



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA FARMACOLOGICA Y TOXICOLOGICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA, ANALGÉSICA,
ANTIINFLAMATORIA, ANTIOXIDANTE E
IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS
MAYORITARIOS DE *DUNALIA SPINOSA*, SOLANACEAE,
ESPECIE VEGETAL PRE-ANDINA CHILENA**

PROFESOR PATROCINANTE:
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

DIRECTORES DE MEMORIA:
PROF. SILVIA ERAZO GIUFFRA
PROF. RUBÉN GARCÍA MADRID

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

GIOVANNA EDITH ROCCO TROQUIAN

SANTIAGO DE CHILE
NOVIEMBRE 2006

*Con todo mi amor a Daniel,
Mamá, Hermanita, y Papito
que desde el cielo me acompañas.*

¡Los quiero mucho!

AGRADECIMIENTOS

Hay muchas personas e instituciones a las que quiero agradecer por su aporte en la realización de este trabajo.

En primer lugar a todo el equipo docente y personal auxiliar del laboratorio de productos naturales de la facultad de ciencias químicas y farmacéuticas de la Universidad de Chile.

A la unidad de mantención de animales del ISP a cargo de la Sra. Ximena Silva.

Al CEPEDEC por la realización de los espectros.

A los profesores Franco Delle Monache y Corrado Galeffi (Roma, Italia).

A todos mis compañeros y amigos, en especial a Claudia Avendaño por su incondicional amistad.

A mi Mamá y Hermanita que siempre confiaron en que este momento llegaría.

A mi esposo que sin su apoyo no soy nada.

A Dios por darme la oportunidad de estar junto a toda esta gente.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

Este estudio fue realizado gracias al “Concurso Memorias 2006”, financiamiento de proyectos para memorias de título de la dirección de investigación de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
CAPITULO I	
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO II	
HIPOTESIS.....	4
CAPITULO III	
OBJETIVOS.....	5
3.1. Objetivos generales.....	5
3.2. Objetivos específicos.....	5
CAPITULO IV	
ANTECEDENTES GENERALES.....	6
4.1. Introducción.....	6
4.2. Clasificación taxonómica.....	6
4.3. Distribución geográfica.....	7
4.4. Descripción botánica.....	8
4.5. Usos en medicina popular.....	9
4.6. Otros usos.....	9
4.7. Estudios previos.....	10
CAPITULO V	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
5.1. Estudio químico.....	11
5.1.1. Material vegetal: recolección.....	11

5.1.2 Preparación de los extractos vegetales.....	11
5.1.2.1 Obtención del exudado resinoso.....	12
5.1.2.2 Obtención de los extractos secuenciales.....	12
5.1.2.3 Obtención del infuso.....	13
5.1.3 Estudio cromatográfico.....	14
5.1.4 Purificación y fraccionamiento.....	17
5.1.4.1 Primera columna rápida de gel de sílice.....	17
5.1.4.2 Segunda columna rápida de gel de sílice.....	17
5.1.4.3 Tercera columna de Sephadex.....	18
5.1.4.4 Cuarta columna de Sephadex.....	18
5.2 Identificación de los compuestos aislados por técnicas espectroscópicas.....	19
5.3. Estudio farmacológico.....	19
5.3.1 Estudios <i>in vivo</i>	19
5.3.1.1 Análisis estadístico.....	20
5.3.1.2 Determinación de la actividad analgésica tópica.....	20
5.3.1.3 Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica.....	21
5.3.2 Estudios <i>in vitro</i>	22
5.3.2.1 Ensayo frente a xantino oxidasa.....	22
5.3.2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar.....	24
5.3.2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía.....	25
5.3.2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos activos aislados.....	26
 CAPITULO VI	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
6.1. Estudio químico.....	28
6.1.1. Preparación de los extractos vegetales e infuso.....	28
6.1.2. Estudio cromatográfico.....	28

6.1.3 Purificación y fraccionamiento.....	31
6.2 Técnicas espectroscópicas.....	32
6.2.1 Espectro de IR.....	32
6.2.2 Espectro de ¹³ C-RMN.....	32
6.2.3 Espectro de ¹ H-RMN.....	33
6.2.4 Espectro de HMQC.....	33
6.2.5 Espectro de HMBC.....	34
6.3 Evaluación de las actividades farmacológicas.....	37
6.3.1 Estudios <i>in vivo</i>	37
6.3.1.1 Determinación de la actividad analgésica tópica.....	37
6.3.1.2. Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica.....	39
6.3.1.2.1 Ácido araquidónico (AA).....	39
6.3.1.2.2 12- miristato-13-acetato forbol (TPA).....	40
6.3.2. Estudios <i>in vitro</i>	41
6.3.2.1 Ensayo frente a xantino oxidasa.....	41
6.3.2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar.....	42
6.3.2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía.....	45
6.3.2.4 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	46
CAPITULO VII	
CONCLUSIONES.....	48
CAPITULO VIII	
BIBLIOGRAFIA.....	51
CAPITULO IX	
ANEXOS.....	54

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 5.1: Fases móviles utilizadas para la separación de los extractos e infuso de <i>Dunalia spinosa</i> , en c.c.f.....	14
Tabla 5.2: Reactivos reveladores y patrones utilizados en las c.c.f.....	14
Tabla 5.3: Fracciones de segunda columna rápida de gel de sílice.....	17
Tabla 5.4: Fracciones de la tercera columna de Sephadex.....	18
Tabla 5.5: Fracciones de la cuarta columna de Sephadex.....	18
Tabla 5.6: Protocolo de ensayo inhibición de enzima xantina oxidasa.....	23
Tabla 6.1: Rendimiento de los extractos e infuso.....	28
Tabla 6.2: Resultado del screening de identificación por c.c.f. de los extractos, infuso y sustancia aislada.....	29
Tabla 6.3: Estudio comparativo de los esteroles encontrados con los patrones β -sitosterol y lupeol.....	30
Tabla 6.4: Estudio comparativo de las cumarinas encontradas con el patrón escopoletina.....	30
Tabla 6.5: Estudio comparativo de los flavonoides encontrados con el patrón quercetina y canferol.....	30
Tabla 6.6: Características de los compuestos aislados desde el exudado resinoso de <i>Dunalia spinosa</i>	31
Tabla 6.7: Coloración de compuestos aislados.....	31
Tabla 6.8: Asignación de señales obtenidas al realizar ^{13}C -RMN ^1H -RMN para el compuesto DU-1.....	35
Tabla 6.9: Actividad analgésica tópica (AAT) de los extractos de <i>Dunalia spinosa</i> e ibuprofeno.....	37
Tabla 6.10: Efecto antiinflamatorio tópico (EAIT) frente a AA para los diferentes extractos e infuso de <i>Dunalia spinosa</i> y nimesulida.....	39
Tabla 6.11: Efecto antiinflamatorio tópico (EAIT) frente a TPA, para los distintos extractos de <i>Dunalia spinosa</i> e indometacina.....	40

Tabla 6.12: Evaluación de la actividad frente a xantina oxidasa, por los extractos de <i>Dunalia spinosa</i> y alopurinol.....	41
Tabla 6.13: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el ERES de <i>Dunalia spinosa</i>	42
Tabla 6.14: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el EHEX de <i>Dunalia spinosa</i>	43
Tabla 6.15: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el EDCM de <i>Dunalia spinosa</i>	43
Tabla 6.16: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el EACET de <i>Dunalia spinosa</i>	44
Tabla 6.17: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el EMET de <i>Dunalia spinosa</i>	44
Tabla 6.18: Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante bioensayo bioautografía de los extractos e infuso.....	45
Tabla 6.19: Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante bioensayo bioautografía de los compuestos aislados DU-1 y DU-2.....	46
Tabla 6.20: Concentración mínima inhibitoria de DU-1.....	46

ABREVIATURAS

% AAT	Porcentaje actividad analgésica tópica
% D	Porcentaje de dolor
% EAIT	Porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico
% I	Porcentaje de inflamación
¹³C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
¹H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
AA	Ácido araquidónico
AAT	Actividad analgésica tópica
AlCl₃	Tricloruro de aluminio
br-s	Singulete ancho
C	Carbono
c.c.f.	Cromatografía en capa fina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
d	Duplete
DCM	Diclorometano
DEPT	Distortionless Enhancement by Proton Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EACET	Extracto acetato de etilo
EAIT	Efecto antiinflamatorio tópico
EDCM	Extracto diclorometano
EHEX	Extracto hexánico
EMET	Extracto metanólico
ERES	Extracto del exudado resinoso
EtOAc	Acetato de etilo
EXT	Extracto
FeCl₃	Tricloruro de hierro
HEX	Hexano
IBUP	Ibuprofeno
IND	Indometacina
INF	Infuso
J	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
MET	Metanol
msnm	Metros sobre nivel del mar
MTT	Sal de Tetrazolium
n	Número de animales
NH₃	Amoniaco

NIM	Nimesulida
NP/PEG	Natural products – polyethylene glycol reagent
OD	Oreja derecha
Od-Oi	Diferencia de peso entre cada porción de orejas
OI	Oreja izquierda
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth
q	Cuadruplete
s	Desviación estandar
s	Singulete
SEM	Error estándar de la media
t	Triplete
TPA	12-miristato-13-acetato forbol
TSA	Tryptic soy agar
TSB	Tryptic soy broth
UV	Ultravioleta
X.O.	Enzima xantina oxidasa

RESUMEN

Dunalia spinosa (Meyen) Dammer (Solanaceae), n.v. chumu-chumi, yara, chilca hembra, es un arbusto que crece en la precordillera de la Región de Tarapacá, Provincia de Arica, I Región de Chile. La medicina folclórica le atribuye propiedades para el dolor de muelas, problemas respiratorios y lavado de heridas. No existen antecedentes acerca de estudios químicos ni farmacológicos.

La recolección del material vegetal (parte aérea) fue realizada en el pueblo de Socoroma (3.000 msnm), conservándose un testigo en el herbario de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (SQF N° 22256).

La obtención de los extractos se realizó de los ejemplares colectados y aún frescos. El exudado resinoso (ERES) fue obtenido por inmersión de la parte aérea de la planta en diclorometano. Luego el material vegetal extraído fue secado, molido y sometido a extracción secuencial con disolventes de polaridad creciente obteniéndose los extractos hexano (EHEX), diclorometano (EDCM), acetato de etilo (EAET) y metanólico (EMET).

La actividad antimicrobiana evaluada mediante siembra radial fue encontrada en los extractos: ERES y EDCM, presentando actividad frente a las bacterias Gram (+): *B. subtilis* y *M. flavus* y Gram (-): *E. coli*, siendo inactivos para los hongos *C.albicans* y *S. cerevisiae*. Mediante el bioensayo bioautografía se verificó la actividad antibacteriana frente a las mismas bacterias, además de *S.aureus* y *K. pneumoniae* por parte de los extractos y los compuestos aislados DU-1 y DU-2. Luego se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para DU-1 frente a una bacteria Gram (-): *E. coli* y una Gram (+): *S. aureus*, dando como resultado para *E. coli*: 30µg/mL, siendo el fármaco de referencia cloramfenicol con una CMI < 5 µg/mL; y para *S.aureus*: 80 µg/mL usando como fármaco de referencia ampicilina con una CMI de 5 µg/mL.

La actividad analgésica tópica *in vivo* fue determinada por el test de formalina, utilizando como fármaco de referencia ibuprofeno, observándose que todos los extractos estudiados presentaron actividad, siendo ésta mayor en los extractos menos polares.

La actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* fue estudiada mediante el método de edema en oreja de ratón utilizando ácido araquidónico (AA) y 12-miristato-13-acetato forbol (TPA) como agentes inflamatorios y como fármacos de referencia se utilizaron nimesulida e indometacina respectivamente. Los extractos ERES, EACET, EMET e INF presentaron actividad frente al edema producido por AA, mientras que sólo el EACET fue activo frente al edema producido por TPA. Debido a estos resultados se evaluó la actividad antiinflamatoria del compuesto aislado DU-1 frente a AA, el cuál no presentó actividad.

Con el fin de evaluar la actividad atrapadora de radicales libres, se realizó el ensayo de inhibición de la enzima xantina oxidasa (X.O.), donde se utilizó como fármaco de referencia alopurinol. Sólo el EDCM presentó una leve actividad, ninguno de los otros extractos fue activo.

Para aislar los metabolitos activos se realizó un fraccionamiento desde el ERES mediante columnas rápidas de gel de sílice y columnas de Sephadex obteniéndose las sustancias aisladas DU-1 y DU-2. De estas dos sustancias se identificó DU-1 mediante un completo estudio espectroscópico del cuál se obtuvo que el compuesto corresponde a un withanólido, el: 26- δ -lactona-1-oxo-4 β , 27-dihidroxi-5,6-epoxi-ergostano-2,24-dieno, conocido con el nombre de withaferina A.

Con los resultados encontrados hasta ahora, quedan respaldados científicamente los usos y las propiedades que la medicina folclórica atribuye a esta especie para el dolor de muelas, lavado de heridas y problemas respiratorios y la validan como planta medicinal.

SUMMARY

“Microbiological, analgesic evaluation, anti-inflammatory, antioxidant evaluation and identification of the majority metabolites of *Dunalia spinosa*, Solanaceae, vegetal species Chilean pre-Andean”.

Dunalia spinosa (Meyer) Dammer (Solanaceae), n.v. chumi-chumi, yara, chilca female, is a shrub that it was grows in the premountain range of the Region of Tarapacá, Arica's province, I region of Chile. The medicine folkloric attributes respiratory properties for the tooth pain, breathing problems, and hurt-cleaning. It doesn't exist any previous to chemical and pharmacologic studies.

