



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES

**Estudio fitoquímico y farmacológico de *Encelia canescens*
Lam. Asteraceae**

PROFESOR PATROCINANTE:
PROF. SILVIA ERAZO GIUFFRA

DIRECTORES DE MEMORIA:
PROF. RUBÉN GARCÍA MADRID
DRA. CARLA DELPORTE VERGARA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

ROXANA ALICIA SEPÚLVEDA ZURITA

SANTIAGO DE CHILE
2007

Con amor a mis padres

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que de una u otra forma han colaborado para la realización de esta memoria.

A los profesores Rubén García, Silvia Erazo, Carla Delporte, Nadine Backhouse por su ayuda, dedicación y por la entrega de sus conocimientos.

Al personal auxiliar por la ayuda prestada en el laboratorio.

A mis amigos que me han acompañado todos estos años con su amor.

A mis padres por estar en todo momento apoyándome, alentándome, entregándome comprensión y amor.

A mis hermanos gracias a la vida por que ellos son parte de mí.

A Jacqueline Castro muchas gracias.

A todos muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	
HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO III	
OBJETIVOS	4
3.1 Objetivos generales	4
3.2 Objetivos específicos	4
CAPÍTULO IV	
ANTECEDENTES GENERALES	5
4.1 Descripción botánica	5
4.2 Distribución geográfica	6
4.3 Usos en medicina popular	6
4.4 Otros usos	6
4.5 Clasificación taxonómica	7
4.6 Estudios previos	7
CAPÍTULO V	
MATERIALES Y MÉTODOS	10
5.1 Estudios químicos	10
5.1.1 Material vegetal: recolección	10
5.1.2 Obtención de los diferentes extractos	10
5.1.2.1 Obtención del infuso	13
5.1.2.2 Obtención del aceite esencial	13
5.1.3 Identificación de las principales familias de metabolitos secundarios por c.c.f.	13

5.1.4 Purificación y fraccionamiento	15
5.1.4.1 Fraccionamiento del ERES	15
5.1.4.2 Fraccionamiento del AESC	16
5.2 Identificación de los componentes del AESC y de los compuestos A y B mediante CG/masa	17
5.3 Identificación del compuesto A por diferentes técnicas espectroscópicas	17
5.4 Estudio farmacológico <i>in vivo</i>	17
5.4.1 Aspectos éticos a considerar para el trabajo con animales	17
5.4.2 Determinación de la toxicidad aguda por vía oral y determinación de la dosis letal 50 (DL ₅₀)	18
5.4.3 Determinación de la actividad analgésica tópica del EMGpa	19
5.4.4 Determinación de la actividad analgésica vía oral	20
5.5. Estudios farmacológicos <i>in vitro</i>	21
DPPH	22
5.5.2 Determinación de la actividad antioxidante a través del ensayo de inhibición de la actividad de la xantino oxidasa	23
5.5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía	25
5.5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto aislado A por siembra en superficie agar.....	26
5.5.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto activo aislado	27
 CAPÍTULO VI	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6.1 Estudio químico	29
6.1.1 Rendimiento en la obtención de los diferentes extractos e infuso	29
6.1.2 Resultados de la identificación de los principales grupos químicos de los diferentes extractos por c.c.f.	30
6.1.3 Purificación y fraccionamiento	33
6.1.4 Característica de Encecanescina	33

6.2 Análisis por cromatografía y espectrometría de masas del AESC y del compuesto separado (B)	33
6.3 Técnicas espectroscópicas realizadas en compuesto A	35
6.3.1 Espectro de IR	35
6.3.2 Espectro de UV	35
6.3.3 Espectro de ¹³ C-RMN	35
6.3.4 Espectro de ¹ H-RMN	36
6.3.5 Espectro de HMQC	37
6.3.6 Espectro de HMBC.....	37
6.3.7 Espectro de masas	40
6.4 Estudio farmacológico	41
6.4.1 Estudios <i>in vivo</i>	41
6.4.1.1 Determinación de la actividad tóxica vía oral y determinación de la DL ₅₀	41
6.4.1.2 Determinación de la actividad analgésica tópica	43
6.4.1.3 Determinación de la analgesia vía oral	44
6.4.2 Estudios farmacológicos <i>en vitro</i>	44
6.4.2.1 Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH	44
6.4.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante a través del ensayo de la inhibición de la xantino oxidasa	45
6.4.2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía.....	46
6.4.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto aislado A por siembra superficie de agar	48
6.4.2.5 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	49
CAPÍTULO VII	
CONCLUSIONES	50
CAPÍTULO VIII	
BIBLIOGRAFÍA	53
GLOSARIO	57
ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Obtención de los diferentes extractos a partir del material vegetal molido de la parte aérea.....	11
FIGURA 2. Esquema de extracción de la resina y obtención de los diferentes extractos a partir de las hojas frescas.....	12
FIGURA 3. Curva comparativa del cambio de peso de los ratones después de la administración del EMGpa y de los animales controles.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
TABLA I.	Fases móviles de los distintos extractos utilizados para el estudio cromatográfico.....	13
TABLA II.	Protocolo del ensayo de DPPH.....	22
TABLA III.	Protocolo del ensayo de inhibición de la x.o	24
TABLA IV.	Microorganismos utilizados para los ensayos microbiológicos	26
TABLA V.	Rendimiento de las extracciones sucesivas por solventes de polaridad creciente de la parte aérea de <i>E. canescens</i>	29
TABLA VI.	Rendimiento de la extracción sucesiva a partir de 200 g de hojas frescas de <i>E. canescens</i> y de las hojas secas y molidas post extracción del ERES	30
TABLA VII.	Resultado del <i>screening</i> de identificación por c.c.f. de los extractos de la parte aérea.....	31
TABLA VIII.	Resultado del <i>screening</i> de identificación por c.c.f.. de los extractos e infuso de las hojas frescas	32
TABLA IX.	Características de los compuestos aislados (A) de la resina y el compuesto aislado (B) del aceite esencial	33
TABLA Xa.	CG/masa del aceite esencial	34
TABLA Xb.	CG/masa del compuesto B	34
TABLA XI.	Espectro HMQC del compuesto A	37
TABLA XII.	Espectro HMBC del compuesto A	38
TABLA XIII.	Asignación de señales obtenidas al realizar los espectros de ¹³ C-RMN ¹ H-RMN para el compuesto A en comparación con la literatura.....	39
TABLA XIV	Registro comparativo de los pesos de los ratones después de la Administración del EMGpa para la evaluación de la toxicidad aguda	42
TABLA XV	Actividad analgésica vía tópica mediante el ensayo de la formalina en la cola con el EMG pa	43
TABLA XVI	Actividad analgésica vía oral del EMGpa mediante el ensayo de contorsiones abdominales	44

TABLA XVII.	Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo de DPPH para el EMGpa.....	45
TABLA XVIII.	Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo del DPPH para el fármaco de referencia quercetina.....	45
TABLA XIX.	Evaluación de la actividad inhibitoria de la x.o. para los diferentes extractos y del fármaco de referencia alopurinol	45
TABLA XX.	Evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos de la parte aérea de la planta.....	46
TABLA XXI.	Evaluación antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos de las hojas frescas	47
TABLA XXII.	Evaluación antimicrobiana del exudado resinoso, aceite esencial y unos compuestos separados del aceite.....	47
TABLA XXIII.	Evaluación antimicrobiana de los compuestos separados de la ERES.....	48
TABLA XXIV.	Resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar del compuesto aislado A	49

RESUMEN

Estudio fitoquímico y farmacológico de *Encelia canescens* Lam., Asteraceae

Encelia canescens Lam., familia Asteraceae de nombre vulgar “coronilla del fraile”, es un arbusto autóctono, que habita desde la I a la IV Región de Chile, zona costera de Perú y norte de Argentina.

Esta especie no tiene estudios farmacológicos, sólo se encuentra literatura de especies que habitan en el Perú. El uso dado por la medicina popular es como galactófora y contra la retención de orina, en cambio otras especies del género son utilizadas como analgésicas para el dolor de muelas, además del uso ornamental, apícola y el llamado corredor biológico.

La recolección fue realizada en julio del 2006 en la III Región en el Valle del Río Huasco. Se procedió a realizar un estudio químico y farmacológico por separado, tanto de la parte aérea seca y molida y de las hojas frescas de la planta.

De la extracción sucesiva con solvente de polaridad creciente de la parte aérea seca y molida de la planta, se obtuvieron los diferentes extractos: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (ACET) y el extracto metanol seriado (MEOH). El extracto resinoso (ERES) fue obtenido extrayendo con diclorometano desde las hojas frescas. El material vegetal sin resina fue extraído de la misma manera anterior, obteniendo los extractos: EHEX, EDCM, EACET y EMEOH. El infuso (INF) fue preparado *in situ* con 20 g de hojas frescas en 100 mL de agua hirviendo, dejándola enfriar antes de filtrarla.

El aceite esencial (AESC) fue obtenido por hidrodestilación desde el material vegetal seco y molido de la parte aérea y desde las hojas frescas, usando un aparato Clevenger, cubriendo el material con agua destilada e hirviéndolo por más de cuatro horas.

Los extractos metanólicos globales fueron obtenidos desde la planta aérea (EMGpa) y de las hojas frescas (EMGh).

Los principales compuestos presentes en los diferentes extractos fueron separados a través de cromatografías en capa fina, utilizando distintos reactivos reveladores y lámpara UV. Tanto en el material vegetal seco y molido de la parte aérea, como las hojas frescas se encontraron metabolitos mayoritarios como esteroides y/o triterpenos, flavonoides y cumarinas.

El análisis del AESC fue realizado mediante un método por cromatografía de gases y espectrometría de masas, donde fueron identificados 12 compuestos de 16.

El ERES y el AESC fueron fraccionados a través de columnas rápidas de gel de sílice, logrando aislar dos compuestos A y B respectivamente. El compuesto A, obtenido desde el ERES, fue identificado por técnicas espectroscópicas como un derivado cromeno 6,6'-(oxidietilidino) bis [7-metoxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano] llamado enecanescina. El compuesto B, aislado desde el AESC, fue identificado por un espectro gas/masa como dimetilencecalina.

La evaluación toxicológica *per os* del EMGpa ensayado en ratones a la dosis de 2 g/kg, no fue tóxico, ni presentó alteraciones en de los diferentes órganos. La actividad analgésica tópica *in vivo* del EMGpa frente al ensayo de la formalina en la cola del ratón fue de un 52 %, siendo menor al efecto máximo del fármaco de referencia ibuprofeno (76,5 %). La analgesia *per os* del EMGpa, mediante el ensayo de las contorsiones abdominales presentó un 40,5 % de efecto, el cual fue menor respecto al fármaco de referencia naproxeno sódico (70 %).

En las evaluaciones farmacológicas *in vitro*, el EMGpa no presentó actividad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo de DPPH. Los ERES, EHEX, EACET de la parte aérea no presentaron actividad antioxidante a través del ensayo de la inhibición de la actividad de la xantino oxidasa.

La actividad antimicrobiana ensayada por la técnica bioensayo bioautografía demostró que los extractos obtenidos desde la parte aérea presentaron actividad frente a las bacterias *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. flavus*, *K.pneumoniae* y *E. coli*, y no fueron activos frente a los hongos *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

El ERES y el compuesto A presentaron actividad frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *K.pneumoniae* y *E.coli*. El compuesto B resultó activo frente a *B. subtilis*, *K.pneumoniae* y *E.coli*.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del compuesto A frente a *B. subtilis* fue de 240 ug/mL. La CMI de la sustancia B no se determinó, dado que se obtuvo una muestra muy pequeña.

SUMMARY

Phytochemical and pharmacological study of *Encelia canescens* Lam., Asteraceae

Encelia canescens Lam., Asteraceae, known as “coronilla de fraile”, is a native shrub that inhabit from I to IV Region of Chile, coastal zone of Peru and northern Argentina.

This species has no pharmacological studies, the literature refers only to species living in Perú. This plant was used by popular medicine as galactophore and against urine retention. In addition other species of the genus are used as analgesic for toothache, besides as ornamentals, and the so-called “biological corridor”.

The plant was collected in July 2006 in the III Region of the Huasco River Valley. The chemical and pharmacological studies were carried out separately with the dry aerial part and the fresh leaves of the plant.

Successive extraction with solvent of increasing polarity of the aerial part of the plant yielded the different extracts: hexane (EHEX), dichloromethane (EDCM), ethyl acetate (EACET) and serial methanol extract (EMEHOH). The resinous extract (ERES) was obtained by dichloromethane extraction from fresh leaves. The vegetal material without resin, was extracted likewise with, obtaining EHEX, EDCM, EACET and EMEOH extracts. The infuse (INF) was prepared *in situ* from 20 g of fresh leaves in 100mL of boiling water, allowing to cool before filter.

The essential oil (AESC) were obtained by hydrodistillation of vegetal material from the dry aerial plant material and from the fresh leaves using a Clevenger apparatus over a bottom rounded flask, covering the plant material with distilled water and heating over 4 hours.

The global methanol extracts were obtained from the aerial plant material (EMGpa) and the fresh leaves (EMGh)

The main compounds present in the different extracts were screened through thin layer chromatography using different chromogenic reagents and UV lamp. Triterpenes and /or sterol, flavonoids and coumarins were found as the main metabolites both from the aerial plant material and fresh leaves.

The AESC analysis was performed by means of gas chromatography-mass spectra tandem method, 12 compounds of 16 substances found were identified.

The ERES and the AESC were fractionated through fast silica gel columns, isolating two compounds named A and B. The compound A, obtained from ERES, was identified by spectroscopic techniques as a cromene derivative 6,6'-(Oxydiethylidene) bis [7-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran], called encecanscin. The compound B, isolated from de AESC, was identified by gas/mass spectra as demethyl encecalin.

The toxicological *per os* evaluation by acute assay in mice showed that EMGpa was no toxic even at a dose of 2 g/kg, neither had toxic effects or the organs showed no alteration o toxic effects. The in vivo topical analgesic activity of EMGpa assayed by the formalin test in mouse tail was about 52% less than the maximum effect of the reference drug ibuprofen (76.5%). The analgesia *per os* of EMGpa in the writhing test mice was a 40.5%, less than the maximum effect of the reference drug sodium naproxen (70%).

In vitro pharmacological evaluations showed that EMGpa had not free radical scavening activity by DPPH test, and the ERES, EHEX, EACET of the aerial part had no antioxidant activity, through xantine oxidase assay.

The antimicrobial activity assayed by bioautographic technique showed that the extracts obtained from the aerial part of the plant were active against *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. flavus*, *K. pneumoniae* and *E. coli* bacteria, and were not active against the fungus *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*.

The ERES and the compound A, were active against *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* and *K.pneumoniae*, on the other hand, the compound B was active against *B. subtilis*, *E. coli* and *K. pneumoniae*.

The minimum inhibitory concentration (MIC) of compound A against *B. subtilis* was 240 ug/mL. Substance B MIC was not determinate due to the small amount of isolated sample.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La especie vegetal nativa *Encelia canescens* Lam., familia Asteraceae, se caracteriza por crecer en una variedad de climas, desde un clima desértico de mucho frío a temperaturas moderadas, secas y hasta muy cálidas, desde la I a la IV Región de Chile, zona sur costera de Perú y parte interior del norte de Argentina (Weberbauer, 1945). Estas adaptaciones a diferentes climas han determinado que las especies de este género presenten la capacidad de generar diferentes metabolitos con interesantes actividades farmacológicas.

Esta especie no tiene estudios farmacológicos previos, sólo se conocen estudios químicos de la especie que habita en Perú, donde es más conocida y utilizada por la medicina folclórica. Por ello, en el laboratorio de Productos Naturales del Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, se realizaron estudios para contribuir al conocimiento científico de esta especie.

La medicina popular usa a *E. canescens* como galactófora y contra la retención de orina (Soukup, 1984 ; Pastor “*et al*”, 1996), en cambio otras especies del género son utilizadas como analgésicas para el dolor de muelas (Moerman, 1998), además del uso ornamental, apícola (Ríos, 2004) y forman parte del “corredor biológico”, llamado así por ser refugio de animales, atraer insectos benéficos y presentar un medio de protección al cultivo (Yañez, 2006).

Estudios químicos previos señalan el aislamiento e identificación de compuestos del tipo cromenos, cromenos dímeros, en hojas y en tallos en *E. canescens* de procedencia peruana. En otras 17 especies de *Encelia*, se han encontrado derivados de encecalina, euparina, encecanescina, 9-epiencecanescina, encecanescol y 9'-epiencecanescol. De otras especies como *E. lariniata*, *E. palmeri* y *E. ventorum*, nativas de México, se realizaron estudios de actividad fototóxica e insecticida de cromenos aislados de ellas, resultando los más activos la 6-metoxieuparina, encecalina y 7-demetilencecalina (Proksch “*et al*”, 1983).

Basándose en los resultados de los estudios fitoquímicos de 18 especies de *Encelia*, además de sus características organográficas y anatómicas, éstas fueron clasificadas en tres grupos según el

porcentaje de derivados cromenos y benzofuranos acumulados, el grupo I presenta la mayor acumulación de cromenos y benzofuranos (2-5% con respecto al peso seco en el tallo y casi nada en las hojas) donde se ubica *E. canescens* (Proksch and Clark, 1987).

En la presente memoria se hizo un estudio de la especie *E. canescens* mediante la obtención de los distintos extractos e infuso. En una primera etapa se investigaron las potenciales propiedades antimicrobianas, antifúngicas, analgésicas, antioxidantes y toxicidad de la parte aérea de la especie. En una segunda etapa se eligieron las hojas de esta especie para un estudio químico y un seguimiento de la actividad antimicrobiana.

En el estudio químico se realizó un rastreo cromatográfico previo de cada uno de los extractos para determinar el tipo de compuestos que se podrían encontrar y su concentración relativa.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS

Encelia canescens presentaría efectos analgésicos, antimicrobianos y antioxidantes, por la presencia de metabolitos secundarios responsables de estas actividades.

Esta hipótesis se basa en:

- Las propiedades terapéuticas atribuidas por la medicina popular a las diferentes especies de *Encelia*.
- La rigurosidad del medio ambiente en donde la especie habita determinaría la presencia de metabolitos secundarios protectores como antioxidantes y antimicrobianos.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 Objetivos generales:

Contribuir al conocimiento de la especie *Encelia canescens* Lam., desde el punto de vista fitoquímico y farmacológico.

3.2 Objetivos específicos:

- Obtener los diferentes extractos y el aceite esencial de *E. canescens*, para su análisis fitoquímico y evaluación farmacológica.
- Realizar un *screening* fitoquímico de los diferentes extractos y del aceite esencial.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos y del aceite esencial.
- Evaluar el grado de toxicidad aguda *in vivo* por vía oral del extracto metanólico global obtenido desde la parte aérea de la planta.
- Determinar la actividad analgésica *in vivo* del extracto metanólico global obtenido desde la parte aérea de la planta.
- Evaluar la acción antioxidante y atrapadora de radicales libres del extracto metanólico global obtenido desde la parte aérea de la planta frente a la xantina oxidasa (XO) y el ensayo de decoloración de DPPH respectivamente.
- Aislar e identificar los compuestos responsables de los efectos farmacológicos y/o de la toxicidad aguda.

CAPÍTULO IV ANTECEDENTES

4.1 Descripción botánica

Encelia canescens Lam., familia Asteraceae (nv: coronilla del fraile), es una especie autóctona, arbustiva, siempre verde, de hasta 60 cm de altura, el tallo es de color verde plumizo por la presencia de pilosidad blanca y muy ramificado. Las hojas son pecioladas y alternas. Las inflorescencias son capítulos terminales con involucre con dos filas de brácteas lanceoladas. Las flores marginales y liguladas son femeninas y de color amarillo; las flores centrales y tubulosas, de color café, pentadentadas, con receptáculo calicino gamosépalo (sin dientes) que rodea al ovario, y un penacho de pelos blancos; estambres con anteras unidas; ovario ínfero con estilo dividido en 2 ramas pilosas. El fruto es un aquenio (Linares, 2000).





4.2 Distribución geográfica

Se desarrolla en suelos arenosos y secos, en laderas de cerros y bordes de la carretera común a lo largo de la costa peruana, de la I hasta IV Región de Chile e interior norte de Argentina (Weberbauer, 1945).

4.3 Uso en la medicina popular

A la especie peruana (mancapanqui) le atribuyen propiedades como galactófora y contra la retención de orina (Soukup, 1984; Pastor “*et al*”, 1996). Otras especies del género se utilizan como analgésico para el dolor de muelas (Moerman, 1998).

4.4 Otros usos

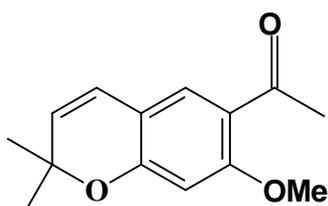
Se considera de uso ornamental y apícola (Ríos, 2004), también forman los llamados corredores biológicos, que tienen por finalidad actuar como refugio para animales, atraer insectos benéficos y presentar un medio de protección al cultivo (Yañez, 2006).

