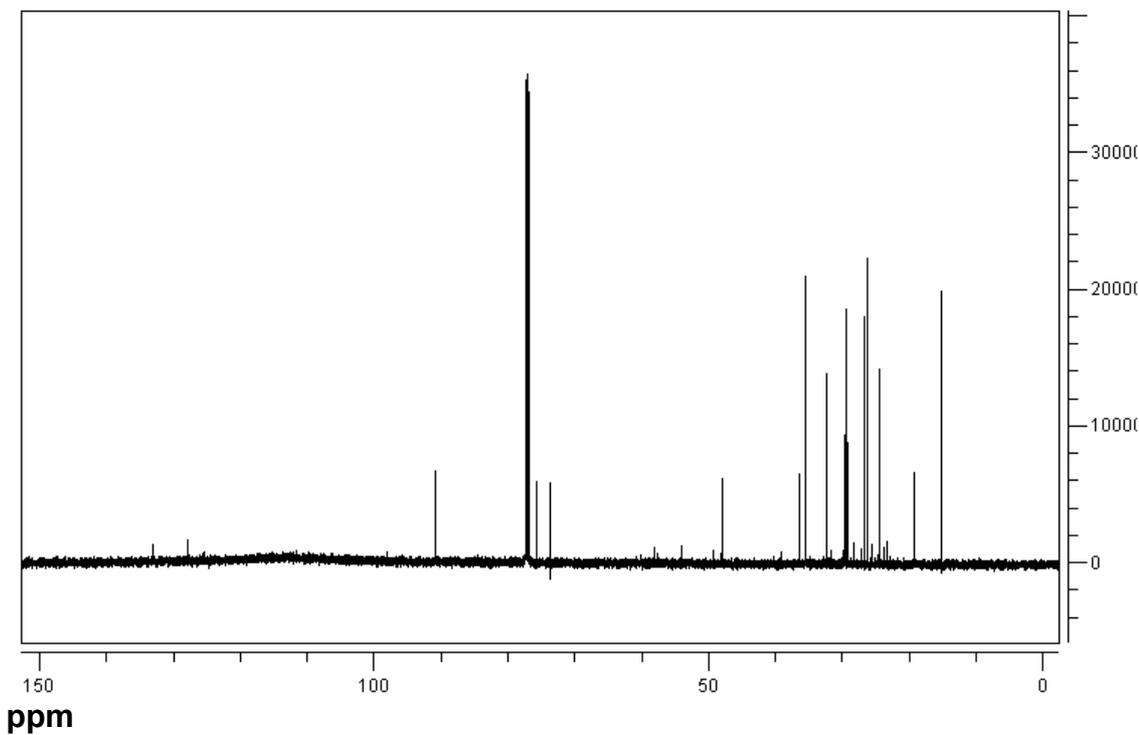
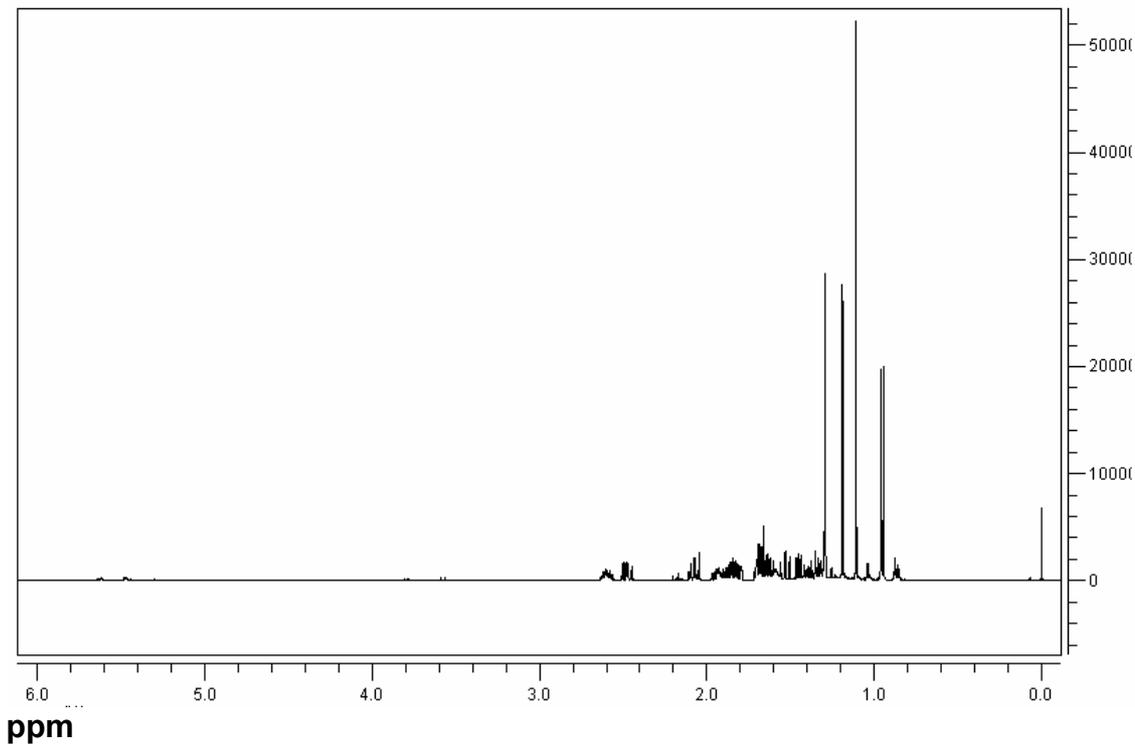
Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

Anexo II: *Azorella cryptantha*
Compuesto 2: Mulinol de *Azorella cryptantha*



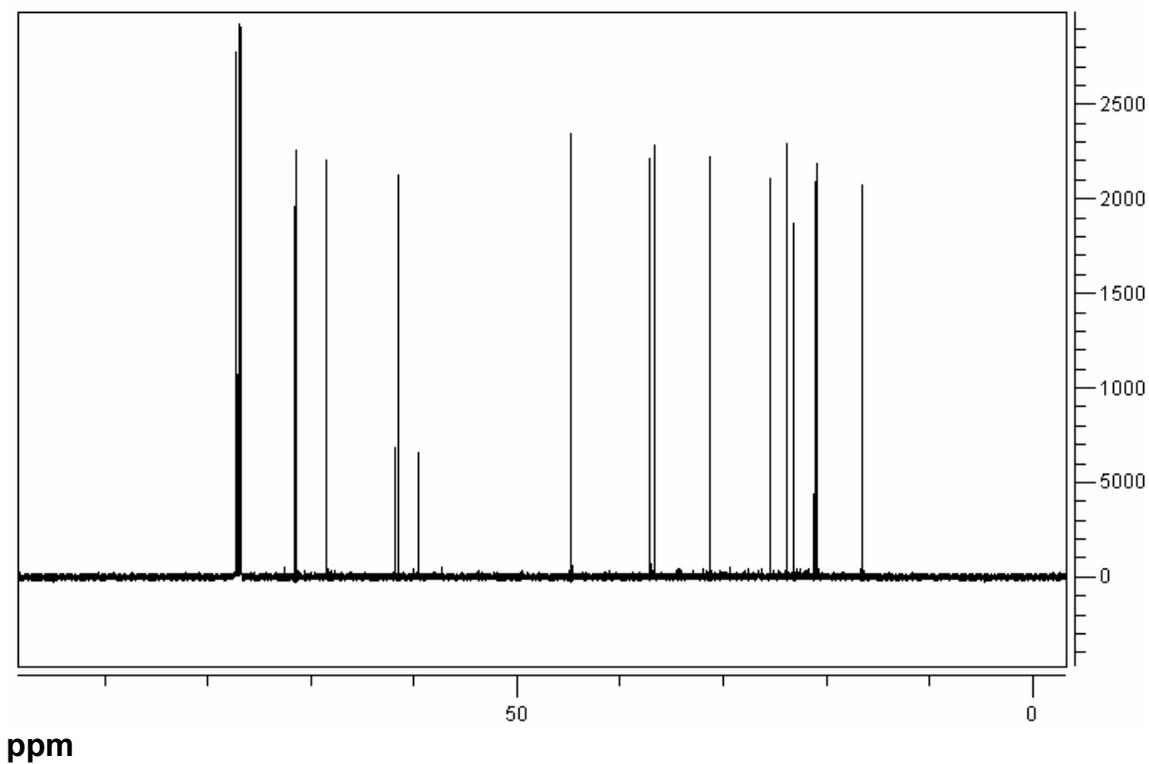
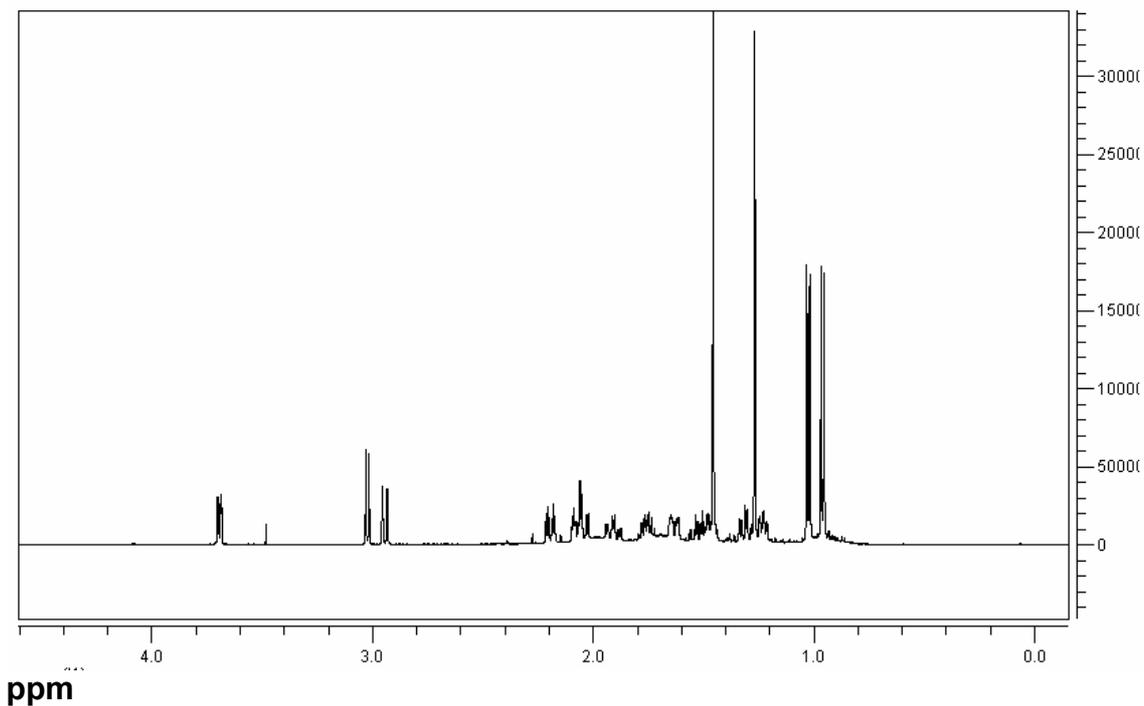
Espectros de ^1H y ^{13}C -RMN