The harvesting of the vegetal material (aerial part) was made in the Socoroma town (3.000 msnm) to keep in a witness in the herbal in the law of the Faculty of Chemical and Pharmaceuticals Science of Chile's University (SQF N° 22256).

The obtaining of the extracts was made of the collected and still fresh units.

The resinous exudate (ERES) was obtained by immersion of the aerial part of the plant in diclorometane. Soon the extracted vegetal material was dried, ground and put under sequential extraction with dissolvent of increasing polarity obtaining the hexane extract (HEX), diclorometano (EDCM), of acetate of ethyl (EACET) and metanolico (EMET).

The evaluated antimicrobial activity by means of radial sowing was found in the extracts: ERES and EDCM, presenting activity in front of the Gram bacteria (+): *B. Subtilis* and *M. flavus* and Gram (-): *E.coli*, being inactive for the fungi *C. albicans* and *S. cerevisiae*. By means of biotest bioautography verified the antibacterial activity in front the same bacteria, in addition to *S. aureus* and *K. pneumoniae* on the part of the isolated extracts and compound DU-1 and DU-2. Soon the inhibiting harassing concentration (CMI) for DU-1 in front of a Gram bacterium (-): *E. coli* and a Gram (+): *S. aureus*, giving like result: *E. coli* 30 µg/ml, using like reference drug: cloramfenicol with CMI < 5 µg/ml, and for *S. aureus*: 80 µg/ml using like reference drug: ampicilina with one CMI of 5 µg/ml.

The activity analgesic external use in it was determined by the formalin test and using like drug of ibuprofen reference, being observed that all the studied extracts presented activity, being this one greater one in the less polar extracts.

The topical anti-inflammatory activity in alive was studied by means of the method of edema in mouse ear having used araquidonic acid (AA) and 12-miristate-13- acetate forbol (TPA) as inflammatory agents and as reference drugs were used nimesulide and indometacine respectively. The extracts ERES, EACET, EMET and INF presented activity edema as opposed to produced by AA, whereas only the EACET was active front to edema produced by TPA. Due to these results the anti-inflammatory activity of isolated compound DU-1 AA was proven as opposed to, which did not present activity.

With the purpose of evaluating the activity catch up the free radicals, the test of inhibited of the enzyme Xantino Oxidasa (X.O) where alopurinol was used like reference drug. Only the EDCM presented one slight activity, no of the other extracts was active.

In order to isolate the active metabolites a division was made from ERES by means of fast silica gel columns and columns of Sephadex obtaining itself isolated substances DU-1 and DU-2. Of these two substances DU-1 by means of a complete spectroscopic study was identified from which it was obtained that the compound corresponds to: 26- δ -lactona-1-oxo-4 β , 27-dihidroxi-5, 6-epoxi-ergostano-2, 24-dieno, known with the name of withaferina A.

With the results found until now, they are endorsed the uses scientifically and the properties that the medicine folkloric attributes to this specie for the tooth pain, washing of hurt and respiratory problems and validate it as it plants medicinal.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Desde hace años la investigación de plantas medicinales representa una importante actividad científica, ya que éstas son una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas, con la obtención de nuevas moléculas bioactivas que se manifiesten con diferentes mecanismos de acción.

La precordillera forma parte de la sub-región del Desierto Andino, representada por el piso vegetacional superior del desierto y ubicado en las laderas de la Cordillera de los Andes entre altitudes aproximadas de 1.800 a 3.500 msnm y aún más en ciertos lugares. Por sus características ambientales, es una región natural única en América del Sur; abarca el norte de Chile, parte de Bolivia, el centro y sur del Perú y el noreste de Argentina. En esta zona se incluyen asentamientos humanos importantes, especialmente en la zona de Parinacota como: Zapahuira (3.270 msnm), Socoroma (3.000 msnm) y Putre (3.200 msnm) entre otros (Fuentes, 2003).

La vegetación de esta zona presenta una serie de adaptaciones para sobrevivir a condiciones ambientales extremas como la salinidad, la aridez, las temperaturas extremas y la falta de lluvia por medio de semillas con periodos de latencia prolongados, ciclos de desarrollo rápidos, mecanismos fisiológicos que permiten sobrevivir en ambientes de baja humedad y alta salinidad, cubiertas externas para evitar la deshidratación, el exceso de luminosidad y las bajas temperaturas (Fuentes, 2003). Entre estas adaptaciones está la de generar metabolitos secundarios que han demostrado poseer interesantes actividades farmacológicas, ya que la vida de un ser vivo está estrechamente relacionada a las condiciones físicas de su ambiente, de modo que una especie vegetal para sobrevivir en un conjunto particular de circunstancias ambientales, puede sufrir adaptaciones que influyan directamente en su composición química (Robbers *et al*, 1996). Por esto es de gran importancia el conocimiento de la composición química de las diferentes especies, unida a sus propiedades farmacológicas, microbiológicas y posible toxicidad para respaldar científicamente su correcta aplicación terapéutica. La revisión bibliográfica revela que

estos estudios en las diferentes especies de Chile, son bastante escasos (Negrete, 1997).

Dunalia spinosa (Meyen) Dammer (Solanaceae), única especie descrita en Chile, es un arbusto que crece en la precordillera de la provincia de Arica, I región de Chile. Se encuentra descrita en el catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú (Brako y Zarucchi, 1993), donde la describen como un arbusto de 1,5 mts de alto, espinoso y glabro, distribuido en los bordes de los terrenos cultivados, laderas y zonas pedregosas desde los 2.900 a 3.700 mt de altitud.

La medicina folclórica lo usa para el dolor de muelas, curación de heridas e inflamaciones (Brako y Zarucchi, 1993).

Esta planta por pertenecer a la familia de las Solanáceas, que ha sido extensamente estudiada, presenta una gran diversidad de compuestos naturales que abarcan entre otros: terpenos, flavonoides, glicósidos, esteroides, betaínas, cumarinas, isoprenoides, sapogeninas y glucoalcaloides, donde las propiedades analgésicas y antiinflamatorias podrían estar asociadas a cumarinas como la escopoletina y umbeliferona presentes en esta especie. (Muñoz, 1992).

Dentro de los derivados terpenoides del género *Dunalia*, destacan los withanólidos que son compuestos esteroidales de 28 átomos de carbono, con una cadena lateral de 9 carbonos formando generalmente anillos lactónicos y con funciones oxigenadas en distintas posiciones del núcleo esteroideal. (Gros, 1985).

Estos withanólidos son los compuestos que se presentan predominantemente en especies de la familia Solanaceas, de los géneros: *Withania*, *Dunalia*, *Physalis*, *Xicantra*, *Datura* (Kirson y Glotter, 1981). Un gran número de las especies productoras de withanólidos están incorporadas en los sistemas de medicina tradicional en muchas regiones del mundo. Las actividades biológicas identificadas en los withanólidos incluyen: antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora, antitumoral y como tripanocida, entre otras. (Bravo *et al*, 2001), (Javier *et al*, 1994).

Considerando el uso folclórico atribuido a esta especie vegetal, en la presente memoria de título se investigarán las potenciales propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antiinflamatorias, analgésicas, y atrapadora de radicales libres de los extractos e infuso de *Dunalia spinosa*, además de identificarse los metabolitos mayoritarios en esta especie, para así colaborar con este trabajo a validar sus beneficios y aprovechar estos recursos para el desarrollo de nuevas drogas que se puedan usar contra una amplia gama de patologías, contribuyendo al mismo tiempo al desarrollo económico de las comunidades que habitan la zona precordillerana.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS

Los extractos e infuso de *Dunalia spinosa*, presentan efectos antiinflamatorio, analgésico, antimicrobiano y antioxidante, efectos que se deberían a la presencia de metabolitos secundarios farmacológicamente activos.

Esta hipótesis se basa en:

- a) Las propiedades dadas a esta especie por la medicina folclórica como antimicrobiano, analgésico y/o antiinflamatorio.
- b) La extrema rigurosidad del medio ambiente en que ésta especie habita, hace posible pensar en la presencia de metabolitos protectores como por ejemplo antioxidantes.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

- Dar un respaldo científico a las propiedades que la medicina folclórica atribuye a esta especie.
- Contribuir al conocimiento científico de las especies vegetales de la precordillera Chilena (I Región), desde un punto de vista fitoquímico y farmacológico.

3.2 Objetivos específicos

- Obtener los diferentes extractos, e infuso de la especie *Dunalia spinosa*, para su análisis fitoquímico y su evaluación farmacológica.
- Aislar e identificar mediante un completo estudio espectroscópico los principales metabolitos de los extractos activos.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos, infuso y compuestos aislados por medio del bioensayo bioautografía.
- Determinar en los compuestos aislados con actividad microbiológica la concentración mínima inhibitoria (CMI).
- Evaluar la actividad antiinflamatoria tópica *in vivo* de los extractos, infuso y compuestos aislados.
- Evaluar la actividad analgésica tópica *in vivo* de los extractos, infuso y compuestos aislados.
- Evaluar la acción antioxidante.

CAPÍTULO IV ANTECEDENTES GENERALES

4.1 Introducción:

Dunalia spinosa (Meyen) Dammer, Solanaceae, n.v. chumi-chumi, yara, chilca hembra se encuentra descrita en el catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú (Brako y Zarucchi, 1993), donde la describen como un arbusto de 1,5m de alto espinoso y glabro. Es un matorral espinoso y microfolioso muy denso, por lo que los pájaros lo emplean como lugar ideal de ubicación de sus nidos, ya que se encuentran muy protegidos de otros depredadores.

Crece en la precordillera de la Provincia de Arica, I Región de Chile; la medicina folclórica le atribuye propiedades para el dolor de muelas, problemas respiratorios y lavado de heridas (http://www.uta.cl/flora_nativa/lista_del_parque.html#).

No existen antecedentes de estudios químicos ni farmacológicos para esta especie.

4.2 Clasificación Taxonómica:

Reino	: Planteae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Asteridae
Orden	: Solanales
Familia	: Solanaceae
Género	: <i>Dunalia</i>
Especie	: <i>Dunalia spinosa</i>
Nombre científico	: <i>Dunalia spinosa</i> (Meyen) Dammer
Nombre vulgar	: chumi-chumi, yara, chilca, chilca hembra.

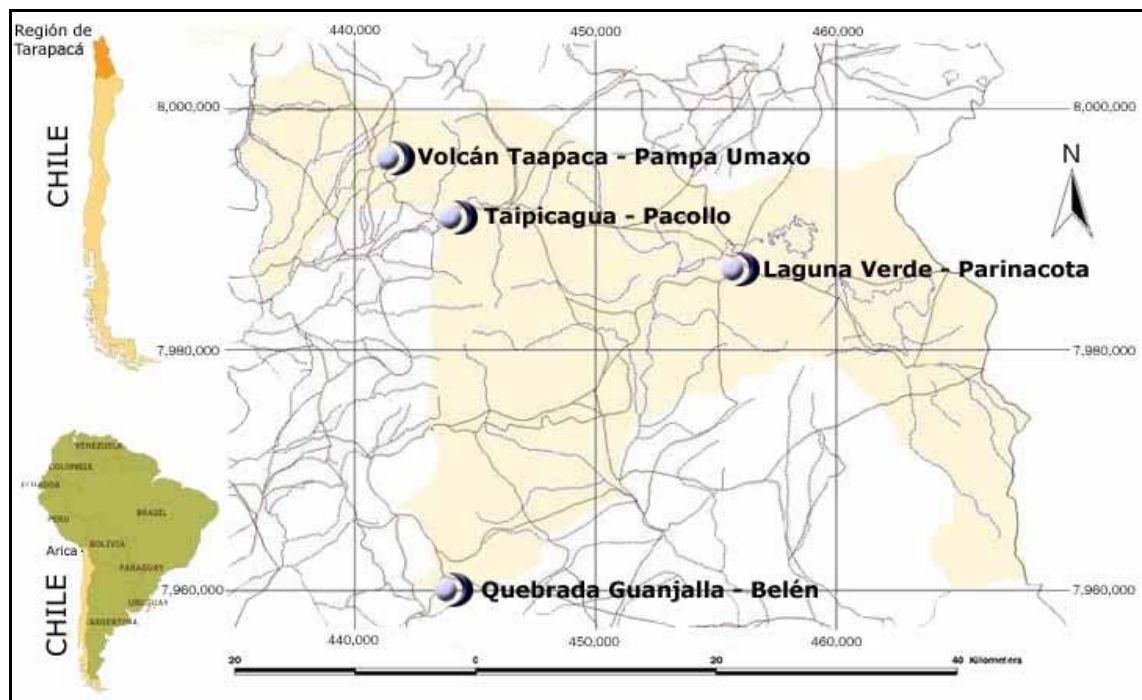
4.3 Distribución geográfica:

Crece en la precordillera de la provincia de Arica, I región de Chile, en los bordes de terrenos cultivados, laderas y zonas pedregosas; desde los 2900-3700 m de altitud (Brako y Zarucchi, 1993).