4.5 Clasificación taxonómica

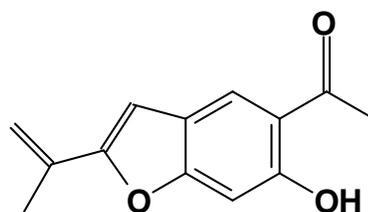
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Género:	Encelia
Nombre científico:	<i>Encelia canescens</i> Lam.
Nombre vulgar: :	coronilla del fraile

4.6 Estudios previos

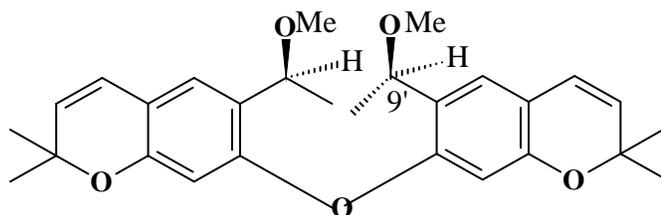
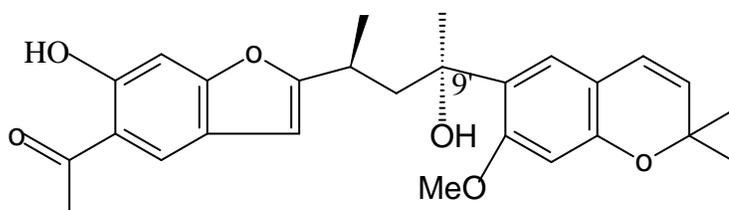
La información obtenida en la literatura, indica que no se han realizados estudios farmacológicos para esta especie, solamente se han desarrollado estudios químicos para *E. canescens*, del Perú, donde se han aislado e identificado diversos cromenos y cromenos dímeros como enecalina (1), euparina (2), encecanescina (3), 9-epiencecanescina (4), encecanescol (5) y 9'-epiencecanescol (6) (Bohlmann "et al", 1983).



Enecalina (1)



Euparina (2)

Encecanescina (9' α -Me) (3)9-epiencecanescina (9' β -Me) (4)Encecanescol (9' α -Me) (5)9-epiencecanescol (9' β -Me) (6)

De otras especies como *E. lariniata*, *E. palmeri* y *E. ventorum* nativas de México, se realizaron estudios de actividad fototóxica e insecticida a cromenos aislados, siendo los más activos la 6-metoxieuparina, encecalina, y 7-dimetilencecalina (Proksch “*et al*”, 1983).

Un análisis fitoquímico realizado a diferentes especies de *Encelia* (18), basándose en contenidos de derivados cromenos y benzofuranos, con un sistema de comparación sistémica de perfiles químicos, permitió agrupar a las distintas especies afines según su organografía y anatomía, resultando tres grupos, en que el grupo I presenta una abundante acumulación de cromenos y benzofuranos (2-5% con respecto al peso seco en el tallo y casi nada en las hojas) donde se ubica

E. canescens; el grupo II, que presenta una menor cantidad acumulada y el grupo III, que presenta una cantidad mínima acumulada (Proksch and Clark, 1987).

CAPÍTULO V

MATERIALES Y METODOS

5.1 Estudio Químico

5.1.1 Recolección

La recolección de las hojas frescas y la parte aérea (constituida por tallo, hojas y flores) de *Encelia canescens* Lam. Asteraceae, fue realizada en julio del 2006 en la III Región en el Valle del Río Huasco. Una muestra testigo de la planta identificada por la Dra. Carla Delporte, se conserva en el Herbario de la Escuela de Química y Farmacia (SQF) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile bajo el N° 22259.

5.1.2 Obtención de los diferentes extractos

Se realizó la investigación química a dos muestras diferentes:

A) Parte aérea seca y molida de la planta

De la muestra seca y molida (871 g) se obtuvieron los diferentes extractos agotándolo en forma sucesiva con hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (ACET) y metanol (MEOH). Una vez concentrados los extractos y llevados a sequedad, permitió obtener los extractos: hexánico (EHEX), diclorometánico (EDCM), acetato de etilo (EACET) y el metanólico seriado (EMEOH) (**Figura 1**). El extracto metanólico global (EMGpa) se obtuvo pesando 100 g de la parte aérea seca y molida de la planta, la cual fue sometida a una extracción hasta total agotamiento con metanol.

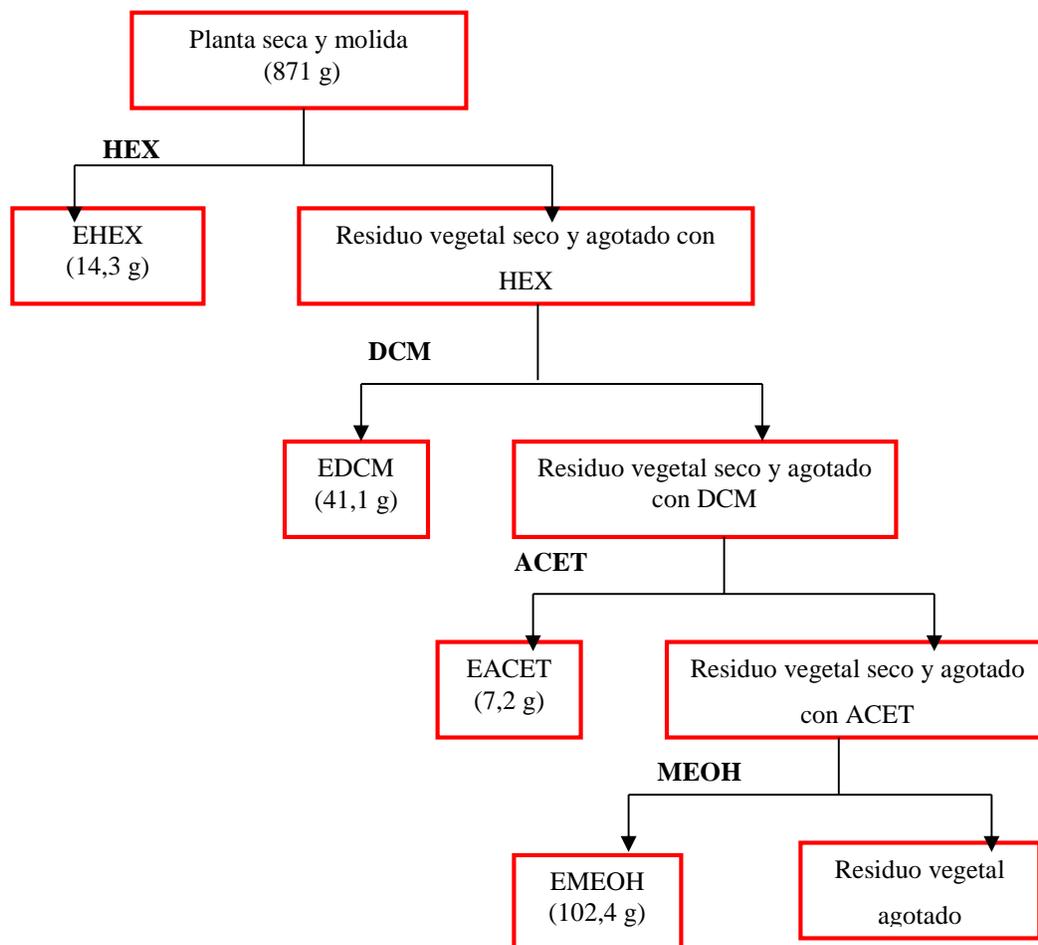


Figura 1: Obtención de los diferentes extractos a partir del material vegetal molido de la parte aérea.

B) Hojas frescas de la planta

Desde las hojas frescas (200 g) se obtuvo el extracto resinoso (ERES), extrayendo con diclorometano el material vegetal. El material vegetal carente del exudado resinoso, se secó a temperatura ambiente y luego de ser molido se procedió a la extracción sucesiva con disolventes de polaridad creciente, comenzando con hexano (HEX), diclorometano (DMC), acetato de etilo (ACET) y metanol (MEOH) hasta agotamiento total, dejando secar el marco vegetal a temperatura ambiente antes de adicionar el siguiente disolvente. Una vez concentrados y llevados a sequedad, se obtuvieron cuatro extractos: extracto hexánico (EHEX), extracto diclorometánico (EDCM), el extracto de acetato de etilo (EACET) y el extracto metanólico

seriado (EMEOH) (**Figura 2**). El extracto metanólico global (EMGh) se obtuvo pesando 100 g de las hojas frescas y molida de la planta, la cual fue sometida a una extracción hasta total agotamiento con metanol.

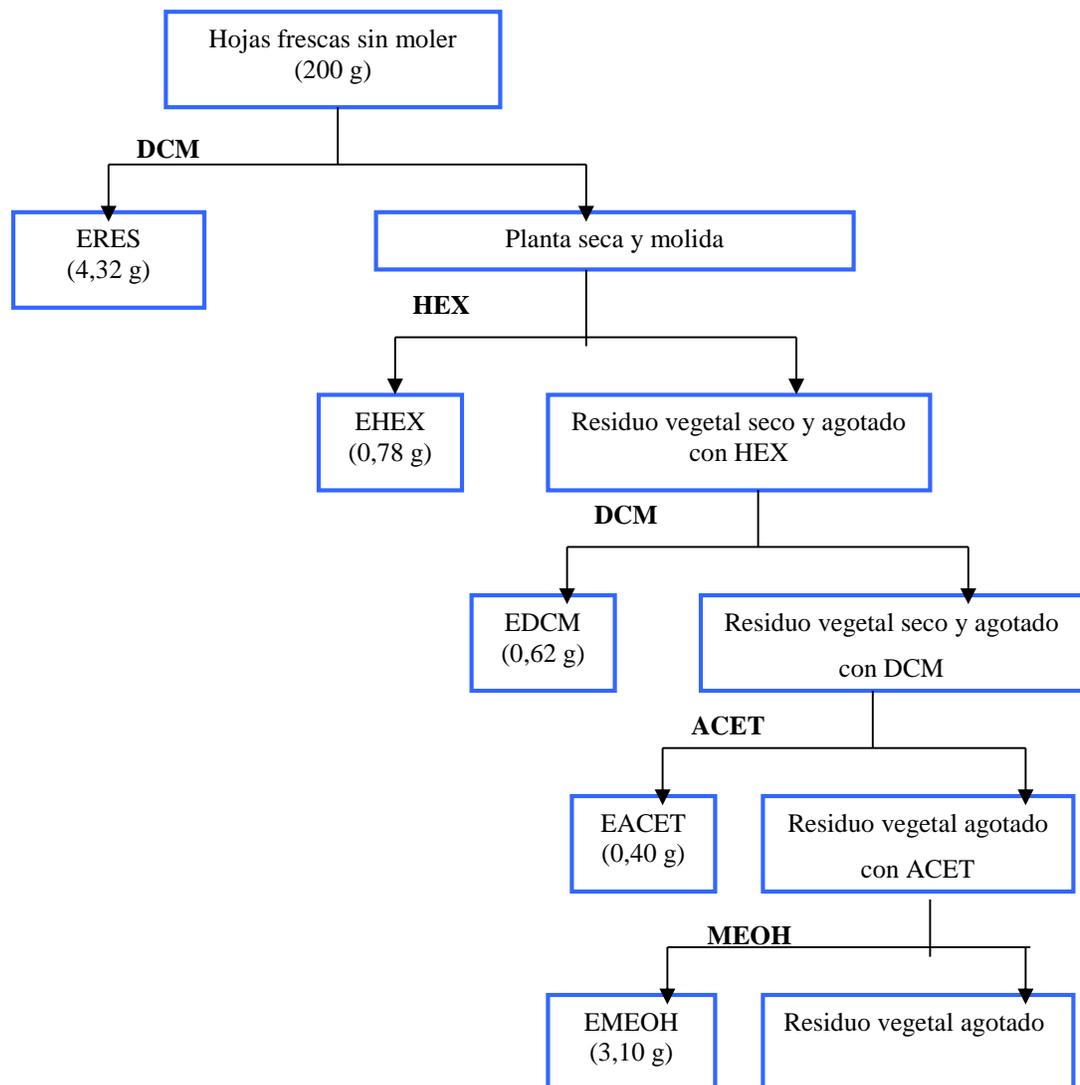


Figura 2: Esquema de extracción de la resina y obtención de los diferentes extractos a partir de las hojas frescas.

5.1.2.1. Obtención del infuso

Para obtener el infuso (INF) al 20%, se pesaron 20 gramos de las hojas frescas de la planta, luego se agregaron 100 mL de agua hirviendo, se maceró por 30 minutos y finalmente se filtró para obtener el INF.

5.1.2.2 Obtención del aceite esencial

El aceite esencial (AESC) fue obtenido desde la parte aérea (300 g) y desde las hojas frescas (300 g) por arrastre con vapor de agua. Para esto se colocó el material vegetal en un extractor provisto de un aparato de Clevenger, calentando por lo menos tres horas. Al cabo de este tiempo se midió la cantidad de aceite esencial extraído, se retiró y secó con sulfato de sodio anhidro y fue envasado en un recipiente oscuro en ambiente nitrogenado, manteniéndose al abrigo de la luz y refrigerado hasta su uso.

5.1.3 Identificación de las principales familias de metabolitos secundarios por c.c.f.

Se realizó un rastreo cromatográfico de los diferentes extractos e infuso, con el propósito de investigar la presencia de metabolitos secundarios, mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.), empleándose cromatoláminas de gel de sílice G tipo 60 con indicador de fluorescencia (Merck). Las fases móviles utilizadas en este estudio, se indican en la Tabla I. Las c.c.f. fueron reveladas con diferentes reactivos cromogénicos y además analizadas por fluorescencia bajo luz UV a las longitudes de onda de 254 y 366 nm.

Tabla I: Fase móvil de los distintos extractos utilizados para el estudio cromatográfico

Extractos	Fase móvil
ERES	DCM:100
EHEX	DCM:ACET=9,5:0,5
EDCM	DCM:ACET=6:4
EACET	ACET=100
EMEOH	ACET:MEOH=3:7
INF	DCM:ACET=4:6

Los reactivos reveladores utilizados para identificar los diferentes grupos químicos fueron los siguientes:

Alcaloides

Reactivo de Dragendorff: Constituido por yoduro doble de bismuto y potasio, puede detectar alcaloides y aminas cuaternarias (Merck, 1972).

Terpenos y esteroides

Reactivo de Liebermann-Burchard: Se emplea para 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. El reactivo está constituido por partes iguales de anhídrido acético y de ácido sulfúrico (Merck, 1972).

Reactivo de p-anisaldehído sulfúrico: Está constituido con p-anisaldehído, ácido acético y ácido sulfúrico. Detecta 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

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 EMEOH 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 1 g de la droga o extracto vegetal seco, en un volumen apropiado de agua destilada (Gautier, 1954).

5.1.4 Purificación y fraccionamiento

El fraccionamiento fue realizado al ERES y al AESC de *E. canescens* por presentar la mayor actividad antimicrobiana, se utilizaron columnas rápidas de gel de sílice.

5.1.4.1 Fraccionamiento de ERES

- Primera columna rápida de gel de sílice:

Se obtuvieron 8 fracciones del ERES, las cuales fueron:

- HEX:DCM (80:20) 2 ; 2,1
- HEX:DCM (60:40) 3
- HEX:DCM (40:60) 4
- DCM (100) 5
- DCM:ACET (80:20) 6; 6,1; 6,2; 6,3
- DCM:ACET (70:30) 7
- ACET (100) 8; 8,1
- MEOH (100) 9; 9,1

De estas fracciones se procedió a realizar la actividad antimicrobiana, encontrando actividad en 2,1; 3; 4; 6,2; 6,3. Las cromatografías se realizaron en HEX:DCM (50:50).

Se eligió la fracción 2,1 para realizar una columna rápida, debido a su actividad antimicrobiana y lograr mayor purificación.

- Segunda columna rápida de gel de sílice de la fracción 2,1:

Se obtuvieron 8 fracciones, los cuales fueron:

- HEX (100) 1 al 6
- HEX:DCM (98:2) 9
- HEX:DCM (96:4) 12
- HEX:DCM (94:6) 15
- HEX:DCM (96:8) 16
- DCM (100) 19
- DCM:MEOH (50:50) 21
- MEOH (100) 22

La fracción 19 de esta columna estaba constituida por una sustancia pura de color azul al revelar con p-anisaldehído sulfúrico, a esta sustancia se le denominó A.

5.1.4.2 Fraccionamiento del AESC

- Columna rápida de gel de sílice:

Se obtuvieron 5 fracciones desde el AESC, las cuales fueron:

- HEX (100) 2
- HEX:DCM (85:15) 10, 12, 37
- DCM (100) 41, 45, 46, 66
- DCM:MEOH (90:10) 73
- MEOH (100) 82, 87

La fracción 37 estaba constituida por un compuesto denominado B.

Las fracciones 37, 45 y 46 fueron sometidas al estudio de la actividad antimicrobiana, encontrándose actividad significativa en todas ellas. Las c.c.f. fueron desarrolladas en DCM (100).

5.2 Identificación de los componentes del AESC y de los compuestos A y B mediante CG/masa

Este análisis fue realizado en el Centro de Estudios para el Desarrollo de la Química (CEPEDEQ) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Se analizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, empleando un equipo GC Fisons, volumen de inyección de 1 µl.

Las condiciones del análisis fueron: Gas carrier: Helio, temperatura inicial: 70°C (4 min), 10°C/min, 200°C (1 min), 20°C/min, 300°C (2 min), temperatura del inyector 250°C.

La identificación de los compuestos se efectuó mediante la comparación de los espectros de masa obtenidos con los de la base de datos controlada por el computador (NIST database).

La cuantificación se realizó por el método de porcentaje de áreas.

5.3 Identificación del compuesto A por diferentes técnicas espectroscópicas

La identificación estructural de la sustancia aislada se realizó mediante estudios espectroscópicos de: ultravioleta (UV), infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protones (¹H-RMN a 300 MHz), de carbono 13 (¹³C-RMN a 50 MHz), y técnicas espectroscópicas como COSY, DEPT, HMQC Y HMBC realizados en CEPEDEQ de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

5.4 Estudio farmacológico *in vivo*

5.4.1 Aspectos éticos a considerar para el trabajo con animales

En virtud al trato humanitario y mitigador del dolor de los animales utilizados en esta investigación, se consideran las “Normas Internacionales en Investigación Biomédicas que involucra el uso de animales”. Esta reglamentación ha sido elaborada por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias médicas en Ginebra (Boletín Oficina Sanitaria Panamericana, 1986), y son aplicadas por la Unidad de Pruebas Biológicas del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), unidad en donde se desarrollaron los ensayos farmacológicos.

5.4.2 Determinación de la toxicidad aguda por vía oral y determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀)

Se evaluó la toxicidad del EMGpa, con este fin se utilizaron ratones de la cepa CF-1 no consanguíneos machos, el número de animales fue de 8 para el grupo tratado y de 6 para el grupo control. La dosis administrada fue de 2g/kg del EMGpa suspendido en goma arábica salina al 5% en volúmenes de 0,4 mL para ratones de 25 g de peso por medio de una sonda de alimentación gástrica. Los animales del grupo control recibieron solamente el vehículo. Los animales se mantuvieron en observación por catorce días con alimento, agua y a temperatura ambiente, controlando su peso en forma diaria (Delporte “*et al*”, 1998; Olivares, 2001).

Luego de haber administrado el extracto, son observados para detectar mortalidad o la aparición de los siguientes signos clínicos:

- Signos motores: movimientos, convulsiones, caída del tren posterior, somnolencia.
- Signos respiratorios: jadeos y cianosis.
- Signos gastrointestinales: diarrea y emesis.
- Salivación y pilo erección.

Esta observación se realizó durante las primeras cuatro horas y luego diariamente durante los catorce días siguientes.

Se debía realizar la necropsia a los animales que mueren durante el experimento, como aquellos que queden vivos una vez terminado el periodo de observación, sacrificándolos mediante dislocación cervical y realizando un análisis morfológico y fisiopatológico de los principales órganos con el objeto de determinar si hubo alteraciones, en comparación con los animales controles que solo recibieron la solución salina de goma arábica al 5% (Jiménez y Padilla, 1999).

Aunque los animales fueron pesados diariamente, sólo los pesos de los días uno y catorce fueron comparados estadísticamente, con el fin de detectar si hubo diferencias significativas entre el periodo inicial y final.

Si se produjese muerte de los animales en este ensayo se debe determinar la dosis letal cincuenta (DL₅₀ dosis que produce la muerte al 50 % de los animales) para lo cual se administran distintas dosis y para el cálculo de la DL₅₀ se utiliza el programa PCS Farm, al cual se ingresan las distintas dosis y los niveles de respuesta, en este caso mortalidad, para cada dosis. El programa realiza la regresión lineal dada por la relación probit-log de la dosis según el método gráfico

numérico modificado para computadores de Lichfield y Wilcoxon, que entrega la DL_{50} y el intervalo de confianza al 95 % (Cubillos “*et al*”, 1999).

5.4.3 Determinación de la actividad analgésica tópica del EMGpa

Ensayo de la formalina en la cola

Se utilizaron ratones de la cepa CF-1 no consanguíneos machos, cuyo peso varió entre los 20 a 25 g y su edad entre los 30 a 35 días de la Unidad de pruebas Biológicas del ISP.

En todas las evaluaciones farmacológicas los animales se mantuvieron en ayunas durante 12 horas previas a cada ensayo con agua *ad libitum* y a temperatura ambiente.

En cada ensayo se trabajó con 10 animales, dejando 2 de ellos como controles, agregando estos a un “pool” de animales controles, constituido por 16 animales controles.

Este ensayo identifica principalmente analgésicos periféricos (Kolesnikov “*et al*”, 2004; Delporte “*et al*”, 2007).

El EMGpa se administró por vía tópica, sumergiendo por tres minutos la cola de los animales en un tubo de ensayo que contiene una solución al 5% p/v del extracto en dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente se inyectó formalina al 10% vía intradérmica en el primer tercio de la cola, que es el agente algésico. Luego se continuó contando durante cinco minutos el tiempo de lamidas que realiza el ratón en el sitio de inyección. Para poder contabilizar las lamidas del ratón se introdujeron en una cámara de vidrio, con espejos en tres de sus caras, con el objetivo de optimizar la observación de los animales durante el conteo (Delporte “*et al*”, 2007). El mismo procedimiento se siguió para el grupo control, en este caso la cola del ratón se sumergió en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) en ausencia del extracto.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por el método estadístico no paramétrico de Wilcoxon para los datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativo para un $p < 0,05$.