Compuesto 3: Stachytriol de *Azorella cryptantha*



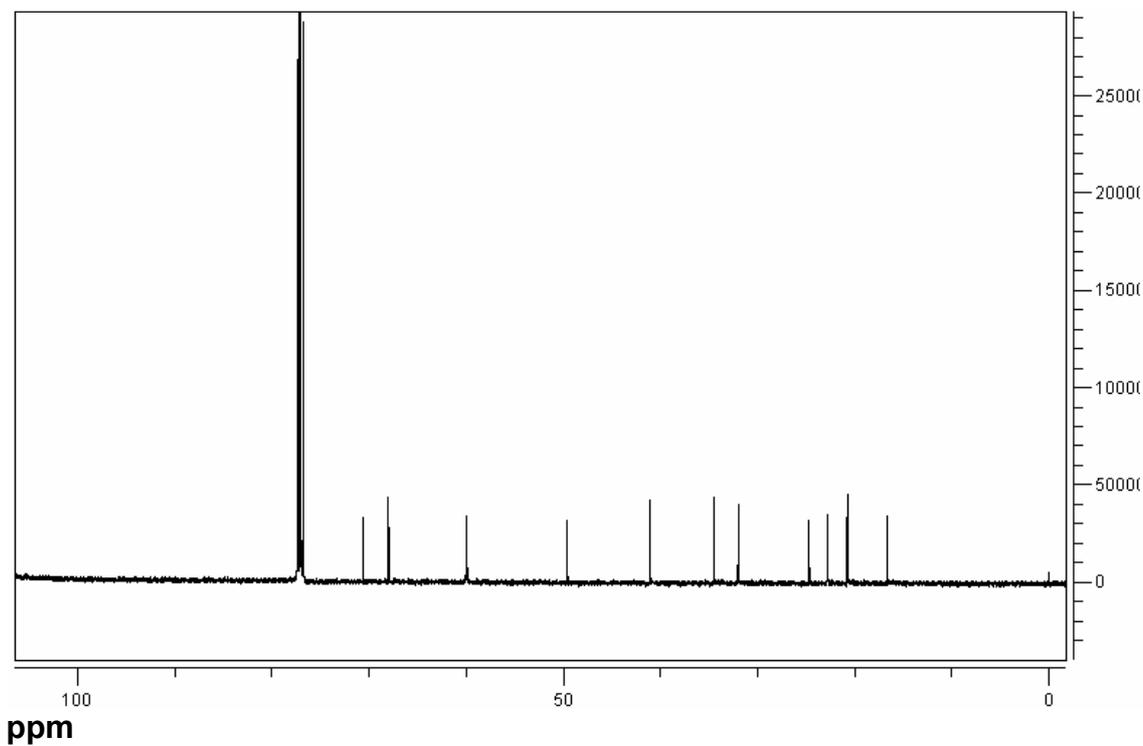
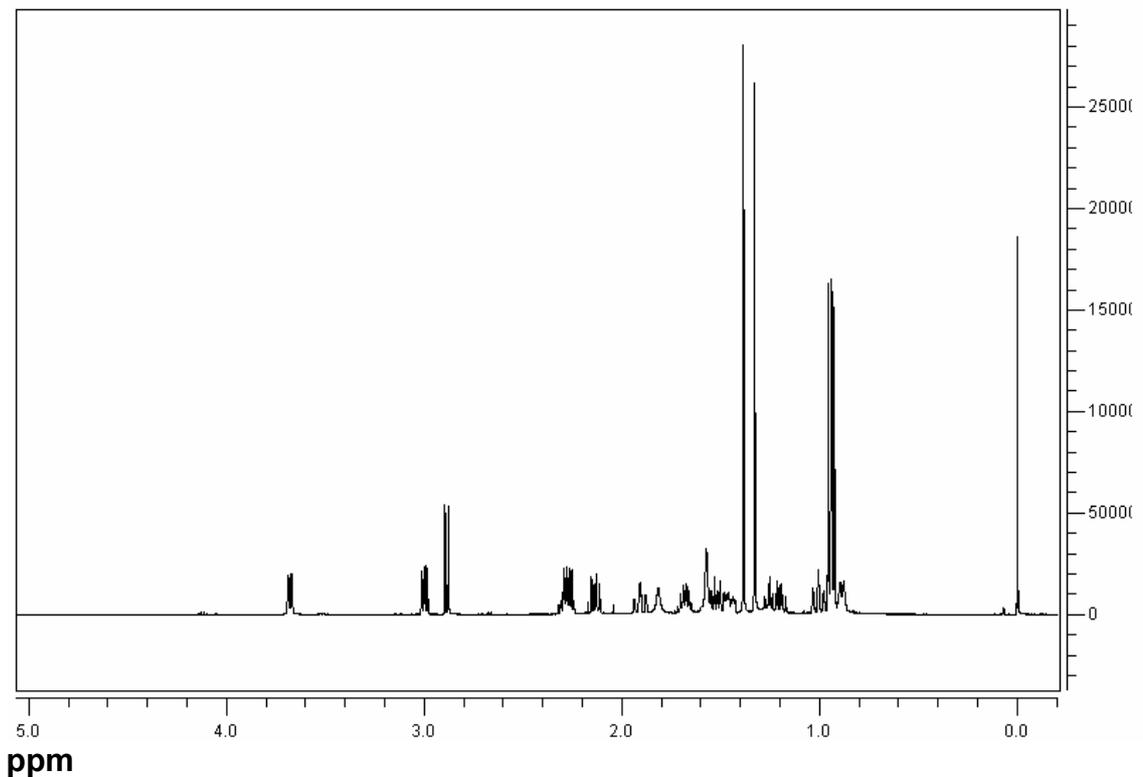
Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

Compuesto 4: 1 α ,10 β ,4 β ,5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol de *Azorella cryptantha*



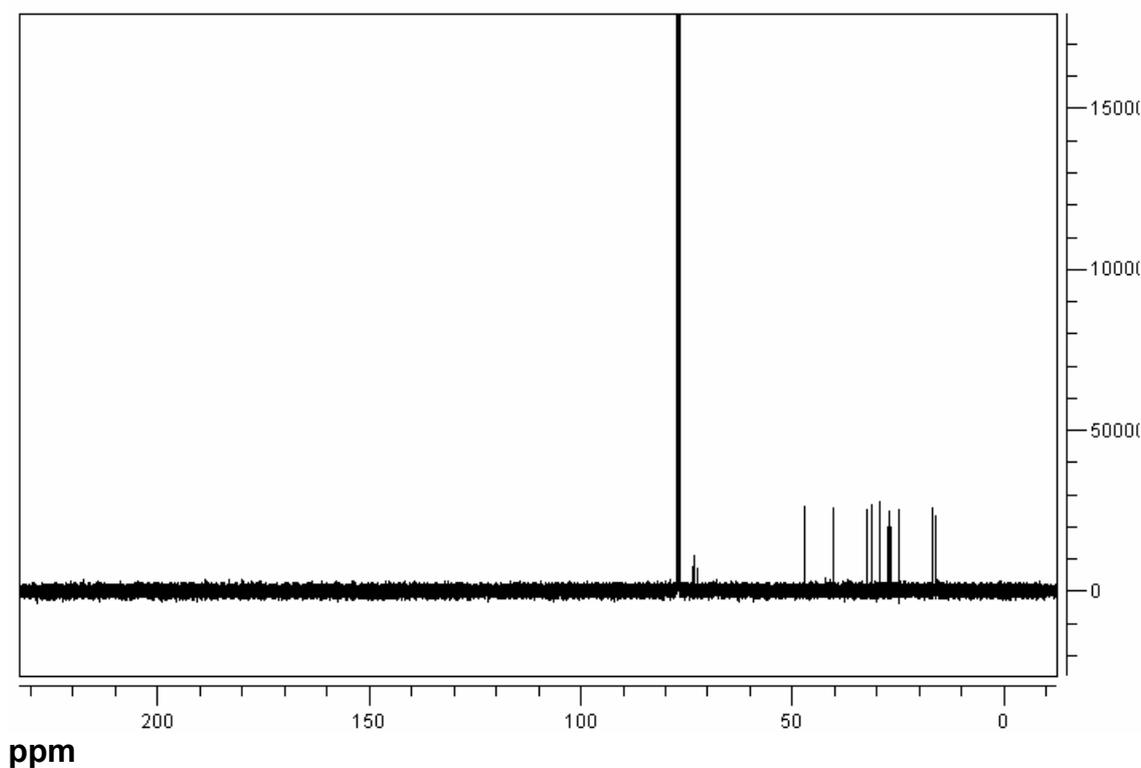
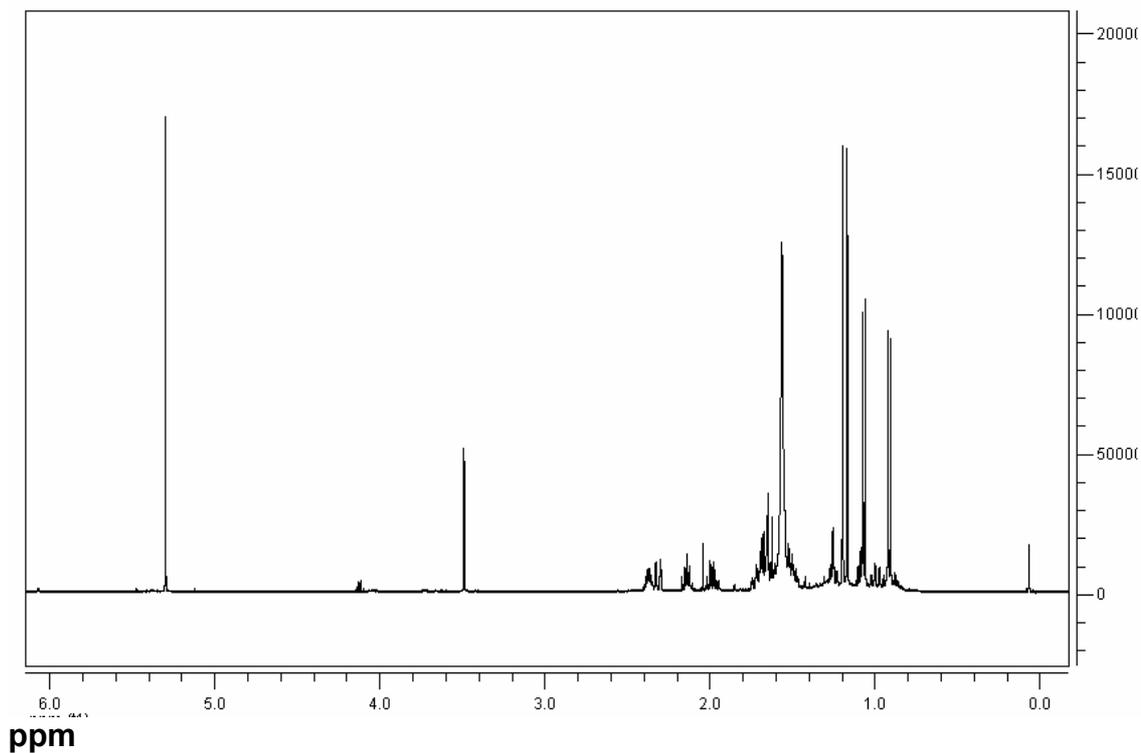
Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