Mapa de la distribución geográfica de *Dunalia spinosa* en la precordillera de la I Región de Chile

FLORA DEL PARQUE NACIONAL LAUCA

http://www.uta.cl/flora_nativa/lista_del_parque.html#



Belén - Qda. Guanjalla

Lectura GPS, piso altitudinal y altura

447764E

7959882N

Precordillera-3400m

4.4 Descripción botánica:

Arbusto de gran envergadura muy leñoso (http://www.uta.cl/flora_nativa/lista_del_parque.html#), 1,5 m de alto, espinoso, microfolioso y glabro. Hojas: dispuestas en fascículos, peciolados simples. Limbo oblanceolado, escapulado, 1,4 – 3,5 cm de largo y 0,5 – 1,1 cm de ancho. Flores: solitarias. Cáliz: glabro campanulado, redondeado hasta la base. Corola: de color violeta de 2 – 2,5 cm de longitud; antera oval de 4mm de longitud. Fruto: baya, rojizo; 8-10 mm de diámetro (Brako y Zarucchi, 1993).

Fotografía de *Dunalia spinosa* (Meyen) Dammer, ejemplar fresco

***Dunalia spinosa* (Meyen) Dammer. Fotografía de herbario natural de la oficina de investigación y cooperación de la Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, Perú.**

<http://www.unsa.edu.pe/invest_cooper/herbarium/Husaimages_archivos/04434.jpg>



4.5 Usos en medicina popular:

Las hojas quemadas con azúcar sirven para la tos y tos convulsiva; los frutos machacados con aceite caliente se usan para "aire de muela" (http://www.uta.cl/flora_nativa/lista_del_parque.html#), también se usa para el lavado de heridas (Brako y Zarucchi, 1993).

4.6 Otros usos:

Se ha empleado tradicionalmente para hacer cierres en las fincas privadas y así evitar el paso del ganado, este uso es debido fundamentalmente a la abundante presencia de espinas.

Uno de los nombres que se otorga a esta planta "chumi-chumi" se debe a que los niños chupan las flores con el fin de gozar de su sabor dulce.

4.7 Estudios previos:

Según la información obtenida en la bibliografía consultada, no se han realizado estudios fitoquímicos ni farmacológicos para esta especie, sin embargo se han desarrollado estudios químicos para la especie *Dunalia brachyacantha* donde se han aislado diversos withanólidos a los que se les atribuye propiedades tripanocidas y actividad antibacteriana (Bravo *et al*, 2001), (Silva *et al*, 1999). También hay referencias de *Dunalia solanacea* donde aíslan otros withanólidos y estudian su actividad biológica como: anticancerígeno, inmunosupresor, antiinflamatorio y hepatoprotector (Javier *et al*, 1994). La tercera especie estudiada es *Dunalia australis*, de la cual se aislaron withanólidos glicosilados, pero no se estudiaron sus propiedades farmacológicas (Lischewski *et al*, 1992). Estas especies no crecen en Chile ya que sólo *Dunalia spinosa* se encuentra descrita como única especie autóctona ubicada en la precordillera de la Región de Tarapacá (Marticorena y Quezada, 1985).

CAPÍTULO V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estudio Químico

5.1.1 Material vegetal Recolección

La parte aérea de *Dunalia spinosa* fue recolectada en noviembre 2005 en la precordillera en el pueblo de Socoroma a 3.400 metros sobre el nivel del mar (I Región, Chile) e identificada por la Sra. Eliana Belmonte S., profesora de botánica de la Universidad de Tarapacá.

Una muestra testigo se guardó en el Herbario de la Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile (SQF N° 22256).

Fotografía de muestra de testigo de herbario de *Dunalia spinosa*.



5.1.2 Preparación de los extractos vegetales

Todos los extractos y las fracciones obtenidas de ellos, que se detallan a continuación, fueron concentrados en un evaporador rotatorio a temperatura inferior a los 60 °C y posteriormente llevados a sequedad a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

5.1.2.1 Obtención del exudado resinoso

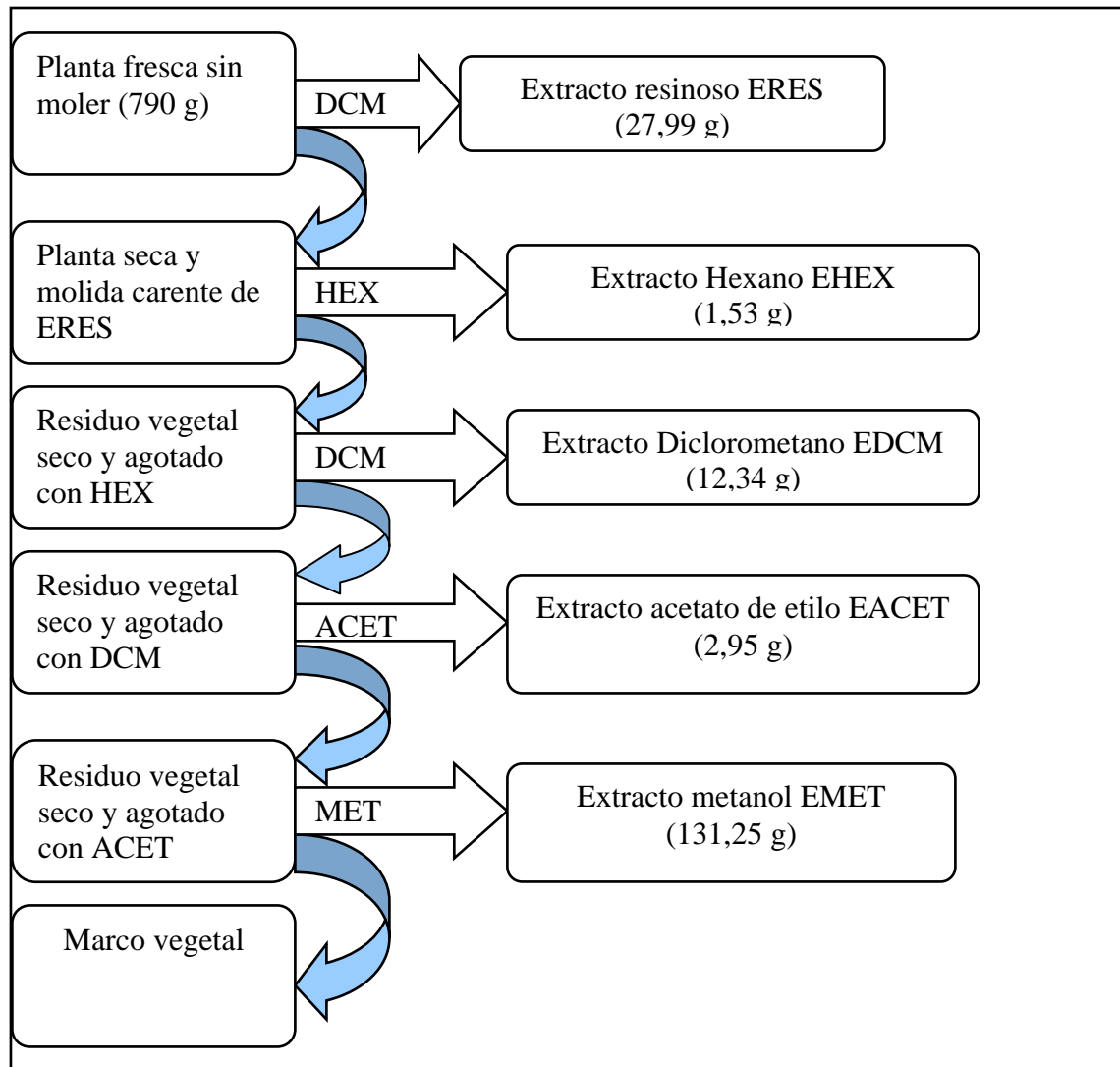
El exudado resinoso de esta especie se obtuvo sumergiendo 790 g de la parte aérea de la planta fresca en diclorometano (DCM) a temperatura ambiente, retirando la parte aérea y adicionando nuevo disolvente fresco, proceso que se repitió hasta el agotamiento total de la resina, obteniéndose de este modo 27,99 g del exudado resinoso (ERES).

5.1.2.1 Obtención de los extractos secuenciales

El material vegetal carente de exudado resinoso, se secó al aire a temperatura ambiente, siendo posteriormente molido para luego ser sometido a extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (ACET) y metanol (MET) hasta total agotamiento.

El material vegetal se dejó secar antes de la adición del siguiente disolvente, de este modo, y luego de concentrados, se obtuvieron cinco extractos: el que proviene del exudado resinoso (ERES); el extracto hexano (EHEX); el extracto diclorometano (EDCM); el extracto acetato de etilo (EACET) y el extracto metanólico (EMET), cuyos rendimientos se indican en la figura 5.1

Fig. 5.1 Esquema de la obtención de los diferentes extractos de *Dunalia spinosa* y su rendimiento



5.1.2.3 Obtención del infuso

Para obtener el infuso (INF) al 10%, se pesaron 10 g de planta fresca y fracturada, luego se agregaron 100 mL de agua hirviendo y después de 30 minutos de maceración, se procedió a filtrar.

5.1.3 Estudio Cromatográfico

Para investigar la presencia de metabolitos secundarios en alta proporción relativa de los diferentes extractos e infuso de *Dunalia spinosa*, se realizó un screening cromatográfico en capa fina (c.c.f.), empleando cromatofolios de gel de sílice G tipo 60 con indicador de fluorescencia (N° 5554 Merck). Las fases móviles utilizadas fueron aquellas que se indican en la tabla 5.1 y con las cuales se logró la mejor separación, lo que permitió visualizar los diferentes grupos químicos de los constituyentes del extracto o infuso. Las cromatografías fueron reveladas con diferentes reactivos cromogénicos además de ser visualizadas por fluorescencia bajo luz UV a las longitudes de onda de 254 y 366 nm. La tabla 5.2 señala los reactivos reveladores y los patrones.

Tabla 5.1: Fases móviles utilizadas para la separación de los extractos e infuso de *Dunalia spinosa*, en c.c.f.

Fase móvil	Extracto analizado
DCM:EtOAc = 9:1	ERES EHEX EDCM
DCM:EtOAc = 6:4	EACET EMET INF

Tabla 5.2: Reactivos reveladores y patrones utilizados en las c.c.f. para la identificación de compuestos químicos

Metabolitos secundarios	Sustancia patrón	Reactivo revelador
Alcaloides	-----	Dragendorff
Triterpenos-Esteroles	ácido oleanólico/ β-sitosterol, lupeol	Liebermann-Bürchard y p-anisaldehído
Antraquinonas	-----	Börntrager
Flavonoides	quercetina-canferol	Luz UV, NP/PEG, AlCl ₃ y NH ₃
Terpenos	-----	p-anisaldehído
Cumarinas	Escopoletina	Luz UV: AlCl ₃ y NP/PEG

Los reactivos reveladores utilizados, de acuerdo a los grupos químicos investigados, fueron los siguientes:

Alcaloides

Reactivo de Dragendorff: Está constituido por yoduro doble de bismuto y potasio, y permite la detección de alcaloides y aminas cuaternarias (Merck, 1972).

Terpenos y esteroides

Reactivo de Liebermann-Burchard: Se emplea para la observación de distintos compuestos orgánicos como, por ejemplo, triterpenos, (al revelar presentan color morado) y esteroides, cuya coloración varía en el tiempo desde el color rosado al verde y posteriormente al pardo, entre otros. El reactivo está constituido por partes iguales de anhídrido acético y de ácido sulfúrico (Merck, 1972).

Reactivo de p-anisaldehído sulfúrico: Este reactivo se prepara con p-anisaldehído, ácido acético y ácido sulfúrico. Permite detectar la presencia de todo tipo de terpenos (aceites esenciales) y triterpenos, por medio de la aparición de coloraciones que varían desde el azul al violeta (Wagner *et al.*, 1984).

Antraquinonas

Reactivo de Börntrager: Esta reacción se emplea para investigar la presencia de grupos antraquinónicos, especialmente los oxidados. Consiste en agregar un reactivo alcalino (NH_3 o solución de NaOH o KOH), ya sea directamente sobre la droga en polvo, o en los principios ya extraídos. La aparición de una coloración roja indica la presencia de este tipo de compuestos (Merck, 1972).

Flavonoides y cumarinas

Vapores de NH_3 : Permite identificar flavonoides y cumarinas, los cuales se caracterizan por presentar fluorescencia a la luz UV 366 nm. Al exponer los flavonoides a los vapores de amoníaco, dan una coloración amarilla al visible y su fluorescencia se intensifica o varía, al exponerlos a la luz UV.

AlCl_3 al 3% en etanol: Los flavonoides dan diversas coloraciones con AlCl_3 al 3 % en etanol, al ser observado bajo la luz UV a 366 nm; en tanto que las cumarinas dan fluorescencia de color celeste a la luz UV y se intensifican con los reactivos anteriormente nombrados (Mabry *et al.*, 1970).

Reactivo NP/PEG: Este reactivo se emplea para detectar compuestos fenólicos como ácidos fenólicos, flavonoides y sus glicósidos. Consiste en una mezcla de

difenilboriloxietilamina (NP) y polietilenglicol etanólico 4000 (PEG), en una razón de (5:4). Inmediatamente después de rociar la placa, se observa bajo luz UV a 366 nm, una intensa fluorescencia de colores que varían entre el amarillo, el anaranjado y el verde, para los flavonoides, y fluorescencia blanca brillante para ácidos fenólicos.

Taninos

La identificación de taninos se realizó agregando una o dos gotas de FeCl_3 a los EMET e INF disueltos en agua destilada y el ERES disuelto en metanol.

Reactivo de FeCl_3 al 1%: Se utiliza para identificar compuestos que poseen en su estructura una función fenólica, como los taninos. Según la naturaleza química del tanino se observan coloraciones que varían desde el azul (taninos pirogálicos), hasta el verde (taninos catéquicos). Otros compuestos fenólicos, como los flavonoides, también presentan coloración verde (Merck, 1972).