Para calcular el efecto se determina la mediana del tiempo de lamidas \pm SEM, y se comparan las medianas del grupo tratado con la mediana del grupo control mediante la siguiente fórmula (Delporte “*et al*”, 2007).

Porcentaje de dolor

$$\%D = (C_m/C_c) \times 100$$

donde:

%D: Porcentaje de dolor.

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

C_c: Mediana del tiempo de lamidas de los animales controles.

Porcentaje de la actividad analgésica tópica

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

donde:

%D: Porcentaje de dolor.

Como fármaco de referencia se utilizó el ibuprofeno.

5.4.4 Determinación de la analgesia vía oral**Ensayo de las contorsiones abdominales**

Este ensayo tiene como objetivo determinar la actividad analgésica vía oral del EMGpa de *E. canescens*, el cual se evaluó a través del método de las contorsiones abdominales inducida por ácido acético (agente algésico).

Se utilizaron ratones de la cepa CF-1 no consanguíneos machos, cuyo peso varió entre los 20 a 25 g.

En cada ensayo se trabajó con 10 animales, dejando 2 de ellos como controles, agregando éstos a un “pool” de 16 animales controles.

Se administró el extracto previamente disuelto en goma arábica salina al 5%, por medio de una sonda de alimentación gástrica, en dosis de 200 mg/kg de peso de ratón. Después de una hora se inyectó por vía i.p. una solución acuosa con 0,5 mL/25 g de peso de ratón de ácido acético al 0,6% (agente algésico), los animales se colocaron individualmente en una cámara de vidrio, con espejos en tres de sus caras. El número de contorsiones (respuesta del dolor) fue contabilizado luego de cinco minutos de la administración del agente algésico (Delporte “*et al*”, 2007), comparando con los animales del grupo control, a los que sólo se le administró el vehículo, goma arábica salina al 5% y el agente algésico.

Las contorsiones se describen como las contracciones de los músculos abdominales, acompañados por la elongación del cuerpo y extensión de las patas traseras.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron por el método estadístico no paramétrico de Wilcoxon para los datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativo para un $p < 0,05$.

El efecto analgésico se determinó en relación a la disminución de las contorsiones abdominales, expresado en porcentaje.

Para calcular el efecto se determina la mediana de las contorsiones abdominales \pm SEM, y se comparan las medianas del grupo tratado con la mediana del grupo control. La actividad analgésica oral se calculó mediante la siguiente fórmula.

Porcentaje de dolor

$$\%D = (C_m/C_c) \times 100$$

donde:

%D: Porcentaje de dolor.

C_m: Mediana de las contorsiones de los animales que reciben la muestra.

C_c: Mediana de las contorsiones de los animales controles.

Porcentaje de efecto analgésico

$$\%E = 100 - \%D$$

donde:

%D: Porcentaje de dolor.

Como fármaco de referencia se utilizó el naproxeno sódico.

5.5 Estudios farmacológicos *in vitro*

Los estudios *in vitro* se realizaron en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéutica de la Universidad de Chile. En el Laboratorio de Productos Naturales fueron llevados a cabo los ensayos de decoloración del DPPH y el ensayo de la inhibición de la actividad de la xantina oxidasa (XO). En el laboratorio de microbiología fueron realizados los ensayos para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

5.5.1 Determinación de la actividad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH

Este ensayo se fundamenta en que el radical 2,2 difenil-1-picril hidrazilo hidratado (DPPH) de color violeta intenso, cuya longitud de onda de máxima absorbancia es de 517 nm, al ser capturado por compuestos atrapadores de radicales libres forma un compuesto estable incoloro. Con esto es posible cuantificar la capacidad capturadora de radicales libres que posean distintas sustancias mediante la determinación del grado de decoloración que dichos compuestos provocan a una solución metanólica de DPPH (Amie “*et al*”, 2003).

Se utilizó una solución metanólica recién preparada del radical DPPH de 20 mg/mL. Se prepararon soluciones metanólicas de los extractos en estudio en un rango de concentración de 1 a 200 ug/mL de acuerdo a la actividad encontrada. De acuerdo al protocolo que aparece en la siguiente Tabla II, se mezclaron volúmenes constantes de DPPH y soluciones de las muestras por triplicado, para luego de cinco minutos leer la absorbancia en el espectrofotómetro UNICAM a una longitud de onda 517 nm.

Tabla II: Protocolo del ensayo de DPPH

	MUESTRA	BLANCO DE MUESTRA	CONTROL DPPH
Muestra (uL)	375	375	0
DPPH (uL)	750	0	750
Metanol (uL)	0	750	375
Volumen Total	1,125	1,125	1,125

EL cálculo del porcentaje de decoloración que corresponde a la capacidad atrapadora de radicales libres, se determinó utilizando la siguiente fórmula:

Porcentaje de decoloración

$$\% \text{ Decoloración} = [1 - (A_m / A_c)] \times 100$$

donde:

Am: Absorbancia de la muestra.

Ac: Absorbancia del control.

Un valor igual a cien corresponde a la máxima capacidad atrapadora de radicales libre y un valor cercano a cero indica una nula capacidad, por lo que el grado de decoloración indica la eficiencia de los extractos como capturadores de radicales libres. Como compuesto de referencia se utilizó la quercetina. Cada determinación se realiza por triplicado, calculando el promedio del % de decoloración \pm la desviación estándar (Feresin *et al*, 2002).

5.5.2 Determinación de la actividad antioxidante a través del ensayo de inhibición de la actividad de la xantino oxidasa

La enzima xantino oxidasa (XO) cataliza la oxidación de la hipoxantina a xantina (X) y ácido úrico, al mismo tiempo y en presencia de oxígeno se produce la reducción de éste, generando el radical libre anión superóxido. En la fase de reperusión de un tejido previamente isquémico, XO produce grandes cantidades de anión superóxido capaces de producir la lipoperoxidación de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares produciendo la lesión de ellas. Para evaluar si la muestra en estudio inhibe la XO se mide el ácido úrico el cuál presenta una absorción (A) a una λ de 290 nm en un espectrofotómetro UNICAM (Kalckar, 1947).

La solución de 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 de 0,006 ug/mL en buffer de Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 a un pH de 7,5. Para determinar la concentración de la enzima a utilizar se ensayó a distintas concentraciones para obtener el gráfico A vs concentración. La concentración de la enzima que dio la A requerida para trabajar (0,300 y 0,400) fue de 0,006 ug/mL.

Los extractos fueron evaluados a 50 ug/mL (Theoduloz “*et al*”, 1991). A las muestras en estudio se les adiciona 3 a 4 gotas de DMSO y el agua bidestilada, se procede se lleva a sonicar para alcanzar mayor solubilidad. Las muestras fueron evaluadas en duplicado y según el protocolo que se muestra en la siguiente Tabla III

Tabla III: Protocolo del ensayo de inhibición de la XO

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 1, 2, 3 y 4 se preincubó las mezclas a 25°C por 15 minutos. A continuación se adicionó a todos los tubos X y se incubó a 25°C por 30 minutos (para que la X esté a la temperatura de las muestras se colocó en el baño junto con éstas.). Para finalizar, la reacción fue detenida con HCL y se procedió a leer la absorbancia (A) del ácido úrico a 290 nm (Noro “*et al*”, 1983), en un espectrofotómetro UNICAM (Kalckar, 1947).

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

Porcentaje de inhibición de la XO

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

donde:

- 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.
AC – AD:	Absorbancia del ácido úrico remanente.

El fármaco de referencia utilizado fue el alopurinol y para determinar su concentración inhibitoria cincuenta (IC_{50}) se ensayaron diferentes concentraciones de este fármaco. Del gráfico %I vs concentración se obtuvo el IC_{50} que resultó ser 0,035 ug/mL.

La significancia de los resultados se calculó con el método no paramétrico de Wilcoxon para datos independientes (Hollander y Wolfe, 1973), considerándose significativos si su $p \leq 0,05$.

Los resultados son expresados como %I \pm la desviación estándar.

5.5.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el bioensayo bioautografía

Para este bioensayo se hicieron cromatograma de gel de sílice 60 (merck, 5554) de 5 cm de ancho por 7 cm de alto, sembrando los extractos. Se determinó la fase móvil más adecuada para cada extracto a ensayar.

Se prepararon los cultivos de los microorganismos a ensayar en un medio de cultivo líquido, TSB (*Tryptic soy Broth*) para bacterias y PDB (*Potato dextrose broth*) para hongos y levaduras, con 24 horas y 48 horas de anticipación respectivamente. Se tomó una alícuota de 1 mL de microorganismo la que se suspendió en 7 mL del medio del cultivo líquido, y se colocó un agitador orbital a 37 °C por dos 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 esterilizarlos para luego ser utilizados. En un tubo estéril se adicionó 350 μ L de la suspensión del microorganismo al medio de cultivo, TSA para las bacterias y PDA para hongos y levaduras fundido. La suspensión se homogenizó mecánicamente y esta solución se dejó escurrir sobre los cromatofolios los cuales se encuentran en una placa de petri. Una vez solidificada la solución en la placa, se adicionan 350 μ L de agua destilada estéril alrededor evitando así que las placas se resequen, llevándolos a incubar durante 24 horas en una estufa termorregulada a 37°C para bacterias y por 48 horas a 28°C para hongos y levaduras.

Las bioautografías se revelaron con una sal de tetrazolium (MTT). AL agregar el reactivo revelador tomaron 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. (Rahalison “*et al*”, 1991; Hamburger y Hostettman, 1991; Erazo “*et al*”, 1997).

Tabla IV: Microorganismos utilizados para los ensayos microbiológicos

Bacterias gram negativas	Tipo de cultivo
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 14207
<i>Salmonella aviatum</i>	ATCC 12228
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	muestra clínica
Bacterias Gram Positivas	

*ATCC: American Type Culture Collection

5.5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto aislado A por siembra en superficie de agar

Para realizar la evaluación antimicrobiana, fue necesario preparar dos alícuotas de 20 mL cada una de agar fundido TSA (*tryptic soy agar*) para bacterias con una concentración final del compuesto aislado (A) de 100 y 200 ug/mL. Para esto se preparó una solución madre de A de 1 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 cada fracción y se dejó solidificar en cápsula 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).

Todo este proceso se realizó bajo campana de flujo laminar.

Los microorganismos en las placas fueron incubados por 24 horas a 37°C.

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 y Hostettman, 1991; Erazo “*et al*”, 1997).

5.5.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del compuesto activo aislado A

Este bioensayo da cuenta de la mínima concentración de la sustancia aislada a la que se presenta inhibición del crecimiento bacteriano “*in vitro*”.

Se preparó un cultivo para el microorganismo a ensayar (*Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) 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. Una vez obtenida esta transmitancia los cultivos de microorganismos se procedió a preparar un set de 30 tubos que contenían medio de cultivo líquido TSB con cantidad suficiente para completar un volumen final de 2 mL, inóculo del microorganismo a estudiar y concentraciones crecientes del compuesto aislado desde 200 a 300 µg/mL 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. Los tubos en los 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 200 μL para ir aumentando en intervalos de 10 μL . Todo este procedimiento fue realizado bajo campana de flujo laminar.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estudio químico

El estudio químico de *Encelia canescens* Lam. fue realizado con la parte aérea de la planta y las hojas frescas. Las que presentaron una gran variedad de sustancias con gran cantidad de precipitados.

6.1.1 Rendimiento en la obtención de los diferentes extractos e infuso

A.- Parte aérea

El rendimiento de la extracción sucesiva por solventes de polaridad creciente de la parte aérea seca y molida de *E. canescens* a partir de 871 g, además del rendimiento del AESC y EMGpa se detallan en la Tabla V.

Tabla V: Rendimiento de las extracciones sucesivas por solventes de polaridad creciente de la parte aérea de *E. canescens*.

	EHEX	EDCM	EACET	EMEOH	AESC	EMGpa
Material vegetal	871 g	871 g	871 g	871 g	300 g	100 g
Cantidad obtenida	14,3 g	41,1 g	7,2 g	102,4 g	0,7 mL	14,3 g
rendimiento	1,64%	4,72%	0,83%	11,76%	0,23 %	14,30 %

El EMEOH y el EMGpa fueron los que presentaron respectivamente los mayores porcentajes de rendimiento.

B) Hojas

El rendimiento de la extracción sucesiva a partir de 200 g de hojas frescas de *E. canescens*, y de 167 g de las hojas secas y molidas, además del rendimiento del INF, del AESC y del EMGh se detallan en la Tabla VI.

Tabla VI: Rendimiento de la extracción sucesiva a partir de 200 g de hojas frescas de *E. canescens* y de las hojas secas y molidas post extracción del ERES

	ERES	EHEX	EDCM	EACET	EMEOH	INF	AESC	EMGh
Material vegetal	200 g	200 g	200 g	200 g	200 g	20 g	300 g	100 g
Cantidad obtenida	4,3 g	0,8 g	0,6 g	0,4 g	3,1 g	4,2 g	2,1 mL	3,8 g
rendimiento	2,15 %	0,40%	0,30 %	0,20%	1,55 %	21 %	0,70 %	3,80 %

Los EMGh, EMEOH y el ERES fueron los que presentaron mayor porcentaje de rendimiento.

Nota: las hojas secas y molidas post extracción de la resina (167g) representan (33g menos 28,7 g) 14,35% de agua

6.1.2 Resultados de la identificación de los principales grupos químicos de los diferentes extractos por c.c.f.

Los resultados del *screening* cromatográfico realizado a los diferentes extractos e INF de *E. canescens*, están detallados para la parte aérea en la Tabla VII y en la Tabla VIII se señalan los resultados obtenidos con las hojas frescas. Se establecieron para cada grupo de metabolitos secundarios las fases móviles y con la utilización de diferentes reactivos reveladores se determinó con un símbolo + o -, la presencia o ausencia de éstos.

Tabla VII: Resultado del *screening* de identificación por c.c.f. de los extractos de la parte aérea

Metabolito Secundario	Revelador	EHEX DCM:ACET 9,5:0,5	EDCM DCM:ACET 6:4	EACET ACET=100	EMEHOH ACET:MEOH 3:7
Alcaloides	Dragendorff				
Esteroles y/o Triterpenos	Liebermann Burchard	+	+	+	
Antraquinona	Böntrager				
Flavonoides	NP/PEG	+	+	+	+
Cumarinas	NP/PEG	+	+	+	
Taninos	FeCl ₃			+	+
Saponinas	Espuma				

+ : Presenta el metabolito

>: No presenta el metabolito

Según los resultados encontrados, esta especie vegetal posee esteroles y/o triterpenos, flavonoides y cumarinas, además los EACET y EMEOH presentan taninos. El extracto en que se encontró la mayor variedad de metabolitos secundarios fue el EACET.

Tabla VIII: Resultado del *screening* de identificación por c.c.f. de los extractos e INF de las hojas frescas

Metabolito Secundario	Revelador	ERES DCM:100	EHEX DCM:ACET 9,5:0,5	EDCM DCM:ACET 6:4	EACET ACET=100	EMEHOH ACET:MEOH 3:7	INF
Alcaloides	Dragendorff	+				+	
Esteroles y/o Triterpenos	Liebermann Burchard	+	+	+	+		
Antraquinoa	Böntrager						
Flavonoides	NP/PEG	+	+	+	+		+
Cumarinas	NP/PEG	+				+	
Taninos	FeCl ₃						+
Saponinas	Espuma						+

+ : Presenta el metabolito

>: No presenta el metabolito

Según los resultados encontrados la especie vegetal posee esteroles y/o triterpenos, flavonoides y cumarinas, además el EMEOH y el ERES fueron los que presentaron alcaloides. El extracto que se encontró la mayor variedad de metabolitos secundarios fue el ERES.

6.1.3 Purificación y fraccionamiento

Al realizar las columnas rápidas de gel de sílice, se logró aislar dos compuestos A y B, los que se describen en la Tabla IX.

Tabla IX: Características de los compuestos aislados (A) de la Resina y el compuesto aislado (B) del aceite esencial

Extracto inicial	Sustancia aislada	Rf	Proporción de disolventes para RF	Cantidad aislada (mg)	Reactivo revelador	Color
Columna DCM de ERES	A	0,39	HEX:DCM (50:50)	310	p-anisaldehído sulfúrico	Azul
Columna HEX:DCM (85:15) de AESC	B	0,18	DCM (100)	20	p-anisaldehído sulfúrico	Amarillo

Estos dos compuestos presentaron mayor actividad antimicrobiana, por ello se procedió a su fraccionamiento, aislamiento e identificación.

6.1.4 Características de Encecanescina

- $[\alpha]_D^{24}$: $-36,5^\circ$ ($c = 0,0137$, CHCl_3)
- UV(MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 228, 284$ y 308 nm
- $\text{IR} \gamma \text{ cm}^{-1}$: 2950-2900, 1600 (fuerte), 1300 a 1100 (varios)
- Ms: m/z (%rel.int.) = 450 (2,2), 435 (1,2), 217 (33,2), 201 (38,5), 185 (24,8). $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_5$.
- ^{13}C -RMN (ppm): $\delta = 157,7, 152,9, 127,4, 125,1, 124,1, 122,3, 113,8, 99,2, 76,3, 68,5, 55,3, 28,3, 28,1, 23,2$
- ^1H -RMN (ppm): $\delta = 7,11$ (1H, s), 6,31 (1H, s), 6,33 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 5,47 (1H, d, $J = 9,8$ Hz), 4,59 (1H, q, $J = 6,4$ Hz), 3,67 (3H, s), 1,32 (3H, d, $J = 6,4$ Hz), 1,46 (3H, s), 1,44 (6H, s)

6.2 Análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas del aceite esencial y del compuesto aislado B

- El análisis realizado al aceite esencial arrojó los siguientes compuestos principales que se muestra en la Tabla Xa

Tabla Xa: CG/masa del aceite esencial

	COMPUESTOS	%REL (AREA)
1	3 Careno- α Pineno	4
2	β pineno	6,9
3	β mirceno	4,3
4	β felandreno	8,6
5	α linalool	3,4
6	Pinalol	3,2
7	Cripton	3
8	D-limoneno	2
9	Cariofileno	2,2
10	Germacreno D	1,4
11	α farneseno	1,3
12	desconocido	3,7
13	desconocido	4,6
14	desconocido	13,8
15	Demetilencecalina	13,8
16	desconocido	23,8

- El análisis realizado al compuesto separado del aceite esencial (B) arrojó lo siguiente en la Tabla Xb

Tabla Xb: CG/masa del compuesto B

COMPUESTOS	%REL(AREA)
demetilencecalina.	81,8

6.3 Técnicas Espectroscópicas realizadas en compuesto Enc-A

6.3.1 Espectro de IR (Anexo 1)

El espectro IR de esta sustancia, presenta diversas bandas de absorción características atribuibles a un compuesto aromático con un doble enlace conjugado, como ser, banda a $2950 - 2900 \text{ cm}^{-1}$ atribuida a vibraciones C-H de grupos CH, y CH_3 .

A 1600 cm^{-1} se observa una fuerte señal debido a la absorción del doble enlace conjugado; y por último, presenta una serie de bandas alrededor desde 1300 a 1100 cm^{-1} , que se puede interpretar para los grupos C-O de la sustancia (Nakanishi, 1962).

6.3.2 Espectro de UV (Anexo 2)

El espectro al ultravioleta presenta máximos de absorción a 226, 282 y 308 nm, indicando la presencia de un anillo aromático acoplado a un doble enlace. No presenta variaciones con NaOH, lo que indica, conjuntamente con el espectro IR, que no presenta grupos hidroxilos fenólicos.

6.3.3 Espectro de ^{13}C -RMN (Anexo 3)

El espectro de ^{13}C -RMN registrado a 50 MHz muestra claramente las señales correspondientes a catorce átomos de carbono presentes en la molécula, de los cuales el espectro DEPT (*Distortionless Enhancement by Proton Transfer*) (Anexo 8) indica la presencia de cinco carbonos no protonados, cinco CH, y cuatro CH_3 , en un intervalo que va desde los 23,1 ppm a 157,7 ppm. A bajo campo aparecen dos señales a 157,7 ppm y 152,9 ppm correspondientes a carbonos cuaternarios aromáticos unidos a oxígeno.

También se observan señales para carbonos unidos a dobles enlaces: dos CH vinílicos a 127,4 ppm y 122,3 ppm y dos aromáticos 124,1 y 99,2 ppm; además de señales interpretadas para tres carbonos unidos a oxígeno en un rango entre 76,3 ppm y 55,3 ppm. A campo alto aparecen tres señales debidas a grupos metilos a 28,3 ppm, 28,1 ppm y 23,2 ppm.

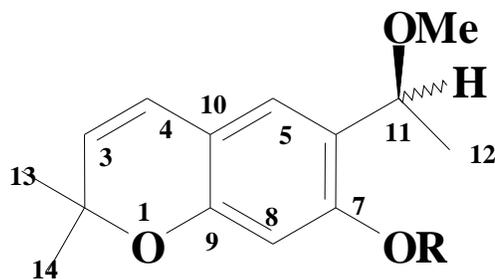
Según este análisis se postula una fórmula global de: $\text{C}_{14}\text{H}_{17/18}\text{O}_3$, lo que indica que la molécula posee seis insaturaciones que podrían ser explicadas en base a todos los antecedentes obtenidos como formados por dos anillos uno aromático y el otro con un doble enlace

6.3.4 Espectro de ^1H -RMN (Anexo 4)

El espectro de ^1H -RMN de 300 MHz realizado en CDCl_3 presenta un total de siete señales, tres de las cuales están integradas para un protón cada una a 7,11 (singlete), 5,47 (doblete) y 4,59 (multiplete); una señal integrada para dos protones a 6,31 (doblete), dos señales integradas para tres protones a 3,67 (singlete) y 1,32 (doblete) y una señal doble integrada para seis protones a 1,44 ppm.