Compuesto 5: 1 β ,10 α ,4 β ,5 α -diepoxi-7 β -germacran-6 β -ol de *Azorella cryptantha*



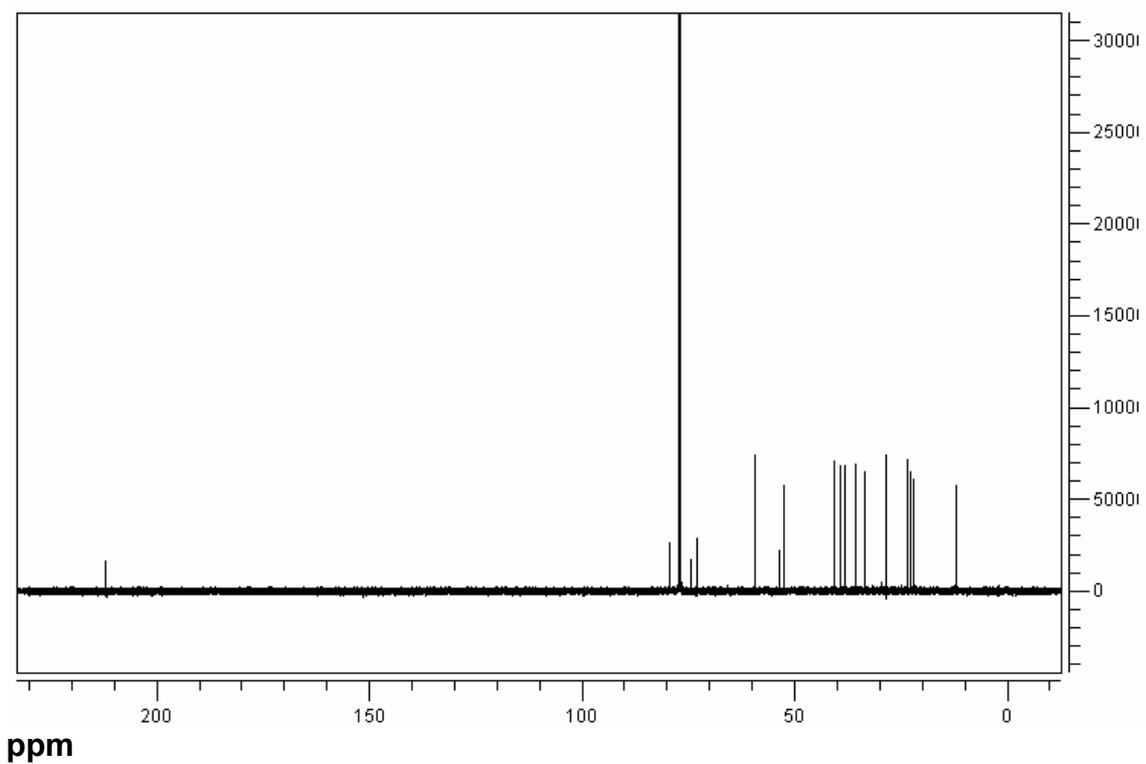
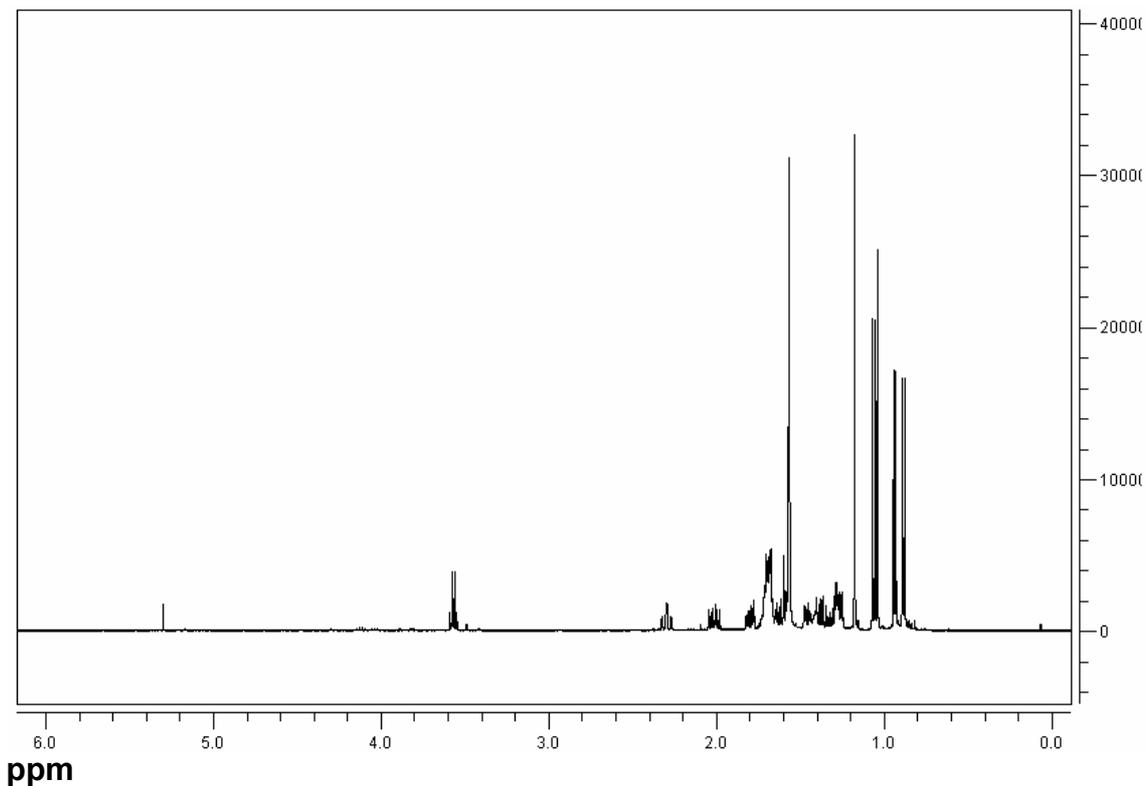
Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

Compuesto 6: 1,2,3,3a,4,5,6,7,8,8a-Decahydro-7-(1-hydroxy-1-methylethyl)-1,4-dimethylazulene-3a,8a-diol de *Azorella cryptantha*



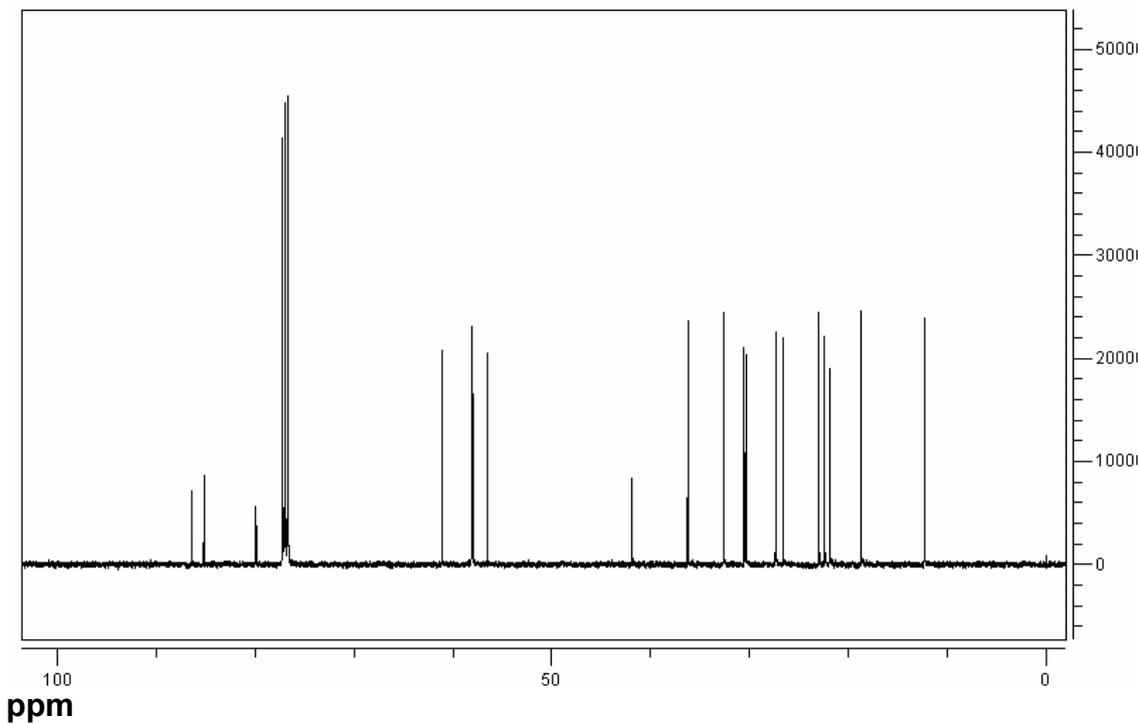
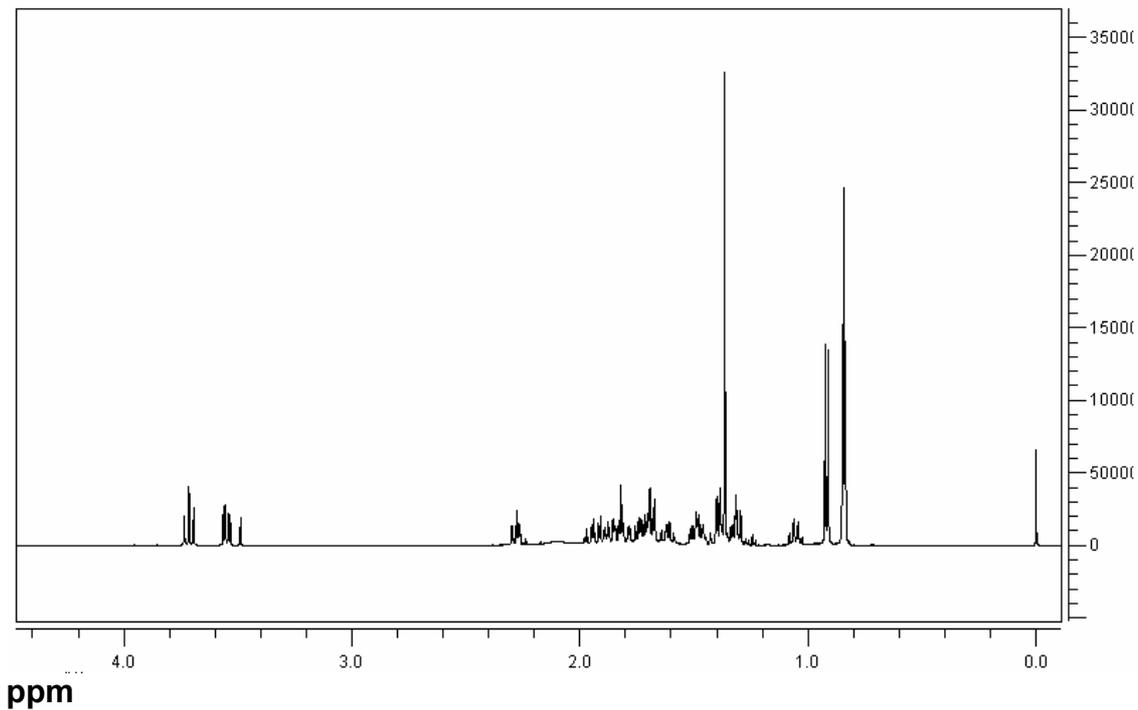
Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