Saponinas

Índice de espuma : Este ensayo permite detectar la presencia de saponinas (sustancias con propiedades tensoactivas), a través de la formación de espuma persistente durante 15 minutos, usando 1g de la droga o extracto vegetal seco, en un volumen apropiado de agua destilada (Gautier, 1954).

5.1.4 Purificación y fraccionamiento

El exudado resinoso de *Dunalia spinosa* fue fraccionado por presentar mayor actividad antimicrobiana, mediante columnas rápidas de gel de sílice y columnas de Sephadex.

5.1.4.1 Primera columna rápida de gel de sílice

Se obtuvieron seis grandes fracciones del ERES (16,99 g) eluyendo con:

- Hexano (100%)
- Hexano:DCM (1:1)
- DCM (100%)
- DCM:EtOAc (1:1)
- EtOAc (100%)
- MeOH (100%)

En la fracción EtOAc (100%) se encontró actividad antimicrobiana por lo que se continuó con su estudio químico.

5.1.4.2 Segunda columna rápida de gel de sílice

Esta segunda columna se realizó con el fin de extraer los compuestos que presentaron actividad antimicrobiana en la fracción EtOAc proveniente de la primera columna rápida. Se utilizó gel de sílice tipo 60 y se eluyó con disolventes de polaridad creciente, con aumentos de 5% del disolvente de mayor polaridad, comenzando con HEX, HEX/DCM, DCM/EtOAc, EtOAc/MEOH, hasta llegar a MET (100%). Aquí fue posible encontrar las fracciones donde se encontraban los metabolitos microbiológicamente activos denominados DU-1 y DU-2.

Tabla 5.3: Fracciones de segunda columna rápida de gel de sílice

Extracto o fracción inicial	Fracciones (vaso)	Mezcla disolvente	Proporción disolvente	Sustancia aislada
Columna EtOAc 100% del ERES	82-122	DCM:EtOAc	90:10 a 80:20	Fracción rica en DU-1
Columna EtOAc 100% del ERES	143-145	EtOAc:MET	90:10 a 80:20	Fracción rica en DU-2

5.1.4.3 Tercera columna de Sephadex

Esta tercera columna fue realizada con la mezcla obtenida por elución con EtOAc de la segunda columna rápida de sílica gel, obteniendo el compuesto DU-1 puro.

Tabla 5.4: Fracciones de la tercera columna de Sephadex

Fracciones (vaso)	Fracción donde eluyó DU-1	Mezcla de disolventes	Proporción de disolventes	Sustancia aislada
82-122 proveniente de la segunda columna	3-7	HEX:DCM:MeOH	2:1,5:0,25	DU-1

5.1.4.4 Cuarta columna de Sephadex

Esta cuarta columna fue realizada con la mezcla obtenida por elución con EtOAc de la segunda columna rápida de sílica gel, obteniendo el compuesto DU-2 puro.

Tabla 5.5: Fracciones de la cuarta columna de Sephadex

Fracciones (vaso)	Fracción donde eluyó DU-2	Mezcla de disolventes	Proporción de disolventes	Sustancia aislada
143-145 proveniente de la segunda columna	11-19	HEX:DCM:MeOH	1:2:1	DU-2

5.2 Identificación de los compuestos aislados por técnicas espectroscópicas

La identificación estructural de las sustancias aisladas se realizó mediante estudios espectroscópicos de: infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN a 300 MHz en DMSO-D_6), de carbono 13 (^{13}C -RMN a 50 MHz en CDCl_3), ^1H -RMN + D_2O , COSY, distortionless enhancement by proton transfer (DEPT), HMQC, HMBC y HETCOR, todos realizados en CEPEDEQ; además de la determinación del punto de fusión.

5.3 Estudio Farmacológico

5.3.1 Estudios *in vivo*

Los ensayos que realiza el grupo de investigación del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, con animales de experimentación, cuentan con la aprobación de la Comisión de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y se rige según las "Normas Internacionales de Investigación Biomédicas que Involucra el uso de animales" aplicados por la unidad de mantención de animales del Instituto de Salud Pública (ISP) (Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 1990).

En el estudio farmacológico *in vivo* se evaluó la actividad analgésica y antiinflamatoria ambas por vía tópica de todos los extractos de *Dunalia spinosa*.

Para estas evaluaciones se usaron ratones de la cepa CF-1 no consanguíneos, de ambos sexos, cuyo peso varió entre los 17 a 20 g y su edad entre 30 a 35 días, en la unidad de mantención de animales del I.S.P.

En todos los casos los animales se mantuvieron en ayuna durante 12 horas previas al ensayo con agua *ad libitum* y a una temperatura controlada de 20 °C.

En cada ensayo se trabajó con 10 animales, dejando 2 de ellos como controles, los que eran agregados al pool de animales controles, que en total formaban un grupo de 16 animales controles.

Una vez concluido, los ensayos, los animales fueron sacrificados inmediatamente, por dislocación cervical (método indoloro).

5.3.1.1 Análisis Estadístico

Para todos los ensayos se calcularon los efectos usando los valores de la mediana, como medida de tendencia central de los datos y el error estándar de la media (SEM), como medida de dispersión. Los resultados se analizaron estadísticamente por el método no paramétrico de Wilcoxon para los datos independientes (Hollander and Wolfe, 1973), considerándose significativos si su p era $\leq 0,05$.

5.3.1.2 Determinación de la Actividad Analgésica Tópica

Test de la formalina:

Este ensayo tiene como objetivo evaluar la analgesia vía tópica de los distintos extractos de *Dunalia spinosa*. En el ensayo los animales fueron escogidos aleatoriamente.

La muestra en estudio se administró por vía tópica, sumergiendo durante 3 minutos la cola de los animales en una solución al 5% p/v de los extractos en dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se inyectó formalina al 10 % vía intradérmica en el primer tercio de la cola, el cual actúa como agente algésico. Luego procedió a contar durante 5 minutos el tiempo de lamidas que realiza el ratón en el sitio de inyección. Para contabilizar éste, los ratones se dispusieron en una cámara de vidrio de 25 cc con espejos en tres de sus caras, para optimizar la observación de los animales (Kolesnikov, 2004). La actividad analgésica tópica (AAT) se calculó mediante la siguiente formula:

$$\%D = (Cm/Cc) \times 100$$

Donde:

Cm: Mediana del tiempo de lamidas de los animales que reciben la muestra

Cc: Mediana del tiempo de lamidas de los animales controles

Una vez obtenido el %D se calculó el porcentaje de actividad analgésica tópica.

$$\%AAT = 100 - \%D$$

Cómo fármaco de referencia se utilizó ibuprofeno (IBUP) el cuál presentó una AAT máximo de 76,53 %, a la concentración de 5%.

5.3.1.3 Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica

Se evaluó mediante el método de inducción de edema en oreja. El ensayo se realizó utilizando dos tipos de agente inflamatorio, ácido araquidónico (AA) y 12-miristato-13-acetato forbol (TPA), los cuales al ser aplicados localmente producen una reacción inflamatoria aguda caracterizada por aumento de la permeabilidad vascular, edema e influjo celular, diferenciándose en el tiempo de acción y mediadores químicos involucrados en los diferentes procesos (Lloret and Moreno, 1995). Se indujo inflamación en la oreja derecha de cada animal, dejando la izquierda de control, donde recibe sólo el vehículo. La inflamación quedó establecida por la diferencia de peso del edema de la oreja derecha con agente inflamatorio, respecto del peso de la oreja izquierda. Se evaluó la propiedad antiinflamatoria en los animales que recibieron las muestras en estudio en función de la disminución de peso del edema de las orejas inflamadas, comparada con el peso del edema del grupo control, que recibieron sólo el agente inflamatorio en la oreja derecha.

Sobre la oreja derecha del ratón se aplicó la muestra en estudio a la dosis de 3 mg/ 20 μ L por oreja, siendo 10 μ L aplicados con una micro pipeta en la cara externa y los otros 10 μ L en la cara interna de la oreja; de igual forma se procedió en la oreja izquierda, pero en este caso se aplicó solamente el vehículo utilizado (Delporte *et al*, 2003). Después de 5 minutos se aplicó el agente inflamatorio (2 mg de AA o 5 μ g de TPA). Pasado el tiempo de inflamación máxima (4 $\frac{1}{2}$ horas en el ensayo con TPA y 1 hora en el ensayo con AA), los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a cortar ambas orejas con un sacabocados de 6 mm de diámetro, obteniendo así porciones uniformes. Éstas posteriormente fueron pesadas, para obtener la diferencia de peso entre ambas, la cual fue comparada con la obtenida en el “pool” de animales controles.

Los vehículos utilizados para las muestras fueron acetona, etanol o etanol: agua (8:2), dependiendo de la solubilidad de las fracciones a estudiar, y acetona para ambos agentes inflamatorios. Estos disolventes no interfieren en el proceso de la inflamación. Luego se aplicó solo el vehículo (acetona) en la oreja izquierda.

La actividad antiinflamatoria tópica de cada muestra se obtuvo comparando la inflamación alcanzada por el grupo control con el que recibió la muestra. Luego el porcentaje de efecto antiinflamatorio tópico (%EAIT) quedó definido por la siguiente fórmula:

$$\%EAIT = \frac{(ODc - OIc) - (ODm - OIm)}{(ODc - OIc)} \times 100$$

Donde:

(ODc - OIc): Mediana de la diferencia de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales controles.

(ODm - OIm): Mediana de la diferencia de los pesos de las orejas derecha e izquierda de los animales que recibieron la muestra.

Para el ensayo con AA, la dosis de este agente inflamatorio fue de 2 mg/20 uL / oreja y el fármaco utilizado como referencia fue nimesulida (NIM) en dosis de 1mg/20ul/oreja, dosis a la cual se produce el efecto antiinflamatorio máximo (48,8%).

Para el TPA se utilizó una dosis de 5 µg/20uL/oreja. El fármaco de referencia fue la indometacina (IND) a una dosis de 0,5 mg/ 20µL/ oreja, la dosis a la cual se produce el efecto antiinflamatorio máximo (92,9 %) (Delporte *et al*, 2003).

5.3.2 Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* fueron realizados en la Facultad de Ciencias Química y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en los Laboratorios de Microbiología para la evaluación de actividad antimicrobiana, y en el laboratorio de Productos Naturales para el ensayo xantino oxidasa (XO).

5.3.2.1 Ensayo frente Xantina Oxidasa

La enzima X.O. cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y esta última a ácido úrico jugando un papel muy importante en la inflamación ya que cuando la XO reacciona con hipoxantina y/o xantina en presencia de elevadas concentraciones de oxígeno forma anión superóxido, siendo este uno de los metabolitos tóxicos presentes

en isquemias como otras patógenias (Dipak and Nilanjana, 1994; Cos *et al*, 1998; Pietta, 2000).

La solución de xantina (X) se preparó tomando 11,4 mg en 500 mL de agua bidestilada sonicando durante 2 a 3 horas a 60 ° C. La enzima se utilizó a la concentración cercana a 0,006 ug/mL la que se prepara en buffer de Na₂HPO₄ y KH₂PO₄ a un pH de 7,5. En este ensayo, la concentración de enzima correspondió a 0,006 µg/mL y se midió la absorbancia de ésta, la cual debe fluctuar entre 0,300 y 0,400.

Las muestras fueron evaluadas a 50 ug/mL (Theoduloz *et al*, 1991), a las que se les adicionó 3 a 4 gotas de DMSO y a continuación agua bidestilada, sonicando cuando se requirió para lograr la solubilidad. Éstas fueron evaluadas en duplicado de acuerdo al protocolo que se detalla en la tabla 5.3:

Tabla 5.6: Protocolo de ensayo inhibición de enzima xantina oxidasa

TUBOS	A	B	C	D
1.- Extracto	-	-	1 mL	1 mL
2.- Agua Bidestilada	1 mL	1 mL	-	-
3.- Buffer	2,9 mL	3 mL	2,9 mL	3 mL
4.- Xantino Oxidasa	0,1 mL	-	0,1 mL	-
Preincubar a 25°C por 15 minutos.				
5.- Xantina	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Incubar a 25°C por 30 minutos.				
6.- HCl	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Medir A ácido úrico a 290 nm	Ac. úrico Total	Blanco de A	Ac úrico remanente	blanco de C
Volumen Total	7 mL	7 mL	7 mL	7 mL

Una vez agregados los reactivos 1, 2, 3 y 4 (Tabla 5.3), se preincubaron las mezclas a 25°C por 15 minutos. A continuación se adicionó a todos los tubos xantina y se incubó a 25°C por 30 minutos (para que la xantina esté a la temperatura de las muestras se colocó en el baño junto con ellas). Para finalizar, la reacción fue detenida con HCl 1 N y se procedió a leer la absorbancia (A) del ácido úrico a 290 nm, en un espectrofotómetro (Noro *et al*, 1983).

El porcentaje de inhibición (%I) se calculó según la siguiente fórmula:

$$\%I = [(AA - AB) - (AC - AD) / (AA - AB)] * 100$$

A: Absorbancia

AA: Absorbancia tubo A. AB: Absorbancia tubo B. AC: Absorbancia Tubo C. AD: Absorbancia Tubo D.

AA - AB: Absorbancia del ácido úrico total (debe tener una A entre 0,300 y 0,400)

AC - AD: Absorbancia del ácido úrico remanente.

El fármaco de referencia utilizado fue el alopurinol y su concentración inhibitoria cincuenta (IC₅₀) resultó ser 0,035 ug/mL.

5.3.2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar.