En un análisis más detenido de este espectro, permite observar que la señal a 6,31 ppm corresponde a la superposición de una señal simple de un protón (singlete a 6,31 ppm) con un doblete centrado a 6,33 ppm, que está a su vez acoplado con la señal centrada a 5,47 ppm con un $J=9,8$ Hz, que por su desplazamiento indicaría ser los protones vinílicos de la molécula, corroborados por el acoplamiento de ambos en el espectro COSY (Anexo 9). También se puede indicar la presencia de un CH_3O - (metoxilo) por el desplazamiento característico de la señal simple debida a tres protones a 3,67 ppm.

El acoplamiento de la señal múltiple debida a un protón (cuadruplete) a 5,47 ppm con el doblete debido a tres protones a 1,32 ppm $J=6,4$ Hz, indicaría la presencia de un grupo $\text{CH}_3\text{-CH-}$ en la molécula. Las señales simples a 7,14 y 6,31 ppm se interpretan para protones aromáticos en para y la señal doble de seis protones resulta ser dos señales simples de metilos.



6.3.5 Espectro de HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) (Anexo 5)

Experimento que relaciona un acoplamiento directo señales, ^1H y ^{13}C

Tabla XI: Espectro HMQC del compuesto A

CARBON	^{13}C -RMN ppm	^1H RMN ppm
C3	127,4	5,47d
C4	122,3	6,33d
C5	124,1	7,11s
C8	99,2	6,31s
C11	68,5	4,59q
C12	23,2	1,32d
C13	28,1	1,46
C14	28,4	1,42

6.3.6 Espectro HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Coherence*) (Anexo 6)

Este experimento 2D se usa para correlacionar o conectar señales, ^1H y ^{13}C para átomos separados por enlaces múltiples (generalmente 2-3), que es extremadamente útil para hacer un asignaciones estructurales

Tabla XII: Espectro HMBC del compuesto A

CARBON	¹³C- RMN	2-enlaces	¹H RMN	3-enlaces	¹H RMN
C2	76,3	H4	6,33d		
C3	127,4	Me13 Me14	1,46s 1,43s		
C4	122,3	H5	7,11s		
C5	124,1	H4	6,33d	H8	6,31s
C6	125,1	H8 Me12	6,31s 1,32d		
C7	157,7	H5 H11	7,11s 4,59q		
C8	99,2			H5	7,11s
C9	152,9	H5 H4	7,11s 6,33d		
C10	113,8	H3 H8	5,47d 6,31s		
C11	68,5	H5	7,11s	H8	6,31s
C13- C14	28,1-28,3	H3	5,47d		

Tabla XIII: Asignación de señales obtenidas al realizar los espectros de ^{13}C -RMN ^1H -RMN para el compuesto Enc-A en comparación con la literatura

C	^{13}C - RMN (ppm) CDCl ₃	[1]	CH _n	^1H - RMN (ppm)	[2]	Multiplicidad	J
1	-	-	-	-	-	-	-
2	76,3	76,1	C	-	-	-	-
3	127,4*	122,2	CH	5,47	5,47	d	6,4
4	122,3*	124,0	CH	6,33	6,32	d	9,8
5	124,1*	127,2	CH	7,11	7,10	s	-
6	125,1	125,1	C	-	-	-	-
7	157,7	157,6	C	-	-	-	-
8	99,2	99,2	C	6,31	6,31	s	-
9	152,9	152,9	C	-	-	-	-
10	113,8	113,8	C	--	-	-	-
11	68,5	68,5	CH	4,59	4,59	c	9,8
12	23,2	23,1	CH ₃	1,32	1,32	d	6,4
13	28,1	28,0	CH ₃	1,46	1,46	s	-
14	28,3	28,2	CH ₃	1,43	1,42	s	-
OMe	55,3	55,1	CH ₃	3,67	3,67	s	-

[1]: (Fang et al 1988).

[2]: (Bohlman et al 1983).

* : diferencia con la literatura.

6.4 Estudio farmacológico

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las evaluaciones de las diferentes actividades farmacológicas a los cuales fueron sometidos los distintos extractos de *Encelia canescens*.

6.4.1 Estudios *in vivo*.

6.4.1.1 Determinación de la actividad tóxica vía oral y determinación de la DL₅₀

En las primeras 4 horas posteriores a la administración del EMGpa se observó normalidad en cuanto a signos motores, respiratorios y gastrointestinales, además no presentaron salivación o pilo erección.

Una vez completados los catorce días de observación y pesada diaria, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se les realizó una necropsia. Se eligieron 2 al azar para realizar la observación visual de los principales órganos. Los parámetros observados para cada uno de los órganos fueron: color, textura y tamaño. Estos parámetros fueron comparados con los de los animales controles.

Al realizar la necropsia de los animales tratados con el EMGpa no se observaron diferencias con los órganos de los animales del grupo control.

Basándose en estos resultados concluimos que el EMGpa es inocuo a la dosis empleada (2g/kg de peso) por vía oral en ratones.

Si bien los datos *in vivo* en animales de experimentación son indicativos de la toxicidad y se toman como marcadores de inocuidad, los ensayos de toxicidad aguda no son suficientes para sostener que el extracto no es tóxico, pues no se consideran los efectos de una dosificación frecuente y a largo plazo (OMS, Ginebra 1997).

Tabla XIV: Registro comparativo de los pesos de los ratones después de la administración del EMGpa para la evaluación de la toxicidad aguda

DIA*	EMGpa mediana del peso (g) ± SEM	n1	Controles mediana del peso (g) ± SEM	N
1	17,0 ± 0,7	8	17,3 ± 0,3	6
2	22,4 ± 0,9	8	24,1 ± 0,6	6
3	23,4 ± 1,0	8	25,3 ± 0,7	6
4	24,2 ± 1,4	8	26,0 ± 0,7	6
5	24,4 ± 1,6	8	26,6 ± 0,9	6
6	26,3 ± 3,6	8	27,4 ± 1,0	6
7	28,5 ± 3,9	8	30,1 ± 1,0	6
8	29,3 ± 4,0	8	31,1 ± 1,3	6
9	39,9 ± 4,1	8	31,8 ± 1,3	6
10	31,1 ± 4,3	8	32,8 ± 1,5	6

*Corresponden a los días que se registraron los pesos, los cuatro días faltantes de la observación no se consideraron por ser fines de semanas, período que no se registró los pesos.

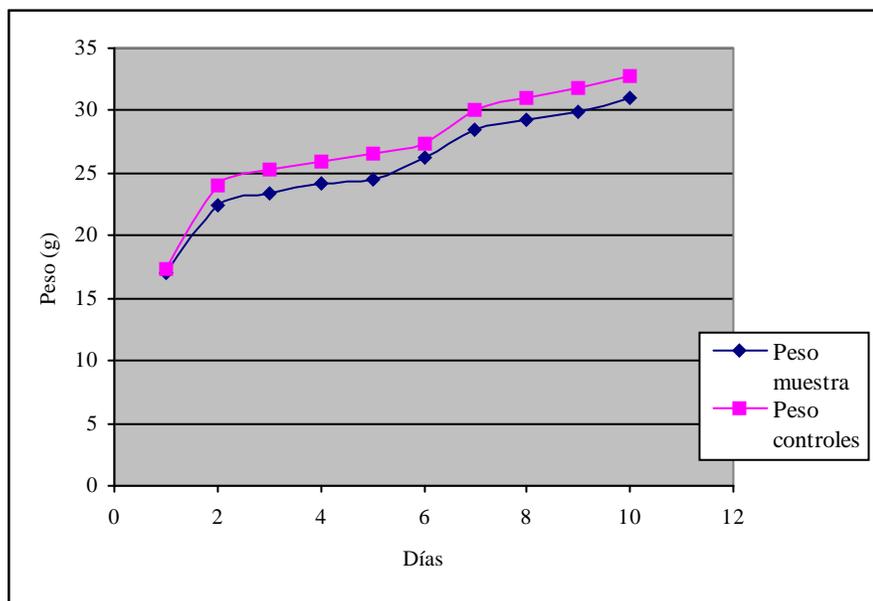
donde:

n1: cantidad numérica de animales tratados.

N: cantidad numérica de animales controles.

SEM: error estándar de la media.

Figura 3: Curva comparativa del cambio de peso de los ratones después de la administración del EMGpa y de los animales controles



El gráfico muestra los días de observación versus la mediana de los pesos. Como se puede ver los ratones tuvieron un aumento de peso normal y no se presentó una diferencia significativa con respecto al aumento de peso de los controles, lo que se demuestra que el extracto ensayado no presentó toxicidad en ellos. Todos los animales vivieron hasta el final del ensayo, por lo que el DL_{50} sería mayor que 2g/kg.

6.4.1.2 Determinación de la actividad analgésica tópica

Ensayo de la formalina en la cola

Tabla XV: Actividad analgésica vía tópica mediante el ensayo de la formalina en la cola con el EMGpa

Extracto (dosis)	Mediana del tiempo de lamidas (seg) \pm SEM	% AAT \pm SEM	P
EMGpa (5% p/v)	23,5 \pm 5,4	52,0 \pm 10,9	0,00027
Ibuprofeno (5% p/v)	12,9 \pm 2,4	76,5 \pm 6,3	0,00005

donde:

AAT: actividad analgésica tópica.

: efecto máximo

SEM: error estándar de la media.

P: significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$

El EMGpa presentó un %AAT = 52,0, en comparación con la del Ibuprofeno la actividad analgésica fue menor, por lo tanto como analgésico tópico tendría una menor actividad con respecto al fármaco de referencia.

6.4.1.3 Determinación de la analgesia vía oral.

Ensayo de las contorsiones abdominales.

Tabla XVI: Actividad analgésica vía oral del EMGpa mediante el ensayo de contorsiones abdominales

Dosis	Medio de disolución	% E \pm SEM	p
200 mg/kg EMGpa	Goma arábica	40,5 \pm 9,9	0,0001
12,5 mg/kg naproxeno sódico	Goma arábica	70 \pm 4,0	0,0069

donde:

E: efecto analgésico.

: efecto máximo

SEM: error estándar de la media.

P: significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$

El EMGpa alcanzó un %E = 40,5, por lo tanto este extracto como analgésico *per os*, presentó una menor actividad con respecto al efecto máximo exhibido por el fármaco de referencia (70 %).

6.4.2 Estudios farmacológicos *in vitro*

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las evaluaciones de las diferentes actividades farmacológicas *in vitro* a los cuales fueron sometidos los distintos extractos de *E. canescens*.

6.4.2.1 Evaluación de la capacidad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH

Se detallan los resultados obtenidos para el ensayo de decoloración de DPPH del EMGpa, además del fármaco de referencia, quercitina.

Tabla XVII: Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo de DPPH para el EMGpa

EMGpa		
concentración (ug/mL)	% decoloración	*SD
0	0	0
200	6,4	0,9
100	13,9	1,7
50	22,7	1,8

*SD: desviación estándar

Tabla XVIII: Evaluación de la actividad atrapadora de radicales libres mediante el ensayo de DPPH para el fármaco de referencia quercetina

quercetina		
concentración (ug/mL)	% decoloración	*SD
0	0	0
1,25	20,8	1,3
2,5	40,5	3,7
3,75	56,3	0,9
5	74,8	1,5
7,5	88,1	0

*SD: desviación estándar

Con respecto a la actividad atrapadora de radicales libres del EMGpa, éste no presentó una actividad significativa.

6.4.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante a través del ensayo de la inhibición de la xantino oxidasa

Se detallan los resultados de la actividad inhibidora de los EHEX, EACET de la parte aérea y el ERES de las hojas frescas, además del fármaco de referencia, alopurinol.

Tabla XIX: Evaluación de la actividad inhibitoria de la xantino oxidasa para los diferentes extractos y el fármaco de referencia alopurinol

EXTRACTO	Concentración (µg/mL)	% de Inhibición ±SD	p
RES	50	2,0± 3,9	0,019
HEX	50	4,3 ± 1,2	0,000
ACET	50	1,2 ± 4,6	0,000
alopurinol	0,035	50,0 ± 2,4	0,002

donde:

SD: desviación estándar.

P: significancia, resultado significativo si $p \leq 0,05$

La evaluación realizada determinó que todos los extractos no inhibieron la enzima XO. El alopurinol, fármaco de referencia presentó una CI_{50} a la concentración de 0,035 $\mu\text{g/mL}$.

6.4.2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana por bioensayo bioautografía

Se ensayó la actividad antimicrobiana en los diferentes extractos e infuso de la parte aérea y de las hojas frescas de *E.canescens* El resumen de los halos de inhibición se observa en las siguientes tablas: indicado en forma + : Presenta actividad y >: No presenta actividad.

Tabla XX: Evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos de la parte aérea de la planta

Cepas	EHEX	EDMC	EACET	EMG	EMEHOH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	-	+	-
<i>Salmonella aviatum</i>	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus flavus</i>	+	+	-	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	-	+	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-

Condiciones cromatográficas para cada extracto:

Extractos: HEX, DMC, MG.

Fase móvil: DCM/ACET 7:3

Extractos: ACET, MEOH.

Fase móvil: ACET/MeOH 7:3

Todos los extractos resultaron inactivos para *C.albicans* y *S. Cerevisiae*. Resultaron activos para *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. flavus*, *K.pneumoniae* y *E.coli* los extractos HEX, DCM y MG.

Tabla XXI: Evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos de las hojas frescas

Cepas	EHEX	EDMC	EACET	EMEOH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella aviatum</i>	-	-	-	-
<i>Micrococcus flavus</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-

Condiciones cromatográficas para cada extracto:

Extractos: HEX, DMC.

Fase móvil: DCM/ACET 9,5/0,5

Extractos: ACET, MEOH.

Fase móvil: ACET 100

En este caso los extractos obtenidos de las hojas frescas no presentaron actividad con las diferentes cepas ensayadas a diferencia con los extractos obtenidos de la parte aérea de la planta que presentaron actividad. Esto se podría atribuir a que deben existir compuestos que tengan la actividad antimicrobiana en otra parte que no sean las hojas.

Tabla XXII: Evaluación de la actividad antimicrobiana del exudado resinoso, aceite esencial y unos compuestos separados del aceite esencial

Cepas	AESC	B	45	46	ERES
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	+	+
<i>Salmonella aviatum</i>	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus flavus</i>	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+

Condiciones cromatográficas para el AESC, ERES y los compuestos separados del aceite (B, 45 y 46):

Fase móvil: DCM 100%

Los compuestos B, 45, 46 y resina fueron activos con *B. subtilis*, *S. aureus*, *K.pneumoniae* y *E.coli*. En tanto el aceite esencial fue activo con *B. subtilis*, *M. flavus* y *E.coli*.

* ver en Anexo 10.1

Tabla XXIII: Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos separados del ERES

Cepas	2	A	3	4	5	6	6,1	6,2	6,3
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	+

Condiciones cromatográficas para los compuestos separados de la ERES:

Para 2, A, 3, 4, 5.

Fase móvil: HEX/DCM 5/5.

Para 6, 6,1, 6,2, 6,3.

Fase móvil: DCM/ACET 8/2.

En esta evaluación se eligió las cepas más activas encontradas en los resultados anteriores, los cuales son *B. subtilis*, *S. aureus*, *K.pneumoniae* y *E.coli*. Los compuestos que presentaron la mayor actividad fueron A, 3, 4 y 5.

* ver en Anexo 10.2 y 10.3

6.4.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana del compuesto aislado A por siembra en superficie de agar

En este ensayo se probó la actividad antimicrobiana del compuesto aislado A, para esto se prepararon placas de Petri con agar y el compuesto A a concentraciones de 100 ug/mL y 200 ug/mL se sembraron los diferentes microorganismos. El compuesto A no presentó inhibición con las cepas ensayadas, esto se detalla en la siguiente tabla. Indicado en forma + : Presenta actividad y >: No presenta actividad.

Tabla XXIV: resultados de la actividad antimicrobiana en superficie de agar del compuesto aislado A

Microorganismos	Concentración A (ug/mL)		
	Control	100	200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Salmonella aviatum</i>	-	-	-
<i>Micrococcus flavus</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-

6.4.2.5 Evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del compuesto activo aislado

Una vez que se realizó el ensayo de la actividad antimicrobiana en superficie de agar, debido a los resultados anteriores negativos a 200 µg/mL del compuesto aislado A, se procedió a medir la concentración mínima inhibitoria a una concentración superior a 200 µg/mL ocupando las cepas Gram (+): *B. subtilis*, *S. aureus* y Gram (-): *K.pneumoniae*, *E.coli*. Obteniendo para *B. subtilis* una concentración de 240 ug/ml y concentraciones superiores a esta para las otras cepas.

CAPÍTULO VII CONCLUSIONES

El análisis de los rendimientos en la obtención de los extractos de *Encelia canescens* Lam, permite concluir que los de mayor rendimiento para la parte aérea fueron EMEOH y EDCM y para las hojas frescas fueron EMEOH y ERES.

El *screening* fitoquímico realizado comprendió una primera etapa realizada a la parte aérea de la planta y una segunda etapa a las hojas.

En la primera etapa, todos los extractos presentaron flavonoides. Los esteroles y/o triterpenos se encontraron en el EHEX, EDCM y el EACET. La presencia de cumarinas se detectaron en los extractos EHEX, EDCM y EACET. Los taninos se encuentran solamente en los EACET y el EMEOH. El infuso presentó principalmente metabolitos como flavonoides, taninos y saponinas. En la segunda etapa los EHEX, EDCM, EACET y el ERES presentaron esteroles y/o triterpenos. Los flavonoides se encontraron en los EHEX, EDCM, EACET y en el ERES. Las cumarinas se observaron en el EMEOH y en el ERES. Además se observó la presencia de trazas de alcaloides en el EMEOH y en el ERES. El infuso presentó metabolitos como flavonoides, taninos y saponinas.

De todos los extractos obtenidos, los que presentaron una mayor actividad antimicrobiana fueron los obtenidos de la parte aérea de la planta, además del ERES y el AESC.

Se seleccionaron el ERES y el AESC para realizar estudios químicos más acabados por tener un mayor grado de significancia en cuanto a su actividad antimicrobiana.

La actividad antimicrobiana evaluada por el bioensayo bioautografía en el ERES presentó actividad en las cepas Gram (+): *S. aureus*, *B. subtilis* y Gram (-): *E.coli*, *K.pneumoniae* y para el AESC fue con las cepas Gram (+): *M.flavus*, *B. subtilis* y Gram (-): *E.coli*.

El AESC se analizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, encontrando 16 compuestos, de los cuales 12 han sido identificados para la especie *E. canescens*.

El fraccionamiento por columna cromatográfica, permitió obtener de la fracción HEX:DCM (85:15) del AESC un compuesto puro nombrado como compuesto B. Posteriormente a través de un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, se logró identificar esta sustancia como demetilencecalina. Este compuesto se obtuvo una cantidad insuficiente para continuar con estudios químicos.

De la fracción DCM (100) del ERES se aisló, purificó e identificó un compuesto denominado compuesto A.

El compuesto A fue identificado por medio de un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas y un completo estudio espectroscópico, que incluye espectrometría ultravioleta (UV), infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN a 300 MHz), de carbono 13 (^{13}C -RMN a 50 MHz), y técnicas espectroscópicas como COSY, DEPT, HMQC Y HMBC. Determinando que se trata de un derivado cromeno dímero el: 6,6' - (Oxidietilidino) bis [7-metoxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano], conocido con el nombre de enecanescina. Este compuesto ya ha sido aislado en *E. canescens* como se describe en la literatura, sin embargo encontramos diferencias de asignaciones en ^{13}C RMN para C₃, C₄ y C₅.

Los dos compuestos identificados A y B presentaron actividad antimicrobiana evaluado a través del método por bioensayo bioautografía, encontrando que la sustancia B era activa en cepas Gram (+): *B. subtilis* y Gram (-): *E.coli*, *K.pneumoniae*. La sustancia A fue activa en cepas Gram (+): *S. aureus*, *B. subtilis* y Gram (-): *E.coli*, *K.pneumoniae*.

La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el compuesto aislado A se realiza con las cepas Gram (+): *S. aureus*, *B. subtilis* y Gram (-): *E.coli*, *K.pneumoniae*. Dando como resultado una concentración de 240 ug/ml para *B. subtilis* y superiores a esta concentración para *S. aureus*, *E.coli* y *K.pneumoniae*.

En la determinación de la actividad tóxica vía oral ensayada en el EMGpa, se observó que los animales tratados no presentaron en las cuatro horas posteriores a la administración del extracto, algún indicio de daño: presentando signos motores normales, respiración normal, signos gastrointestinales normales, ausencia de salivación y ausencia de piloerección. Durante los

catorce días de observación mantuvieron un crecimiento normal. Al realizar la necropsia una vez terminado el ensayo, los animales no mostraron diferencias con los controles en cuanto a color, textura y tamaño de los órganos.

Se puede concluir que el EMGpa ensayado no fue tóxico para los ratones. Todos los animales vivieron hasta el final del ensayo, por lo que el DL_{50} sería mayor que 2g/kg de peso corporal.

En la determinación de la actividad analgésica por vía tópica, a través del ensayo de la formalina en la cola, el EMGpa exhibió un 52,0 % de actividad, ésta fue menor a la exhibida por el ibuprofeno (76,5 %).