Compuesto 7: Madreporanone de *Azorella cryptantha*



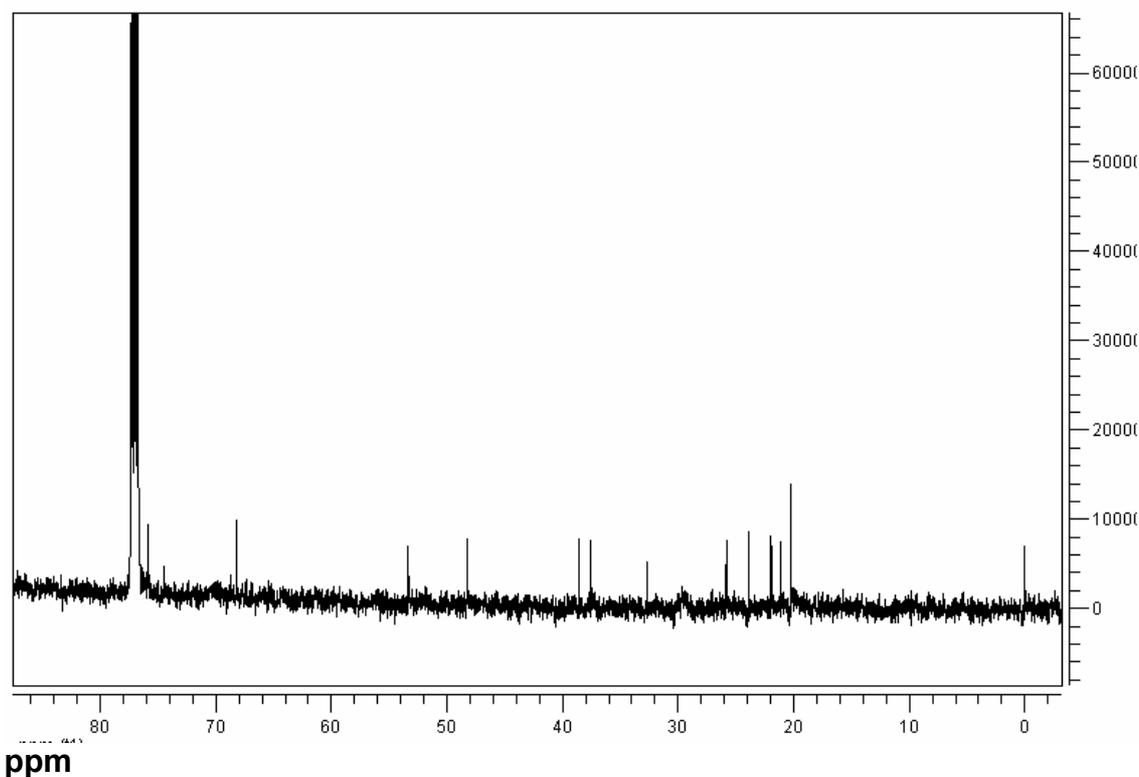
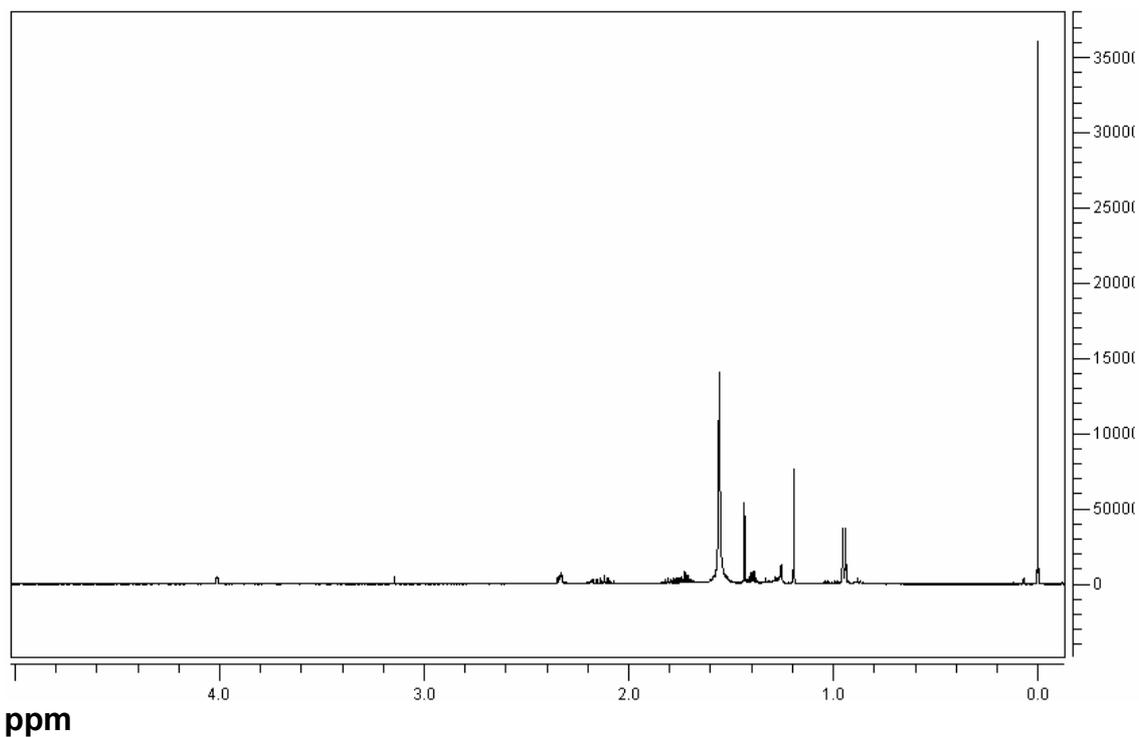
Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

Compuesto 8: Yaretol de *Azorella cryptantha*



Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

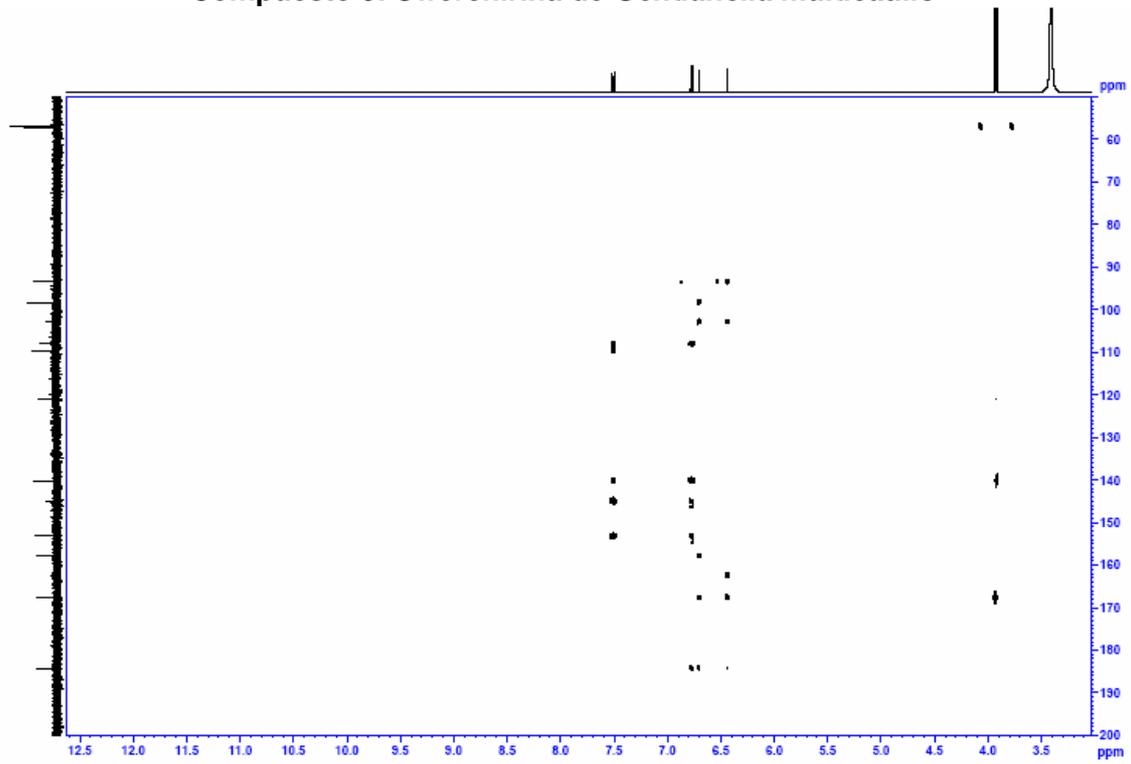
Compuesto 9: 6 β ,10 β -epoxi-4 α -hidroxiguaiano o chrisothol de *Azorella cryptantha*