Para realizar la evaluación antibacteriana y antifúngica de los extractos, fue necesario preparar dos alícuotas de 20 mL cada una de agar fundido TSA (tryptic soy agar) para bacterias y PDA (Potato dextrose agar) para hongos, con una concentración final de extracto de 100 y 200 ug/mL. Para esto se preparó una solución madre de extracto seco de 100 mg por 1 mL de DMSO y se incorporó a cada porción de 20 mL de agar fundido, 0,02 y 0,04 mL de dicha solución. Se homogenizó bien cada fracción y se dejó solidificar en cápsulas de Petri. Una vez fría se procedió a sembrar en forma lineal con un asa de micrón estéril y en superficie (Erazo *et al*, 1997) cada uno de los microorganismos de prueba, indicados en farmacopea (USP XXII) para la valoración de antibióticos, obtenidos de American type culture collection que aparecen a continuación:

Gram negativos:	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14207
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(aislamiento clínico)
	<i>Salmonella aviatum</i>	ATCC 12228
	<i>Salmonella typhimurium</i>	LT 2
Gram positivos:	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
	<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC 10290
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
Hongos:	<i>Candida albicans</i>	(aislamiento clínico)
	<i>Sacharomyces cereviceae</i>	(aislamiento clínico)

***ATCC: American Type Culture Collection**

Todo este proceso se realizó bajo campana de flujo laminar.

Los microorganismos en las placas fueron incubados por 24 horas a 37°C para bacterias y 48 horas a 28°C para hongos.

Los controles estaban constituidos por placas que contenían el agar fundido sobre el cual se aplicaron las distintas cepas en estudio (Rahalison *et al*, 1991; Hamburger and Hostettman, 1991; Erazo *et al*, 1997).

5.3.2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía

Para la realización de este bioensayo se hicieron cromatogramas en cromatoláminas de gel de sílice 60 (Merck, 5554) de 5 cm de ancho por 7 cm de alto donde se sembraron los extractos. Se determinó la fase móvil más apropiada para cada extracto a ensayar.

Se prepararon cultivos de los microorganismos en un medio de cultivo líquido, TSB para bacterias y PDB para hongos, con 24 y 48 horas de anticipación, respectivamente. Se tomó una alícuota de 1 mL de cultivo de microorganismos la que se suspendió en 9 mL de medio de cultivo líquido, y se colocó en un agitador orbital a 37 °C por 2 horas, con el fin de obtener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento.

El cromatograma se expuso a la radiación U.V. (254 nm) durante 30 minutos con el fin de ser esterilizados para luego ser utilizados. En un tubo estéril se adicionó la

suspensión del microorganismo al medio de cultivo sólido (TSA para las bacterias y PDA para hongos) fundido. La suspensión se homogenizó mecánicamente mediante un agitador y se agregó sobre el cromatograma, quedando cubiertos completamente con una película de agar inoculado con cada bacteria y hongo. Finalmente los cromatogramas fueron puestos cada uno en una placa de Petri con tapa en un ambiente húmedo con agua destilada esterilizada y se incubaron durante 24 horas en una estufa termostática a 37°C para bacterias y por 48 horas a 28°C para hongos. Las bioautografías se revelaron con una sal de tetrazolium (MTT) y se dejaron incubando por 1 hora más. Al ser agregado el reactivo revelador se tomaron con un color violeta intenso, exceptuando la zona donde se produjo la inhibición del crecimiento bacteriano por parte de los metabolitos activos presentes, quedando de color marfil y a los cuales se les midió su Rf (Rahalison *et al*, 1991; Hamburger and Hostettman, 1991; Erazo *et al*, 1997).

5.3.2.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los compuestos activos aislados

Este bioensayo da cuenta de la mínima concentración de la sustancia aislada que inhibe el crecimiento bacteriano "*in vitro*".

Se preparó un cultivo para el microorganismo a ensayar (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) en medio TSB por 24 horas a 37°C. Para esto se siembra con asa de micrón estéril el microorganismo en el medio de cultivo líquido. Después de incubar los microorganismos bajo estas condiciones se tomó 1 mL del microorganismo y se inoculó sobre 9 mL de TSB, se agitó por 1 hora con el fin de obtener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente se les midió la transmitancia en un SPECTRONIC 20D que debía resultar igual a 50% a una longitud de onda de 580 nm. Se procedió a preparar un set de 20 tubos que contenían medio de cultivo líquido TSB con cantidad suficiente para completar un volumen final de 2 mL después de agregar concentraciones crecientes de DU-1, desde 10 hasta 80 µg/ml según la actividad

presentada por cada compuesto aislado, y se inocularon con concentraciones constantes de microorganismo dejando desarrollar por un período de 24 horas a 37°C. Al mismo tiempo se prepararon tubos controles. El primero de ellos contenía medio de cultivo TSB, el segundo tubo TSB más 125 µL de inóculo del microorganismo y el tercer tubo control contenía TSB más la mayor concentración de la sustancia ensayada. El primer tubo en el que no se apreció turbidez, es decir, con total transparencia del TSB (al igual que el tubo control de TSB) se consideró la concentración mínima a la que se produjo la inhibición de crecimiento bacteriano. Este tubo fue comparado con todos los tubos controles visualmente para determinar la inhibición.

Para preparar las distintas concentraciones de la sustancia aislada se preparó una disolución de 1 mg/mL de DMSO. De esta solución de concentración conocida se fueron extrayendo volúmenes exactos con micro pipeta con puntas estériles partiendo de 10 µL para ir aumentando en intervalos de 10 µL. Todo este procedimiento fue realizado bajo campana de flujo laminar.

Los resultados obtenidos se compararon con un fármaco de referencia: ampicilina para el microorganismo Gram (+) (*Staphylococcus aureus*), y cloramfenicol para el microorganismo Gram (-) (*Escherichia coli*).

CAPÍTULO VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estudio Químico

El estudio químico realizado a *Dunalia spinosa* mostró los siguientes resultados:

6.1.1 Preparación de los extractos vegetales e infuso

El rendimiento de los distintos extractos a partir del material vegetal (790g y 10g para infuso) se detalla en la tabla 6.1, de acuerdo al peso del material vegetal, además se detallan el rendimiento del infuso.

Tabla 6.1: Rendimiento de los extractos e infuso

	ERES	EHEX	EDCM	EACET	EMET	INF
Cantidad obtenida (g)	27,99	1,53	12,34	2,95	131,25	0,37
Porcentaje de rendimiento	3,54	0,19	1,56	0,37	16,61	3,73

Los extractos EMET, ERES e INF fueron los que presentaron los mayores porcentajes de rendimiento. De todas formas la obtención del infuso no fue suficiente para ser evaluado farmacológicamente.

6.1.2 Estudio Cromatográfico

Los resultados del screening inicial realizado a los extractos, infuso y compuesto aislado DU-1 de *Dunalia spinosa*, obtenidos con las distintas fases móviles y con los diferentes reactivos reveladores, están representados en la tabla 6.2, indicando con un símbolo + o -, la presencia o ausencia de éstos.

Tabla 6.2: Resultado del screening de identificación por c.c.f. de los extractos y sustancia aislada

Metabolito secundario	Revelador	ERES	EHEX	EDCM	EACET	EMET	INF	DU-1	DU-2
Alcaloides	Draguendorff	+	-	+	-	+	-	-	-
Esteroles y/o triterpenos	Liebermann Burchard y p-anisaldehido	+	+	+	+	+	+	+	+
Antraquinonas	Börntrager	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoides	NP/PEG	+	-	-	+	+	+	-	-
Cumarinas	NP/PEG	+	-	-	+	-	-	-	-
Taninos	FeCl ₃	-	-	-	-	+	+	-	-
Saponinas	Espuma	-	-	-	-	+	+	-	-

+ : Presenta el compuesto

- : No presenta el compuesto

La fase móvil utilizada en el estudio de alcaloides, terpenos y /o esteroides fue DCM/EtOAc 9:1, para flavonoides y para cumarinas se usó DCM/EtOAc (6:4).

Según los resultados observados, esta especie vegetal posee triterpenos y/o esteroides; trazas de alcaloides, cumarinas y flavonoides en los diferentes extractos analizados. También se observa que el EHEX presentó la menor cantidad de constituyentes, seguido de EDCM, mientras que los demás extractos incluyendo el ERES concentraron la mayor cantidad de metabolitos secundarios a medida que incrementaron su polaridad, deduciendo que los compuestos mayoritarios son de estructura de mediana polaridad a polares.

Tabla 6.3: Estudio comparativo de los esteroides encontrados con los patrones β -sitosterol y lupeol

Patrón	Revelador	ERES	EHEX	EDCM	EACET	EMET	INF
β -Sitosterol	Liebermann-Burchard	+	+	+	+	-	-
Lupeol	Liebermann-Burchard	+	-	+	+	-	-

+ : Presenta el compuesto

- : No presenta el compuesto

Según estos resultados podría existir la presencia de β -sitosterol y lupeol principalmente en el ERES, EDCM y EACET.

Tabla 6.4: Estudio comparativo de las cumarinas encontradas con el patrón escopoletina

Patrón	Revelador	ERES	EHEX	EDCM	EACET	EMET	INF
Escopoletina	NP/PEG	+	-	-	+	-	-

+ : Presenta el compuesto

- : No presenta el compuesto

Hay que tener en consideración que las cumarinas se encuentran muy difundidas en la familia de las Solanáceas. (Gros, 1985). Los datos obtenidos demuestran que esta especie podría presentar escopoletina.

Tabla 6.5: Estudio comparativo de los flavonoides encontrados con el patrón quercetina y canferol

Patrón	Revelador	ERES	EHEX	EDCM	EACET	EMET	INF
Quercetina	NP/PEG	-	-	-	+	-	-
Canferol	NP/PEG	-	-	-	-	-	-

+ : Presenta el compuesto

- : No presenta el compuesto

Según los resultados esta especie podría presentar quercetina, pero no canferol en sus extractos EACET y EMET.

6.1.3 Purificación y fraccionamiento

Al realizar las columnas rápidas de gel de sílice y columnas Sephadex fue posible aislar los compuestos DU-1 y DU-2 descritos y caracterizados en la tabla 6.6:

Tabla 6.6: Características de los compuestos aislados desde el exudado resinoso de *Dunalia spinosa*

Extracto inicial	Sustancia aislada	Rf	Proporción de disolventes para RF	Cantidad aislada (mg)	Punto de fusión
Columna EtOAc de ERES	DU-1	0,45	DCM:EtOAc (9:1)	100	249-250
Columna EtOAc de ERES	DU-2	0,55	EtOAc:MeOH (7:3)	5	-

Los dos compuestos aislados contenidos en la tabla corresponden a los que presentaron actividad antimicrobiana lo cual motivó su fraccionamiento y posterior aislamiento. El compuesto DU-2 no fue posible aislarlo en cantidades suficientes para su posterior identificación por lo que sólo será nombrado.

La tabla 6.7 se muestra la coloración de los compuestos aislados al ser revelados con el reactivo p-anisaldehído sulfúrico por cromatografía en capa fina.

Tabla 6.7: Coloración de compuestos aislados

Reactivo	Compuesto	Coloración
p-anisaldehído sulfúrico	DU-1	violácea
p-anisaldehído sulfúrico	DU-2	negro-verdoso

6.2 Técnicas Espectroscópicas realizadas en compuesto DU-1

6.2.1 Espectro de IR (Anexo 1)

El espectro IR presenta diversas bandas de absorción características, como ser: a 3410 cm^{-1} aparece una banda intensa debido a las vibraciones de tensión O-H de grupos hidroxilos. Otra banda a 2980 cm^{-1} atribuida a vibraciones C-H de grupos CH, CH₂ y CH₃.

A 1675 cm^{-1} se observa una fuerte señal debido a la absorción del grupo carbonilo y que por su desplazamiento debería estar conjugado con un doble enlace.

Por último, presenta una serie de bandas alrededor desde 1300 a 1100 cm^{-1} , que se puede interpretar para los grupos C-O de carboxilos, carbonilos y alcoholes (Nakanishi, 1962).

6.2.2 Espectro de ¹³C-RMN (Anexo 2)

El espectro de ¹³C-RMN registrado a 50 MHz muestra claramente las señales correspondientes a 28 átomos de carbono presentes en la molécula, de los cuales el espectro DEPT (Distortionless Enhancement by Proton Transfer) (Anexo 2.1) indica la presencia de 7 carbonos no protonados, diez correspondientes a grupos CH, siete a grupos CH₂ y cuatro a CH₃, en un intervalo que va desde los 12,8 ppm a 203,3 ppm. A bajo campo aparecen 2 señales a 203,3 ppm y 166,9 ppm correspondientes a carbonilos, siendo esta última señal la correspondiente a grupo carboxilo.

También se observan señales para carbonos unidos a dobles enlaces: dos CH vinílicos a 146,7 ppm y 132,8 ppm y dos carbonos cuaternarios a 156,3 ppm y 126,9 ppm, además de señales interpretadas para 4 carbonos unidos a oxígeno en un rango entre 79 ppm y 60,2 ppm. A campo intermedio aparecen 2 señales de CH y CH₂, esta última unida a un hidroxilo. A campo alto aparecen 4 señales debidas a grupos metilos a 21,4 ppm, 17,7 ppm, 16,4 ppm y 12,8 ppm.

Según este análisis se postula una fórmula global de: C₂₈H₃₆O₆, lo que indica que la molécula posee 10 insaturaciones que podrían ser explicadas en base a todos los antecedentes obtenidos como formados por un anillo ciclopentanoperhidrofenantreno unido a una cadena formada por nueve átomos de carbono que representa un

esqueleto del tipo ergostano con un anillo lactónico que presenta además 2 dobles enlaces, 1 carbonilo, y 1 epóxido.