En la determinación de la analgesia por vía oral, a través del ensayo de las contorsiones abdominales, el EMGpa mostró un 40,5 % de efecto, éste fue menor al efecto máximo del naproxeno sódico (70%).

El EMGpa no presentó capacidad atrapadora de radicales libres a través del ensayo de DPPH.

Los EHEX y EACET obtenidos desde la parte aérea y el ERES no inhibieron la actividad de la xantina oxidasa.

CAPÍTULO VIII
BIBLIOGRAFÍA

- ❖ ABOUD K., SIMONSEN S., FANG N., YU S. AND MABRY T. Structure of (\pm) Encecanescin. *Phytochemistry*, 1990 vol. 20 n°46: 1563-1566.
- ❖ AMIÉ D., BESEO D. AND TRINAJSTIÉ N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croatica Chemica Acta*, 2003. 76(1): 55-61.
- ❖ BOHLMANN F., TSANKOVA E., JAKUPOVIC J., KING R., ROBINSON H. Dimeric Chromenes and mixed dimers of a chromene with Euparin from *Encelia canescens*. *Phytochemistry*, 1983 vol. 22 n°2: 557-560.
- ❖ BOLETÍN OFICINA SANITARIA PANAMERICANA Ginebra, Suiza, 1986. 108 (5-6); 637-641.
- ❖ BRAKO, L. y Zarucchi, J. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 1993 45: i--xl, 1—1286.
- ❖ CUBILLOS A. Determinación de la dosis letal media (DL₅₀) de alcaloides del lupino en pollas de reposición blancas y marrones. *Archivo Médico Veterinario*, 1999. 31 (2): 249-256.
- ❖ DELPORTE C., BACKHOUSE N., NEGRETE R., SALINAS P., RIVAS P., CASSELS B.K., SAN FELICIANO A. Antipyretic, hypothermic and antiinflammatory activities and metabolites from *Solanum ligustrinum* Lood. *Phytotherapy*, 1998. 12:118-122. ISI=0,525.
- ❖ DELPORTE C., BACKHOUSE N., INOSTROZA V., AGUIRRE M.C., PEREDO N., SILVA X., NEGRETE R., MIRANDA H.F. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. *J. Ethnopharmacology*, 2007. 112(1): 162-165.
- ❖ EKUNDAYO O., LAAKSO I., HILTUNEN R. AND SEPPÄNEN T. Rapid analyses of chromenes (benzopyrans) by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography* 403, 1987. pp 358-362.
- ❖ ERAZO S., DELPORTE C., NEGRETE R., GARCÍA R., ZALDIVAR M., ITURRA G., CABALLERO E., LÓPEZ-PÉREZ JL., BACKHOUSE N. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus* N. *J. of Ethnopharmacology*, 2006.

- ❖ ERAZO S., GONZÁLEZ V., ZALDÍVAR M. AND NEGRETE R. Antibacterial activity of *Psoralea glandulosa*, L. Int. J. Pharmacog, 1997. 3(1) 1-3.
- ❖ FERESIN G., TAPIA A., GUTIERREZ R., DELPORTE C., BACKHOUSE N. AND SCHMEDA-HIRSCHMANN G. Free radical scavengers, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acaena magellanica*. Journal of pharmacy and pharmacology, 2002. 54:835 – 844.
- ❖ GAUTIER E. Apuntes de trabajos prácticos de Farmacognosia. Ed. Universitaria. Santiago, Chile, 1954 p 293
- ❖ HAMBURGER M. AND CORDELL G. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. Journal of Natural Products, 1987. 50 (1): 19-22.
- ❖ HOLLANDER M. AND WOLFE D. Nonparametric Statistical Methods. New York, John Wiley & Sons, 1973. p 27-32, 62-70.
- ❖ INOSTROZA V. Evaluación de las actividades analgésicas in vivo de *Ugni molinae* Turcz. y sus potenciales efectos antimicrobianos e inhibitorios de la xantina oxidasa. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Santiago, Chile, 2005
- ❖ JIMÉNEZ I. Y PADILLA C. Toxicidad aguda oral del *Xantium strumarium* L. (guizajo de caballo). Revista cubana de plantas medicas, 1999. 1(4): p 30-40.
- ❖ KALCKAR H.M. Differentiation spectrophotometry of purine compound by means of specific enzymes, Journal of Biological Chemistry, 1947. 167: 429 – 443.
- ❖ KOLESNIKOV Y, CRISTEA M., OKSMAN G., TOROSJAN A. and WILSON R. Evaluation of the tail formalin test in mice as a new model to assess local analgesic effects, Brain Research, 2004. 1029: 217-223.
- ❖ LINARES E. y BENAVIDES M. Flora silvestre del transecto Yura-Chivay, Departamento de Arequipa. Boletín de Lima, 1995 N° 100:211-254.
- ❖ LINARES E. Etnobotánica del transecto Yura-Chivay, departamento de Arequipa, Perú., Chloris chilensis revista chilena de flora y vegetación, 2000 Año 3. N°1.
- ❖ MABRY T.J., MARKHAM K.R., THOMAS M.B. The systematic identification of flavonoids. Ed. Springer-Verlag, N.Y., USA, 1970 p 354
- ❖ MERCK. Reactivos de colocación para cromatografía en capa fina y en papel, Darmstadt, Alemania, Ed. Merck, 1972 p130
- ❖ MOERMAN. D. Native American Ethnobotany Timber Press, Oregon 1998.

- ❖ NAKANISHI K. Infrared absorption spectroscopy. Tokio, Nankodo company limited, 1962.
- ❖ NORO T., ODA Y., MIYASE T., UENO A. AND FUKUSHIMA S. Inhibitors of Xantine oxidase from the flowers and bud of *Daphne genkwa*. Chem. Pharm .Bull., 1983, 31(11):3984 – 3987.
- ❖ OLIVARES B. Efecto hepatoprotector de Artemisa douglasiana Besser. Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de San Luis Argentina, 2001. p 55
- ❖ PASTOR S., ANGELES E., ALVAREZ J., GUTIERREZ L., JAYOS E., BRICEÑO I., ROSALES M., GOMEZ L., SEVILLA R., CARPIO C., RIVERA J. Peru: Informe Nacional para la Conferencia Técnica Internacional de la Fao Sobre los Recursos Fitogenéticos, 1996.
- ❖ PROKSCH P AND CLARK C. Systematic implications of Chromenes and Benzofurans From *Encelia* (Asteraceae). Phytochemistry, 1987 vol. 26 n°1: 171-174.
- ❖ PROKSCH P. AND RODRIGUEZ E. Chromenes and Benzofurans of the Asteraceae, their chemistry and biological significance. Phytochemistry, 1983 vol. 22 n°11: 2335-2348.
- ❖ PROKSCH P., PROKSCH M., TOWERS G. AND RODRIGUEZ E. Phototoxic and insecticidal activities of Chromenes and Benzofurans From *Encelia*. Journal of Natural Products, 1983 vol. 46 n°3: 331-334.
- ❖ RAHALISON L., HAMBURGER M., HOSTETTMANN K., MONOD M. AND FRENK E. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemical Analysis, 1991, 2: 199-203.
- ❖ RÍOS C. Caracterización Ecomorfológica del matorral costero árido del norte de Chile y la potencialidad del Germoplasma nativo. Tesis presentada como requisito para optar al grado de *Magister* en Ciencias Vegetales, 2004.
- ❖ SOUKUP, J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana y catálogo de los géneros. Edit. Salesiana. Lima, 1984.
- ❖ THEODULOZ C., PACHECO P. AND SCHMEDA-HIRSCHMANN G.. Xantine oxidase inhibitory activity of Chilean Myrtaceae. Journal of Ethnopharmacology, 1991. 33: 253–255.

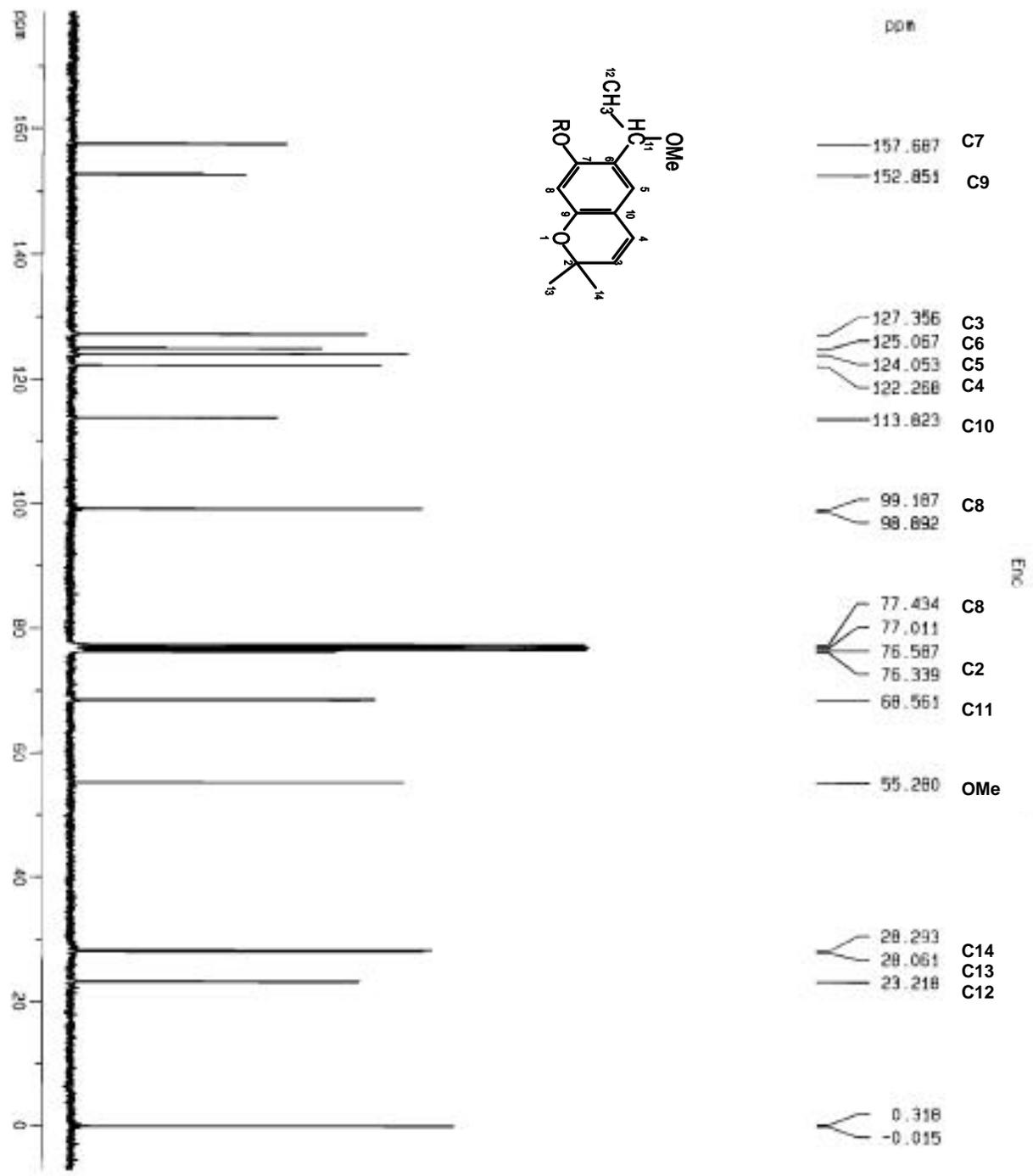
- ❖ WAGNER H., BLADT S., ZGAINSKLI E.M. Plant Drug analysis. Ed. Springer-Verlag, N. Y., USA, 1984 p 384
- ❖ WEBERBAUER A. El mundo vegetal de los andes peruanos. Ministerio de Agricultura. Lima. Perú, 1945
- ❖ YÁÑEZ P. Caracterización técnico-Económica de la implementación de un sistema biodinámico en un viñedo convencional cv. Cabernet Sauvignon en el Valle de Limarí. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo, 2006.

GLOSARIO

%AAT	: porcentaje de actividad analgésica tópica
%D	: porcentaje de dolor
%E	: porcentaje de efecto analgésico
%I	: porcentaje de inflamación
%p/v	: porcentaje peso volumen
%REL	: porcentaje relativo
A	: absorbancia
ACET	: acetato de etilo
AESC	: aceite esencial
ATTC	: <i>American type Culture Collections</i>
c.c.f	: cromatografía en capa fina
CG/masa	: cromatografía de gases espectrometría de masas
¹³ C-RMN	: resonancia magnética nuclear de carbono 13
d	: duplete
DCM	: diclorometano
DMSO	: dimetilsulfóxido
DPPH	: radical 2,2-difenil-1-picril hidrazilo
EACET	: extracto de acetato de etilo
EDCM	: extracto de diclorometano
EHEX	: extracto hexánico
EMEOH	: extracto metanólico
EMG	: extracto metanólico global
EMGh	: extracto metanólico global de las hojas frescas
EMGpa	: extracto metanólico global parte aérea
ERES	: extracto resinoso
g	: gramos
HEX	: hexano
¹ H-RMN	: resonancia magnética nuclear de protones
INF	: infuso

i.p.	: intra peritoneal
IR	: infrarrojo
<i>J</i>	: constante de acoplamiento
m	: multiplete
MEOH	: metanol
mg	: miligramos
mL	: mililitros
MTT	: sal de tetrasolium
NP/PEG	: <i>natural products/ polyethylene glycol reagent</i>
PDA	: <i>potato dextrose agar</i>
PDB	: <i>potato dextrose broth</i>
<i>Per os</i>	: vía oral
q	: cuadruplete
s	: singulete
S.D.	: error estándar
seg	: segundos
SEM	: error estándar de la media
t	: triplete
TSA	: <i>tryptic soy agar</i>
TSB	: <i>tryptic soy broth</i>
UV	: ultravioleta
X	: solución de xantina
XO	: enzima xantino oxidasa
μL	: microlitros

ANEXO 3 ESPECTRO DE ¹³C RMN DE ENC - A (CDCl₃)



```

Solvent Data Parameters
NAME          1,2,1,2,2
EXPNO        10
PROCNO       1
F2 - Acquisition Parameters
Date_         28070616
Time          20:37
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm Hslt/Tract
PULPROG      zgpg30
TD           32768
SOLVENT      CDCl3
NS           6144
DS           2
SWH           17985.611 Hz
FIDRES       0.548837 Hz
AQ           0.5110004 sec
RG           426.1
DM           27.000 usec
DE           6.01 usec
TE           300.2 K
D1           1.00000000 sec
d11          0.03000000 sec
d12          0.03000000 sec

***** CHANNEL f1 *****
NUC1          13C
P1           9.00 usec
PL1          -6.00 dB
SFO1         75.4756233 MHz

***** CHANNEL f2 *****
CPDPRG2      waltz16
NUC2          1H
PCPD2       100.00 usec
PL2         18.00 dB
PL12        30.00 dB
PL13        30.00 dB
SFO2        500.1312623 MHz

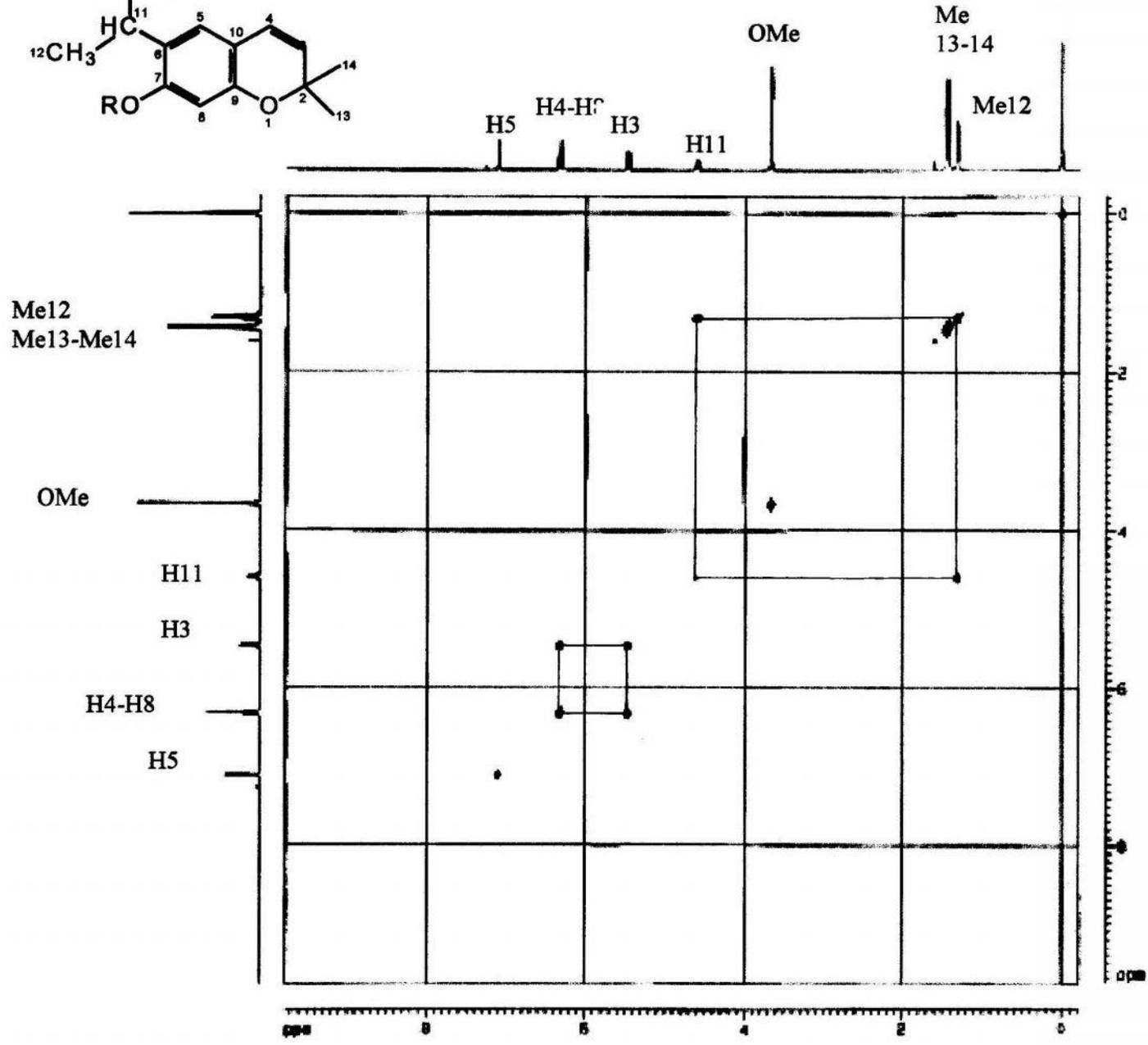
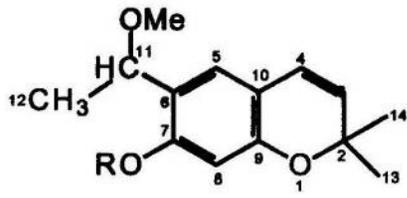
F2 - Processing parameters
SI           32768
SF           75.4677501 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40

ID: NMR Data Parameters
SI           32768
SF           75.4677501 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40

ID: NMR Data Parameters
SI           32768
SF           75.4677501 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           1.00 Hz
GB           0
PC           1.40

SPEECH       9.25672 GHz/Hz
WIDEN        701.88266 Hz/Hz
    
```

ANEXO 9
 ESPECTRO COSY DE ENC - A (DMSO)