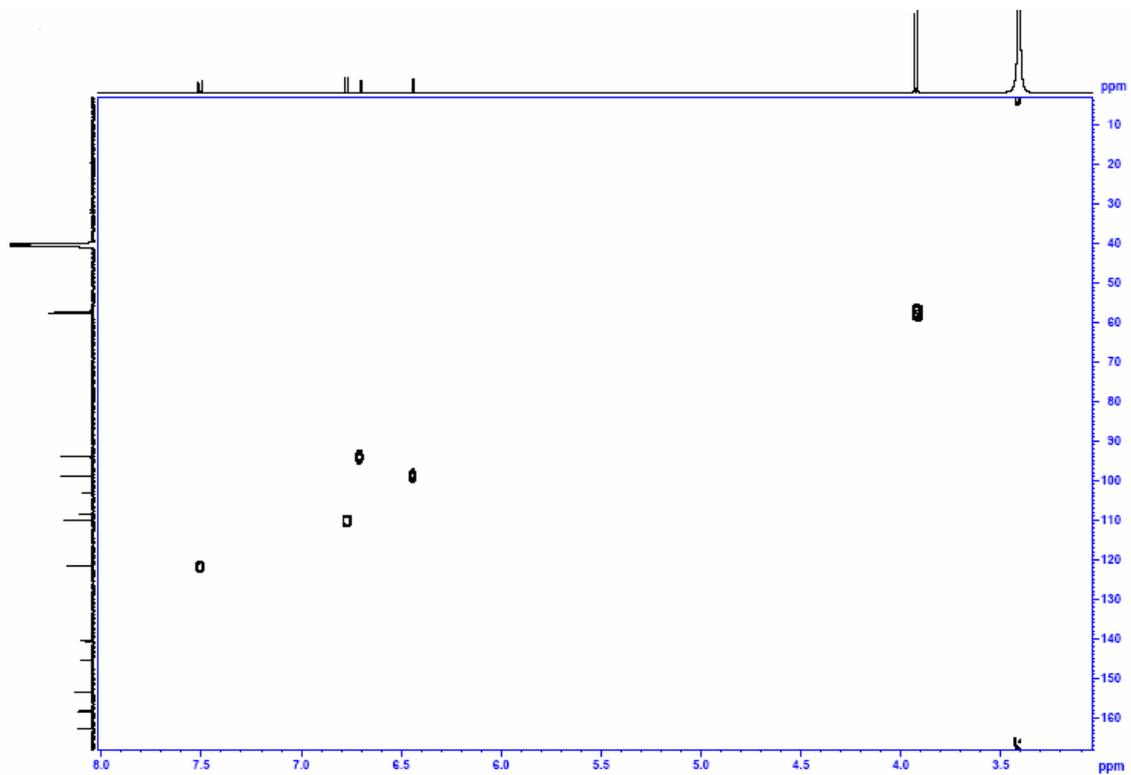
Espectros de ^1H y ^{13}C -RMN

Anexo III

Compuesto 3: Swerchirina de *Gentianella multicaulis*

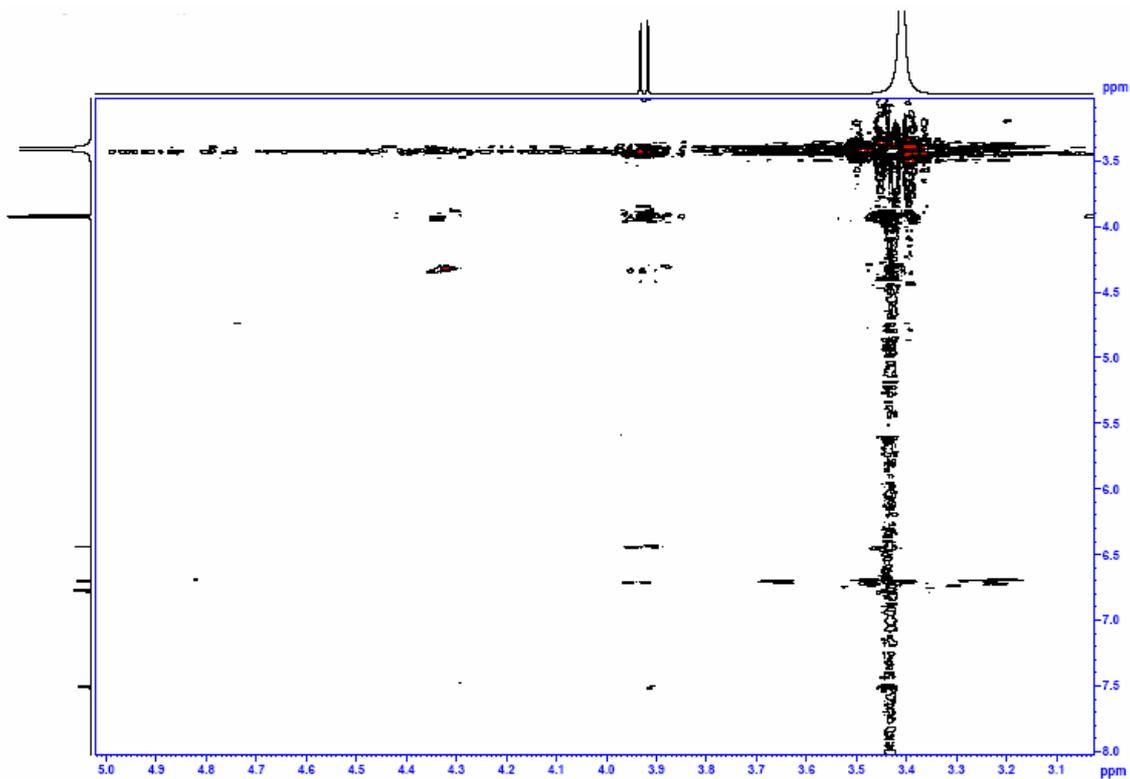


Espectro de HMBC

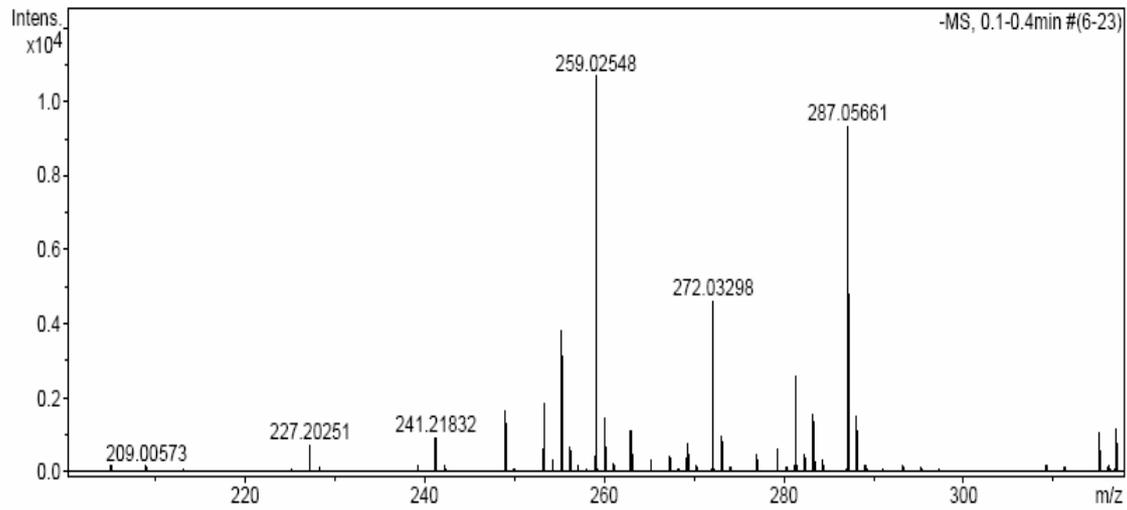


Espectro de HSQC

Anexo III: *Gentianella multicaulis*

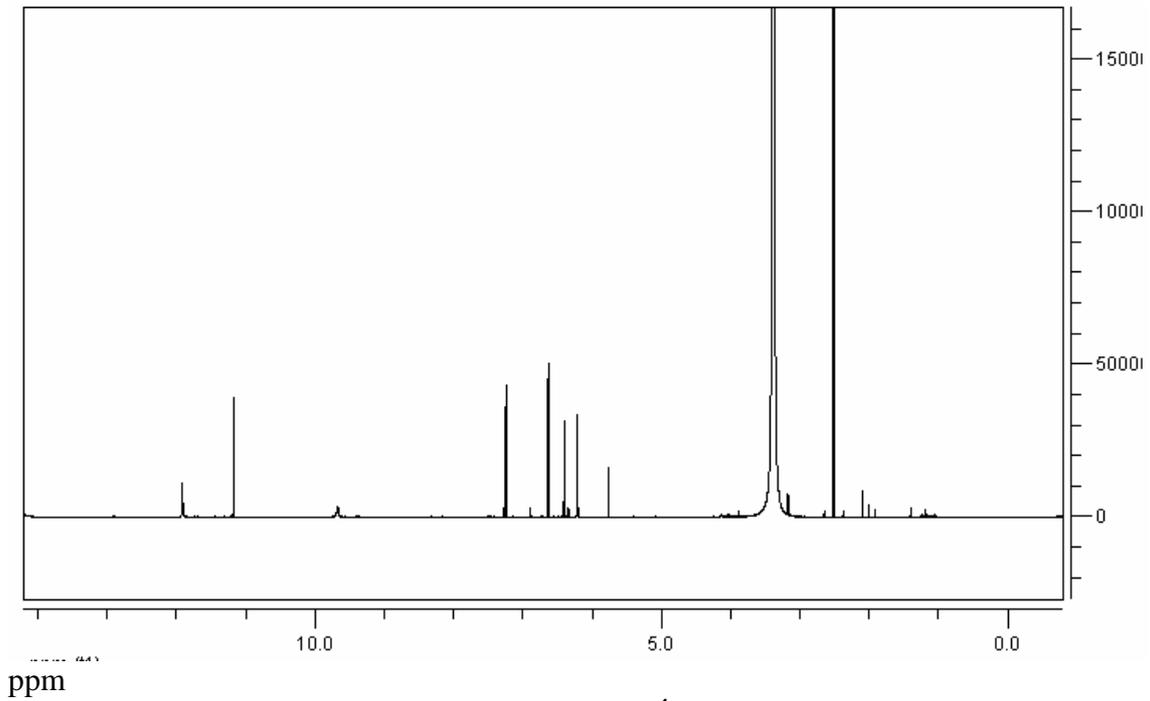