6.2.3 Espectro de ^1H -RMN (Anexo 3)

El espectro de ^1H -RMN de 300 MHz realizado en DMSO-D_6 presenta señales a bajo campo correspondientes a los protones H3 y H2 a (ppm): 6,97 (m), 6,01 (d) respectivamente. En un análisis más profundo se puede observar que la señal a 6,97 ppm corresponde a un duplete de duplete con $J=$; 9,8 y 6,3Hz y la señal a 6,01 ppm aparece como un duplete con $J=9,8$ lo que indicaría un acoplamiento entre ellos y que por su desplazamiento corresponderían a los protones vinílicos de la molécula y que se encontrarían cercanos al grupo carbonilo, corroborados por el acoplamiento de ambos en el espectro COSY, (anexo 3.1).

A 5,53 ppm (d), la señal corresponde a un OH; a 4,17 ppm (m), se observa la señal correspondiente al H22 del anillo lactónico.

A 3,42 ppm, aparece una señal integrada para un protón correspondiente al H4 (dd) y a 3,05 ppm (br-s), correspondiente al H6.

A campos más altos; 1,85 ppm, 1,14 ppm, 0,53 ppm, se observan señales integradas para 3 protones correspondientes a los CH_3 en CH_3 -28, CH_3 -19, CH_3 -18, respectivamente y una señal doblete a 0,79 ppm correspondiente al CH_3 -21, interpretados como los metilos de esta molécula.

Al agregar agua deuterada, se puede observar cambios en el espectro, con la desaparición de las señales entre 4 ppm y 5,8 ppm que serían atribuibles a grupos hidroxilos en que la señal debida al agua aparece a 4,02 ppm (Anexo 3.2).

6.2.4 Espectro de HMQC (Anexo 4)

La señal del carbono del metilo C18 a 12,8 ppm se correlaciona a un enlace con el protón centrado a 0,53 ppm (Me 18); a su vez los carbonos de los metilos C21, C19 y C28 que aparecen a 16,4 ppm, 17,7 ppm y 21,4 ppm, respectivamente se correlacionan con los protones centrados a 0,79 ppm (d), 1,14 ppm (s) y 1,85 ppm (s). El C6 a 60,2 ppm se correlaciona con el protón centrado 3,05 ppm (s), además se observa la correlación del C4 a 70,1 ppm con el protón 4 a 3,42 ppm (dd). A más bajo

campo se observa la señal del C2 a 132,8 ppm con el protón 2 centrado a 6,01 ppm (d) y el C3 a 146,7 ppm se correlaciona con el protón 3 centrado a 6,97 ppm (dd).

6.2.5 Espectro HMBC (Anexo 5)

La señal de uno de los protones del metilo 18 centrado a 0,53 ppm, se relaciona con C13 y C17 a 2 y 3 enlaces respectivamente. Uno de los protones del metilo 19 centrado a 1,14 ppm se correlaciona a 3 enlaces con el carbonilo 1, C9 y C5 y a 2 enlaces con C10.

Uno de los protones del metilo 28 centrado a 1,85 ppm se correlaciona con el carbono 24, 25, y 26 a 2 y 3 enlaces respectivamente.

El protón 6, centrado a 3,05 ppm se correlaciona con carbono 7, 4 y 8 a 2 y 3 enlaces respectivamente.

El protón 4 centrado a 3,42 ppm se correlaciona con el C5 a 2 enlaces y C10 y C6 a 3 enlaces respectivamente. El protón 22 centrado a 4,14 ppm se correlaciona con el C17 a 3 enlaces. El protón 2 centrado a 6,01 ppm se correlaciona a 2 enlaces con el carbonilo 1 y con el C4 y con C10 a 3 enlaces respectivamente. El protón 3 centrado a 6,97 ppm se correlaciona con el C4 y C5 a 2 y 3 enlaces respectivamente.

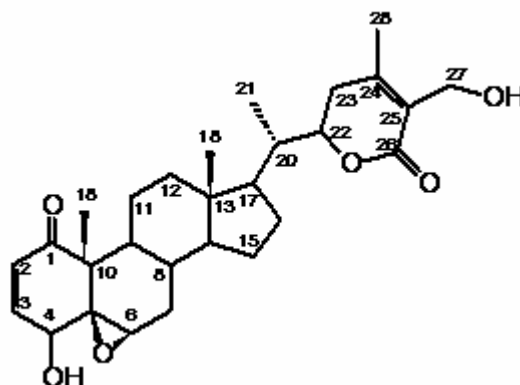
Tabla 6.8: Asignación de señales obtenidas al realizar ^{13}C -RMN ^1H -RMN para el compuesto DU-1 comparado con otros withanólidos.

C	δ ^{13}C -RMN (ppm) DMSO	[1]	[2]	CHn	δ ^1H -RMN (ppm)	Multiplicidad	J
1	203,3	202,2		C			
2	132,8	132,2		CH	6,01	d	9,8
3	146,7	141,9		CH	6,97	d-d	9,8-6,3
4	70,1	68,8		CH	3,42	d-d	
5	64,7	63,9		C			
6	60,2	62,6		CH	3,05	br-s	
7	30,5	31,4		CH ₂			
8	30,9	29,9		CH	1,9	m	
9	44,9	44,4		CH	0,65	m	
10	48,7	47,7		C			
11	22,2	22,5		CH ₂			
12	32,9	34,3		CH ₂			
13	43,4	46,8		C			
14	52,6	55,8		CH			
15	25,5	24,3		CH ₂			
16	28	27,2		CH ₂			
17	56,7	52,7		CH			
18	12,8			CH ₃	0,53	s	
19	17,7			CH ₃	1,14	s	
20	39,9		39,2	CH	1,7		
21	16,4		13,4	CH ₃	0,79	d	6,5
22	79		78,8	CH	4,17	m	
23	40,1		30	CH ₂	2,3	m	
24	156,3		153,8	C			
25	126,9		127,4	C			
26	166,9		166	C			
27	56		56,3	CH ₂	4,02	m	
28	21,4		20,1	CH ₃	1,85	s	

[1]: (Silva *et al*, 1999).

[2]: (Matsuda *et al*, 2001).

Del análisis de los espectros: IR, $^1\text{H-RMN}$, $^1\text{HRMN}+\text{D}_2\text{O}$, $^{13}\text{C-RMN}$, DEPT, COSY, HETCOR, HMQC Y HMBC, se puede concluir que el compuesto aislado corresponde a un derivado esteroidal de esqueleto ergostano, con 4 metilos (C18, C19, C21 Y C28), con un anillo lactónico entre C22 y C26, y que presenta además de dos dobles enlaces (C2-C3 y C24-C25), un epóxido entre C5 y C6, una cetona en C1 y 2 grupos hidroxilos en posiciones 4 y 27.



En base a este completo estudio espectroscópico y considerando las características fisicoquímicas de esta sustancia, podemos concluir que se trata del 26 δ lactona-1-oxo-4 β , 27-dihidroxi-5,6-epoxi-ergostano-2,24-dieno, sustancia conocida con el nombre de **withaferina A**.

En la bibliografía a nuestro alcance no aparece información sobre actividad antimicrobiana para esta sustancia, sin embargo se ha encontrado para otro withanólido glicosilado, en el cuál se registra actividad antifúngica y contra las bacterias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Echerichia coli*, *Shigella dysenteriae* y *Pseudomona aeruginosa* (Ahmed *et al.*, 2001). En cuanto a la actividad antiinflamatoria, tampoco se registra información para withaferina A, pero si para un withanólido aislado de los frutos de *Withania coagulans*. En cuanto a la actividad analgésica no hay información para withaferina A y ningún withanólido conocido.

6.3 Evaluación de las Actividades Farmacológicas

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las evaluaciones de las diferentes actividades farmacológicas a las cuales fueron sometidos los distintos extractos, infuso y DU-1 de *Dunalia spinosa*.

6.3.1 Estudios *in vivo*

Al evaluar la actividad analgésica y antiinflamatoria tópica de los extractos, infuso y DU-1 de *Dunalia spinosa*, de los cuales disponíamos en cantidad suficiente para realizar estos ensayos, se obtuvieron los siguientes resultados expuestos en las tablas 6.9 a 6.11.

6.3.1.1 Determinación de la Actividad Analgésica Tópica

Con esta evaluación se pudo probar la actividad analgésica tópica de *Dunalia spinosa*, donde todos los extractos presentaron actividad, siendo el más activo ERES, en comparación con el fármaco de referencia (ibuprofeno). Los resultados se expresan en la tabla 6.9 y se compararon con el fármaco de referencia ibuprofeno.

Tabla 6.9: Actividad analgésica tópica (AAT) obtenida de los extractos de *Dunalia spinosa* e ibuprofeno

Extracto (dosis)	Tiempo de lamida ± SEM	% AAT ± SEM	p
ERES (5% p/v)	4,5 ± 1,74	90,82 ± 3,56	0,000044
EHEX (5% p/v)	15,5 ± 2,55	68,4 ± 5,21	0,000044
EDCM (5% p/v)	25,5 ± 3,51	40,0 ± 8,27	0,000379
EACET (5% p/v)	25,5 ± 5,98	47,95 ± 12,21	0,001217
EMET (5% p/v)	33,0 ± 4,39	32,65 ± 8,95	0,000014
Ibuprofeno (5% p/v)	12,9 ± 2,4	76,53 ± 4,8	0,00005

* Resultado significativo ($p \leq 0,05$)

De los extractos estudiados sólo ERES (90,8%) exhibió una actividad analgésica mayor que el fármaco de referencia, sin embargo los siguientes extractos presentaron efectos analgésicos significativos importantes: EHEX (68,4 %), EDCM (40,0 %), EACET (47,95 %) y EMET (32,65 %), resultados que demuestran que se debe continuar con su estudio para llegar a identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad analgésica.

El EMET fue el que presentó la menor actividad analgésica, como trabajamos con extractos seriados podemos suponer que el o los componentes responsables de dicha actividad se han extraído en los extractos menos polares.

El ERES presentó el mayor efecto analgésico, esto puede deberse a la presencia de esteroides presentes identificados en el screening de metabolitos por c.c.f, principalmente por la presencia de β -sitosterol, cuya propiedad analgésica ha sido reportada en la especie *Phyllanthus corcovadensis* (Santos *et al*, 1995).

Todos los resultados obtenidos en los ensayos realizados para las distintas muestras resultaron ser estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

6.3.1.2 Determinación de la actividad antiinflamatoria Tópica

6.3.1.2.1 EAIT frente a ácido araquidónico (AA)

Los resultados obtenidos de efecto antiinflamatorio tópico para los extractos, infuso y compuesto aislado DU-1 de *Dunalia spinosa*, comparados con los efectos del fármaco de referencia nimesulida y usando AA como agente inflamatorio se resumen en la tabla 6.10:

Tabla 6.10: Efecto antiinflamatorio tópico (EAIT) frente a AA para los diferentes extractos e infuso de *Dunalia spinosa* y nimesulida

Extracto	Dosis (mg/20µL/oreja)	(Od-Oi) ± SEM Muestra	n	(Od -Oi) ± SEM Controles	n	%EAIT ± SEM	P
ERES	3	0,0020 ± 0,0007	8	0,0065 ± 0,0007	16	69,2 ± 11,3	0,0007
EHEX	3	0,0074 ± 0,0018	8	0,0065 ± 0,0007	16	-13,1 ± 27	0,4151 *
EDCM	3	0,0056 ± 0,0002	8	0,0065 ± 0,0007	16	13,8 ± 3	0,0992 *
EACET	3	0,0027 ± 0,0006	8	0,0065 ± 0,0007	16	59,2 ± 8,8	0,0002
EMET	3	0,0020 ± 0,0005	8	0,0065 ± 0,0007	16	70,0 ± 8,1	0,0002
INF	3	0,0041 ± 0,0008	8	0,0065 ± 0,0007	16	37,7 ± 12,6	0,025
DU-1	1	0,0073 ± 0,0014	8	0,0065 ± 0,0007	16	-11,5 ± 21	0,4756 *
Nimesulida	1	0,0007 ± 0,0003	7	0,0099 ± 0,0005	10	48,8 ± 4,0	0,0002

* Resultado no significativo ($p \geq 0,05$)

Los ensayos realizados a ERES, EACET, EMET e INF resultaron ser estadísticamente significativos, mientras que EHEX, EDCM y DU-1 resultaron no ser significativos ($p \geq 0,05$).

En los resultados obtenidos de este estudio destacan los efectos antiinflamatorios de ERES, EACET y EMET con un 69,2%, 59,2% y 70,0% de efecto respectivamente comparados con el fármaco de referencia, nimesulida, el que alcanza un 48,8% de efecto máximo; el INF obtuvo un efecto antiinflamatorio un poco más bajo comparado con nimesulida. El EHEX y DU-1 no presentaron efectos.

6.3.1.2.2 EAIT frente a 12-miristato-13-acetato forbol (TPA)

En la tabla 6.11 se resume el efecto antiinflamatorio tópico de los extractos de *Dunalia spinosa*, usando TPA como agente inflamatorio y se compararon con indometacina (fármaco de referencia).