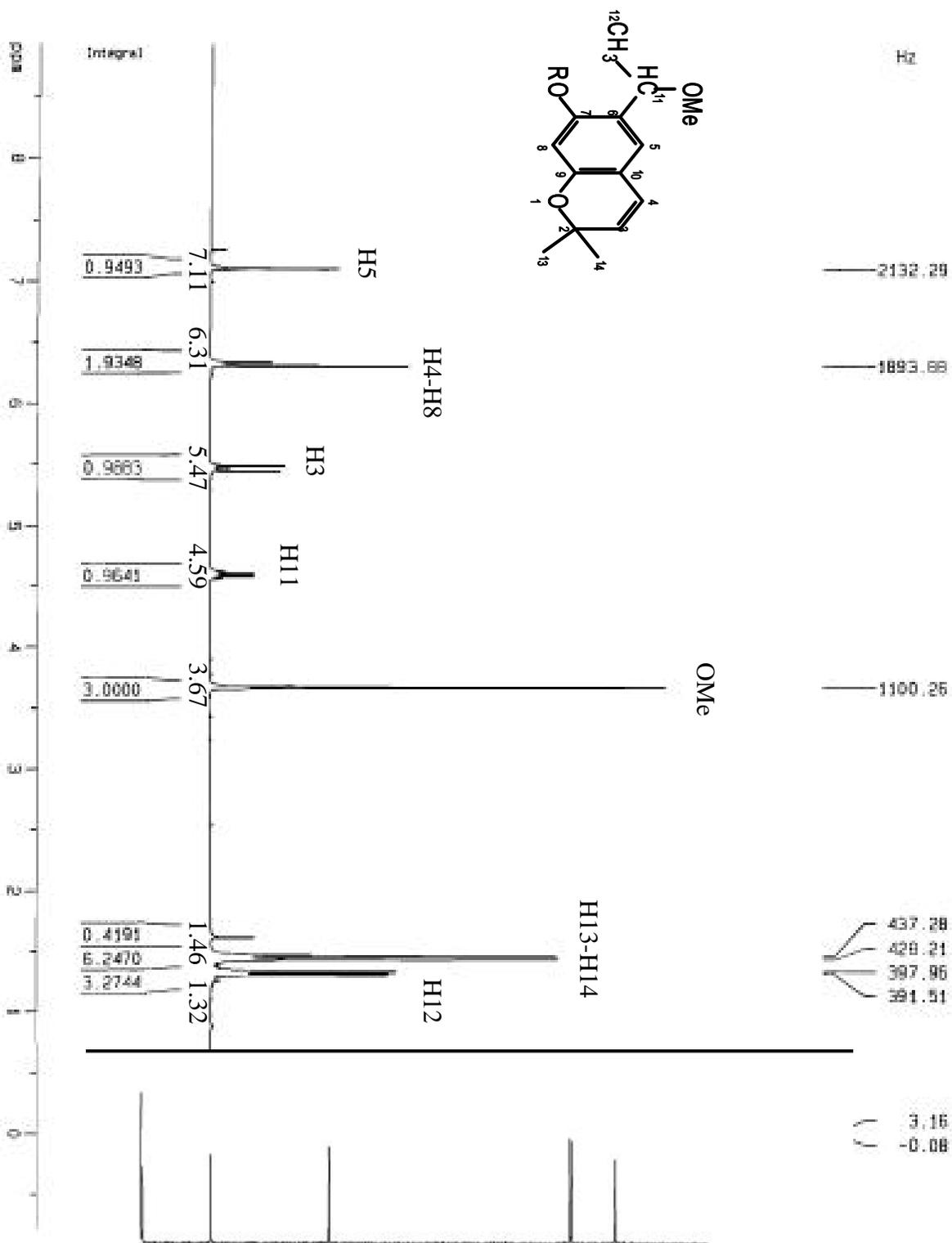


ENC 11a

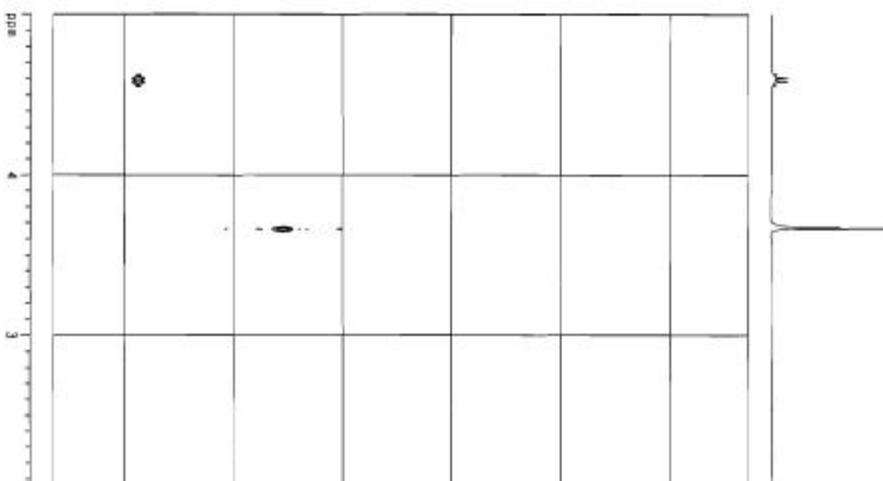
NAME		ENC 11a	
EXPNO	1	PROCNO	1
F2 - Acquisition parameters			
INSTRUM	zgpg30	PROBHD	5mm QNP 1H/13
PROBHD	5mm QNP 1H/13	NUC1	13C
NUC2	1H	NUC3	13C
PCPDPRG2	zgpg30	PCPDPRG1	zgpg30
PCPDPRG3	zgpg30	PCPDPRG4	zgpg30
PCPDPRG5	zgpg30	PCPDPRG6	zgpg30
PCPDPRG7	zgpg30	PCPDPRG8	zgpg30
PCPDPRG9	zgpg30	PCPDPRG10	zgpg30
PCPDPRG11	zgpg30	PCPDPRG12	zgpg30
PCPDPRG13	zgpg30	PCPDPRG14	zgpg30
PCPDPRG15	zgpg30	PCPDPRG16	zgpg30
PCPDPRG17	zgpg30	PCPDPRG18	zgpg30
PCPDPRG19	zgpg30	PCPDPRG20	zgpg30
PCPDPRG21	zgpg30	PCPDPRG22	zgpg30
PCPDPRG23	zgpg30	PCPDPRG24	zgpg30
PCPDPRG25	zgpg30	PCPDPRG26	zgpg30
PCPDPRG27	zgpg30	PCPDPRG28	zgpg30
PCPDPRG29	zgpg30	PCPDPRG30	zgpg30
PCPDPRG31	zgpg30	PCPDPRG32	zgpg30
PCPDPRG33	zgpg30	PCPDPRG34	zgpg30
PCPDPRG35	zgpg30	PCPDPRG36	zgpg30
PCPDPRG37	zgpg30	PCPDPRG38	zgpg30
PCPDPRG39	zgpg30	PCPDPRG40	zgpg30
PCPDPRG41	zgpg30	PCPDPRG42	zgpg30
PCPDPRG43	zgpg30	PCPDPRG44	zgpg30
PCPDPRG45	zgpg30	PCPDPRG46	zgpg30
PCPDPRG47	zgpg30	PCPDPRG48	zgpg30
PCPDPRG49	zgpg30	PCPDPRG50	zgpg30
PCPDPRG51	zgpg30	PCPDPRG52	zgpg30
PCPDPRG53	zgpg30	PCPDPRG54	zgpg30
PCPDPRG55	zgpg30	PCPDPRG56	zgpg30
PCPDPRG57	zgpg30	PCPDPRG58	zgpg30
PCPDPRG59	zgpg30	PCPDPRG60	zgpg30
PCPDPRG61	zgpg30	PCPDPRG62	zgpg30
PCPDPRG63	zgpg30	PCPDPRG64	zgpg30
PCPDPRG65	zgpg30	PCPDPRG66	zgpg30
PCPDPRG67	zgpg30	PCPDPRG68	zgpg30
PCPDPRG69	zgpg30	PCPDPRG70	zgpg30
PCPDPRG71	zgpg30	PCPDPRG72	zgpg30
PCPDPRG73	zgpg30	PCPDPRG74	zgpg30
PCPDPRG75	zgpg30	PCPDPRG76	zgpg30
PCPDPRG77	zgpg30	PCPDPRG78	zgpg30
PCPDPRG79	zgpg30	PCPDPRG80	zgpg30
PCPDPRG81	zgpg30	PCPDPRG82	zgpg30
PCPDPRG83	zgpg30	PCPDPRG84	zgpg30
PCPDPRG85	zgpg30	PCPDPRG86	zgpg30
PCPDPRG87	zgpg30	PCPDPRG88	zgpg30
PCPDPRG89	zgpg30	PCPDPRG90	zgpg30
PCPDPRG91	zgpg30	PCPDPRG92	zgpg30
PCPDPRG93	zgpg30	PCPDPRG94	zgpg30
PCPDPRG95	zgpg30	PCPDPRG96	zgpg30
PCPDPRG97	zgpg30	PCPDPRG98	zgpg30
PCPDPRG99	zgpg30	PCPDPRG100	zgpg30

ANEXO 4 ESPECTRO H RMN DE ENC - A (CDCl₃)

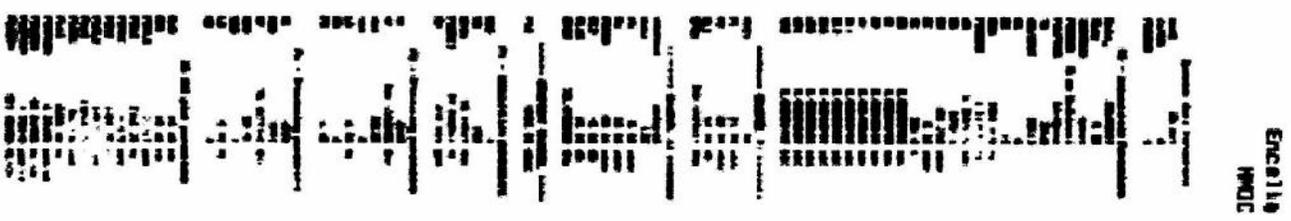
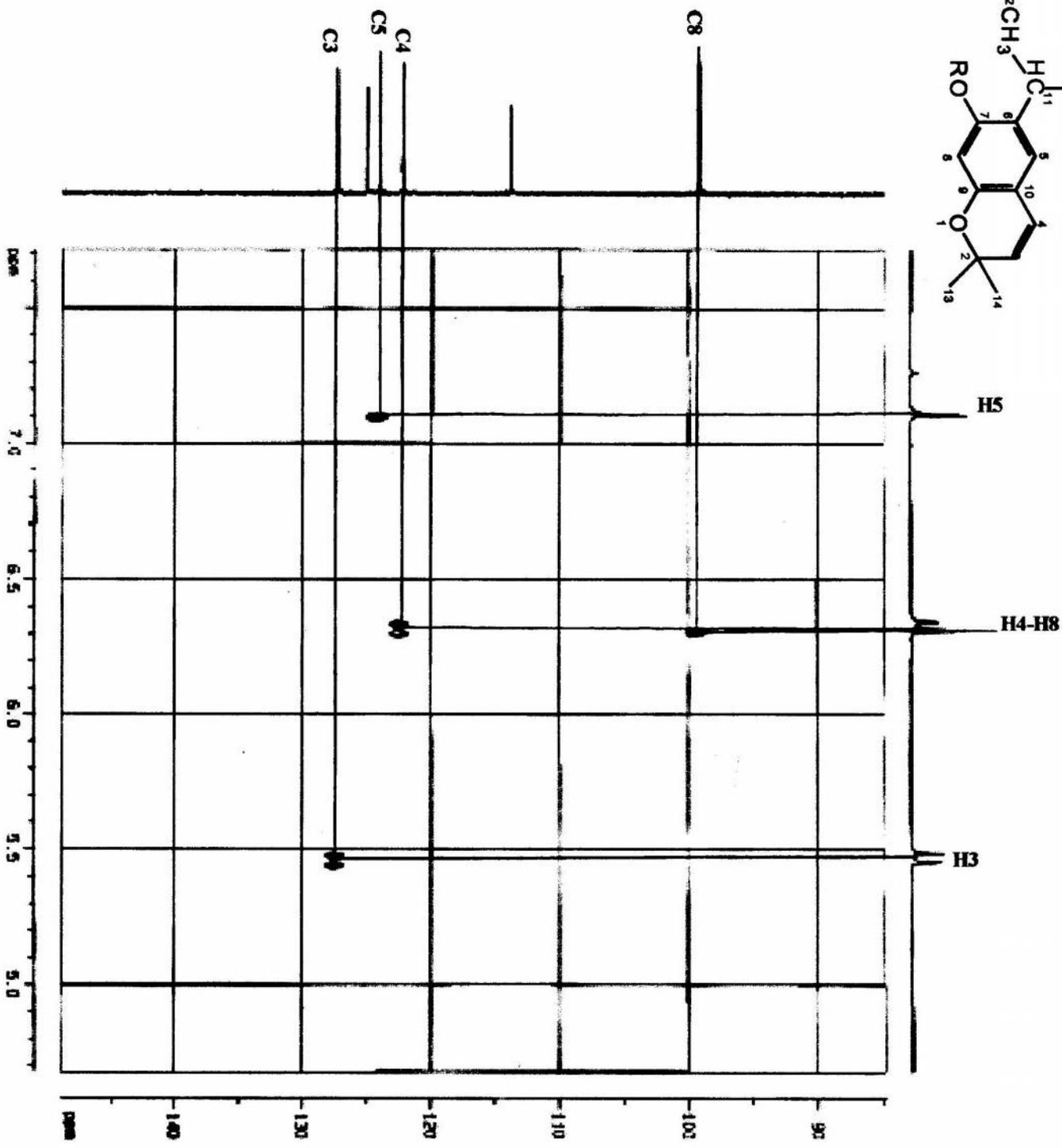
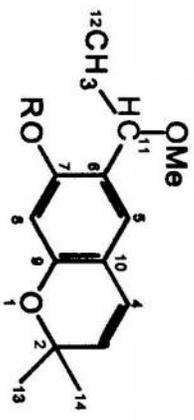
ENC116



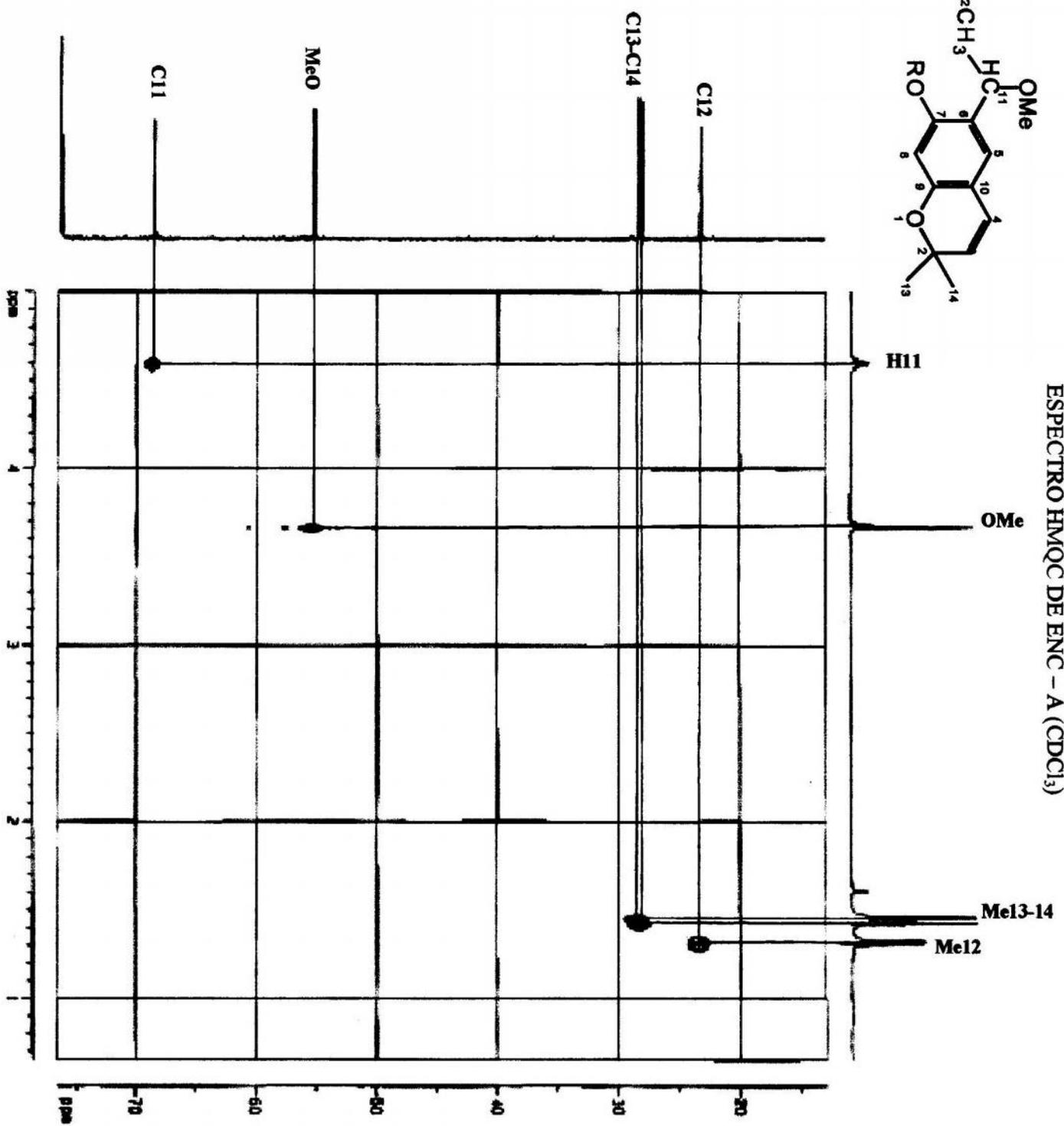
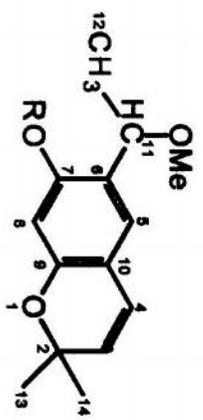
Current Data Parameters
 NAME: H1_05017
 EXPNO: 12
 PROCNO: 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_: 20070805



ANEXO 5.1
ESPECTRO HMQC DE ENC - A (CDCl₃)



ANEXO 5.2
 ESPECTRO HMQC DE ENC - A (CDCl₃)

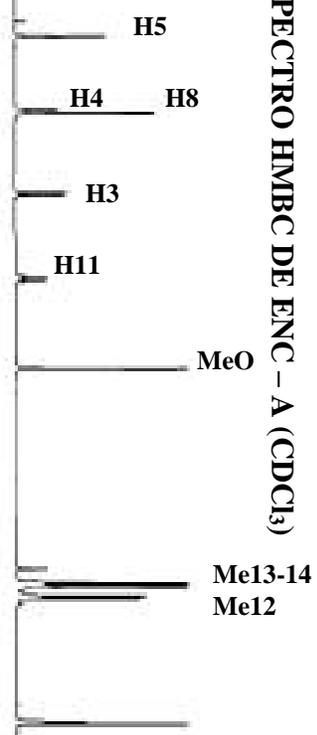
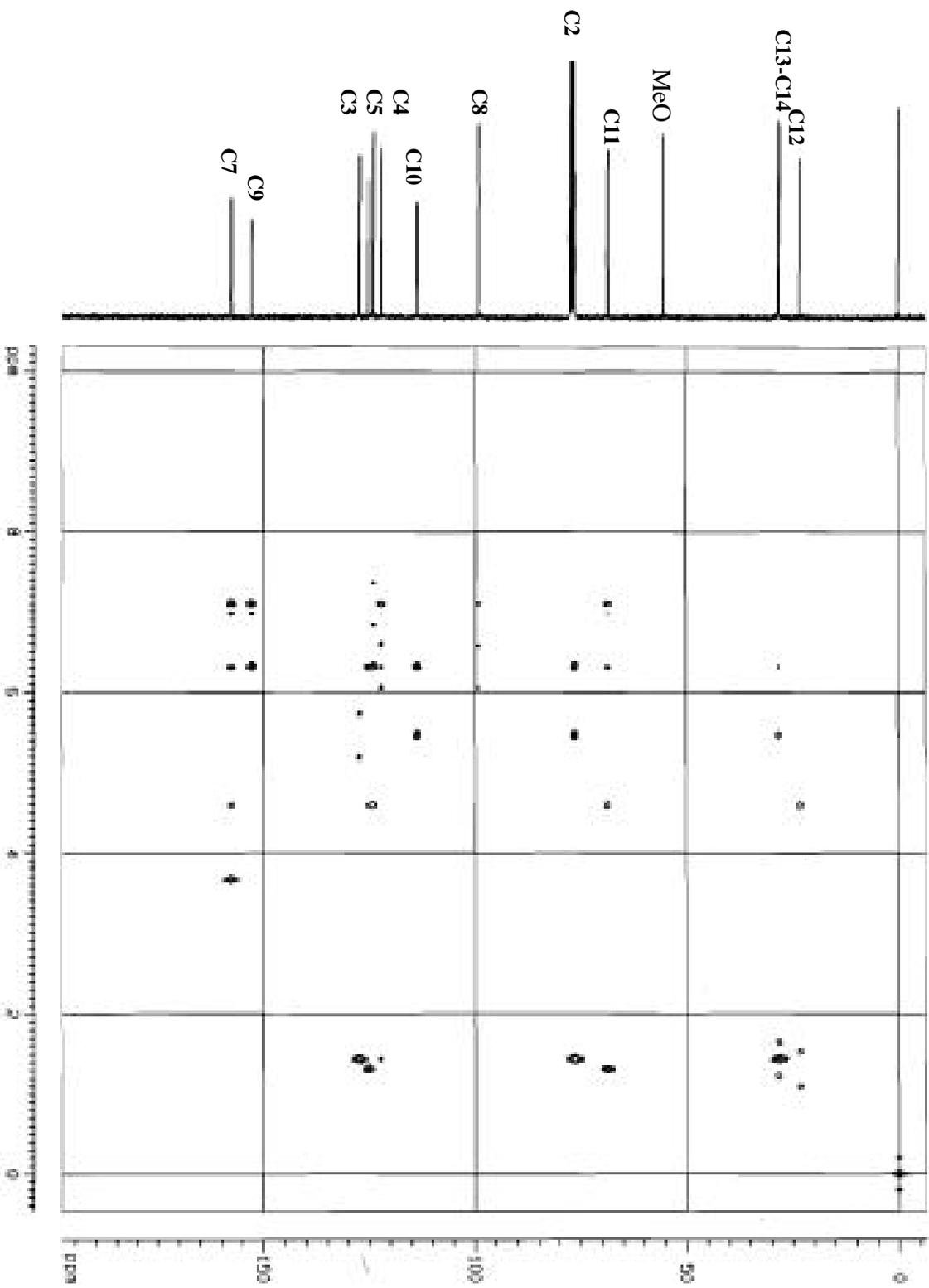
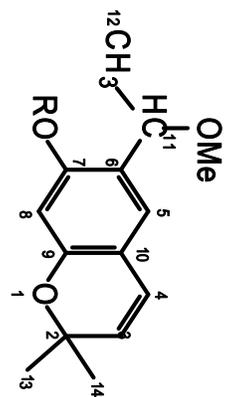


Eractis
 HMU:

1H NMR (CDCl₃)
 1.2 (s, 6H, Me12, Me13-14)
 3.8 (s, 3H, OMe)
 4.5 (s, 2H, H11, C11)
 7.0-7.5 (m, 5H, aromatic)

13C NMR (CDCl₃)
 25 (Me12, Me13-14)
 55 (OMe, MeO)
 70 (C11, H11)

ANEXO 6 ESPECTRO HMBC DE ENC - A (CDCl₃)