Espectro de NOESY

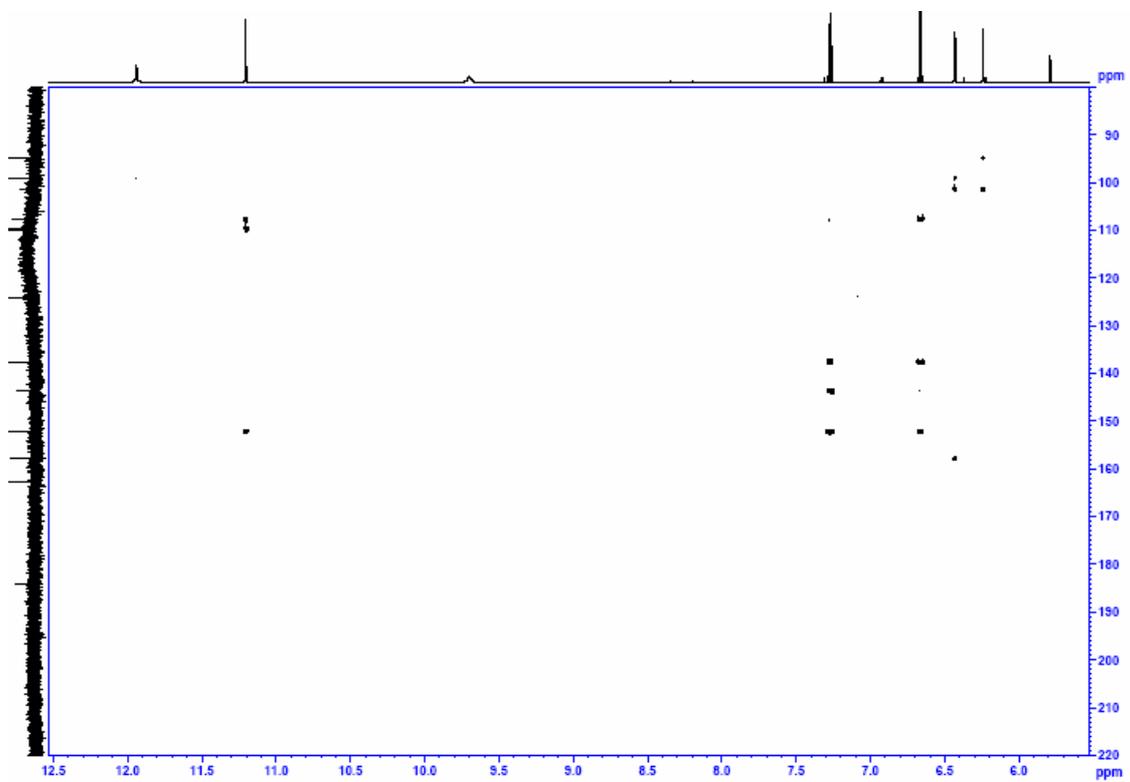


Espectro de Masas

Compuesto 4: Bellidina de *Gentianella multicaulis*

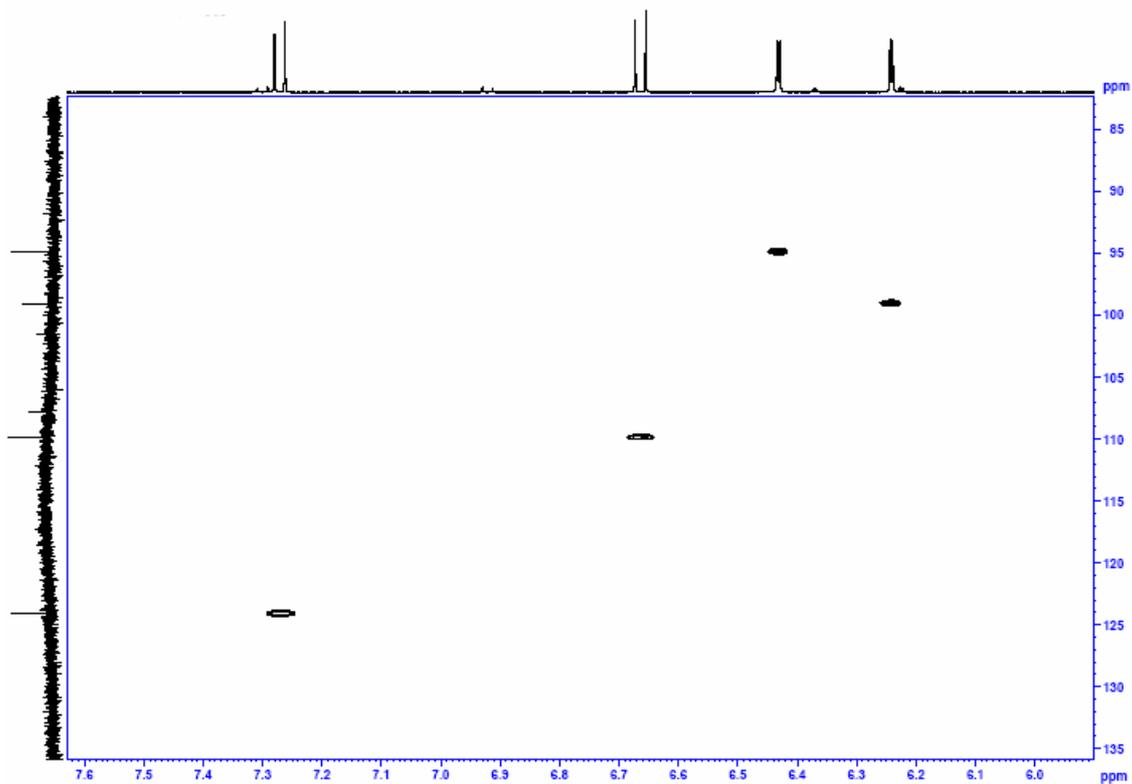


Espectros de ¹H

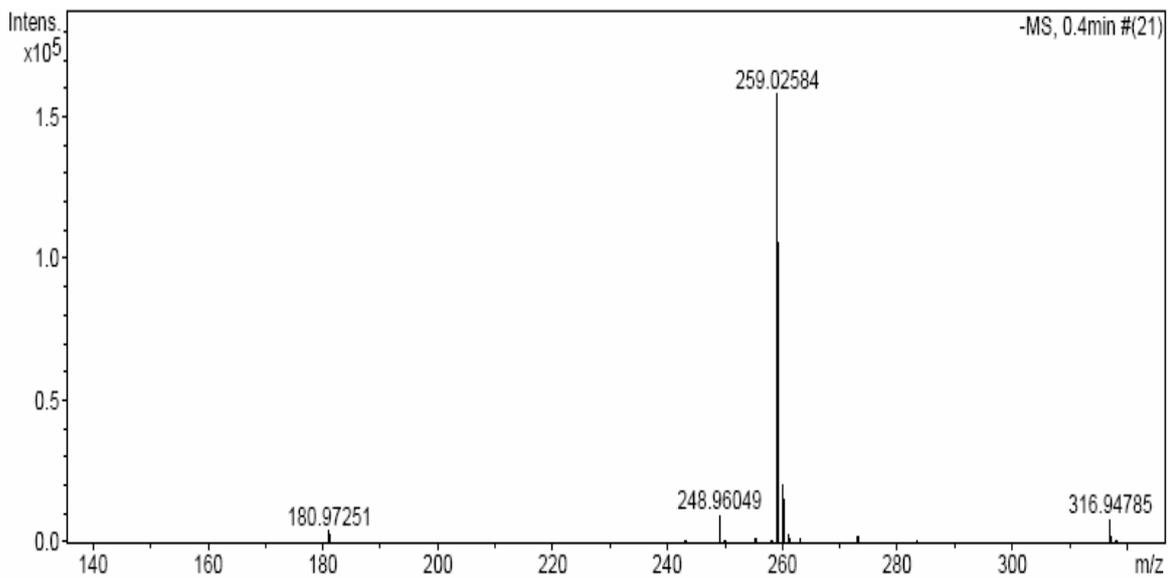


Espectro de HMBC

Anexo III: *Gentianella multicaulis*

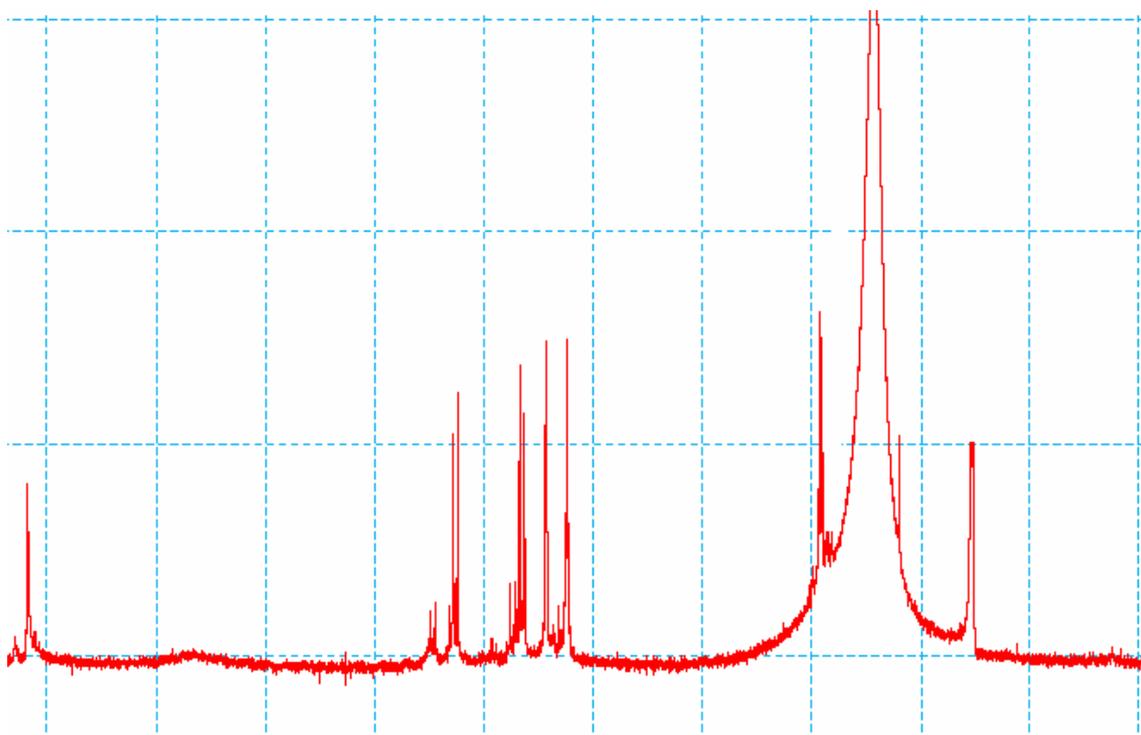


Espectro de HSQC

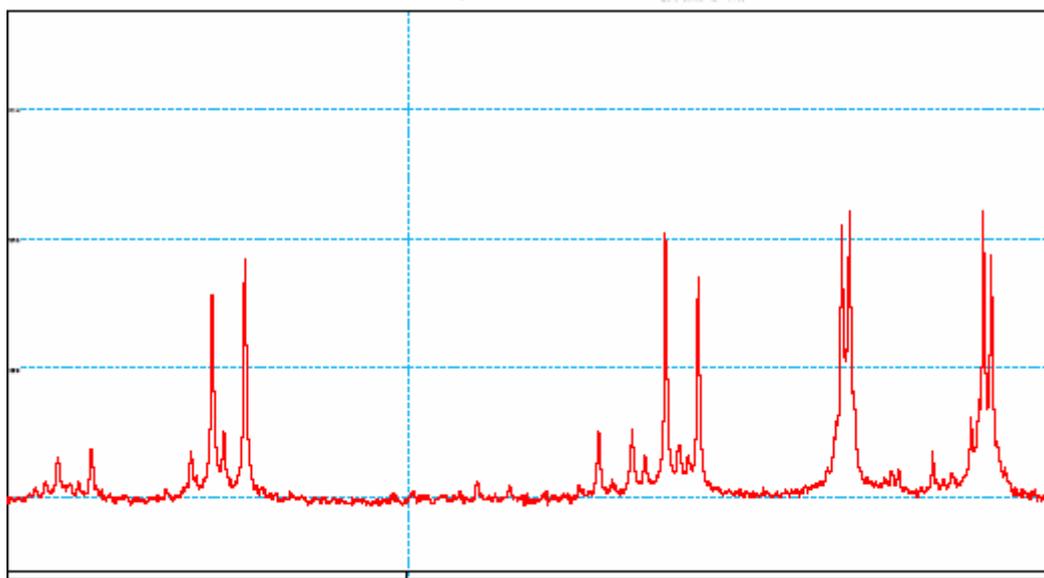


Espectro de Masas

Compuesto 6: isobellidifolina de *Gentianella multicaulis*

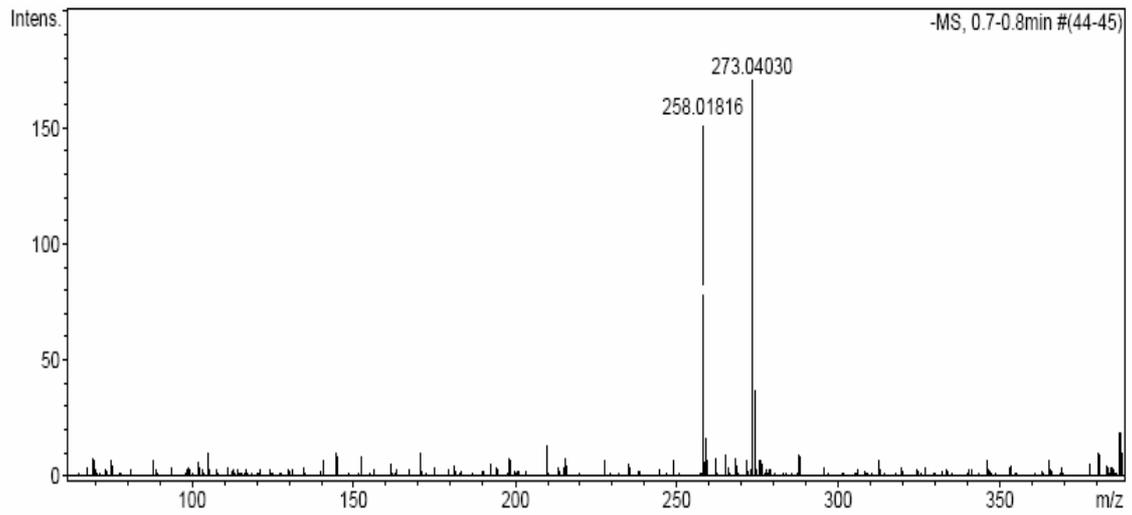


Espectros de ¹H



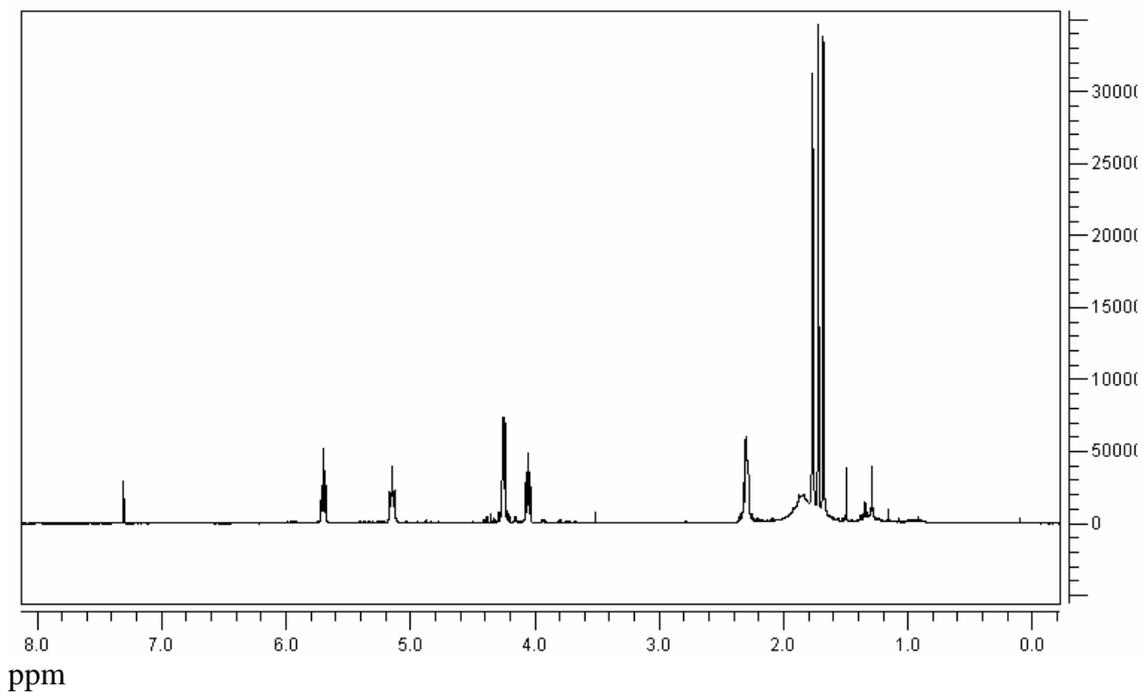
Espectros de ¹H (Ampliación aromáticos)

Anexo III: *Gentianella multicaulis*

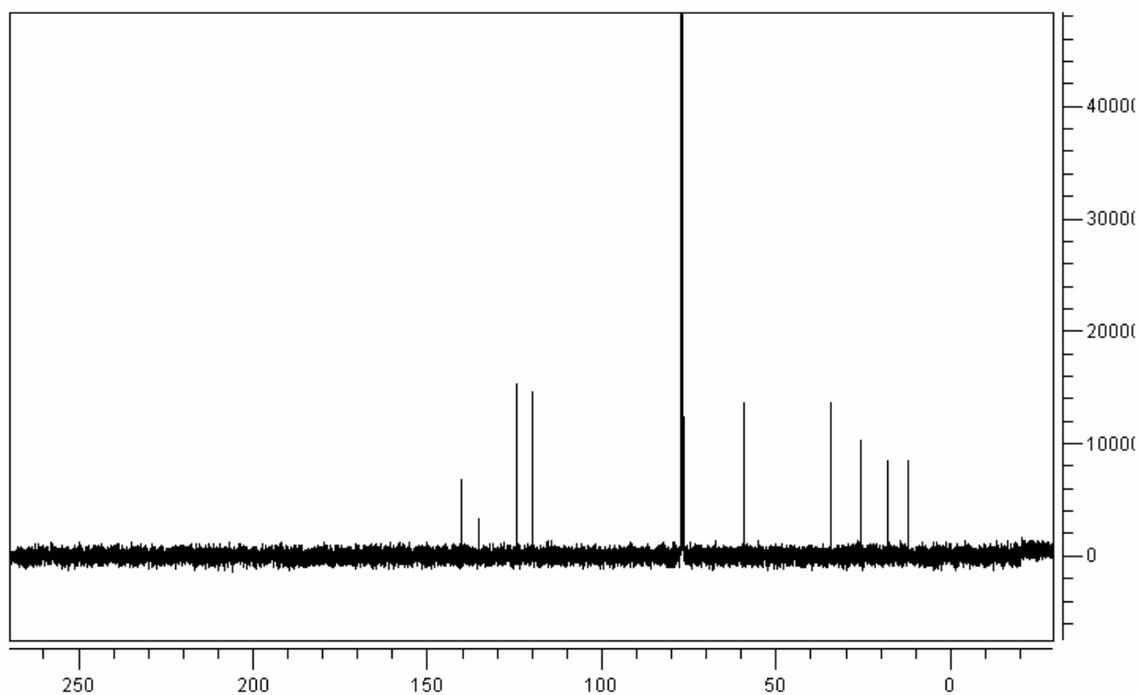


Espectro de Masas

Compuesto 6 Dihidrorosefurano de *Tagetes mendocina*



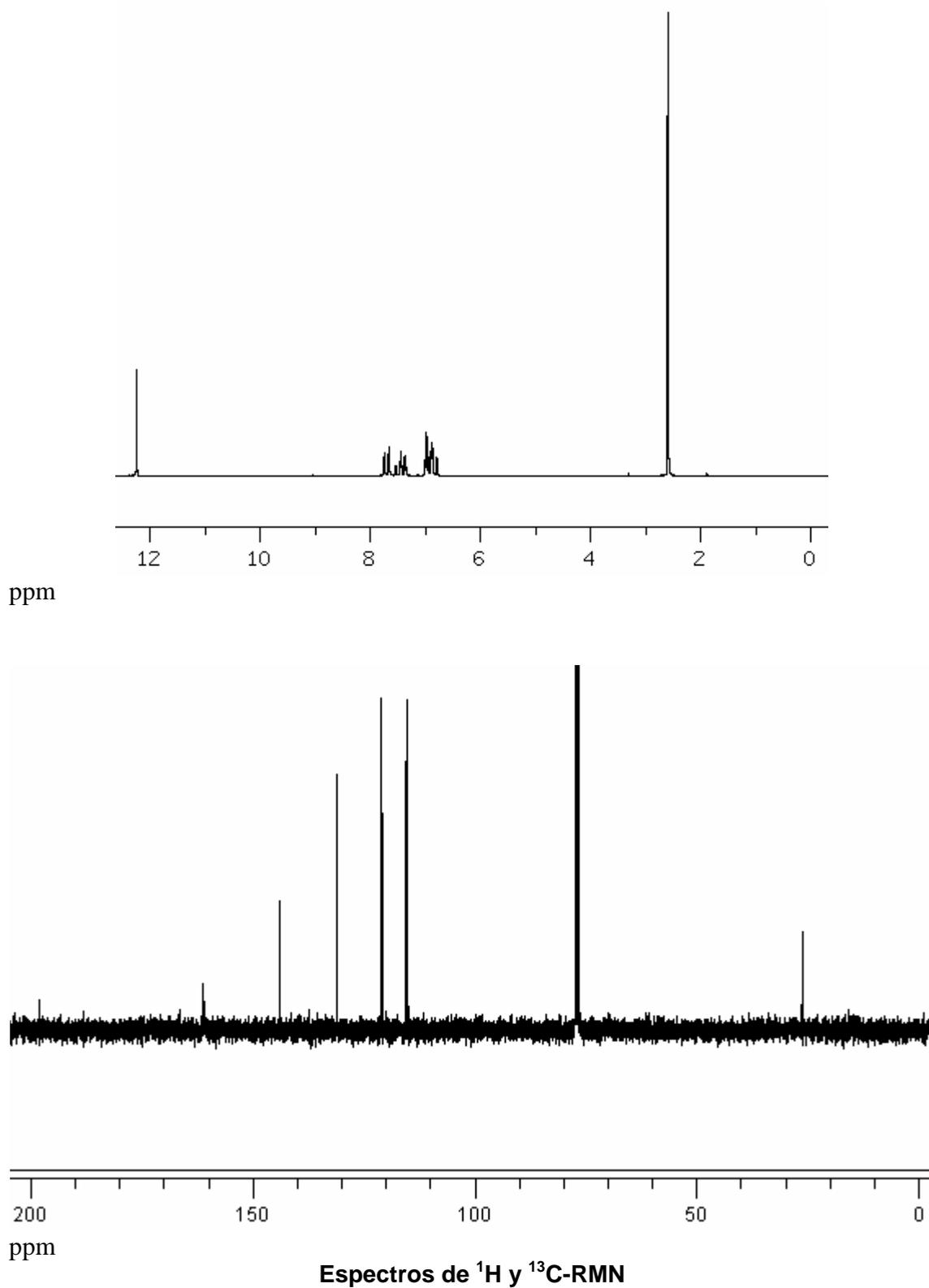
ppm

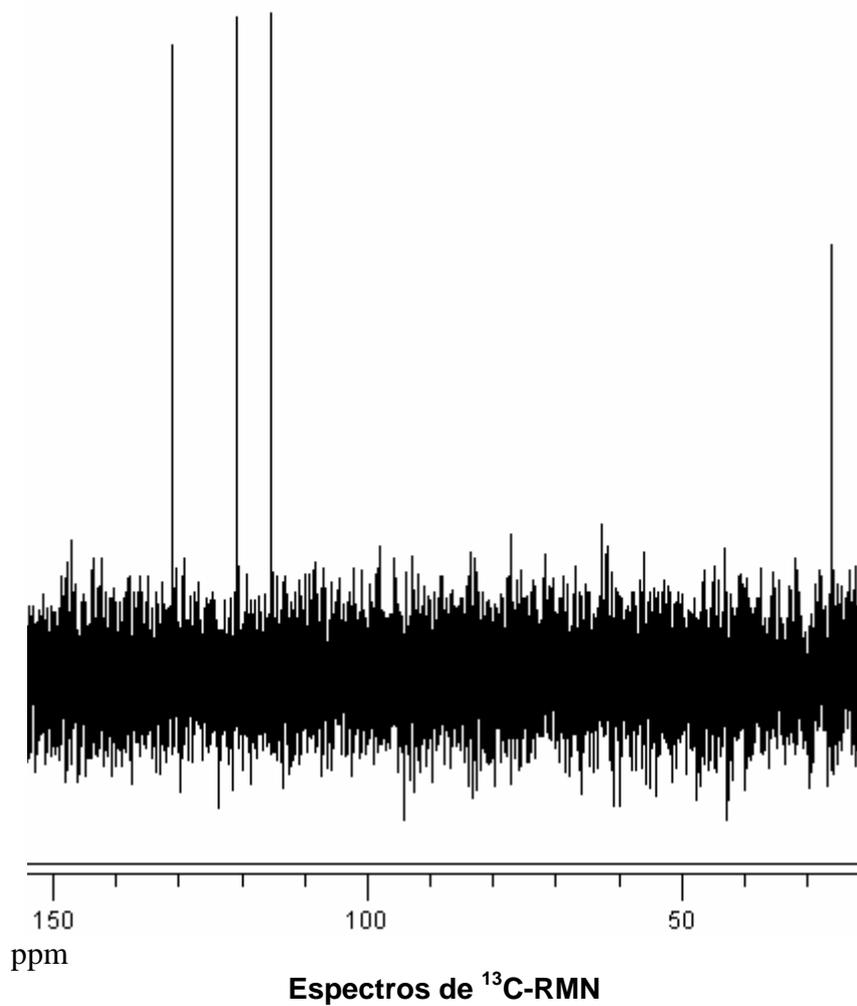


ppm

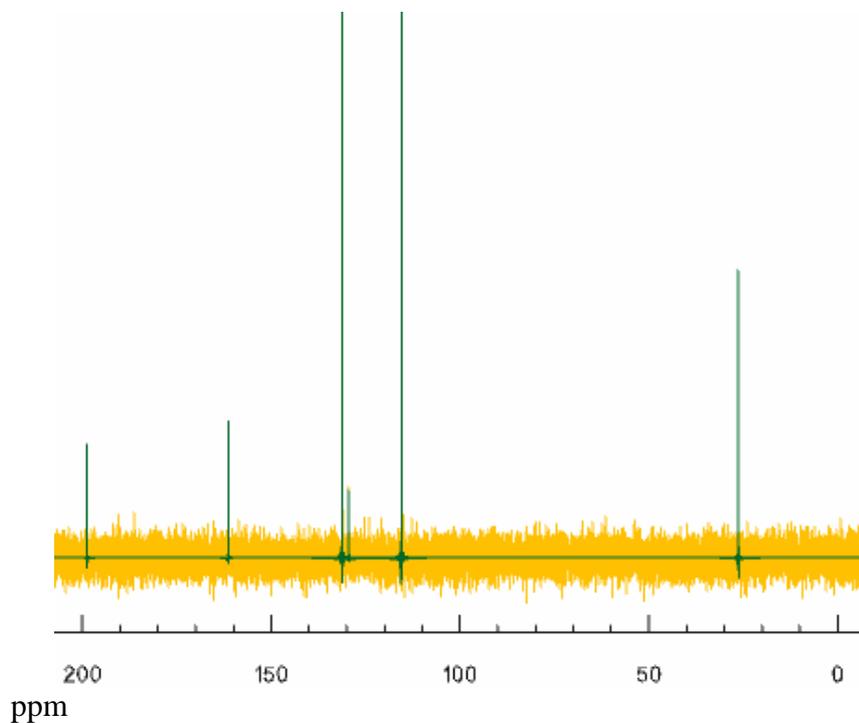
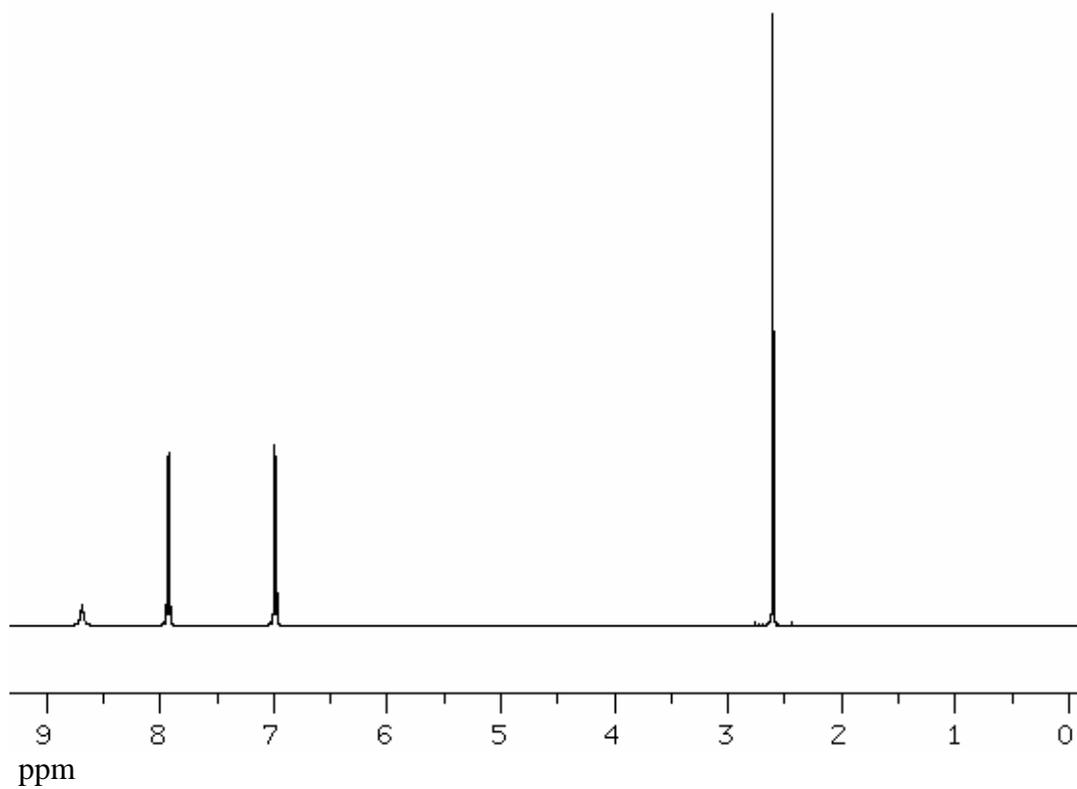
Espectros de ¹H y ¹³C-RMN

Compuesto 5: 2-hidroxiacetofenona de *Tagetes mendocina*





Compuesto 4: 4-hidroxiacetofenona de *Tagetes mendocina*



Espectros de ¹H y ¹³C-RMN