Tabla 6.11: Efecto antiinflamatorio tópico (EAIT) frente a TPA, para los distintos extractos de *Dunalia spinosa* e indometacina

Extracto	Dosis (mg/20µL/oreja)	(Od-Oi) ± SEM Muestra	n	(Od-Oi) ± SEM Controles	n	%EAIT ± SEM	p
ERES	3	0,0084 ± 0,0012	8	0,0065 ± 0,0007	16	-29,2 ± 12,8	0,8777 *
EHEX	3	0,0074 ± 0,0018	8	0,0065 ± 0,0007	16	-13,1 ± 24,8	0,4151 *
EDCM	3	0,0072 ± 0,0006	8	0,0065 ± 0,0007	16	-10,8 ± 10,5	0,6433 *
EACET	3	0,0008 ± 0,0006	8	0,0065 ± 0,0007	16	87,7 ± 8,7	0,0002
EMET	3	0,0101 ± 0,0011	8	0,0065 ± 0,0007	16	-55,4 ± 17,6	0,9621 *
indometacina	0,5	0,0090 ± 0,0005	6	0,0046 ± 0,0007	12	92,9 ± 3,2	0,0001

* Resultado no significativo ($p \geq 0,05$)

De los extractos estudiados, solo el EACET alcanzó una actividad antiinflamatoria tópica significativa (87,7 %), cercana al efecto máximo del fármaco de referencia indometacina (92,9 %); los valores obtenidos para los otros extractos no se consideran estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$), además no poseen efecto antiinflamatorio.

La inflamación inducida por TPA es una inflamación más lenta, si la comparamos con la inflamación inducida por AA. Como respuesta a la acción del TPA se desencadenan una serie de eventos en los cuales se sintetizan enzimas pro-inflamatorias como ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) entre otras (Lloret and Moreno, 1995).

En resumen: para el modelo de edema inducido por AA se obtuvieron efectos significativos para los extractos ERES, EACET y EMET en comparación con el modelo

de edema inducido por TPA donde se obtuvo efecto sólo en EACET; sin embargo no se observó esta actividad antiinflamatoria tópica al estudiar el compuesto DU-1 aislado desde la resina, esto puede ser debido a que la parte activa de la planta se encuentra formada por numerosos componentes y su acción farmacológica es superior a la que se obtiene con los principios activos aislados, es decir, sus componentes actuarían sinérgicamente.

Al revisar la literatura se encontró un withanólido aislado de *Withania coagulans* que posee actividad antiinflamatoria (Budhiraja *et al*, 1984), donde se evaluó de forma sistémica esta actividad, por lo que se podría evaluar estos extractos en estudios posteriores en otras formas de administración.

6.3.2 Estudios *in vitro*

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las evaluaciones de las diferentes actividades *in vitro* a las cuales fueron sometidos los distintos extractos e infuso de *Dunalia spinosa*.

6.3.2.1 Ensayo frente Xantina Oxidasa

La actividad frente a la inhibición de la enzima xantina oxidasa se determinó para todos los extractos de *Dunalia spinosa*; los resultados obtenidos se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 6.12: Evaluación de la actividad frente a xantina oxidasa, por los extractos de *Dunalia spinosa* y alopurinol

Extracto	Concentración (µg / mL)	% de Inhibición	P
ERES	50	0	0,002
EHEX	50	0	0,002
EDCM	50	14,74	0,002
EACET	50	0	0,003
EMET	50	0	0,002
Alopurinol	0,035	50 ± 2,4	0,0018

* Resultado no significativo ($p \geq 0,05$)

De los resultados obtenidos se puede observar que EDCM presenta una baja actividad como inhibidor de la X.O comparado con el fármaco de referencia alopurinol. Ninguno de los otros extractos presentó actividad como inhibidor de la xantina oxidasa.

6.3.2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos por siembra en superficie de agar

Este ensayo tuvo por objetivo poder dilucidar cuál extracto de la planta en estudio presentaba actividad antimicrobiana, para continuar su posterior análisis, para esto en placas de Petri con agar y los extractos a las concentraciones de 100 ug/mL y 200 ug/mL se sembraron los diferentes microorganismos. Como resultado de esta prueba se pudo observar que los extractos ERES y EDCM fueron activos frente a la bacteria Gram (-): *E. coli*, para ambas concentraciones y sólo el extracto EDCM presentó actividad frente a las bacterias Gram (+): *B. subtilis* y *M. flavus* a 200 µg/ml, no siendo ninguno de los extractos ensayados activos sobre los hongos *C. albicans* y *S. cerevisiae*.

El resumen de las cepas ensayadas y las actividades encontradas en los extractos se señalan en las tablas 6.13 a la 6.17, indicando actividad antimicrobiana presente o ausencia de ésta con los signos + y – respectivamente (Ver anexo 6: Fotografías de la actividad antimicrobiana en superficie de agar de los extractos: ERES y EDCM de *Dunalia spinosa*).

Tabla 6.13: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar del ERES de *Dunalia spinosa*

Microorganismos	Concentración ERES (ug/mL)		
	Control	100	200
<i>S.aureus</i>	-	-	-
<i>M.flavus</i>	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	-	-	-
<i>E.coli</i>	-	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-
<i>S.aviatum</i>	-	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	-	-

Tabla 6.14: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, del EHEX de *Dunalia spinosa*

Microorganismos	Control	Concentración EHEX (ug/mL)	
		100	200
<i>S.aureus</i>	-	-	-
<i>M.flavus</i>	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	-	-	-
<i>E.coli</i>	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-
<i>S.aviatum</i>	-	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	-	-

Tabla 6.15: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, del EDCM de *Dunalia spinosa*

Microorganismos	Control	Concentración EDCM (ug/mL)	
		100	200
<i>S.aureus</i>	-	-	-
<i>M.flavus</i>	-	-	+
<i>B.subtilis</i>	-	-	+
<i>E.coli</i>	-	+	+
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-
<i>S.aviatum</i>	-	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	-	-

Tabla 6.16: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, del EACET de *Dunalia spinosa*

Microorganismos	Control	Concentración EACET (ug/mL)	
		100	200
<i>S.aureus</i>	-	-	-
<i>M.flavus</i>	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	-	-	-
<i>E.coli</i>	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-
<i>S.aviatum</i>	-	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	-	-

Tabla 6.17: Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, del EMET de *Dunalia spinosa*

Microorganismos	Control	Concentración EMET (ug/mL)	
		100	200
<i>S.aureus</i>	-	-	-
<i>M.flavus</i>	-	-	-
<i>B.subtilis</i>	-	-	-
<i>E.coli</i>	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-
<i>S.aviatum</i>	-	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	-	-

Con estos resultados se puede concluir que en estos extractos existen metabolitos que serían responsables de esta actividad antimicrobiana.

6.3.2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía

Este ensayo se realizó para verificar la actividad de cada uno de los extractos de *Dunalia spinosa* con tres cepas Gram (+), cuatro cepas Gram (-) y dos hongos.

También se realizó el ensayo sobre los compuestos aislados DU-1 y DU-2, usando las mismas cepas más una cepa Gram (-): *S. typhimurium*.

Los extractos ERES, EDCM, EACET, EMET e INF, además de los compuestos aislados DU-1 y DU-2 presentaron actividad sobre las cepas Gram (+): *S.aureus*, *M flavus*, *B.subtilis* y Gram (-): *E.coli* y *K.pneumoniae*, no siendo ninguno de los extractos ensayados activos sobre los hongos *C.albicans* y *S.cerevisiae*.

El resumen de las cepas ensayadas y las actividades encontradas se detalla en las tablas 6.18 y 6.19, donde se indica con la siguiente simbología la presencia o ausencia de actividad antimicrobiana:

- +++ : Presentó actividad
- ++ : Presentó menor actividad
- + : Presentó mínima actividad
- : presentó nula actividad

Tabla 6.18: Evaluación de la Actividad Antimicrobiana mediante Bioensayo Bioautografía de los extractos e infuso

CEPAS	ERES	EHEX	EDCM	EACET	EMET	INF
<i>S.aureus</i>	+++	-	++	+	++	++
<i>M.flavus</i>	++	-	+	+	++	++
<i>B.subtilis</i>	+++	-	++	+	++	++
<i>E.coli</i>	+++	-	+	+	++	++
<i>P.aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	+++	-	++	+	++	++
<i>S.aviatum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-

Se debe tener presente que este ensayo se realiza aplicando los extractos en las placas de c.c.f a una concentración no establecida, la que pudo haber sido mayor a las usadas en superficie de agar (100 y 200 µg/ml), debido a esto algunos extractos presentaron actividad que no se observó en el ensayo anterior.

Tabla 6.19: Evaluación de la Actividad Antimicrobiana mediante Bioensayo Bioautografía de los compuestos aislados DU-1 y DU-2.

(Anexo 7: Fotografías de la actividad de DU-1).

CEPAS	DU-1	DU-2
<i>S.aureus</i>	+++	++
<i>M.flavus</i>	++	+
<i>B.subtilis</i>	+++	++
<i>E.coli</i>	+++	++
<i>P.aeruginosa</i>	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	+++	+
<i>S.aviatum</i>	-	-
<i>S.typhimurium</i>	-	-
<i>C.albicans</i>	-	-
<i>S.cerevisiae</i>	-	-

Según estos resultados se puede concluir que la actividad antimicrobiana de *Dunalia spinosa* se debe a los compuestos DU-1 y DU-2.

6.3.2.4 Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Una vez realizado el bioensayo bioautografía se procedió a medir la concentración mínima inhibitoria del compuesto activo DU-1.

Tabla 6.20: Concentración Mínima Inhibitoria de DU-1

Cepa	Compuesto aislado	CMI (µg/ml)	Ampicilina (µg/ml)	Cloramfenicol
<i>S. aureus</i>	DU-1	80	5	-
<i>E. coli</i>	DU-1	30	-	< 5

La mayor actividad antimicrobiana se obtuvo con DU-1 frente a *E.coli* a 30 µg/mL.

Al comparar los resultados de la CMI obtenidos con el DU-1, frente a los fármacos de referencia, se puede concluir que aunque presentaron actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, y *E.coli*, ésta es baja, ya que el fármaco de referencia ampicilina frente a

S. aureus posee una CMI de 5 µg/mL y cloramfenicol frente a *E.coli* exhibe una CMI menor a 5 µg/mL.

No se realizó la CMI para el compuesto DU-2 ya que su estudio se continuará posteriormente.

En la literatura revisada no existen investigaciones de actividad antimicrobiana para la especie *Dunalia spinosa*, pero si para otras especies como *Dunalia brachyacantha* desde donde se aislaron withanólidos que presentaron actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) como *S. aureus*, *B. subtilis*, y Gram (-) como *E. coli* (Bravo *et al*, 2001). También se han encontrado withanólidos glicosilados en otras familias como las Orchidiáceas que también presentaron actividad antimicrobiana frente a las mismas cepas (Ahmed *et al*, 2001).

Frente a los resultados obtenidos en las diferentes evaluaciones de la actividad antimicrobiana y la literatura revisada se podría atribuir esta actividad al compuesto aislado DU-1, el cuál corresponde a un withanólido, y con esto confirmar las propiedades que la medicina folclórica atribuye a esta especie.

CAPÍTULO VII CONCLUSIONES

El proceso de extracción al que fue sometida *Dunalia spinosa*, permitió concluir que los extractos: ERES, EMET y EDCM fueron aquellos que presentaron el mayor rendimiento.

En el screening fitoquímico realizado se pudo observar que todos los extractos presentaron esteroides y/o triterpenos también presentes en los extractos más apolares y de polaridad media. Los flavonoides y cumarinas se encuentran en los extractos más polares y en ERES. Los taninos y saponinas se presentaron en los extractos EMET e infuso. Además se observó la presencia de trazas de alcaloides.

La identificación de metabolitos secundarios a través de patrones conocidos permitió demostrar la posible presencia de β -sitosterol y lupeol en todos los extractos excepto EMET, además de escopoletina en el extracto ERES y EACET y quercetina sólo en el extracto EACET.

De los extractos obtenidos, se seleccionó ERES para realizar el estudio químico, ya que fue el que presentó la mayor actividad antimicrobiana.

De la fracción EtOAc del exudado resinoso se aislaron 2 compuestos con características de esteroides, de los cuales uno de ellos, DU-1 se encuentra identificado, en tanto que el otro DU-2 se obtuvo en cantidad insuficiente para realizar su estudio químico y farmacológico, por lo cuál se continuará su estudio posteriormente.

DU-1 fue identificado mediante un completo estudio espectroscópico: IR, ^1H -RMN, ^1H -RMN + D_2O , ^{13}C -RMN, COSY, HMQC, HMBC y HETCOR. Se trata de un withanólido, el: 26- δ -lactona-1-oxo-4 β , 27-dihidroxi-5,6-epoxi-ergostano-2,24-dieno, conocido con el nombre de withaferina A, compuesto que hasta ahora no ha sido aislado del género *Dunalia*, ni de la especie *spinosa*, pero si derivados semejantes conocidos como withanólidos, siendo la withaferina A aislado por primera vez de *Withania somnifera*.

Los dos compuestos aislados desde *Dunalia spinosa*, son los responsables de la actividad antimicrobiana de ésta especie. Esta actividad fue detectada mediante el bioensayo bioautografía y confirmada con la CMI para DU-1.

DU-1 es un compuesto que presenta un amplio espectro contra las bacterias Gram (+): *S. aureus*, *M. flavus* y *B. subtilis*, y contra las bacterias Gram (-): *E.coli* y *K. pneumoniae*.

La concentración mínima inhibitoria para DU-1 se realizó con una bacteria Gram (+): *S. aureus*, presentando una CMI de 80 µg/mL comparado con un fármaco de referencia ampicilina que posee una CMI igual a 5 µg/mL y con una bacteria Gram (-): *E.coli*, donde la CMI para DU-1 fue de 30 µg/mL, comparado con el fármaco de referencia cloramfenicol que presentó una CMI menor a 5 µg/mL.