Enc-118

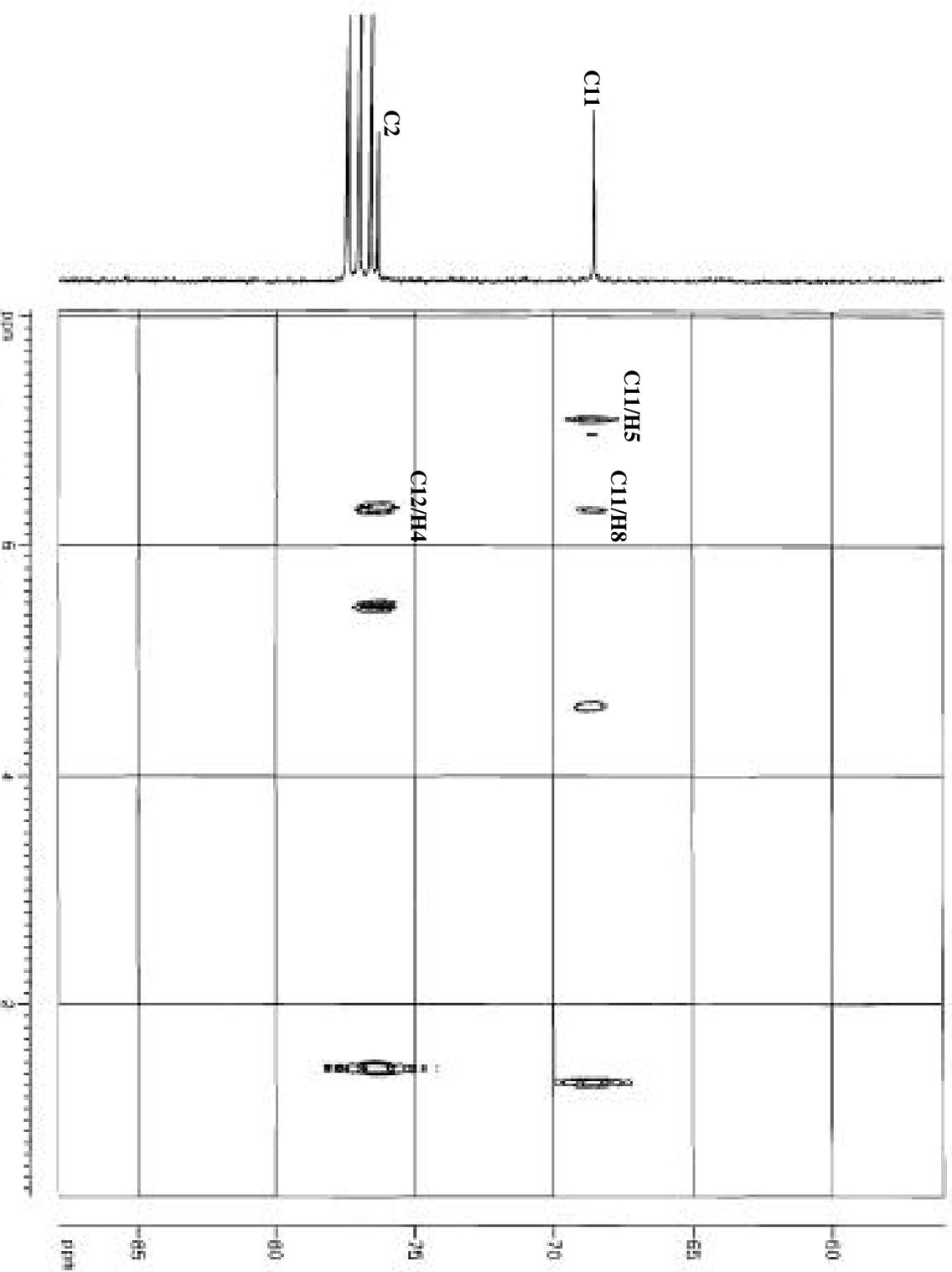
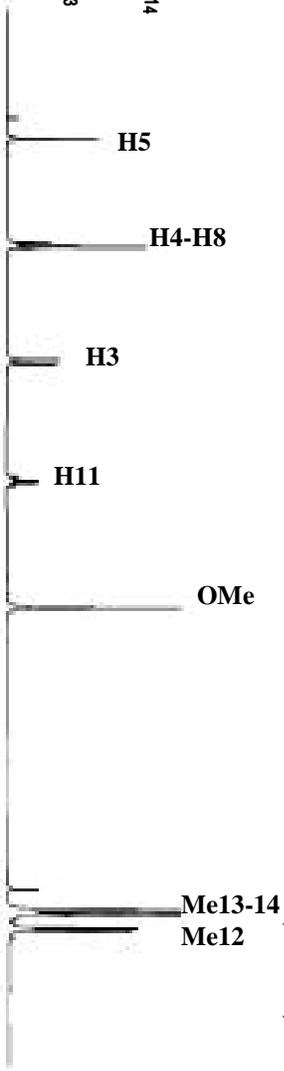
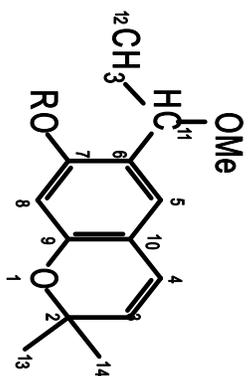
13C - Acquired Parameters

NAME	ENC-118
EXPNO	1
PROCNO	1
DATE_	11/01/2011
TIME	11:00:00
INSTRUM	zgpg30
PROBHD	5mm QNP 1H/13
PULPROG	zgpg30
TD	65536
SF	125.760131
AQ	0.100000
RG	327.5
SI	2048
SD	1.000000
WDW	EM
SSB	0
LB	3.000000
GB	0
PC	1.000000
DC	0
BLK	0
BR	0
BU	0
BT	0
BD	0
BE	0
BF	0
BF2	0
BF3	0
BF4	0
BF5	0
BF6	0
BF7	0
BF8	0
BF9	0
BF10	0
BF11	0
BF12	0
BF13	0
BF14	0
BF15	0
BF16	0
BF17	0
BF18	0
BF19	0
BF20	0
BF21	0
BF22	0
BF23	0
BF24	0
BF25	0
BF26	0
BF27	0
BF28	0
BF29	0
BF30	0
BF31	0
BF32	0
BF33	0
BF34	0
BF35	0
BF36	0
BF37	0
BF38	0
BF39	0
BF40	0
BF41	0
BF42	0
BF43	0
BF44	0
BF45	0
BF46	0
BF47	0
BF48	0
BF49	0
BF50	0
BF51	0
BF52	0
BF53	0
BF54	0
BF55	0
BF56	0
BF57	0
BF58	0
BF59	0
BF60	0
BF61	0
BF62	0
BF63	0
BF64	0
BF65	0
BF66	0
BF67	0
BF68	0
BF69	0
BF70	0
BF71	0
BF72	0
BF73	0
BF74	0
BF75	0
BF76	0
BF77	0
BF78	0
BF79	0
BF80	0
BF81	0
BF82	0
BF83	0
BF84	0
BF85	0
BF86	0
BF87	0
BF88	0
BF89	0
BF90	0
BF91	0
BF92	0
BF93	0
BF94	0
BF95	0
BF96	0
BF97	0
BF98	0
BF99	0
BF100	0

1H - Acquired Parameters

NAME	ENC-118
EXPNO	1
PROCNO	1
DATE_	11/01/2011
TIME	11:00:00
INSTRUM	zgpg30
PROBHD	5mm QNP 1H/13
PULPROG	zgpg30
TD	65536
SF	125.760131
AQ	0.100000
RG	327.5
SI	2048
SD	1.000000
WDW	EM
SSB	0
LB	3.000000
GB	0
PC	1.000000
DC	0
BLK	0
BR	0
BU	0
BT	0
BD	0
BE	0
BF	0
BF2	0
BF3	0
BF4	0
BF5	0
BF6	0
BF7	0
BF8	0
BF9	0
BF10	0
BF11	0
BF12	0
BF13	0
BF14	0
BF15	0
BF16	0
BF17	0
BF18	0
BF19	0
BF20	0
BF21	0
BF22	0
BF23	0
BF24	0
BF25	0
BF26	0
BF27	0
BF28	0
BF29	0
BF30	0
BF31	0
BF32	0
BF33	0
BF34	0
BF35	0
BF36	0
BF37	0
BF38	0
BF39	0
BF40	0
BF41	0
BF42	0
BF43	0
BF44	0
BF45	0
BF46	0
BF47	0
BF48	0
BF49	0
BF50	0
BF51	0
BF52	0
BF53	0
BF54	0
BF55	0
BF56	0
BF57	0
BF58	0
BF59	0
BF60	0
BF61	0
BF62	0
BF63	0
BF64	0
BF65	0
BF66	0
BF67	0
BF68	0
BF69	0
BF70	0
BF71	0
BF72	0
BF73	0
BF74	0
BF75	0
BF76	0
BF77	0
BF78	0
BF79	0
BF80	0
BF81	0
BF82	0
BF83	0
BF84	0
BF85	0
BF86	0
BF87	0
BF88	0
BF89	0
BF90	0
BF91	0
BF92	0
BF93	0
BF94	0
BF95	0
BF96	0
BF97	0
BF98	0
BF99	0
BF100	0

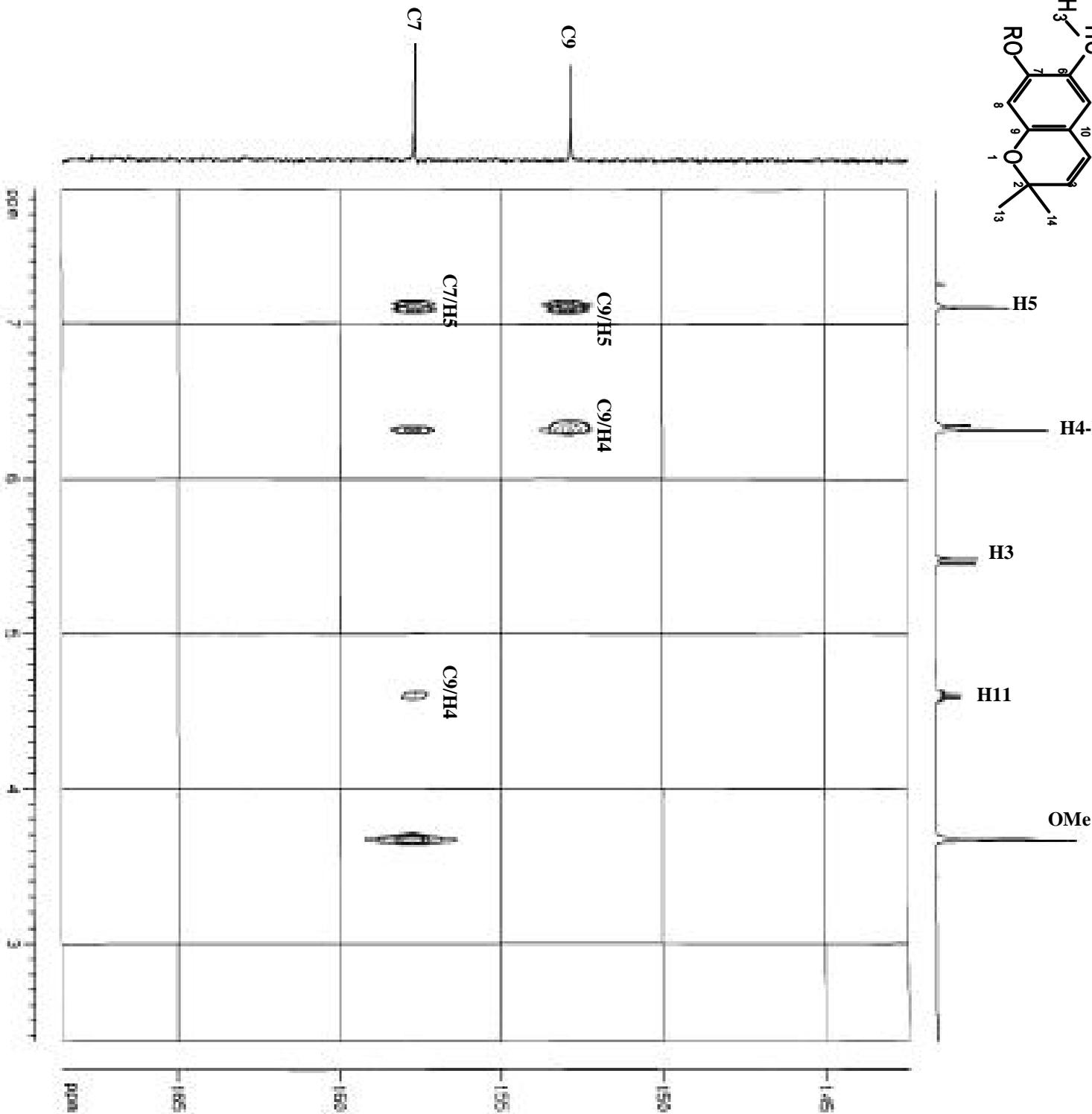
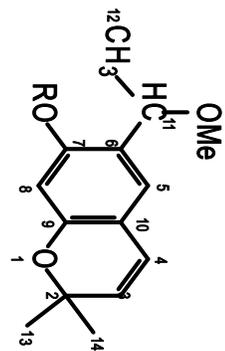
ANEXO 6.1 ESPECTRO HMBC DE ENC - A (CDCl₃)



Encel11a

Encel11a
 13C NMR (100 MHz, CDCl₃)
 158.1, 157.8, 157.5, 157.2, 156.9, 156.6, 156.3, 156.0, 155.7, 155.4, 155.1, 154.8, 154.5, 154.2, 153.9, 153.6, 153.3, 153.0, 152.7, 152.4, 152.1, 151.8, 151.5, 151.2, 150.9, 150.6, 150.3, 150.0, 149.7, 149.4, 149.1, 148.8, 148.5, 148.2, 147.9, 147.6, 147.3, 147.0, 146.7, 146.4, 146.1, 145.8, 145.5, 145.2, 144.9, 144.6, 144.3, 144.0, 143.7, 143.4, 143.1, 142.8, 142.5, 142.2, 141.9, 141.6, 141.3, 141.0, 140.7, 140.4, 140.1, 139.8, 139.5, 139.2, 138.9, 138.6, 138.3, 138.0, 137.7, 137.4, 137.1, 136.8, 136.5, 136.2, 135.9, 135.6, 135.3, 135.0, 134.7, 134.4, 134.1, 133.8, 133.5, 133.2, 132.9, 132.6, 132.3, 132.0, 131.7, 131.4, 131.1, 130.8, 130.5, 130.2, 129.9, 129.6, 129.3, 129.0, 128.7, 128.4, 128.1, 127.8, 127.5, 127.2, 126.9, 126.6, 126.3, 126.0, 125.7, 125.4, 125.1, 124.8, 124.5, 124.2, 123.9, 123.6, 123.3, 123.0, 122.7, 122.4, 122.1, 121.8, 121.5, 121.2, 120.9, 120.6, 120.3, 120.0, 119.7, 119.4, 119.1, 118.8, 118.5, 118.2, 117.9, 117.6, 117.3, 117.0, 116.7, 116.4, 116.1, 115.8, 115.5, 115.2, 114.9, 114.6, 114.3, 114.0, 113.7, 113.4, 113.1, 112.8, 112.5, 112.2, 111.9, 111.6, 111.3, 111.0, 110.7, 110.4, 110.1, 109.8, 109.5, 109.2, 108.9, 108.6, 108.3, 108.0, 107.7, 107.4, 107.1, 106.8, 106.5, 106.2, 105.9, 105.6, 105.3, 105.0, 104.7, 104.4, 104.1, 103.8, 103.5, 103.2, 102.9, 102.6, 102.3, 102.0, 101.7, 101.4, 101.1, 100.8, 100.5, 100.2, 99.9, 99.6, 99.3, 99.0, 98.7, 98.4, 98.1, 97.8, 97.5, 97.2, 96.9, 96.6, 96.3, 96.0, 95.7, 95.4, 95.1, 94.8, 94.5, 94.2, 93.9, 93.6, 93.3, 93.0, 92.7, 92.4, 92.1, 91.8, 91.5, 91.2, 90.9, 90.6, 90.3, 90.0, 89.7, 89.4, 89.1, 88.8, 88.5, 88.2, 87.9, 87.6, 87.3, 87.0, 86.7, 86.4, 86.1, 85.8, 85.5, 85.2, 84.9, 84.6, 84.3, 84.0, 83.7, 83.4, 83.1, 82.8, 82.5, 82.2, 81.9, 81.6, 81.3, 81.0, 80.7, 80.4, 80.1, 79.8, 79.5, 79.2, 78.9, 78.6, 78.3, 78.0, 77.7, 77.4, 77.1, 76.8, 76.5, 76.2, 75.9, 75.6, 75.3, 75.0, 74.7, 74.4, 74.1, 73.8, 73.5, 73.2, 72.9, 72.6, 72.3, 72.0, 71.7, 71.4, 71.1, 70.8, 70.5, 70.2, 69.9, 69.6, 69.3, 69.0, 68.7, 68.4, 68.1, 67.8, 67.5, 67.2, 66.9, 66.6, 66.3, 66.0, 65.7, 65.4, 65.1, 64.8, 64.5, 64.2, 63.9, 63.6, 63.3, 63.0, 62.7, 62.4, 62.1, 61.8, 61.5, 61.2, 60.9, 60.6, 60.3, 60.0, 59.7, 59.4, 59.1, 58.8, 58.5, 58.2, 57.9, 57.6, 57.3, 57.0, 56.7, 56.4, 56.1, 55.8, 55.5, 55.2, 54.9, 54.6, 54.3, 54.0, 53.7, 53.4, 53.1, 52.8, 52.5, 52.2, 51.9, 51.6, 51.3, 51.0, 50.7, 50.4, 50.1, 49.8, 49.5, 49.2, 48.9, 48.6, 48.3, 48.0, 47.7, 47.4, 47.1, 46.8, 46.5, 46.2, 45.9, 45.6, 45.3, 45.0, 44.7, 44.4, 44.1, 43.8, 43.5, 43.2, 42.9, 42.6, 42.3, 42.0, 41.7, 41.4, 41.1, 40.8, 40.5, 40.2, 39.9, 39.6, 39.3, 39.0, 38.7, 38.4, 38.1, 37.8, 37.5, 37.2, 36.9, 36.6, 36.3, 36.0, 35.7, 35.4, 35.1, 34.8, 34.5, 34.2, 33.9, 33.6, 33.3, 33.0, 32.7, 32.4, 32.1, 31.8, 31.5, 31.2, 30.9, 30.6, 30.3, 30.0, 29.7, 29.4, 29.1, 28.8, 28.5, 28.2, 27.9, 27.6, 27.3, 27.0, 26.7, 26.4, 26.1, 25.8, 25.5, 25.2, 24.9, 24.6, 24.3, 24.0, 23.7, 23.4, 23.1, 22.8, 22.5, 22.2, 21.9, 21.6, 21.3, 21.0, 20.7, 20.4, 20.1, 19.8, 19.5, 19.2, 18.9, 18.6, 18.3, 18.0, 17.7, 17.4, 17.1, 16.8, 16.5, 16.2, 15.9, 15.6, 15.3, 15.0, 14.7, 14.4, 14.1, 13.8, 13.5, 13.2, 12.9, 12.6, 12.3, 12.0, 11.7, 11.4, 11.1, 10.8, 10.5, 10.2, 9.9, 9.6, 9.3, 9.0, 8.7, 8.4, 8.1, 7.8, 7.5, 7.2, 6.9, 6.6, 6.3, 6.0, 5.7, 5.4, 5.1, 4.8, 4.5, 4.2, 3.9, 3.6, 3.3, 3.0, 2.7, 2.4, 2.1, 1.8, 1.5, 1.2, 0.9, 0.6, 0.3, 0.0.

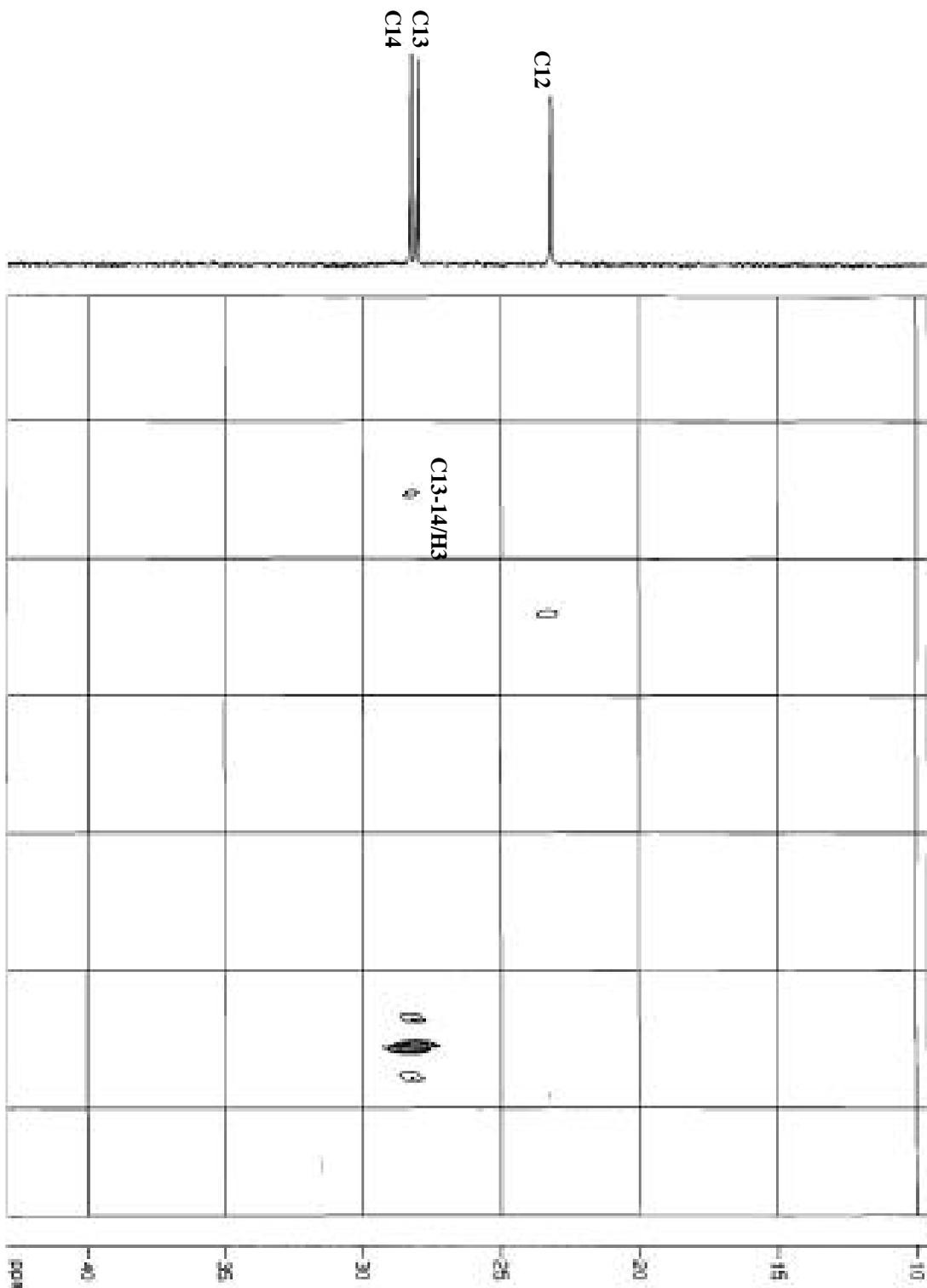
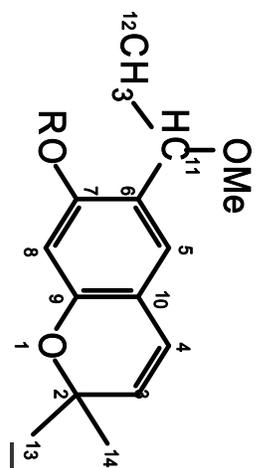
ANEXO 6.3 ESPECTRO HMBC DE ENC - A (CDCl₃)



Enc 6.118

13C NMR (101 MHz, CDCl₃)
 152.0 (C9), 151.0 (C7), 148.0 (C9/H4), 147.0 (C9/H4), 146.0 (C9/H4), 145.0 (C9/H4), 144.0 (C9/H4), 143.0 (C9/H4), 142.0 (C9/H4), 141.0 (C9/H4), 140.0 (C9/H4), 139.0 (C9/H4), 138.0 (C9/H4), 137.0 (C9/H4), 136.0 (C9/H4), 135.0 (C9/H4), 134.0 (C9/H4), 133.0 (C9/H4), 132.0 (C9/H4), 131.0 (C9/H4), 130.0 (C9/H4), 129.0 (C9/H4), 128.0 (C9/H4), 127.0 (C9/H4), 126.0 (C9/H4), 125.0 (C9/H4), 124.0 (C9/H4), 123.0 (C9/H4), 122.0 (C9/H4), 121.0 (C9/H4), 120.0 (C9/H4), 119.0 (C9/H4), 118.0 (C9/H4), 117.0 (C9/H4), 116.0 (C9/H4), 115.0 (C9/H4), 114.0 (C9/H4), 113.0 (C9/H4), 112.0 (C9/H4), 111.0 (C9/H4), 110.0 (C9/H4), 109.0 (C9/H4), 108.0 (C9/H4), 107.0 (C9/H4), 106.0 (C9/H4), 105.0 (C9/H4), 104.0 (C9/H4), 103.0 (C9/H4), 102.0 (C9/H4), 101.0 (C9/H4), 100.0 (C9/H4), 99.0 (C9/H4), 98.0 (C9/H4), 97.0 (C9/H4), 96.0 (C9/H4), 95.0 (C9/H4), 94.0 (C9/H4), 93.0 (C9/H4), 92.0 (C9/H4), 91.0 (C9/H4), 90.0 (C9/H4), 89.0 (C9/H4), 88.0 (C9/H4), 87.0 (C9/H4), 86.0 (C9/H4), 85.0 (C9/H4), 84.0 (C9/H4), 83.0 (C9/H4), 82.0 (C9/H4), 81.0 (C9/H4), 80.0 (C9/H4), 79.0 (C9/H4), 78.0 (C9/H4), 77.0 (C9/H4), 76.0 (C9/H4), 75.0 (C9/H4), 74.0 (C9/H4), 73.0 (C9/H4), 72.0 (C9/H4), 71.0 (C9/H4), 70.0 (C9/H4), 69.0 (C9/H4), 68.0 (C9/H4), 67.0 (C9/H4), 66.0 (C9/H4), 65.0 (C9/H4), 64.0 (C9/H4), 63.0 (C9/H4), 62.0 (C9/H4), 61.0 (C9/H4), 60.0 (C9/H4), 59.0 (C9/H4), 58.0 (C9/H4), 57.0 (C9/H4), 56.0 (C9/H4), 55.0 (C9/H4), 54.0 (C9/H4), 53.0 (C9/H4), 52.0 (C9/H4), 51.0 (C9/H4), 50.0 (C9/H4), 49.0 (C9/H4), 48.0 (C9/H4), 47.0 (C9/H4), 46.0 (C9/H4), 45.0 (C9/H4), 44.0 (C9/H4), 43.0 (C9/H4), 42.0 (C9/H4), 41.0 (C9/H4), 40.0 (C9/H4), 39.0 (C9/H4), 38.0 (C9/H4), 37.0 (C9/H4), 36.0 (C9/H4), 35.0 (C9/H4), 34.0 (C9/H4), 33.0 (C9/H4), 32.0 (C9/H4), 31.0 (C9/H4), 30.0 (C9/H4), 29.0 (C9/H4), 28.0 (C9/H4), 27.0 (C9/H4), 26.0 (C9/H4), 25.0 (C9/H4), 24.0 (C9/H4), 23.0 (C9/H4), 22.0 (C9/H4), 21.0 (C9/H4), 20.0 (C9/H4), 19.0 (C9/H4), 18.0 (C9/H4), 17.0 (C9/H4), 16.0 (C9/H4), 15.0 (C9/H4), 14.0 (C9/H4), 13.0 (C9/H4), 12.0 (C9/H4), 11.0 (C9/H4), 10.0 (C9/H4), 9.0 (C9/H4), 8.0 (C9/H4), 7.0 (C9/H4), 6.0 (C9/H4), 5.0 (C9/H4), 4.0 (C9/H4), 3.0 (C9/H4), 2.0 (C9/H4), 1.0 (C9/H4), 0.0 (C9/H4).

ANEXO 6.4 ESPECTRO HMBC DE ENC - A (CDCl₃)



Enc 6.1.1.4

Chemical shift (ppm): 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40

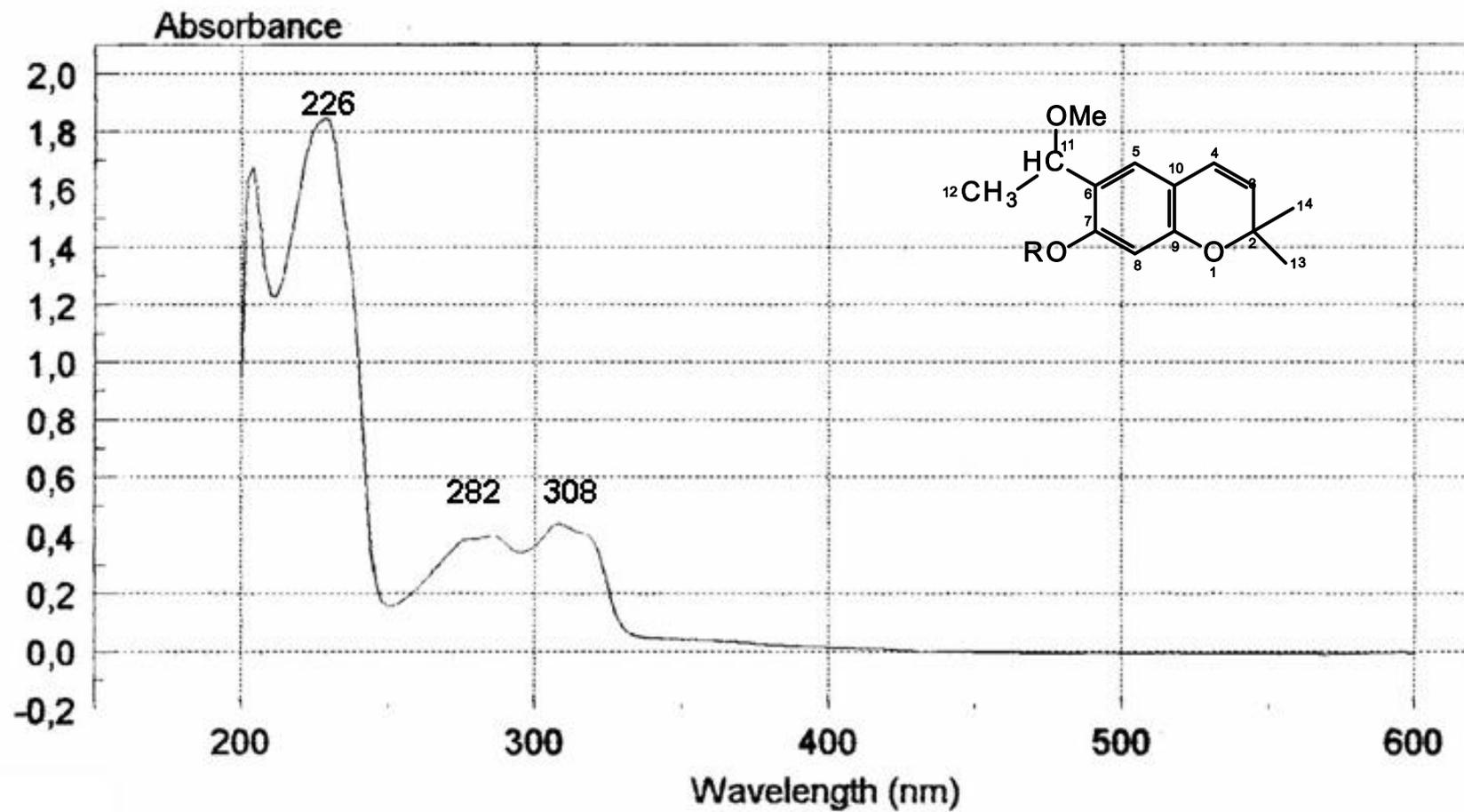
13C NMR (CDCl₃):

Chemical Shift (ppm)	Assignment
~1.0	Me12
~1.2	Me13-14
~3.8	OMe
~7.2-7.8	H4-H8, H3, H11
~26	C12
~31	C13, C14

1H NMR (CDCl₃):

Chemical Shift (ppm)	Integration	Assignment
~1.0	3H	Me12
~1.2	3H	Me13-14
~3.8	3H	OMe
~7.2-7.8	7.20, 7.40, 7.60	H4-H8, H3, H11

ANEXO 2 ESPECTRO UV DE ENC-A

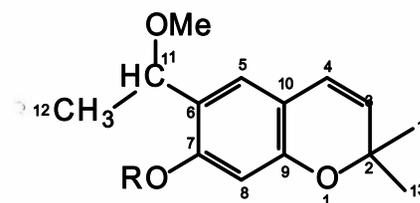
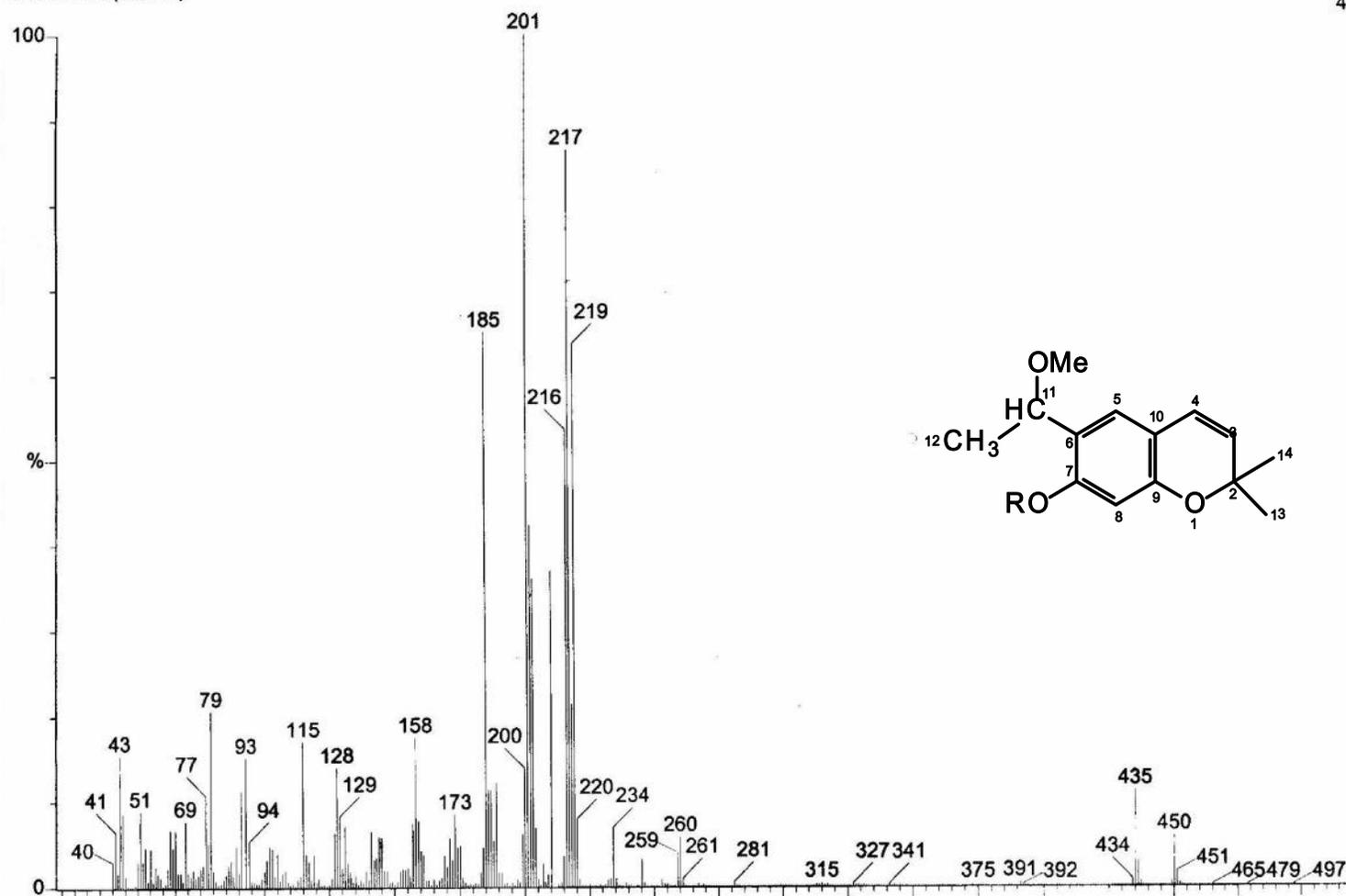


ANEXO 7 ESPECTRO DE MASAS DE ENC-A

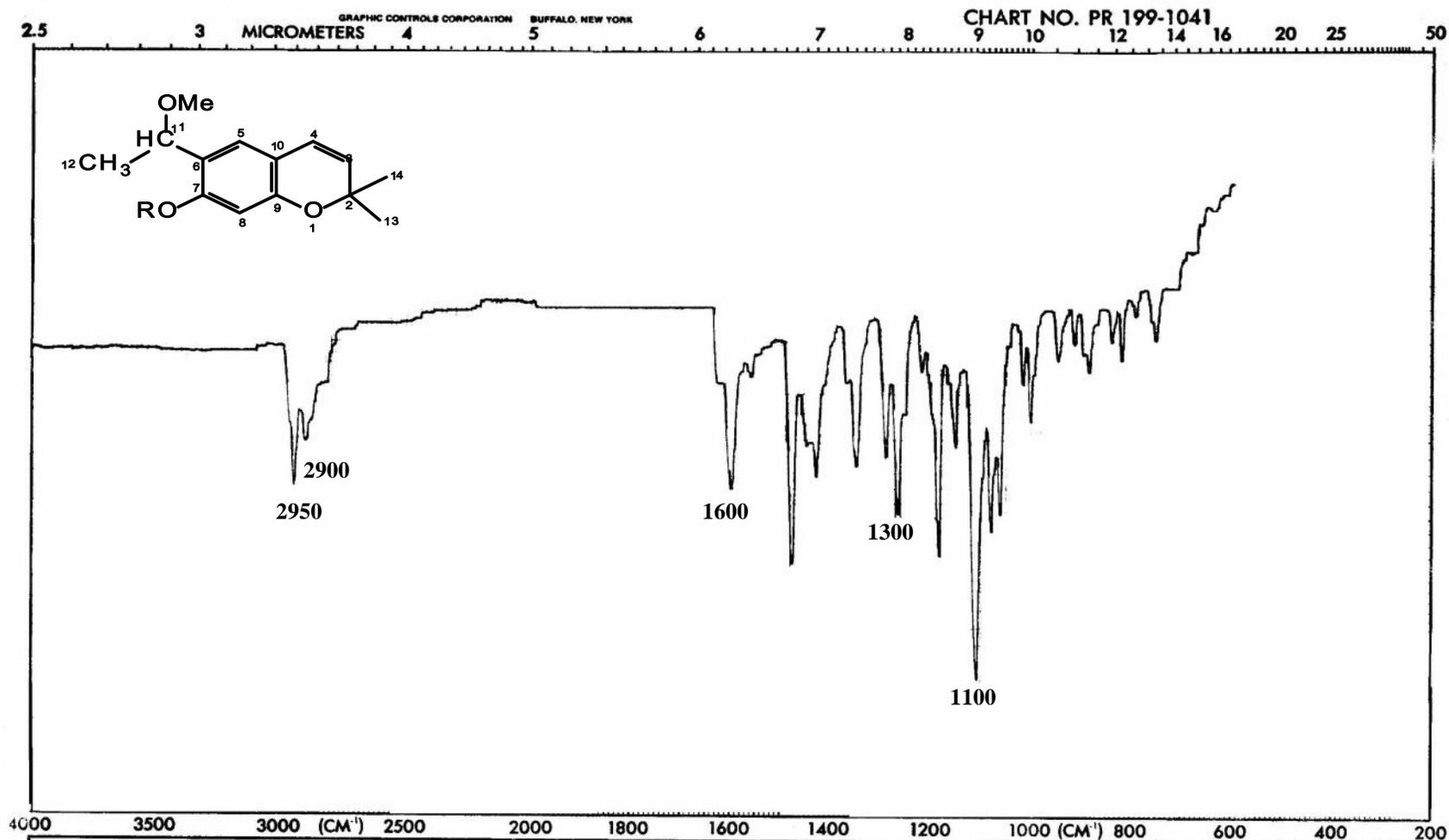
Sample ID: Sample Description
Acquired 03-Aug-2007 at 10:54:35
Library: NIST
11733A 776 (16.939)

Forward Fit: 446, Reverse Fit: 668

4.44e6



ANEXO 1 ESPECTRO IR DE ENC - A



SAMPLE REF. NO.

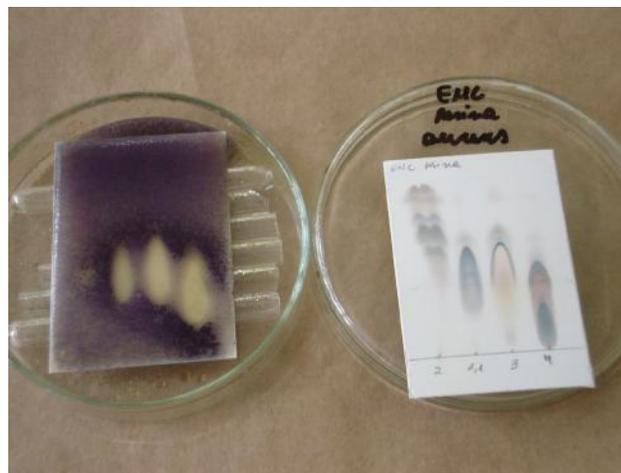
ABSCISSA	ORDINATE	SCAN TIME _____	REP. SCAN _____ SINGLE BEAM _____
EXPANSION _____	EXPANSION _____	MULTIPLIER _____	TIME DRIVE _____
	% T _____ ABS _____	SLIT PROGRAM _____	OPERATOR _____ DATE _____
SAMPLE _____	REMARKS _____	SOLVENT _____	CELL PATH _____
ORIGIN _____		CONCENTRATION <u>2%</u>	REFERENCE _____

ANEXO 10

Anexo 10.1 fotografía de la actividad antimicrobiana mediante Bioensayo Bioautografía del compuesto 45 y 46, además del AESC y del ERES frente a *E. coli*



Anexo 10.2 fotografía de la actividad antimicrobiana mediante Bioensayo Bioautografía del compuesto 2, 2,1 (denominado A), 3 y 4 frente a *S. aureus*



Anexo 10.3 fotografía de la actividad antimicrobiana mediante Bioensayo Bioautografía del compuesto 2, 2,1 (denominado A), 3 y 4 frente a *B. subtilis*