De los dos compuestos aislados, DU-1 presentó mayor actividad que DU-2, visualizado a través del bioensayo bioautografía.

Ninguno de los extractos y compuestos aislados de *Dunalia spinosa* presentaron actividad antifúngica.

Todos los extractos de *Dunalia spinosa* presentaron actividad analgésica tópica, siendo el ERES el más activo (90,8 %) comparado con el fármaco de referencia ibuprofeno. Estos resultados podrían estar avalados por la presencia de esteroides y/o triterpenos en todos los extractos, entre los que se identificaron el β-sitosterol y lupeol, además de la presencia de los compuestos aislados obtenidos, que son de naturaleza esteroide.

Al evaluar la actividad antiinflamatoria tópica, con el agente inflamatorio AA, se obtuvo que todos los extractos presentaron un efecto mayor al efecto máximo del fármaco de referencia nimesulida (48,8%).

Al observar los resultados de la actividad antiinflamatoria tópica frente a AA se podría deducir que las sustancias responsables del efecto obtenido se encuentran principalmente en los extractos ERES, EACET y EMET.

Al evaluar la actividad antiinflamatoria tópica frente al agente inflamatorio TPA, no se observó un efecto significativo, ya que sólo el extracto EACET presentó un efecto de 87,7%. El fármaco de referencia utilizado fue indometacina con una actividad de 92,9%.

Al estudiar el compuesto aislado DU-1, no se encontró actividad antiinflamatoria tópica, esto puede deberse a que la parte activa de la planta se encuentra formada por numerosos componentes y su acción farmacológica es superior a la que se obtiene con los principios activos aislados, es decir, sus componentes actuarían sinérgicamente.

En el ensayo de X.O. no se obtuvieron resultados importantes, sólo el EDCM presentó una leve actividad no importante (14,7 %).

Debido a que *Dunalia spinosa* no presenta estudios fitoquímicos ni farmacológicos anteriores y con los resultados obtenidos de las evaluaciones de las actividades analgésicas, antiinflamatorias y antimicrobianas se puede respaldar científicamente las propiedades atribuidas por la medicina folclórica a esta especie, como analgésico antiinflamatorio y antimicrobiano y con esto contribuir al conocimiento científico de esta especie vegetal.

CAPÍTULO VIII BIBLIOGRAFÍA

- * **AHMED, F., Sayeed, A., Islam, A., Salam, S., Sadik, G., Khan, G.** (2001). Characterization and in vitro antimicrobial activity of 17-hidroxy-14,20-epoxi-1-oxo-[22-R]-3-[O-d-glucopyranosyl]-5, 24-withadienolide from *Vanda Roxburghii* Br. The science 1(5):324-326.
- * **BOLETIN OFICINA SANITARIA PANAMERICANA** (1990). "Normas Internacionales para la investigación Biomédica con animales", 108 (5-6): 637- 641.
- * **BRAKO, L. y Zarucchi, J.** (1993). Catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Missouri botanical garden.45: 1286.
- * **BRAVO, J., Sauvain, M., Gimenez, A., Balanza, E., Serani, L., Laprévotte, O., Massiot, G., and Lavaud, C.** (2001). Trypanocidal Withanolides and Withanolide Glycosides from *Dunalia brachyacantha*. J. Nat. Prod. 64: 720-725.
- * **COS, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Peters, L., Vlietinck, A.J., Vander Bergehe, D.**(1998). Structure – activity relationship and classification of flavonoids as inhibitions of Xanthine oxidase and superoxide scavengers, J.
- * **DELPORTE, C., Backhouse, N., Salinas, P., San Martín, A., Bórquez, J., and Loyola, A.**, (2003). Pharmaco-toxicological study of diterpenoids. Bioorgan. Med. Chem. 11: 1187-1190.
- * **DIPAK, K.D., and Nilanjana, M.**, (1994). Antioxidant Effectiveness in Ischemia-Reperfusion Tissue Injury. Methods in Enzymology, 233: 601- 610.
- * **ERAZO, S., González, V., Zaldívar, M., and Negrete, R.** (1997). Antibacterial activity of *Psoralea glandulosa* L. Int. J. Pharmacog 3(1) 1-3.
- * **FUENTES, R.** (2003). Vegetación arbustiva y herbácea de Tarapacá. Guías de identificación y biodiversidad Chilena. Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. 11 pp.
- * **GAUTIER, E. (1954).** Apuntes de trabajos prácticos de Farmacognosia, Editorial Universitaria, Santiago, 12 – 13.
- * **GROS, E.** (1985). Introducción al estudio de productos naturales. Editorial Organización de Estados Americanos (OEA). Buenos Aires, Argentina. pp. 50.
- * **HAMBURGER, M., Cordell, G.** (1987). A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. J. Nat. Prod. 50 (1): 19-22.

- * **HOLLANDER, M. and Wolfe, D.** (1973). Nonparametric Statistical Methods. J. Wiley and Sons, New York, 27-32, 62-70.
- * **KIRSON, I., Glotter, E.** (1981). Recent developments in naturally occurring ergostane-type steroids. A review. *Journal of Natural Products*.44 (6):633-647.
- * **LISCHEWSKI, M., Thi-Bich Hang, N., Porzel, A., Adam, G., Massiot, G., and Lavaud, C.** (1992). Withanolide Glycosides from *Dunalia australis*. *Phytochemistry* 31 (3): 939-942.
- * **LLORET S. and Moreno, J.J.** (1995). Effects of an anti-inflammatory peptide (antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and edema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem. Pharmacol.* 50(3): 347-353.
- * **LUIS, J., Echeverri, F. and Gonzalez, A.** (1994). Acnistins C and D, withanolides from *Dunalia solanacea*.*Phytochemistry* 36 (5): 1297-1301.
- * **LUIS, J., Echeverri, F. and Gonzalez, A.** (1994). Acnistins F-H, withanolides from *Dunalia solanacea*.*Phytochemistry* 25 (3): 769-772.
- * **MABRY, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B. (1970).** The systematic identification of flavonoids, Editorial Springer-Verlang, New York, 35.
- * **MARTICORENA, C., Quezada, M.** (1985). Flora vascular de Chile. *Gayana Bot*, 42:71.
- * **MATSUDA, H., Murakami, T., Kishi, A., Yoshi, M.** (2001). Structures of withanosides I,II,III,IV,V,VI and VII, new withanolide glycosides from the roots of indian *Withania somnifera* Dunal. And inhibitors activity for tachyphylaxis to clonidine in isolated guinea pig ileum. *Biorganic and medicinal chemistry*, 9 1499-1507.
- * **MERCK,** (1972). Reactivos de coloración para cromatografías en capa fina y en papel. Editorial Merck, Darmstadt, Alemania, 18.
- * **MUÑOZ, O.** (1992). Química de la flora de Chile. Editorial Universitaria de Chile. Santiago, Chile. pp. 189-192.
- * **NAKANISHI, K.** (1962). Infrared absorption spectroscopy. Tokio, Nankodo company limited.
- * **NEGRETE, R.** (1997). La vegetación en el Altiplano. En: *El altiplano: Ciencia y conciencia en Los Andes. Actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos*. Arica Chile, Octubre 19 al 21, 1993, Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

- * **NORO, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. and Fukushima, S.** (1983). Inhibitors of xanthine oxidase from the flowers and bud of *Daphne genkwa*. Chem. Pharm. Bull., 31(11): 3984-3987.
- * **PIETTA, P.G.** (2000). Flavonoids as antioxidants, J.Nat.Prod., 63(7): 1035-1042.
- * **RAHALISON, L., Hamburger, M., Hostettman, K., Monod, M. and Frenk, E.** (1991). A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical Analysis, 2, 199-203.
- * **ROBBERS, J., Speedie, M. and Tyler, V.** (1996). "Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology", Ed. Williams and Wilkins, USA, pp 10-11.
- * **SANTOS, A.R., Niero, R., Filho, V.C., Yunes, R.A., Pizzolatti, M.G., Delle Monache, F. and Calixto, J.B.** (1995). Antinoniceptive properties of steroids isolated from *Phyllanthus corcovadensis* in mice. Planta Med., 61(4):329-32.
- * **SILVA, G., Burton, G. and Oberti, J.** (1999).18,20 - Hemiacetal-type and other Withanolides from *Dunalia brachyacantha*. J. Nat. Prod. 62: 949-953.
- * **THEODULOZ, C., Pacheco, P. and Schmeda-Hirschmann, G.** (1991). Xanthine oxidase inhibitory activity of chilean Myrtaceae. Journal of ethnopharmacology, 33: 253-255.
- * **UNIVERSIDAD DE TARAPACÁ ARICA.** Flora del Parque Nacional Lauca. <http://www.uta.cl/flora_nativa/lista_del_parque.html#>. [consulta: 12 noviembre 2006]
- * **UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTIN DE AREQUIPA.** (Oficina de investigación y cooperación). <http://www.unsa.edu.pe/invest_cooper/herbarium/Husaimages_archivos/04434.jpg>. [consulta: 12 noviembre 2006].
- * **WAGNER, H., Blatt, S., Zgainskli, E.M.** (1984). Plant Drug analysis. Ed. Springer-Verlag, N. Y., USA. Pp 299-305.

Anexo 6: Fotografías de la actividad antimicrobiana en superficie de agar de los extractos ERES, EDCM y EMET de *Dunalia spinosa*.

Actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el ERES de *Dunalia spinosa* a 100 µg/mL frente a *E.coli*:



Actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el ERES de *Dunalia spinosa* a 200 µg/mL frente a *E.coli*:



Actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el EDCM de *Dunalia spinosa* a 100 µg/mL frente a *E.coli*:

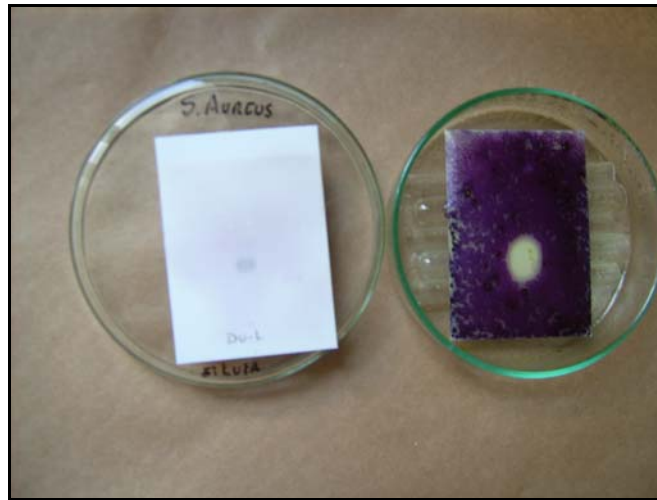


Actividad antimicrobiana en superficie de agar, para el EDCM de *Dunalia spinosa* a 200 µg/ml frente a *M. flavus* y *E.coli*:

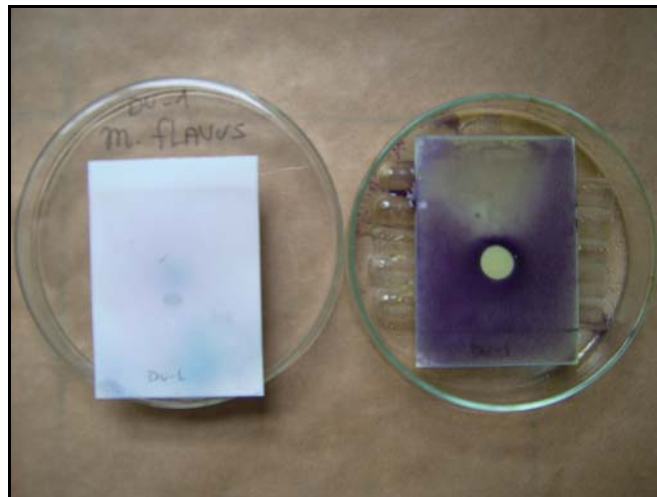


Anexo 7: Fotografías de la Actividad Antimicrobiana mediante Bioensayo Bioautografía del compuesto aislado DU-1

Actividad de DU-1 frente a *S. aureus*:



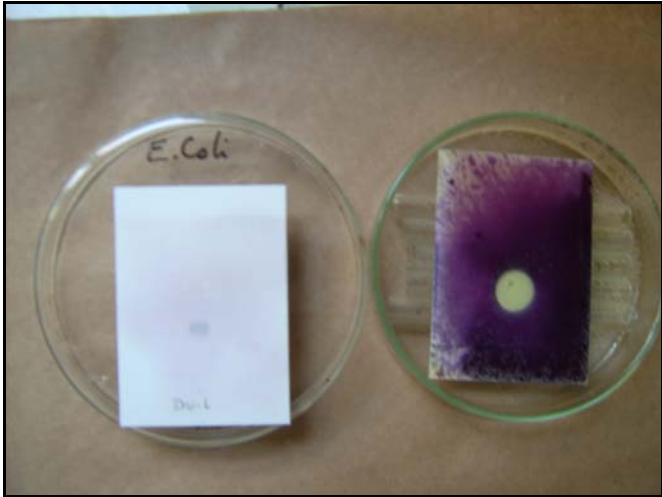
Actividad de DU-1 frente a *M. flavus*:



Actividad de DU-1 frente a *B.subtilis*:



Actividad de DU-1 frente a *E. coli*:



Actividad de DU-1 frente a *K. pneumoniae*:

