



Universitat Autònoma
de Barcelona

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, DE TERAPEUTICA Y DE
TOXICOLOGIA, UNIDAD DOCENTE HOSPITAL UNIVERSITARIO
GERMANS TRIAS I PUJOL
Programa de Doctorado en Farmacología

**PRINCIPIOS CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA DE LA RAÍZ Y RIZOMA DE
*FERULA HERMONIS***

Tesis presentada por **Abdel Hadi Mohd Abdel Hadi Al Jafari** para la
obtención del Grado de Doctor por la Universidad Autònoma de Barcelona,
dirigida por los Dres. **Roser Vila i Casanovas** y **Joan Costa i Pagès**

Barcelona, Octubre 2014.



Universitat Autònoma
de Barcelona

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA, DE TERAPEUTICA Y DE
TOXICOLOGIA, UNIDAD DOCENTE HOSPITAL UNIVERSITARIO
GERMANS TRIAS I PUJOL
Programa de Doctorado en Farmacología

**PRINCIPIOS CON ACTIVIDAD
ANTIFÚNGICA DE LA RAÍZ Y RIZOMA DE
*FERULA HERMONIS***

Directores

Dra. Roser Vila i Casanovas

Dr. Joan Costa i Pagès

Doctorando

Abdel Hadi Mohd Abdel Hadi Al Jafari

Los Dres. Roser Vila i Casanovas,
Profesora Titular de Farmacología y
Farmacognosia de la Facultad de
Farmacia de la Universidad de Barcelona,
y Joan Costa i Pagès, Profesor Titular de
Farmacología de la Facultad de Medicina
de la Universidad Autónoma de
Barcelona,

CERTIFICAN: Que la Tesis titulada “Principios con
actividad antifúngica de la raíz y rizoma de *Ferula
hermonis*”, presentada por Abdel Hadi Mohd Abdel
Hadi Al Jafari, ha sido realizada bajo su dirección y
reúne los requisitos necesarios para su presentación
y posterior defensa ante el tribunal correspondiente.

Barcelona, 2014.

Dra. Roser Vila i Casanovas

Dr. Joan Costa i Pagès

Hasta el momento, de la presente Tesis se han derivado las siguientes publicaciones:

“Composition and antifungal activity of the essential oil from rhizome and roots of *Ferula hermonis*”. *Phytochemistry*, 72:1406-1413 (2011).

“Antifungal compounds from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*”. *Phytotherapy Research*, 27: 911-915 (2013).

Y las siguientes comunicaciones a congresos:

“Anti-dermatophyte constituents of the essential oil from the root of *Ferula hermonis*”, presentada en: 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Berlin, 29th August-2nd September (2010).

“Composition and antifungal activity of the essential oil of the root of *Ferula hermonis*”, presentada en: 7th joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, Athens, Greece, 3 – 8 August (2008), Publicada en *Planta Medica*; 74(9): 1194, (2008).

“Antifungal principle from the root of *Ferula hermonis*”, presentada en PSE Congress: *Phytotherapy – The role of an ancient tradition in modern times*, Madeira, Portugal, 1 – 5 November (2005).

El presente trabajo jamás hubiera visto la luz sin la colaboración de determinadas personas y entidades:

Dres. Roser Vila i Casanovas, Profesora de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de Barcelona y Joan Costa i Pagés, Profesor del Departamento de Farmacología, de Terapéutica i de Toxicología de la Universidad Autónoma de Barcelona y directores de la presente Tesis Doctoral.

Dr. Salvador Cañigüeral Folcará, Profesor de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de Barcelona.

Dra. Blanca Freixa de Reynoso, Profesora de la Unidad de Farmacología y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de Barcelona.

Éstas personas me han proporcionado todos los medios a su alcance para realizar la Tesis Doctoral.

Dr. Joseph Casanova y Dr. Felix Tomi, de la Universidad de Córcega por la obtención y la elucidación de una buena parte de los espectros de ^{13}C -RMN del aceite esencial.

Además he recibido colaboraciones imprescindibles, que resumo a continuación:

Dr. Adnan Badwan de "The Jordanian Pharmaceutical Manufacturing Co.", Naor, Jordania, y Dr. Talal El-Thaher de "Aragen Biotechnology", Naor, Jordania, por proporcionar el material vegetal.

Dra Magda Bou Dagher Kharrat, Département Sciences de la Vie et de la Terre, Université Saint Joseph, Bairut, Líbano, por la identificación botánica.

Las técnicas espectroscópicas se realizaron, en su mayoría, en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Barcelona: espectros de masas EI-MS y CI-MS (por Asunción Marín, Facultad de Farmacia); espectros de RMN (por Ana Linares, en la Facultad de Farmacia y por Marga Gairi en la *Unitat de RMN d'Alt Camp* en la Facultad de Ciencias Químicas).

Dr. Mohammad Sharif Damra y Renato Pérez Rosés por su amistad, colaboración y apoyo técnico y lingüístico para la redacción de la Tesis.

A mis padres, hermanos y hermanas, familiares, amigos y compañeros, que me disteis apoyo, esperanza y fuerzas para llegar hasta el final, os llevaré siempre en mi corazón.

ABREVIATURAS

- **1 AE:** Compuesto 1 del aceite esencial.
- **1 Ext:** Compuesto 1 de los extractos.
- **2 Ext:** Compuesto 2 de los extractos.
- **AE-RFH:** Aceite esencial de la raíz de *Ferula hermonis*.
- **¹³C-RMN:** Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13.
- **CC:** Column Chromatography. Cromatografía en Columna.
- **CCF:** Cromatografía en Capa Fina.
- **CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo.
- **CI-MS:** Chemical Ionization-Mass Spectromery. Espectrometría de Masas por Ionización Química.
- **CMF:** Concentración Mínima Fungicida. Minimal Fungicidal Concentration.
- **CMI:** Concentración Mínima Inhibitoria. Minimal Inhibitory Concentration.
- **COSY:** COrelated Spectroscopy.
- **DEPT:** Distortionless Enhancement by Polarization Transfer. Efecto de Distorsión y Transferencia de la Polarización.
- **EI-MS:** Electron Impact-Mass Spectrometry. Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico.
- **FID:** Flame Ionization Detector. Detector de Ionización de Llama.
- **GC:** Gas Chromatography. Cromatografía de Gases.
- **GC-MS:** Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Cromatografía de Gases asociada a Espectrometría de Masas.
- **¹H RMN:** Resonancia Magnética Nuclear de Protón.
- **HH COSY:** Homonuclear HH COrelated Spectroscopy.
- **HC COSY:** Heteronuclear HC Correlated Spectroscopy

- **HMBC**: Heteronuclear Multiple Bond Connectivity.
- **HSQC**: Heteronuclear Single Quantum Coherence.
- **J**: Constante de acoplamiento.
- **m/z**: Relación masa/carga.
- **MS**: Mass Spectrometry. Espectrometría de Masas.
- **Rf**: Retention factor. Factor de retención.
- **RFH**: Raíz de *Ferula hermonis*.
- **RMN**: Resonancia Magnética Nuclear.
- **UFC**: Unidades Formadoras de Colonias.
- **UV-VIS**: Ultravioleta-Visible.
- δ : Desplazamiento químico.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2.	ANTECEDENTES DE <i>FERULA HERMONIS</i>	7
2.1.	Introducción.....	9
2.2.	Aspectos botánicos.....	10
2.3.	Utilización en medicina tradicional.....	15
2.4.	Composición química de <i>F. hermonis</i>	16
2.5.	Actividad farmacológica.....	17
3.	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES	21
3.1.	Propiedades generales.....	23
3.2.	Localización botánica.....	24
3.3.	Composición química.....	25
3.4.	Actividad biológica y utilización.....	26
3.5.	Aceites esenciales en el género <i>Ferula</i>	29
4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	35
4.1.	Introducción.....	37
4.2.	Obtención de extractos.....	37
4.3.	Propiedades físico-químicas.....	40
4.3.1.	Determinación de la densidad relativa.....	40
4.3.2.	Determinación de la rotación óptica.....	40
4.3.3.	Determinación del índice de refracción.....	40
4.4.	Técnicas cromatográficas.....	41
4.4.1.	Introducción.....	41
4.4.2.	Cromatografía de adsorción.....	41
4.4.3.	Cromatografía de exclusión molecular.....	42

4.4.4.	Cromatografía en capa fina (CCF).....	43
4.4.5.	Cromatografía preparativa en columna.....	45
4.4.6.	Cromatografía de gases (GC).....	46
4.4.7.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	49
4.5.	Técnicas espectroscópicas.....	51
4.5.1.	Espectrometría de masas (MS).....	51
4.5.2.	Espectrometría de masas de impacto electrónico (EI-MS).....	51
4.5.3.	Espectrometría de masas de ionización química (CI-MS).....	52
4.5.4.	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	52
4.5.4.1.	RMN monodimensional.....	53
4.5.4.2.	RMN bidimensional.....	55
4.6.	Métodos de estudio de la actividad antifúngica.....	56
4.6.1.	Introducción.....	56
4.6.2.	Cepas de hongos.....	57
4.6.3.	Antifungigrama.....	58
4.6.4.	Bioautografía.....	60
4.6.5.	Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	63
4.6.6.	Concentración mínima fungicida (CMF).....	65
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
5.1.	Screening de la actividad antifúngica.....	69
5.2.	Investigación del aceite esencial.....	72
5.2.1.	Composición y actividad antifúngica del aceite esencial.....	72
5.2.2.	Índices físicos.....	83
5.2.3.	Fraccionamiento del aceite esencial y caracterización de los principios activos.....	83
5.3.	Investigación de los extractos hexánico y diclorometánico.....	101

5.3.1.	Compuestos antifúngicos de los extractos.....	101
5.3.2.	Fraccionamiento del los extractos hexánico y diclorometánico y caracterización de los compuestos activos.....	108
6.	CONCLUSIONES	135
7.	BIBLIOGRAFÍA	141

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En las últimas décadas, la incidencia de infecciones provocadas por hongos en los seres humanos, en particular las relacionadas con la piel y mucosas, ha incrementado de forma considerable, especialmente en los países tropicales y subtropicales, siendo *Candida* sp. y los dermatofitos *Tricophyton* sp., *Microsporum* sp. y *Epidermophyton* sp., algunos de los patógenos más frecuentes. Por otra parte, ha aumentado notablemente el número de pacientes inmunodeprimidos que con frecuencia desarrollan micosis oportunistas y superficiales (Pfaller y Diekema, 2007). Asimismo, los hongos pueden producir micosis invasoras graves en individuos sometidos a trasplantes de órganos o quimioterapia antineoplásica, en afectados por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en individuos de edad avanzada o en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, entre otros (Mateo y Nath, 2009). La evolución de las infecciones fúngicas se ve agravada, a menudo, por el hecho de que suelen ser difíciles de diagnosticar y se reconocen cuando ya se encuentran en estado avanzado. Por ello, las enfermedades causadas por hongos se han convertido en un importante problema de salud pública con un elevado coste económico.

Aunque en la actualidad se dispone de una variedad de fármacos antimicóticos con diferentes mecanismos de acción, su eficacia está limitada por una serie de factores tales como: su baja potencia, poca solubilidad, toxicidad y la aparición de cepas resistentes (Bastert *et al.*, 2001). Así pues, a pesar del enorme progreso experimentado en medicina, existe una evidente necesidad de nuevos agentes antifúngicos, más seguros, eficaces y económicos (Abad *et al.*, 2007).

La Naturaleza debido a su enorme diversidad química constituye una importante fuente para la búsqueda de nuevos productos útiles en terapéutica, particularmente antiinfecciosos. En este sentido, algunos de los agentes antifúngicos más recientemente introducidos en la práctica clínica, tales como las equinocandinas y las sordarinas, son derivados de productos naturales (Di Santo, 2010). En particular, el reino vegetal, ya sea como fuente de compuestos puros o de productos

extractivos, proporciona oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevos fármacos (Cos *et al.*, 2006). Efectivamente, las plantas ofrecen una amplia biodiversidad que comporta también una elevada diversidad química. Se estima que se conocen menos del 10% de los metabolitos secundarios de los vegetales, los cuales en numerosas ocasiones actúan como mecanismo de defensa de las plantas frente a ataques de microorganismos, insectos, etc... Por otra parte, alrededor de 14-28% de las especies de plantas superiores son utilizadas en terapéutica: las plantas constituyen una importante fuente de preparados medicinales (extractos, infusiones, aceites esenciales, etc...) empleados en la medicina tradicional desde la antigüedad, y particularmente muchas de ellas en el tratamiento de enfermedades infecciosas, constituyendo una importante fuente de compuestos biológicamente activos. Hasta la actualidad, más de 600 especies vegetales han demostrado poseer actividad antifúngica; sin embargo, sólo una pequeña parte de ellas han sido investigadas para caracterizar sus principios activos (Portillo *et al.*, 2001; Svetaz *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2013).

En los últimos años, numerosos estudios han evidenciado la actividad antifúngica de muchos productos obtenidos a partir de plantas (Abad *et al.*, 2007; Aqil *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2014; Freixa *et al.*, 2001; Portillo *et al.*, 2005.; Prescott *et al.*, 2014; Thevissen *et al.*, 2007). De todos ellos, los aceites esenciales constituyen uno de los grupos más prometedores, no sólo por su propia actividad y mecanismos de acción (Dorman y Deans, 2000; Lang y Buchbauer, 2012; Palmeira-de Oliveira *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2006; Vila *et al.*, 2011; Zuzarte *et al.*, 2011 y 2012), sino también debido al efecto sinérgico que pueden presentar cuando se administran en combinación con otros fármacos, lo cual permite una reducción de las dosis de estos últimos (Khan y Ahmad, 2011; Pyun y Shin, 2006; Rosato *et al.*, 2008).

El género *Ferula* (Apiaceae), conocido como una buena fuente de compuestos biológicamente activos, comprende unas 170 especies de amplia distribución en toda la zona del Mediterráneo y Asia Central (Pimenov y Leonov, 1993). Muchas de ellas se han utilizado desde la antigüedad por su aroma y gomorresina ya sea para fines

medicinales o culinarios. Varias especies de *Ferula* sp. son apreciadas en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones de la piel, trastornos estomacales, fiebre, disentería, histerias y como afrodisíaco (Al-Yahya *et al.*, 1998; Gamal-Eldeen y Hegazy, 2010). Los efectos hormonales y, más recientemente, las propiedades de prevención de cáncer y citotóxicas han sido también investigadas en plantas de este género (Lhuillier *et al.*, 2005).

Particularmente, *F. hermonis* Boiss., un arbusto que crece en el monte Hermón, entre Líbano y Siria, comúnmente conocido como "Shirsh-el-Zallouh", que significa raíz peluda, se utiliza en Medio Oriente para mejorar el comportamiento sexual en el tratamiento de la frigidez y la impotencia (Auzi *et al.*, 2008; El-Taher *et al.*, 2001; Lev y Amar, 2002). Si bien anteriormente se han publicado algunos trabajos sobre la composición de diferentes extractos (Al-Shae'r *et al.*, 2001; Auzi *et al.*, 2008; Diab *et al.*, 2001a, y b; Galal, 2000; Galal *et al.*, 2001; Lhuillier *et al.*, 2005) y sobre sus propiedades antibacteriana e insecticida (Al-Najar *et al.*, 2006; Al-Shae'r *et al.*, 2001; Galal *et al.*, 2001; Hilan *et al.*, 2007), existe muy poca información acerca de la composición de su aceite esencial y de su actividad antifúngica.

Así pues, partiendo de estos antecedentes, el presente trabajo plantea la **hipótesis** de que *F. hermonis* podría contener compuestos con actividad antifúngica, en particular en su aceite esencial del cual apenas se conoce su composición química. Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de una de las líneas de investigación del grupo de Farmacognosia y Fitoterapia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona dirigida a la búsqueda de nuevos productos de origen vegetal con actividad antifúngica.

Por consiguiente, el **objetivo general** ha sido estudiar los compuestos activos presentes en el aceite esencial y extractos del rizoma y raíces de *F. hermonis*. Para ello, los **objetivos específicos** planteados han sido:

- Determinar la actividad de diferentes productos extractivos obtenidos a partir de la raíz y rizoma de *F. hermonis* frente a diversas cepas de hongos.

- Realizar una investigación exhaustiva de la composición cualitativa y cuantitativa de su aceite esencial.
- Caracterizar los principios activos del aceite esencial y de los extractos con mayor actividad.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES DE *FERULA HERMONIS*

2.1. Introducción

La selección de especies vegetales constituye un punto clave en la investigación de nuevos productos naturales bioactivos, del cual dependerá en buena parte el éxito de los resultados finales.

Tradicionalmente, se han empleado dos tipos de programas de selección: la selección al azar y la selección dirigida, esta última utilizando criterios quimiotaxonómicos o etnofarmacológicos (Cox, 1990).

La gran biodiversidad vegetal en nuestro planeta, tanto en la superficie terrestre como en las profundidades de los mares y océanos, constituye una importante fuente potencial de nuevas moléculas naturales bioactivas, que ha sido relativamente poco investigada.

La investigación etnofarmacológica, basada principalmente en estudios botánicos, químicos y farmacológicos, así como de otras disciplinas (antropología, arqueología, historia y lingüística), contribuye a la búsqueda de nuevos productos naturales con actividad biológica (Rivier y Bruhn, 1979) y tiene como objetivos rescatar y documentar una importante herencia cultural para evitar que se pierda, así como investigar y evaluar los agentes empleados (Holmstedt, 1991).

La exploración del patrimonio terapéutico natural, y más particularmente, de las farmacopeas tradicionales ha sido siempre reconocida por las ciencias contemporáneas como una fuente importante de nuevos conocimientos sobre los constituyentes activos de las plantas. En efecto, aproximadamente el 75% de los medicamentos derivados de plantas han sido descubiertos a través de investigaciones etnofarmacológicas a partir de las farmacopeas de la medicina tradicional (Elisabetsky, 1991; Farnsworth y Soejarto, 1991; Gentry, 1993).

La utilización de plantas con fines terapéuticos es una práctica que se remonta al origen de la humanidad, basada en la experiencia y tradición de los pueblos, que

se trasmite de forma oral. Hasta algunos años atrás, se limitaba al sector rural, pero las necesidades migratorias hacia las grandes ciudades han aumentado la demanda de usuarios de este tipo de práctica, y hoy en día encontraremos sus manifestaciones en todas las capitales, incluso en los países desarrollados (Massó, 1992). Sin embargo, el fenómeno de la industrialización, que se impone en los hogares a partir de la década de los 60, cambia enormemente la situación, debido al nuevo modelo de vida diseñado, con un claro predominio de la sociedad industrializada o urbana y un abandono de la vida rural, con lo cual la transmisión oral del conocimiento popular sobre el empleo de plantas en la medicina tradicional se ha visto reducida de forma importante (Vallés y Bonet, 1996). Es preciso hacer un esfuerzo para evitar el riesgo de pérdida de estos conocimientos, no sólo para preservar parte de la herencia popular, sino también para conservar las informaciones sobre los usos de las plantas, las cuales servirán como fuente relevante de datos para otros estudios; asimismo, puede ser útil como medio de consulta para los lugareños (Raja *et al.*, 1997).

2.2. Aspectos botánicos

La especie objeto de estudio, *Ferula hermonis* Boiss., se incluye en la familia Apiáceas (Umbelíferas) que comprende casi exclusivamente plantas herbáceas de aspecto típico: tallos con nudos manifiestos y entrenudos huecos, hojas esparcidas, casi siempre repetidamente divididas y provistas de una vaina ensanchada que abraza el tallo; características inflorescencias en umbelas compuestas, en ocasiones simples, y frutos de tipo aquenio. Su composición química es causa de la toxicidad de algunas de sus especies, muchas de las cuales contienen alcaloides. Algunas Apiáceas ya eran conocidas por las antiguas civilizaciones china y mexicana, así como en la cuenca mediterránea, por las civilizaciones micénica, griega y romana. Teofrasto (372-278 a.C.) designaba a la familia con el nombre griego *Nartheodes*. Posteriormente, la palabra griega *Narhex* fue sustituida por la latina *Ferula*, nombre aplicado a los pedicelos secos de algunas Umbelíferas como *Foeniculum* (hinojo) o

férula. En el arte griego, Dionisio se representa a menudo con una *Ferula* o férula en la mano.

Un curioso carácter de la familia es que no se conoce absolutamente ningún híbrido interespecífico, lo cual es un inconveniente para los programas de selección (Heywood, 1985).

Tradicionalmente en la familia Apiáceas se han incluido 3 subfamilias: Hidrocotiloideas, Saniculoideas y Apioideas que comprenden unos 300 géneros y 2500-3000 especies. Sin embargo, las últimas revisiones consideran que abarca más de 400 géneros y más de 3000 especies, reunidas en 4 subfamilias: Azorelloideas, Mackinlayoideas, Saniculoideas y Apioideas. En esta última, precisamente, se incluye el género *Ferula*, que comprende unas 170 especies, tales como: *F. assafoetida* L., *F. communis* L., *F. foetida* Bungre., *F. galbaniflua* Boiss, *F. jaeschkeana* Vatke., *F. narthex* Boiss., entre otras (Plunkett *et al.*, 2004).

Las especies de la familia Apiáceas se hallan difundidas especialmente en las regiones extratropicales del hemisferio boreal; se trata de plantas esteparias, palustres, pratícolas y nemorales. Particularmente, en las estepas de Asia central se cultivan especies vivaces gigantescas, de varios metros de altura (ej., *Ferula* sp.). En Europa central son características de las praderas bien abonadas (ej., *Heracleum* sp.). Debido a su contenido en aceites esenciales, muchas de ellas se emplean como especias y como plantas medicinales, utilizándose principalmente los frutos, así como también las hojas y las raíces. Así, por ejemplo: la alcaravea (*Carum carvi*), el anís (*Pimpinella anisum*), el cilantro (*Coriandrum sativum*), el hinojo (*Foeniculum vulgare*) y el perejil (*Petroselinum crispum*), entre otras. Algunas especies tienen raíces napifomes comestibles, como la zanahoria (*Daucus carota*), o incluso venenosas como la cicuta (*Conium maculatum*), utilizada por Sócrates en su suicidio pero también empleada en medicina (Strasburger *et al.*, 2004).

F. hermonis Boiss. (figura 2.1. y 2.2.) es un arbusto pequeño de 1-2 m de altura, con flores blancas o amarillas, autóctono del monte Hermon (2814 m) ubicado

entre Siria y Líbano (figura 2.3.) y conocido en la zona con el nombre árabe de *Yabal esh Sheij* o Monte del Jefe por tener tres picos cubiertos siempre de nieve. Al pie de esta montaña se encuentran los conocidos altos del Golán. *F. hermonis* crece a una altura de 2000 - 2500 m y su cosecha óptima tiene lugar entre agosto y octubre antes de las primeras nevadas. Se utilizan el rizoma y las raíces (figura 2.4.), conocidos en la zona con el nombre de *Shirish El Zallouh*, que significa raíz del Zallouh o raíz peluda.



Figura 2.1. *F. hermonis* Boiss.



Figura 2.2. Parte aérea desecada de *F. hermonis*.



Figura 2.3. Ubicación del Monte Hermon.



Figura 2.4. Raíces y rizoma desecados de *F. hermonis*.

2.3. Utilización en medicina tradicional

F. hermonis es una especie empleada en la medicina tradicional del Líbano y otros países vecinos, como Siria, Jordania y Palestina, para el tratamiento de la disfunción eréctil. También ha sido muy utilizada para aumentar el número de montas entre el ganado, principalmente cabras y ovejas. En terapéutica se emplean principalmente las raíces y/o el rizoma, si bien las semillas también se utilizan. En la última década ha ganado la fama de ser una especie de Viagra[®] natural, conocida como “Viagra[®] libanesa”. En los países de Oriente Medio y en los Estados Unidos se comercializa la parte subterránea pulverizada en forma de preparados para administración oral, ya sean cápsulas o bolsitas para infusión.

El empleo tradicional de esta droga por las poblaciones locales se realiza de la siguiente forma: Se trocea la parte subterránea y se reduce una pequeña cantidad de

la raíz desecada hasta casi polvo. Posteriormente, se toma una parte equivalente a unos 5 g, según describen algunas fuentes, y se le añaden aproximadamente 200 mL de agua caliente y miel o azúcar según disponibilidad o gusto del consumidor. Se deja reposar en un vaso tapado con un plato unos 10-15 min y se bebe 3 veces al día durante 3 días consecutivos con el fin de obtener una mayor potencia para la realización del acto sexual.

Resulta curioso que entre los habitantes del monte Hermon, que practican una fe conocida como Drusismo (Drusos), está prohibido el uso de esta planta a los individuos menores de cuarenta años. En un principio, se pensó que se debía a su efecto afrodisíaco, pero posteriormente se ha confirmado que el empleo prolongado de los preparados de *F. hermonis* causa esterilidad al producir cambios estructurales en los testículos. Dado que esta especie se encuentra en una zona de cultura Árabe con tendencia al temprano matrimonio y a tener varios hijos, se entiende que un hombre a partir de los cuarenta años ya no necesita procrear, sino sólo poder cumplir satisfactoriamente con sus obligaciones conyugales, por lo que podría utilizar *F. hermonis* de forma segura (Homady, 2001).

2.4. Composición química de *F. hermonis*

La composición química de diferentes extractos de *F. hermonis* ha sido investigada por diversos autores. Un estudio exhaustivo de un extracto de las semillas obtenido con hexano:acetato de etilo (1:1) dio como resultado la identificación de diecisiete ésteres sesquiterpénicos derivados del núcleo del daucano, de los cuales tres fueron descritos por primera vez en la naturaleza (Auzi *et al.*, 2008).

En numerosos estudios se han analizado extractos de las raíces de *F. hermonis* obtenidos con diferentes disolventes orgánicos. Muchos de ellos se caracterizan por contener los sesquiterpenos ferutinina, teferina y teferidina, principales responsables de algunas de las actividades biológicas de los mismos (Abourashed *et al.*, 2001; Allouh, 2011; Al-Sha'er *et al.*, 2001; Colman-Saizarbitoria *et*

al., 2006; Diab *et al.*, 2001a; Diab *et al.*, 2001b; Galal *et al.*, 2001; Geroushi *et al.*, 2011; Ibraheim *et al.*, 2012a; Lhuillier *et al.*, 2005; Zanolli *et al.*, 2005; Zavatti *et al.*, 2006). Sin embargo, éstos no son los únicos compuestos descritos en las raíces de *F. hermonis*. Otros autores han identificado la presencia de α -tocoferol (Aoun *et al.*, 2005) y más recientemente de saponinas, tales como: sandrosaponina IX, sandrosaponina X y sandrosaponina XI (Ibraheim *et al.*, 2012b).

La información existente sobre la composición del aceite esencial de *F. hermonis* se recoge en el apartado 3.5. del Capítulo 3.

2.5. Actividad farmacológica

Varios estudios farmacológicos realizados durante la pasada década han permitido dar una base científica al empleo tradicional de *F. hermonis* como afrodisíaco.

En un estudio realizado con ratas “Wistar” macho se encontró que el aceite de las semillas de *F. hermonis* era capaz de mejorar la función eréctil de los animales en forma dosis dependiente (El-Thaher *et al.*, 2001). Posteriormente, se evaluó la actividad de un extracto metanólico de las raíces en comparación con el citrato de sildenafil. Este estudio halló que el extracto metanólico producía un aumento significativo en el número de cópulas que tenían las ratas sometidas a tratamiento respecto al grupo control o al grupo que recibió el citrato de sildenafil (Hadidi *et al.*, 2003). En otro trabajo, los resultados del tratamiento de ratas macho con extractos acetónicos fueron en cierto modo contradictorios, pues las dosis agudas incrementaron la motivación sexual de las ratas tratadas mientras que las dosis subcrónicas redujeron el número de eyaculaciones (Zanolli *et al.*, 2003). La actividad afrodisíaca de los extractos de la raíz de *F. hermonis*, por lo general, se asocia a la presencia de los sesquiterpenos ferutinina, teferina y teferidina. No obstante, cuando estos sesquiterpenos se administran de forma individual los resultados son complejos. En un ensayo “*in vivo*” realizado con ratas macho, los niveles de testosterona aumentaron al someter a los animales a tratamientos con ferutinina o

teferidina. Sin embargo, si bien la ferutinina era capaz de mejorar el comportamiento sexual de los machos sometidos a una dosis aguda, la teferidina únicamente provocaba un retraso en la eyaculación (Zanoli *et al.*, 2005a).

Cuando los extractos de la raíz de *F. hermonis* se administran a ratas hembra los resultados obtenidos son completamente diferentes. La actividad sexual de las ratas hembra tratadas disminuye significativamente respecto al grupo control. Esta reducción de la actividad sexual podría estar relacionada con una actividad anti-estrogénica (Zanoli *et al.*, 2005b). Cuando varios grupos de ratas hembra ovariectomizadas fueron tratadas con los sesquiterpenos teferina y teferidina la actividad sexual no varió respecto al grupo control. Sólo el tratamiento con ferutinina redujo la receptividad sexual de las ratas hembra (Zavatti *et al.*, 2006). Curiosamente, el mismo grupo de investigación, en un experimento similar publicado tres años más tarde, encontró resultados completamente opuestos en los que el tratamiento con ferutinina aumentó significativamente la actividad sexual del grupo tratado de ratas hembra ovariectomizadas respecto al grupo control (Zavatti *et al.*, 2009).

Los efectos de los extractos de *F. hermonis* no se circunscriben a la modificación del comportamiento sexual, sino que también alteran parámetros como la fertilidad. En un ensayo “*in vivo*” realizado con ratones hembra tratadas durante 6 semanas con un extracto etanólico se encontró que se redujo la fertilidad, el número de fetos viables y la implantación de los fetos en el útero (Homady *et al.*, 2002). Así mismo, se encontró que un extracto acuoso de *F. hermonis* no solo disminuía la fertilidad en ratones macho sino que también reducía la movilidad de los espermatozoides y la agresividad social de estos roedores (Khleifat *et al.*, 2001). Ello podría estar relacionado con la inhibición del crecimiento normal de los testículos y de la glándula prepuccial provocados por la administración de extractos de *F. hermonis*, efectos que fueron demostrados en experimentos realizados con ratones que no habían llegado a la madurez sexual (Homady, 2001).

Los mecanismos que a nivel molecular son modificados por los componentes de los extractos de *F. hermonis* y que alteran el comportamiento sexual o la fertilidad podrían, también, estar implicados en otras manifestaciones orgánicas. Allouh (2011) demostró que un extracto de *F. hermonis* administrado a ratas macho sometidas a ejercicio físico era capaz de incrementar la masa muscular y el tamaño de la fibra muscular. Los resultados fueron comparados con los obtenidos en los grupos control de ratas no tratadas sometidas a ejercicio y ratas tratadas no sometidas a ejercicio. El mecanismo molecular subyacente podría estar relacionado con un incremento en los niveles de testosterona provocado por el extracto investigado.

Los sesquiterpenos de la raíz y rizoma de *F. hermonis* han evidenciado también otras actividades biológicas. Así, en el modelo del edema plantar inducido por carragenina en rata, la ferutinina y la teferina mostraron una clara actividad antiinflamatoria, en tanto que la teferidina no provocó ningún efecto (Geroushi *et al.*, 2011). La ferutinina es capaz, también, de activar de forma importante la enzima óxido nítrico sintasa del tejido nervioso (Colman-Saizarbitoria *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha investigado la actividad citotóxica de este sesquiterpeno frente a las líneas celulares MiaPaCa-2 de cáncer de páncreas, MCF-7 de cáncer de mama, CCRF-CEM de leucemia y la línea celular multi-resistente CEM/ADR5000. En todos los ensayos la IC₅₀ determinada fue inferior a 20 µg/mL, lo cual sugiere un interés potencial de la ferutinina en el control del cáncer (Kuate *et al.*, 2012). Por último, se ha investigado la actividad antioxidante de los sesquiterpenos aislados a partir del extracto etanólico de la raíz de *F. hermonis*. Tres de los diecisiete sesquiterpenos estudiados mostraron una gran capacidad de captación de radicales libres en el ensayo del DPPH (Ibraheim *et al.* 2012b).

Desde la antigüedad, la medicina tradicional de los países de Oriente Medio ha empleado *F. hermonis* en el tratamiento de infecciones de la piel, fiebre y disentería. No es de extrañar, por ello, que los extractos de esta planta hayan sido investigados por sus efectos antimicrobianos. En un importante estudio realizado por Kuate y col. (2012) se investigó la actividad del extracto diclorometánico de las raíces frente a 12

cepas bacterianas pertenecientes a 4 especies de microorganismos: *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. El extracto manifestó una potente actividad antimicrobiana, siendo efectivo frente al 91,7% de las bacterias estudiadas. Estos resultados dan soporte al posible empleo de los extractos de *F. hermonis* en el tratamiento de infecciones bacterianas. En un ensayo anterior ya se había estudiado la actividad de *F. hermonis* frente a algunas de las bacterias mencionadas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecalis*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. En este caso, los resultados mostraron que los gérmenes gram negativos son muy susceptibles a los componentes de la resina, mientras que los gérmenes gram positivos son más sensibles a los componentes presentes en el aceite esencial de las raíces. Incluso se podría afirmar que, en general, *F. hermonis* posee una potente actividad bactericida, siendo incluso superior a la de los antibióticos ensayados (Hilan *et al.*, 2007).

En otro estudio, se examinó la actividad de la ferutinina frente a *Mycobacterium smegmatis*. En el ensayo de dilución en agar, su potencia resultó superior a la de la estreptomina o la rifampicina (Abourashed *et al.*, 2011). La ferutinina, junto a la teferidina y otros extractos, había sido previamente ensayada frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. En este caso, la ferutinina mostró una buena actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*, resultando inactiva frente al resto de los microorganismos ensayados, en tanto que la teferidina no mostró ningún tipo de actividad (Al-Sha'er *et al.*, 2001). La actividad antimicrobiana de una serie de diecisiete sesquiterpenos aislados a partir del extracto etanólico de la raíz fue a su vez ensayada frente a: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Los sesquiterpenos teferidina, ferutinina y teferina mostraron una potente actividad frente a *S. aureus*, *B. subtilis*, *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Ninguno de los compuestos ensayados presentó actividad antifúngica significativa (Ibraheim *et al.*, 2012b).

CAPITULO 3

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

3.1. Propiedades generales

Las drogas vegetales que contienen aceites esenciales han sido utilizadas y apreciadas desde la antigüedad por sus propiedades medicinales y aromáticas. Actualmente, tienen gran importancia económica en campos como la industria farmacéutica, perfumería, cosmética e industria alimentaria.

Los aceites esenciales son producto del metabolismo secundario del vegetal y constituyen el resultado del balance entre su biosíntesis y su catabolismo y/o pérdida física. Denominados, también, comúnmente esencias, son sustancias volátiles, que se obtienen principalmente por destilación, aunque se pueden extraer también por otros métodos. Se trata de mezclas complejas de compuestos orgánicos volátiles, más o menos numerosos, generalmente líquidos a temperatura ambiente, si bien algunos solidifican como el alcanfor. Cuando son de obtención reciente, los aceites esenciales suelen ser incoloros, como el de anís, o amarillentos, como el de comino y el de naranja. No obstante, algunos pueden ser rojizos, como los de canela y clavo, verdosos como el de ajeno y el de bergamota, o azules como el de manzanilla.

El aroma característico de un aceite esencial se atribuye, fundamentalmente, a los compuestos oxigenados que la componen. En general, las esencias son fluidas, como la de trementina, si bien algunas poseen viscosidad elevada, como la esencia de cubeba. Su densidad suele ser inferior a la del agua, a excepción de los aceites esenciales de canela, clavo y *Sassafras*, cuya densidad es superior a 1. Poseen un índice de refracción elevado y poder rotatorio, parámetros que se emplean en su control de calidad.

Se trata de productos de naturaleza lipófila, generalmente solubles en éter etílico y en la mayor parte de disolventes orgánicos, y poco solubles en agua. Con frecuencia, los aceites esenciales se encuentran asociados a otras sustancias, tales como gomas y resinas, y tienden a resinificarse por exposición al aire (Bruneton, 1995; Trease y Evans, 1991).

3.2. Localización botánica

Los aceites esenciales se encuentran repartidos por todo el reino vegetal, aunque es en el grupo de las Angiospermas donde existen numerosas familias especialmente ricas en esencias, tales como las Lamiáceas, en la que destacan los géneros *Thymus* sp., *Salvia* sp. o *Rosmarinus* sp.; las Rutáceas, especialmente los géneros *Citrus* sp. y *Ruta* sp.; y las Apiáceas, por ejemplo, el género *Carum* sp., entre otras. Por lo que se refiere a las Gimnospermas, cabe señalar los aceites esenciales de los géneros *Pinus* sp. y *Juniperus* sp. Entre los hongos, particularmente los Basidiomicetos, sobresale la producción de derivados farnesanos (Bocchi *et al.*, 1992). Los líquenes también contienen aceites esenciales que se caracterizan por estar constituidos por compuestos policetónicos e incluso halogenados (Greenberg, 1991). Por su parte, los musgos son fuente de nuevas estructuras sesquiterpénicas, tal y como lo demuestran los estudios llevados a cabo por Asakawa y col. (1998). Asimismo, las esponjas marinas también pueden contener compuestos volátiles característicos: en el género *Octocorallia* (Izac *et al.*, 1982) se encuentran derivados sesquiterpénicos furánicos. Este tipo de compuestos se han descrito, también, en el aceite esencial de la mirra, *Commiphora molmol* (Brieskorn *et al.*, 1983), y en el de *Commiphora kua* (Manguero *et al.*, 1996), así como en los de *Smyrniun galaticum* (Kubeczka *et al.*, 1996), *Smyrniun perfoliatum* (Mölleken *et al.*, 1998) y *Hedyosmum mexicanum* (Mundina *et al.*, 2000).

Los aceites esenciales se pueden hallar en diferentes órganos vegetales, tales como: estigmas (*Crocus sativa*), flores (*Smyrniun aromaticum*), hojas (*Salvia officinalis*), raíces (*Cichorium intybus*), rizomas (*Zingiber officinale*), cortezas (*Cinnamomum* sp.), frutos (*Cuminum cyminum*) y semillas (*Myristica fragrans* o *Brassica* sp.) (Bruneton, 1995). Se encuentran comúnmente localizados en órganos secretores especializados cuya estructura es, generalmente, característica de la familia a la que pertenece la planta (Craker, 1990).

3.3. Composición química

Los aceites esenciales contienen compuestos de estructura muy diversa, que se pueden reunir en dos grupos dependiendo de su origen biosintético: compuestos terpénicos y compuestos de origen no terpénico.

El término “terpeno” deriva de los estudios realizados sobre los destilados obtenidos a partir de Coníferas, cuyo aceite esencial procede de la oleorresina trementina, (“terpentin” en alemán, o “térébinthine” en francés). En un principio, fue aplicado exclusivamente a compuestos hidrocarburos, aunque posteriormente su uso se ha ido generalizando hasta llegar al concepto actual de terpeno, que incluye a toda aquella sustancia procedente del metabolismo isoprenoide. La biosíntesis de los compuestos de naturaleza terpénica sigue una secuencia de reacción fundamental en la que se parte de la formación del “isopreno activo” (C₅) o isopentenil pirofosfato (IPP). Tradicionalmente, se consideraba que el isopreno se biosintetizaba a partir de la *ruta del mevalonato*, o del ácido mevalónico, compuesto formado por condensación de tres moléculas de acetil CoA. Sin embargo, actualmente se conoce que en los cloroplastos el isopreno se puede formar también a partir de otra vía denominada *ruta de la desoxixilulosa fosfato*, siendo éste un intermediario biosintetizado a partir del piruvato y del fosfogliceraldehido. La unión sucesiva de unidades C₅ da lugar a la formación de los diferentes tipos de terpenos. Así, el IPP condensado con su isómero dimetil-alil pirofosfato (DMAPP), da lugar al geranil pirofosfato (GPP), precursor de la síntesis de monoterpenos (C₁₀). Una nueva condensación con otra unidad de IPP da lugar al farnesil pirofosfato (FPP), precursor de la síntesis de sesquiterpenos (C₁₅). Finalmente, gracias a la unión de una nueva unidad de IPP se origina el precursor de la síntesis de diterpenos (C₂₀), el geranilgeranil pirofosfato (GGPP). A continuación, se producen modificaciones de los esqueletos terpénicos previamente formados: introducción de grupos funcionales, reacciones de isomerización, etc. (Beale, 1991; Bruneton, 1995; Hanson, 1993; Luthra *et al.*, 1999).

Entre los componentes de origen no terpénico, se incluyen aquéllos cuya biogénesis transcurre a partir de la *vía del ácido sikímico*: son los derivados del fenilpropano (C₆-C₃), como la miristicina (*Myristica fragans*) o el eugenol (*Syzygium aromaticum*), y del fenilmetano (C₆-C₁), como la vanillina (*Vanilla planifolia*) (Bruneton, 1995). También se pueden encontrar compuestos derivados del metabolismo de los aminoácidos; por ejemplo: compuestos nitrogenados y azufrados, como el isotiocianato de alilo de la esencia de *Brassica nigra* (Greenberg, 1991). En este grupo heterogéneo no terpénico se incluyen, también, compuestos acíclicos de bajo peso molecular derivados de la vía biosintética de los ácidos grasos que pueden ser hidrocarburos u oxigenados, como en el caso de la esencia de *Coriandrum sativum*, constituida por alcanales, 2-alquenes y 2-alquenoles (Potter *et al.*, 1990).

3.4. Actividad biológica y utilización

Se han formulado diversas hipótesis sobre el papel que desempeñan los aceites esenciales en el vegetal. Se trata de productos del metabolismo secundario a los que se han atribuido, fundamentalmente, diversas funciones ecológicas. Favorecen la polinización, debido a que su aroma atrae a los insectos; así, por ejemplo, el sesquiterpeno farnesol es un potente atrayente sexual en los mismos; en cambio, concentraciones elevadas de monoterpenos actúan como repelentes de potenciales depredadores y favorecen la cicatrización de heridas. Las esencias pueden constituir, también, sustancias de reserva para el vegetal y actuar como fuente de energía en casos de estados deficientes por interrupción de la asimilación normal de CO₂. Otro tipo de funciones físicas consistiría en la protección de los tejidos contra la acción de agentes atmosféricos y evitar el recalentamiento de la planta mediante un mecanismo de ahorro de agua, siendo utilizado el calor absorbido para evaporar el aceite volátil (Harborne y Turner, 1984; Luckner, 1990).

Los aceites esenciales presentan acciones farmacológicas muy diversas debido a la heterogeneidad y número de componentes. Ciertos aceites esenciales están formados por un constituyente mayoritario al cual deben su actividad, como en

el caso del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, cuya actividad antiséptica se debe fundamentalmente al 1,8-cineol. Otros, en cambio, deben sus propiedades a la sinergia producida por sus diferentes componentes sin que se puedan atribuir a un compuesto determinado, como por ejemplo, el aceite esencial de *Ocimum basilicum* (Rouzet, 1991).

Entre estas actividades farmacológicas cabe destacar por su importancia, la acción antimicrobiana y, por extensión, antiséptica y desinfectante, debidas fundamentalmente a las alteraciones que producen ciertos componentes de los aceites esenciales en la permeabilidad de las membranas de los microorganismos (Belaiche *et al.*, 1995; Deans y Svoboda, 1990; Janssen *et al.*, 1987). En este sentido, los derivados terpénicos más activos son los fenoles timol y carvacrol, seguidos de alcoholes, aldehídos y, finalmente, hidrocarburos (Cruz *et al.*, 1993). Un gran número de esencias poseen, en particular, actividad antifúngica, siendo la de tomillo, por ejemplo, activa frente a 39 cepas diferentes (Benjilali *et al.*, 1984; Farag *et al.*, 1989; Pina-Vaz *et al.*, 2004).

Otras actividades de los aceites esenciales con interés terapéutico son (Bruneton, 1995; Schilcher, 1984): **espasmolítica** y **sedante** de la esencia de lavanda; **carminativa y digestiva** de la esencia de anís o **colerética y colagoga** de la esencia de cúrcuma. El aceite esencial de manzanilla común presenta actividad **antiinflamatoria**, debido, principalmente, a su contenido en α - y β -bisabolol y sus óxidos correspondientes, así como al camazuleno, aunque en menor grado. El aceite esencial de clavo posee acción **antiséptica** y **analgésica** debido al eugenol, que constituye un 80% del total de la esencia. La esencia de trementina es **expectorante** y **diurética** debido a su elevado contenido en hidrocarburos, en especial α - y β -pineno, que producen un efecto irritante a nivel bronquial y renal, provocando un aumento de la microcirculación local. En otras ocasiones, las esencias pueden presentar propiedades **insecticidas y repelentes**, como el aceite esencial de albahaca. También, pueden ser **rubefacientes**, como es el caso de las esencias de

algunas *Melaleuca* sp., o tener acción **anticonvulsivante** como se está comprobando en la esencia de *Pimpinella anisum* (Pourgholami *et al.*, 2000).

En las últimas décadas, gracias a la evolución experimentada por las técnicas de separación y de identificación estructural de componentes de estas mezclas complejas, se han podido investigar los mecanismos de actividad de determinados constituyentes de las esencias. Así, por ejemplo, el mecanismo de la **actividad citotóxica y antitumoral** de ciertas lactonas sesquiterpénicas, se explica en base a su estructura (Hall *et al.*, 1977; Zafra-Polo y Blazquez, 1991). Se trata de γ -lactonas α,β -insaturadas que actuarían potencialmente sobre la alquilación de los centros nucleófilos de moléculas biológicas, bloqueando así los enzimas necesarios para el funcionamiento de las vías metabólicas principales. Este mecanismo ha sido comprobado “*in vitro*” para compuestos como la helenalina (Cordell, 1977; Picman, 1986).

También se han comprobado, en lactonas sesquiterpénicas, otras actividades biológicas importantes, tales como: **antihepatotóxica, alergénica, espasmolítica y antiinflamatoria** (Zafra-Polo y Blazquez, 1991).

En la actualidad, son numerosos los estudios referentes a la actividad **antioxidante** de diversos grupos de compuestos de origen vegetal. En este sentido, algunas drogas aromáticas han mostrado efectos antioxidantes notables debidas a los componentes fenilpropanoides que contienen. Del mismo modo, se han encontrado diterpenos fenólicos antioxidantes en las esencias de salvia y de romero (Kramer, 1984; Nakatani *et al.*, 1992).

Otro grupo de constituyentes de los aceites esenciales objeto de investigaciones farmacológicas son los alilbencenos con **propiedades psicoactivas**. La miristicina, por ejemplo, es un alucinógeno con una estructura muy similar a la de la mescalina o a la de la anfetamina. Este grupo de sustancias es metabolizado, por transaminación, a derivados anfetamínicos en el cerebro, de ahí su actividad. El

safrol, químicamente relacionado con la metilendioxiacetamina (MDA), presenta también la misma actividad (Forrest *et al.*, 1972).

Los aceites esenciales y las drogas que los contienen se emplean como excipientes, aromatizantes y/o correctores del sabor, conservantes o antioxidantes, en múltiples preparaciones farmacéuticas así como en la industria alimentaria (Deighton *et al.*, 1993). Asimismo, algunos de sus constituyentes son utilizados como precursores para la semisíntesis de compuestos más complejos o de difícil obtención por otros métodos. Es el caso, por ejemplo, de la producción de mentol a partir de α -pineno, o de vainillina a partir de safrol o eugenol (Benjilali, 1986).

Por otra parte, es importante el estudio de la posible **toxicidad** de los aceites esenciales. A menudo, el hecho de pensar que se trata de productos naturales conduce a un abuso del producto en la creencia equivocada de que no resulta nocivo para la salud. Por tanto, estos estudios deben dirigirse, no sólo hacia sus posibles propiedades farmacológicas y aplicaciones terapéuticas, sino también hacia la determinación de las dosis adecuadas y los posibles efectos secundarios a corto o largo plazo. Los efectos tóxicos que pueden presentar estos productos son notables. Así, por ejemplo: el pineno y, en general, los hidrocarburos monoterpénicos poseen efectos narcóticos a dosis elevadas; la tujona es una cetona monoterpénica psicoanaléptica que puede producir trastornos psíquicos y sensoriales; el mentol puede provocar espasmo de glotis en niños con el consiguiente riesgo de asfixia; el safrol, fenilpropanoide contenido en el aceite esencial de la raíz de *Sassafras officinale*, ha mostrado ser cancerígeno en roedores (Bruneton, 1995; Caldwell y Archibald, 1987; Tateo *et al.*, 1989).

3.5. Aceites esenciales en el género *Ferula*

El género *Ferula* comprende cerca de 170 especies distribuidas alrededor del Mediterráneo y Asia central. La composición química de los aceites esenciales en este género ha sido estudiada por muchos grupos de investigación.

En la tabla 3.1. se muestran las especies estudiadas, su procedencia, la parte de la planta empleada para la obtención del aceite esencial y los compuestos mayoritarios.

En sus aceites esenciales es característica la presencia de sesquiterpenos derivados del daucano, humulano, himachalano, germacrano, eudesmano y guaiano (Ibraheim *et al.*, 2012b).

Entre los constituyentes mayoritarios descritos en los aceites esenciales investigados del género *Ferula* se encuentran: hidrocarburos monoterpénicos, tales como α -pineno (Karim y Bhatti, 1978; Maggi *et al.*, 2009; Rustaiyan *et al.*, 2001a), β -pineno (Ghannadi y Amree, 2002; Omidbaigi y Sefidkon 2002; Rustaiyan *et al.*, 2002), mirceno (Ferrari *et al.*, 2005; Maggi *et al.*, 2009), *cis*-ocimeno (Habibi *et al.*, 2006a; Sefidkon *et al.*, 1998), o δ -3-careno (Ahmad *et al.*, 1987; Ashraf *et al.*, 1979c; Ghannadi y Amree, 2002); hidrocarburos sesquiterpénicos como *trans*-cariofileno (Maggi *et al.*, 2009); sesquiterpenos oxigenados como el farnesol (Ashraf *et al.*, 1979a); compuestos azufrados como el disulfuro de *trans*-1-propenilo sec-butilo (Dai y Qiu 1992), y alcanos como el nonano (Başer *et al.*, 2000).

Características químicas y biológicas de los aceites esenciales

Especie	Origen	Parte de la planta	Compuestos mayoritarios	Referencia
<i>F. arrigonii</i> Bocchieri	Córcega	Hojas	β -Felandreno (16,6%) Germacra-1(10),5-dien-11-ol (15,4%) Linalol (12,5%)	Filippini <i>et al.</i> , 2000
<i>F. assa-foetida</i> L.	Irán	Gomo-resina	Disulfuro de <i>trans</i> -1-propenilo <i>sec</i> -butilo (58,9%) <i>cis</i> - β -Ocimeno (11,9%) <i>trans</i> - β -Ocimeno (9%)	Sefidkon <i>et al.</i> , 1998
<i>F. communis</i> L.	Córcega	Hojas	Mirceno (53,5%) Aristoleno (8,5%) α -Pineno (6,6%)	Ferrari <i>et al.</i> , 2005
<i>F. costata</i> Ghuttai	Pakistán	Semillas	Farnesol (30,2%) β -Cariofileno (11,7%) δ -Cadinol (10,7%)	Ashraf <i>et al.</i> , 1979a
<i>F. elaeochytris</i> Korovin	Turquía	Frutos	Nonano (27,1%) α -Pineno (12,7%) Germacreno B (10,3%)	Başer <i>et al.</i> , 2000
<i>F. flabelliloba</i> Rech.	Irán	Parte aérea	δ -Cadineno (13,2%) α -Cadinol (12%) Cadina-4,1(10)-dien-8 β -ol (10,9%)	Rustaiyan <i>et al.</i> , 2001b
		Frutos	10-epi- γ -Eudesmol (14,1%) β -Dihidroagrofurano (13,3%) α -Bisabolol (9,9%)	Iranshahi <i>et al.</i> , 2008
<i>F. foetida</i> Regel (<i>Ushi</i>)	Pakistán	Semillas	β -Selineno (17,2%) Longifoleno (5,9%) Eugenol (5%)	Ashraf <i>et al.</i> , 1979b
<i>F. fukanesis</i> K. M. Shen	China	Resina	Disulfuro de <i>trans</i> -1-propenilo <i>sec</i> -butilo (41,1%) Disulfuro de <i>sec</i> -butil- <i>trans</i> -2-butenilo (27,8%) Disulfuro de di- <i>sec</i> -butilo (9,6%)	Dai y Qiu 1992
<i>F. galbaniflua</i> Boiss.	Irán	Raíz	β -Pineno (58,8%) Mirceno (3,7%) α -Pineno (2,6%)	Rustaiyan <i>et al.</i> , 2002
<i>F. galbaniflua</i> Boiss.	Irán	Tallo	β -Pineno (58,8%) Acetato de <i>cis</i> -crisantono (6,1%) <i>trans</i> -Nerolidal (5,2%)	Rustaiyan <i>et al.</i> , 2002
<i>F. glauca</i> L.	Italia	Hojas	<i>trans</i> -Cariofileno (20,5%) Epoxicariofileno (13,9%) α -Humuleno (7,6%)	Maggi <i>et al.</i> , 2009
		Flores	Germacreno D (16,4%) Mirceno (10,1%) <i>trans</i> -Cariofileno (9,4%)	

Capítulo 3

		Frutos	α -Pineno (36,8%) β -Pineno (17,8%) Mirceno (4,1%)	
		Raíz	Elemicina (9%) <i>trans</i> - β -Farneseno (8,4%) α -Zingibereno (6,9%)	
<i>F. gummosa</i> Boiss.	Irán	Gomo-latex	β -Pineno (58,8%) δ -3-careno (12,1%) α -Pineno (5,7%)	Ghannadi y Amree, 2002
		Goma	β -Pineno (74%) α -Pineno (9,5%) Limoneno (4%)	Omidbaigi y Sefidkon 2002
		Frutos	β -Pineno (50,1%) α -Pineno (18,3%) 3-Careno (6,7%)	Sayyah <i>et al.</i> , 2001
<i>F. hirtella</i> Boiss.	Irán	Parte aérea	α -Pineno (15,4%) Timol (14,9%) Espatulenol (6,5%)	Akhgar <i>et al.</i> , 2005
<i>F. iliensis</i> Krasn.	Uzbekistán	Raíz	α -2-Bisaboleno (2,1%) α -Cadinol (1,8%) 2-Disulfuro de metilbutilo (1,5%)	Sinitsin <i>et al.</i> , 1982
<i>F. jaesekheana</i> Vatke.	Pakistán	Semillas y tallos	δ -3-Careno (18,8%) Limoneno (10,2%) α -Pineno (8,3%)	Ahmad <i>et al.</i> , 1987
		Raíz	α -Pineno (9,5%) β -Pineno (5,2%) Camazuleno (6,7%)	Kapahi <i>et al.</i> , 1985
		Frutos	α -Pineno (30%) β -Pineno (16,2%) Limoneno (trazas)	
<i>F. latisecta</i> Rech. f. & Aellen	Irán	Parte aérea	<i>cis</i> -Ocimeno (32,4%) <i>trans</i> -Ocimeno (20,3%) <i>cis</i> -Pinocarvona (11,4%)	Habibi <i>et al.</i> , 2006a
<i>F. micrcolea</i> Boiss.	Irán	Parte aérea	α -Pineno (19,2%) Nonano (13,2%) β -Pineno (13%)	Akhgar <i>et al.</i> , 2005
<i>F. nathex</i> Boiss. (Rao)	Pakistán	Semillas	δ -3-Careno (20,4%) α -Terpineol (16,2%) α -Pineno (7,3%)	Ashraf <i>et al.</i> , 1979c
<i>F. ovina</i> Boiss.	Irán	Parte aérea	Carvacrol (9%) α -Pineno (8,2%) Isovalerato de geranilo (7,2%)	Ghannadi <i>et al.</i> , 2002
		Semillas	α -Pineno (53,7 - 70,6%) Canfeno (7,9 - 16,7%) Mirceno (5,8 - 11,4%)	Karim y Bhatti, 1978
	Pakistán	Raíz	Borneol (19%) Limoneno (14,2%) α -Pineno (13,8%)	

<i>F. persica</i> Wild.	Irán	Raíz	Trisulfuro de dimetilo (18,2%) Miristicina (8,9%) Tetrasulfuro de dimetilo (7,6%)	Iranshahi <i>et al.</i> , 2006
<i>F. sinkiangensis</i> K. M.	China	Resina	Disulfuro de <i>cis</i> -sec-butil-1-propenilo (26,4%) Disulfuro de <i>trans</i> -sec-butil-1-propenilo (24,5%) α -Pinenos (12,7%)	Dai y Qiu 1992
<i>F. stencarpa</i> Boiss.	Irán	Resina	α -Pinenos (48,8%) β -Pinenos (30,1%) <i>trans</i> - β -Ocimeno (2,9%)	Rustaiyan <i>et al.</i> , 2001a
<i>F. szowitsiana</i> D. C.	Irán	Parte aérea	α -Pinenos (12,6%) Germacreno D (12,5%) β -Pinenos (10,1%)	Habibi <i>et al.</i> , 2006b
	Turquía	Hojas	β -Eudesmol (32%) α -Eudesmol (18,2%) α -Pinenos (8,6%)	Ozek <i>et al.</i> , 2007
		Tallo	β -Eudesmol (29,5%) α -Eudesmol (16,6%) α -Pinenos (6,4%)	

Tabla 3. 1. Constituyentes mayoritarios de aceites esenciales del género *Ferula*.

El aceite esencial de diferentes partes de *F. hermonis* ha sido objeto de algunos estudios previos. Así, en un estudio preliminar del aceite esencial de las raíces se identificaron siete compuestos que constituían el 61,1% del total de la esencia: α -bisabolol (23%), α -farneseno (12,6%), *cis*-cariofileno (9,2%), alcohol cinámico (5,7%), cupareno (4,4%), globulol (4,1%) y *cis-trans*-farnesol (1,8%). Su actividad antimicrobiana fue ensayada frente a microorganismos gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptomyces scabies*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*) y gram negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y *Escherichia coli*), así como también frente a los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum*, encontrándose un potente efecto inhibitorio frente a los dos primeros grupos de bacterias, de tipo dosis-dependiente, en tanto que la actividad frente a las cepas fúngicas fue leve (Al-Najar *et al.*, 2006).

Posteriormente, otro grupo describió la composición de los aceites esenciales de las semillas, de la parte aérea y de las raíces. En el aceite esencial de semillas se

detectaron tres componentes: α -pineno (51,3%), β -pineno (42,5%) y canfeno (6,2%). Sin embargo, en la esencia de la parte aérea se identificaron 27 compuestos, siendo los mayoritarios: α -pineno (38%), carvacrol (5,5%), limoneno (2,5%), lavandulol (2,5%), acetato de geranilo (2,2%) y sabineno (2%). En el aceite esencial de la raíz se identificaron 30 compuestos de los cuales los mayoritarios son: α -pineno (31%), acetato de linalilo (16%), 1,8-cineol (6%), lavandulol (4,5%), carvacrol (3,1%), γ -terpineno (2,5%) y borneol (2,5%) (Hilan *et al.*, 2007).

CAPITULO 4

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Introducción

Para estudiar la composición química de una droga vegetal es necesario realizar una serie de pasos: obtener distintos tipos de extractos, someterlos a procedimientos de fraccionamiento y purificación, con el objetivo de obtener compuestos puros aislados; y determinar, finalmente, su estructura.

En nuestra investigación, para estudiar el aceite esencial y los extractos así como para aislar y purificar sus principios activos, se han utilizado diferentes técnicas cromatográficas descritas más adelante independientemente de su uso analítico o preparativo. Se han empleado también técnicas espectroscópicas orientadas a obtener información sobre su estructura química. En el caso del aceite esencial, para completar su caracterización, se han determinado una serie de índices físicos tales como la densidad química, la rotación óptica y el índice de refracción.

Asimismo, se ha realizado un estudio de la actividad antifúngica tanto del aceite esencial como de los extractos, fracciones y compuestos puros aislados.

4.2. Obtención de extractos

Para el estudio químico y farmacológico de un determinado material vegetal primero se prepara la muestra para facilitar los procesos posteriores de separación y purificación. Un tratamiento previo y adecuado de la misma, así como la correcta elección del disolvente de extracción, permiten ahorrar mucho tiempo y agilizar el aislamiento. La extracción inicial con disolventes de baja polaridad permite separar los componentes más lipófilos, mientras que los disolventes alcohólicos y acuosos proporcionan un amplio espectro de compuestos de polaridad variable. Actualmente, existen diferentes métodos de extracción. Los más comunes son la percolación y la maceración, este último mediante agitación manual o mecánica.

En el presente trabajo, la raíz de *Ferula hermonis* se ha sometido a tres tipos de extracciones:

a) Obtención del aceite esencial por **hidrodestilación** utilizando un destilador tipo Clevenger, según el método descrito en la Farmacopea Europea (Council of Europe, 2014). Para ello, un total de 3450 g de raíz desecada y pulverizada se han sometido a destilación durante 3,5 h, repartidos en 12 destilaciones. El aceite esencial obtenido se ha filtrado sobre Na₂SO₄ anhidro y se ha conservado a 4 °C hasta su análisis y fraccionamiento.

b) Extracción con disolventes de polaridad creciente (figura 4.1), para abarcar así un rango más amplio de constituyentes y evitar que posibles principios activos no sean extraídos.

- 25 g de droga desecada y pulverizada se han extraído tres veces consecutivas con 600 mL de hexano, mediante maceración en frío y con agitación mecánica durante 18 h. Los líquidos extractivos obtenidos se han evaporado hasta residuo seco a presión reducida por debajo de 40 °C, obteniéndose así el **extracto hexánico**.

- El marco del extracto hexánico, una vez evaporado el disolvente, se ha sometido a una extracción con 1200 mL de diclorometano en un dispositivo Soxhlet durante 4 h. La extracción se ha realizado por triplicado. El líquido extraído se ha reunido y evaporado al vacío hasta residuo seco, obteniéndose así el **extracto diclorometánico**.

- El marco del extracto diclorometánico, una vez evaporado el disolvente, se ha sometido a extracción con 500 mL de MeOH (95%) a temperatura ambiente por agitación durante 18 h. La extracción se ha realizado por triplicado. Los líquidos extractivos una vez reunidos, se han filtrado y concentrado hasta obtener un líquido siruposo, que una vez liofilizado ha constituido el **extracto metanólico**.

- Finalmente, el marco del extracto metanólico, una vez evaporado el disolvente, se ha extraído por decocción acuosa durante 3 h con 1 L de agua desionizada. El extracto obtenido se ha concentrado y liofilizado, dando lugar al **extracto acuoso**.

c) Extracción por **decocción acuosa**, basada en un criterio etnofarmacológico, es decir, reproduciendo el modo de preparación empleado en medicina tradicional.

25 g de droga desecada y pulverizada, se han mantenido en ebullición en 1 L de agua desionizada durante 30 min, con reflujo. El decocto, una vez filtrado, se ha evaporado a presión reducida por debajo de 40 °C hasta líquido siruposo y, finalmente, se ha liofilizado, obteniéndose el extracto acuoso.

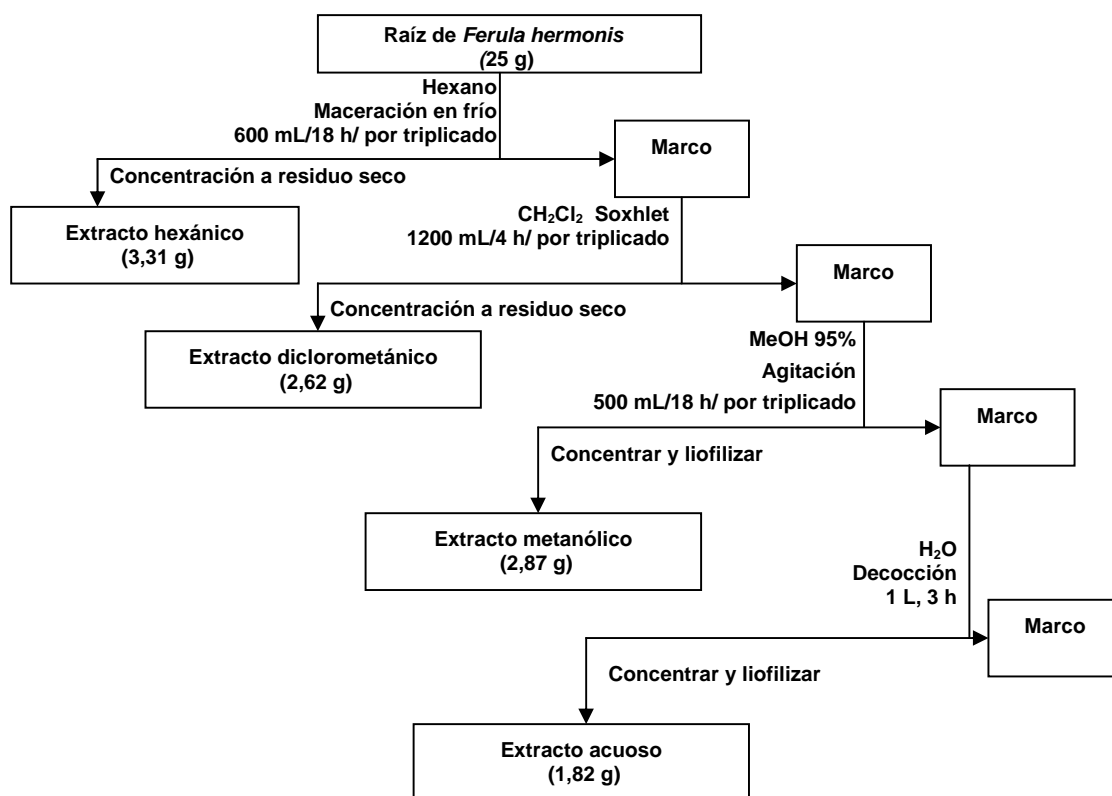


Figura 4.1. Esquema de la extracción con disolventes de polaridad creciente.

4.3. Propiedades físico-químicas

4.3.1. Determinación de la densidad relativa

Para determinar la densidad relativa se ha seguido la metodología descrita en la Farmacopea Europea (Council of Europe, 2014). Se toma el picnómetro N° 92 con un volumen de 5,022 cm³ y, perfectamente seco, se le determina la masa. También se determina la masa del picnómetro lleno de agua bidestilada a 20 °C. A continuación, se rellena el picnómetro con el aceite esencial a 20 °C y se determina la masa. La densidad relativa del aceite esencial se define como el cociente entre la masa del aceite esencial (masa del picnómetro lleno de aceite esencial menos la masa del picnómetro vacío) y la masa del agua bidestilada (masa del picnómetro lleno de agua bidestilada menos la masa del picnómetro vacío). El resultado que se muestra es la media de tres mediciones independientes.

4.3.2. Determinación de la rotación óptica

Las determinaciones de rotación óptica se han realizado siguiendo las recomendaciones descritas en la Farmacopea Europea (Council of Europe, 2014). La temperatura de ensayo ha sido de 25 °C y se ha empleado un polarímetro Atago AP-300 que tiene como fuente de luz una lámpara de halógeno. Los ensayos se han realizado a una longitud de onda de 589 nm y los resultados se presentan como la media de tres mediciones independientes.

4.3.3. Determinación del índice de refracción

El índice de refracción se ha determinado siguiendo las recomendaciones descritas en la Farmacopea Europea (Council of Europe, 2014). Para ello, se ha utilizado un refractómetro modelo Atago R5000. Los resultados se presentan como la media de tres mediciones independientes. El rango de medición del refractómetro se encuentra entre 1,333 -1,520.

4.4. Técnicas cromatográficas

4.4.1. Introducción

La cromatografía es un método de separación basado en la migración diferencial de solutos a través de un sistema de dos fases, una de las cuales es móvil y la otra estacionaria (Mandava e Ito, 1988). Los componentes de la muestra se separan según su grado de retención que depende de su afinidad por las fases móvil y estacionaria, siendo éste un proceso bajo control termodinámico. El grado de retención de un compuesto en un dispositivo cromatográfico con una fase estacionaria y bajo la influencia de una fase móvil depende de la partición o distribución de este compuesto entre ambas fases.

Atendiendo a la naturaleza de la fase móvil implicada en la separación, las técnicas cromatográficas se pueden clasificar en cromatografía de gases y cromatografía líquida. Por otro lado, en función del mecanismo de retención de los solutos en la fase estacionaria, se distinguen: cromatografía de adsorción, partición, exclusión, intercambio iónico, quiral y por afinidad (Macrae *et al.*, 1993). A continuación, se describe el fundamento de los tipos de cromatografía y las fases estacionarias empleados en el presente trabajo.

4.4.2. Cromatografía de adsorción

En la cromatografía de adsorción, los solutos de una muestra son distribuidos entre la fase móvil, por disolución, y la fase estacionaria, por adsorción en base a su polaridad.

La silicagel es el material más comúnmente utilizado en este tipo de cromatografía. Se trata de una matriz constituida por sílice (Si) unida a oxígeno (O) formando redes tridimensionales de grupos siloxano (Si-O-Si). Es una estructura porosa en la que los átomos de Si terminales están saturados con grupos OH libres (grupos silanol), lo cual le confiere características polares, siendo especialmente útil para separar sustancias de tipo apolar (Hostettmann y Hostettmann, 1982). El

principal inconveniente que presenta es la retención irreversible de los solutos de la muestra, especialmente si ésta es de carácter polar. En ciertas ocasiones, es necesario un tratamiento previo consistente en un prelavado con HCl para eluir las trazas de hierro que pueda contener la silicagel, que son la causa de la fuerte adherencia de muchos polifenoles.

En nuestro estudio la silicagel ha sido utilizada como fase estacionaria, tanto en CCF analítica como preparativa, así como en CC.

4.4.3. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se basa en la separación de moléculas de diferentes tamaños debido a la migración diferencial a través de un material poroso. El rango de tamaños de partícula que pueden ser separados por este procedimiento depende del rango de tamaño de poro de la fase estacionaria. Los geles de exclusión molecular poseen unas uniones cruzadas tridimensionales que dejan unos poros demasiado pequeños para permitir la penetración de las moléculas de elevado peso, de manera que éstas son excluidas del gel y eluyen en primer lugar. Las moléculas más pequeñas penetran en el gel, más o menos libremente en función de su tamaño, y eluyen más tarde (Janson, 1967; Valcárcel y Gómez, 1990). Cada fase estacionaria está caracterizada por un rango de fraccionamiento entre la penetración completa y la exclusión completa. El Sephadex[®] (Pharmacia Biotech, 1993; Valcárcel y Gómez, 1990) es la fase estacionaria más utilizada en la cromatografía de exclusión molecular. Se trata de un gel orgánico de material poroso e inerte, obtenido a partir del dextrano por tratamiento con epíclorhidrina, dando lugar a una serie de entrecruzamientos, que ofrecen mayor uniformidad tridimensional. Se distinguen dos tipos: serie G y serie LH. Este último está constituido por dextrano metilado y se utiliza con eluyentes orgánicos. Son muy útiles para la separación de fitoconstituyentes, concretamente flavonoides y polifenoles, en general. Los geles de esta serie combinan fenómenos de adsorción y exclusión molecular, tienen elevada capacidad de carga y se pueden regenerar

fácilmente. El más utilizado es el LH-20, eluido con metanol o mezclas de metanol-agua (Joustra *et al.*, 1967).

Geles porosos blandos, como Sephadex[®] o Biogel[®], pueden usarse solamente en condiciones de baja presión, sin embargo, existen otras fases que pueden ser empleadas en condiciones de presión elevadas permitiendo mayores velocidades de fase móvil y acortando el tiempo de análisis.

En la práctica, la mayoría de los materiales de exclusión molecular presentan también interacciones secundarias, siendo la exclusión molecular pura muy rara.

En nuestro estudio, se ha utilizado Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia Biotech AB, 17-0090-02), y Lipophilic Sephadex[®] LH20 (Sigma-Aldrich) de 25-100 micrones para la cromatografía en columna.

4.4.4. Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía en capa fina clásica (CCF) es una técnica instrumental de gran importancia para el análisis de la mayoría de sustancias de origen vegetal (Hauck *et al.*, 1990). Se trata de una técnica planar en la que se produce una migración diferencial de los componentes de una muestra, aplicada como mancha o como banda fina, sobre la fase estacionaria extendida sobre un soporte plano cuando una fase móvil eluye a su través, gracias a un fenómeno de capilaridad.

Se ha utilizado con los siguientes objetivos:

- Análisis preliminar de los componentes de los productos extractivos sometidos a estudio.
- Investigación de las técnicas y sistemas cromatográficos adecuados para su fraccionamiento.
- Detección, seguimiento y control de los componentes de los eluatos de las diferentes técnicas preparativas utilizadas.

- Aportar datos para una aproximación a la identificación de sustancias, teniendo en cuenta los R_f y el color y la fluorescencia de las manchas cromatográficas. Es útil el estudio comparativo con sustancias puras o patrones.
- Empleo como soporte sólido desde el cual difunden las sustancias de una muestra en la técnica de la bioautografía.
- Separación y aislamiento de compuestos de un extracto.

La fase estacionaria utilizada en CCF ha sido Silicagel 60 F₂₅₄. Se han empleado cromatofolios de Silicagel 60 F₂₅₄ de 0,2 mm de espesor (Merck 5554 y SDS CCM 221254) para la cromatografía en capa fina analítica y cromatofolios de Silicagel 60 F₂₅₄ de 0,5 mm de espesor (SDS CCM 121354) para la cromatografía en capa preparativa.

Una vez desarrolladas, las placas de cromatografía se observan a la luz visible y a la luz UV (254 y 366 nm), con o sin la aplicación de algún reactivo revelador. Existen un gran número de reactivos de tipo general y de tipo específico, para funciones químicas o para determinados grupos estructurales de sustancias (Ríos *et al.*, 1986; Wagner *et al.*, 1984).

Los reveladores utilizados en nuestro estudio han sido:

- Solución de Anisaldehído: Mezclar, en el siguiente orden, 0,5 mL de anisaldehído, 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico (Council of Europe, 2014).
- Vanillina sulfúrica (Godine): Formado por la mezcla a partes iguales de dos soluciones A y B. Solución A: H₂SO₄ al 10 % en MeOH. Solución B: Vanillina al 1 % en MeOH. Después del revelado, se calienta la placa a 105 °C durante 10 min y se observa a la luz visible (Wagner *et al.*, 1984).

En algunos casos, existe una estrecha relación entre el revelado de las sustancias separadas en los cromatogramas y su estructura química, pudiéndose formular algunas hipótesis sobre la misma (Brasseur y Angenot, 1986; Ghosh *et al.*, 1987).

4.4.5. Cromatografía preparativa en columna

Las técnicas de cromatografía en columna disponen de un tubo cilíndrico que sirve de soporte para la fase estacionaria. La muestra se aplica, de forma manual o mediante inyector, en la cabeza de la columna en forma de banda, y los compuestos separados de la muestra eluyen por la parte inferior al ser arrastrados por la fase móvil.

Para el fraccionamiento del aceite esencial y de los extractos investigados ha sido necesaria la utilización de varias técnicas de cromatografía en columna, cuyo fundamento se describe sucintamente a continuación.

a) Cromatografía líquida en columna clásica (CC)

La cromatografía líquida en columna es una de las técnicas más útiles para el aislamiento y purificación de productos naturales. Sin embargo, para su utilización, se deben tener en cuenta una serie de factores, tales como: la elección de la fase estacionaria y del eluyente, la geometría de la columna y su empaquetamiento (en húmedo o en seco), la aplicación de la muestra (en solución o en siembra sólida) y el flujo del eluyente (Dalmases y Bonet, 1984; Unger y Janzen, 1986; Valcárcel y Gómez, 1990).

En la cromatografía en columna clásica (CC), la elución se realiza a presión atmosférica, de tal forma que el eluyente avanza por la fuerza de la gravedad y por la presión hidrostática ejercida por él mismo en la parte superior de la columna (Dalmases y Bonet, 1984). La elección de la fase estacionaria y la fase móvil se realiza mediante CCF, de tal forma que los componentes de la muestra deben presentar la mejor separación posible y su R_f no debe ser superior a 0,5.

En nuestro estudio, en la cromatografía preparativa CC se han utilizado como fases estacionarias: Silicagel 60 A CC (35-70 μm) SDS P2000027 y Sephadex[®] LH-20.

b) Cromatografía “flash”

La cromatografía “flash” se utiliza en el aislamiento de diversos tipos de productos naturales: flavonoides, alcaloides y saponinas, entre otros (Hostettmann, 1985; Hostettmann y Hostettmann, 1982).

Se trata de un tipo de cromatografía en columna en la que la elución se efectúa a una presión ligeramente superior a la atmosférica, producida por la acción de un gas (generalmente, He, N₂ o aire). Consta de una columna en cuya parte superior y en unión hermética lleva un embudo de decantación, el cual actúa como reservorio de eluyente y tiene una válvula que permite controlar la presión del gas utilizado (Majors y Enzweiler, 1989).

La elección de la fase móvil y la fase estacionaria se realiza por CCF. En este caso, en el sistema escogido el R_f de las sustancias separadas no debe ser superior a 0,35 (Hostettmann y col., 1986)

La cromatografía “flash”, respecto a la CC clásica, reduce el tiempo de separación, los posibles riesgos de descomposición de compuestos y la aparición de colas en la elución, inconvenientes frecuentes en la separación de productos naturales.

En nuestro estudio se ha utilizado como fase estacionaria Silicagel 60 A CC (35-70 μm) SDS P2000027.

4.4.6. Cromatografía de gases (GC)

Se trata de un sistema de cromatografía en columna que se caracteriza por utilizar como fase estacionaria un líquido retenido en un soporte sólido inerte y como fase móvil un gas, que puede ser N₂, H₂ o He. Es un método de separación físico, en

el que los componentes de una muestra homogénea se separan debido a una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, de manera que cada uno de ellos es eluido a distinta velocidad.

La separación depende de la temperatura a la que tiene lugar el proceso, del tipo de columna utilizado, de la naturaleza de la fase estacionaria y del flujo del gas portador.

La columna se encuentra en el interior de un horno de temperatura regulable. Existen dos tipos de columnas: las capilares y las empaquetadas. Actualmente, las más utilizadas son las capilares de sílice fundida, mucho más largas (hasta 200 m), de diámetro interno mucho menor (0,2-0,75 mm) y con mayor poder de resolución que las empaquetadas convencionales.

Las fases estacionarias pueden ser de diferente tipo. Entre las más frecuentemente utilizadas, sobresalen las de polidimetilsiloxano de carácter apolar (tales como Supelco SPBTM-1) y las de polietilenglicol (tales como SupelcowaxTM 10) de naturaleza polar.

Los sistemas de aplicación de la muestra o sistemas de inyección deben asegurar una eficacia de separación óptima de la columna y deben evitar alteraciones de la muestra. El más utilizado es el sistema de inyección con división de flujo o "split", que reduce la cantidad de muestra que llega a la columna. Es especialmente indicado en el caso de columnas capilares, las cuales sólo pueden aceptar de 10 a 100 ng de muestra para obtener una buena separación.

Los detectores pueden ser de dos tipos: universales o selectivos. Entre los primeros, que detectan casi todos los compuestos orgánicos, destaca el de ionización a la llama ("Flame Ionization Detector", FID), el cual mide el aumento de la conductividad entre dos electrodos cada vez que un componente de la muestra es quemado al llegar al detector. La señal producida es transmitida a un integrador que realiza un registro en forma de cromatograma.

La cromatografía de gases se utiliza fundamentalmente para el análisis de sustancias volátiles, como los aceites esenciales. No obstante, tiene también una importante aplicación en el análisis de sustancias no volátiles que se pueden transformar en volátiles por derivatización (metilación, etc.) (Chaplin y Kennedy, 1986).

Condiciones del análisis por GC

Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890, equipado con un detector FID.

Columna 1: Supelcowax™ 10 (60 m x 0.25 mm d.i; 0,25 µm de espesor).

Columna 2: Supelco SPB™-1 (60 m x 0.25 mm d.i; 0,25 µm de espesor).

Gas portador: He.

Flujo: 1 mL/ min.

Temperatura del detector: 270 °C.

Temperatura del inyector: 250 °C.

Split: 1/80.

Temperatura del horno: programa de temperatura:

- 50 °C (8 min); 50 °C - 120 °C (4 °C/min); 120 °C (10 min); 120 °C - 230 °C (4 °C/min); 230 °C (17min).

Tiempo de análisis: 80 min.

4.4.7. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) proporciona mucha información sobre los constituyentes de una mezcla a partir de una pequeña cantidad de muestra (Belz, 1981).

La espectrometría de masas se basa en la fragmentación de las moléculas y posterior separación de los fragmentos resultantes, en función de la relación masa/carga (m/z) de estos fragmentos acelerados en un campo electromagnético. Siempre que una molécula se rompe en las mismas condiciones se obtiene el mismo número y abundancia de los fragmentos que son característicos, dando lugar a un espectro propio de la molécula.

Una óptima combinación de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas necesita (Ten Noever De Braw *et al.*, 1981):

- sistema de bombeo diferencial, es decir, una bomba de difusión para el analizador de masas y otra para la fuente de iones. Esta última debe bombear el gas hacia el exterior y mantener unas condiciones de vacío aceptables para el funcionamiento del espectrómetro.
- presión lineal de la fuente de iones, para que la intensidad de la corriente de iones varíe linealmente con la cantidad de muestra inducida.
- registro de los espectros de masas en el menor tiempo posible.
- compatibilidad con un sistema computerizado que permita recoger y almacenar los datos que genere un análisis. El ordenador, generalmente dispone de programas adecuados de búsqueda que permiten comparar los espectros de masas obtenidos con los existentes en la librería.
- interfase GC-MS que permita conectar la salida del cromatógrafo de gases y la entrada del espectrómetro de masas, que sea inerte, que transmita el gas

cromatográfico eluido de la columna a la fuente de iones en el menor tiempo posible y que aísle la columna del vacío del espectrómetro de masas.

Se emplean dos tipos de interfase: conexión directa y “split” abierto. El desarrollo de columnas capilares ha facilitado la conexión directa entre ambos instrumentos, ya que en ellos el flujo de gas es lo suficientemente pequeño para ser absorbido por las bombas de vacío del espectrómetro de masas (Freeman, 1981).

Además, esta interfase proporciona:

- Fase estacionaria de baja volatilidad y buena estabilidad térmica.
- Máxima resolución cromatográfica para evitar el registro de espectros correspondientes a compuestos no separados.

En el presente trabajo se ha utilizado un sistema GC-MS Hewlett Packard, integrado por un cromatógrafo de gases modelo 6890 y por un detector selectivo de masas modelo Hewlett Packard 5973N, en el que la conexión entre la columna capilar y el espectrómetro de masas es directa. El sistema incluye un ordenador HP Vectra 386/25 y un programa informático, MS ChemStation, que dispone de una librería de espectros (NBS75) que permite comparar los espectros de masas obtenidos con los de compuestos conocidos.

Condiciones del análisis por GC-MS

Columna 1: SupelcowaxTM 10 (60 m x 0.25 mm d.i; 0,25 µm de espesor).

Columna 2: Supelco SPBTM-1 (60 m x 0.25 mm d.i; 0,25 µm de espesor).

Gas portador: He.

Flujo: 1 mL/ min.

Temperatura del inyector: 250 °C.

Split: 1/80.

Temperatura del horno: programa de temperatura:

- 50 °C (8 min); 50 °C - 120 °C (4 °C/min); 120 °C (10 min); 120 °C - 230 °C (4 °C/min); 230 °C (17min).

Tiempo de análisis: 80 min.

Los espectros de masas han sido obtenidos entre m/z 35 y m/z 400 utilizando una energía de ionización de 70 eV.

4.5. Técnicas espectroscópicas

4.5.1. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) consiste fundamentalmente en la ionización de la muestra y posterior separación de los fragmentos, según su relación masa/carga (m/z).

Las técnicas más empleadas son el impacto electrónico (EI-MS) y la ionización química (CI-MS), que requieren la volatilización previa de la muestra. Por ello, los compuestos no volátiles deben ser previamente derivatizados a componentes volátiles (permetilados, peracetilados, etc). Para poder realizar el análisis directo de estas sustancias sin derivatizar, así como de sustancias termolábiles, se utilizan otras técnicas como el bombardeo por átomos rápidos (FAB) y el electrospray (ESI), entre otros.

En nuestro estudio, se han empleado las técnicas de EI-MS y CI-MS.

4.5.2. Espectrometría de masas de impacto electrónico (EI-MS)

La espectrometría de masas de impacto electrónico (EI-MS) es muy útil en la identificación de compuestos orgánicos y determinación de la estructura molecular (Seibl, 1973). Se basa en bombardear la muestra directamente mediante haces de electrones procedentes de un filamento incandescente (energía: 70 eV). Los fragmentos resultantes se separan en función de la relación masa/carga y son

acelerados en un campo electromagnético. El espectro de masas ofrece información sobre los fragmentos formados y, en determinados casos, puede identificarse el pico molecular, que al tratarse de un ión con carga simple indica el peso molecular. La intensidad relativa de los iones $[M+1]^+$ y $[M+2]^+$ ofrece información sobre el contenido en heteroátomos y sobre la fórmula molecular de los compuestos orgánicos (Pasto y Johnson, 1997).

Los espectros de masas se han registrado con un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5989A, por introducción directa de la muestra a la cámara de ionización.

4.5.3. Espectrometría de masas de ionización química (CI-MS)

La espectrometría de masas por ionización química (CI-MS) consiste en introducir la muestra en una cámara de ionización química clásica, donde se encuentra un gas reactivo ionizado (metano, propano, amoníaco). Las moléculas de la muestra reaccionan con los iones del gas dando lugar a fragmentos característicos que permiten la deducción del peso molecular. Cuando el gas es metano, se pueden identificar en el espectro de masas resultante los iones $[M+1]^+$, $[M+29]^+$ y $[M+41]^+$, siendo M el peso molecular de la sustancia.

Los espectros se han registrado con un espectrómetro de masas Hewlett Packard 5989A, por introducción directa de la muestra a la cámara de ionización. El gas empleado ha sido metano.

4.5.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las técnicas más utilizadas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos. Se basa en la interacción entre un núcleo y un campo magnético aplicado en la que se produce una transición de un valor a otro del estado del spin del núcleo.

Los métodos RMN pueden clasificarse en monodimensionales y bidimensionales, en función del número de frecuencias utilizadas para determinar cada pico del espectro.

La ^1H -RMN proporciona información respecto al tipo y entorno químico de los protones de la molécula, mientras que ^{13}C -RMN proporciona la misma información referente a sus carbonos.

Además, la RMN bidimensional, sea de acoplamiento (RMN-2D-J) o de correlación (RMN-2D o COSY “Correlated Spectroscopy”) homo o heteronuclear, los experimentos de irradiación, los espectros “off resonante” y una serie de experimentos realizados, principalmente en espectroscopía de ^{13}C -RMN (Nuclear Overhauser Effect -NOE-, Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer -DEPT-, etc.) han aumentado notablemente, junto con la mejora instrumental, el caudal de información proporcionado por RMN (González-Sierra *et al.*, 1989; Shoolery, 1984).

Los experimentos de RMN del presente trabajo se han realizado mediante espectrómetros Mercury 400, Gemini 300, Bruker AR-X-400 y Varian VXR a 500 MHz.

A continuación, se detallan los métodos utilizados, tanto monodimensionales (Sadler, 1988) como bidimensionales (Derome, 1989), en la elucidación estructural de las sustancias aisladas.

4.5.4.1. RMN monodimensional

a) Resonancia magnética nuclear de proton (^1H -RMN)

La ^1H -RMN proporciona información sobre la posición y estado de los distintos protones de la muestra que se analiza. Una determinada señal de protón da información del entorno a través de su desplazamiento químico e información de los protones vecinos a través de los acoplamientos “spin-spin”. Se utiliza fundamentalmente para la distinción de moléculas con grupos funcionales semejantes, así como para la determinación del número de azúcares y sus tipos de enlace con la molécula.

La irradiación a la frecuencia de un protón determinado permite además eliminar todos los acoplamientos que éste pueda presentar con otros protones. La modificación que esto provoca en el espectro puede tener elevado valor diagnóstico (Freixa, 2001).

b) Resonancia magnética nuclear de Carbono-13 (^{13}C -RMN)

El desarrollo de la RMN por transformadas de Fourier ha conseguido que los versátiles estudios de RMN de ^{13}C sean no sólo prácticos, sino también casi comparables con los de RMN de ^1H en cuanto a facilidad experimental y calidad de los resultados.

El espectro normal de ^{13}C -RMN, con desacoplamiento total de protón, da información directa sobre el C estudiado. Si es registrado con desacoplamiento incompleto (espectro “off resonance”), permite estudiar el número de protones asociados a cada carbono, ya que C, CH, CH_2 y CH_3 aparecen, respectivamente, como singulete, doblete, triplete y cuadruplete.

Es útil en el estudio de heterósidos, como en el caso de polifenoles, saponinas, etc., pues ayuda a establecer el número total de carbonos de la molécula del aglicón y del azúcar por separado (Agrawal, 1992).

c) DEPT (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer)

Constituye el método de elección para determinar la multiplicidad de los átomos de carbono, permite diferenciar entre CH_3 , CH_2 , CH o carbonos cuaternarios (Hanke *et al.*, 1989; Rahman, 1989). Es un espectro RMN monodimensional de ^{13}C de señales con fase positiva o negativa en el que se produce una transferencia de polarización del ^1H al ^{13}C que incrementa la sensibilidad hasta un factor de 4. Por esta razón, es el método más rápido para determinar la multiplicidad ^1H - ^{13}C (Breitmaier, 1993; González-Sierra *et al.*, 1988).

4.5.4.2. RMN bidimensional

a) COSY (Correlated Spectroscopy)

Existen varios tipos de espectros bidimensionales COSY en función de los átomos que se correlacionan: homonucleares (HH COSY) y heteronucleares (HC COSY).

Los experimentos homonucleares HH COSY correlacionan los desplazamientos químicos de los ^1H acoplados de una molécula, proporcionando información sobre las relaciones entre los distintos protones de la molécula y los acoplamientos entre los mismos. En los experimentos bidimensionales se representan los desplazamientos de los protones sobre dos ejes de frecuencias. El resultado es un diagrama de simetría cuadrada. La proyección del espectro monodimensional ^1H -RMN aparece sobre la diagonal (señales diagonales). Además, aparecen correlaciones o señales fuera de la diagonal (señales cruzadas) donde los protones están acoplados con otros. De esta forma, un diagrama HH COSY indica las conexiones HH en posición geminal o vecinal de los protones de una molécula (González Sierra *et al.*, 1989).

El experimento HC COSY correlaciona los desplazamientos químicos de los ^{13}C , en una dimensión, con los desplazamientos químicos de los ^1H , en la otra, a través de una unión CH. Las secuencias de pulsos utilizadas suponen una transferencia de polarización ^1H - ^{13}C que es la base de la secuencia DEPT y que aumenta la sensibilidad. Por esta razón, los experimentos HC COSY no necesitan más muestra que un espectro ^{13}C RMN desacoplado de banda estrecha de ^1H . El resultado es una correlación CH bidimensional, en la que el desplazamiento del ^{13}C se representa en abscisas y el del ^1H en ordenadas (o viceversa). Los desplazamientos de los núcleos ^{13}C y ^1H que están unidos entre ellos son las coordenadas de las señales cruzadas (Breitmaier, 1993; Derome, 1989). Esta técnica permite descifrar qué ^1H está unido a cada ^{13}C de la molécula.

b) HSQC y HMBC (Electroscopías RMN de detección inversa)

La espectroscopía inversa detecta indirectamente “spins” de baja sensibilidad (por ejemplo ^{13}C , ^{15}N ,...) a través de “spins” de alta sensibilidad (^1H). En un espectro de ^1H convencional aparece toda la información derivada de las interacciones con núcleos de ^{13}C , pero que normalmente no se observa a simple vista, ya que la información que se aprecia mayoritariamente es la de ^1H unido a ^{13}C . Las secuencias de pulsos que forman la espectroscopía inversa están diseñadas, precisamente, para que sólo se encuentren presentes en el espectro final, estas interacciones ^1H - ^{13}C .

Los experimentos de espectroscopía RMN de detección inversa utilizados para la elucidación estructural de las sustancias aisladas han sido los experimentos bidimensionales HSQC (“Heteronuclear Single Quantum Coherence”) y HMBC (“Heteronuclear Multiple Bond Connectivity”) que permiten determinar las correlaciones protón-carbono directas y a larga distancia (2-3 enlaces), respectivamente, y que resultan muy útiles en el análisis estructural de productos naturales y biomoléculas (Martin y Crouch, 1991).

4.6. Métodos de estudio de la actividad antifúngica

4.6.1 Introducción

Existen diversos métodos para investigar la actividad antifúngica “*in vitro*” tanto de extractos crudos o parcialmente fraccionados, como de principios activos purificados.

En nuestro estudio, se han empleado las siguientes técnicas:

- Antifungigrama, para evaluar la actividad de los extractos y productos aislados (Recio y Rios, 1989).
- Bioautografía por contacto, para el seguimiento de la actividad antifúngica durante los procesos de purificación de los principios activos (Homans y Fuchs, 1970; Marston y Hostettmann, 1987).

-
- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Recio y Rios, 1989) y la concentración mínima fungicida (CMF) (Balows *et al.*, 1991) para cuantificar la actividad de los extractos y productos aislados.

A continuación, se indican las cepas de hongos empleadas en los diferentes ensayos y se describen el fundamento y el protocolo seguido en cada uno de ellos.

4.6.2. Cepas de hongos

Las cepas de hongos utilizados en el “screening” de actividad antifúngica proceden de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España) e incluyen tanto levaduras como hongos filamentosos. Entre ellos se encuentran hongos oportunistas y patógenos de piel y mucosas, así como hongos causantes de pérdidas económicas en agricultura y almacenaje de alimentos.

Las cepas seleccionadas son las siguientes:

Levaduras:

- *Candida albicans*, (Robin) Berkhout. A, CECT 1394.
- *Candida lactis-condensi*, syn. *Filobasidiella neoformans* Kwon-Chung var. *neoformans*. T, CECT 1075.
- *Saccharomyces cerevisiae*, Meyen : E.C. Hansen, CECT 1324.

Dermatofitos:

- *Mycrosporium gypseum*, (E. Bodin) Guiart & Grigoraki, CECT 2908.
- *Trichophyton mentagrophytes*, syn. *Arthroderma benhamiae* Ajello and Cheng, CECT 2795.

Hongos filamentosos no dermatofitos:

- *Aspergillus niger*, van Tieghem. A, CECT 2574.

- *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. A, CECT 2071.
- *Penicillium purpurogenum*, Stoll. A, CECT 20436.

4.6.3. Antifungigrama

El antifungigrama es un método de difusión basado en la inhibición del crecimiento fúngico producido por una sustancia que difunde desde un soporte sólido (por ejemplo, un disco de papel de filtro) hacia el medio de agar, previamente inoculado (Ríos *et al.*, 1988; Van den Berghe y Vlietinck, 1991). A medida que la distancia al centro del disco aumenta, la concentración del agente antimicrobiano disminuye de forma logarítmica, creando un gradiente de concentraciones en el medio de agar que rodea al disco. Al mismo tiempo, los microorganismos inoculados en el agar que no son inhibidos por la concentración del agente antimicrobiano, continúan multiplicándose hasta que el crecimiento es visible. En las áreas donde se alcanza una concentración inhibitoria del agente no hay crecimiento formándose un halo de inhibición alrededor de cada disco (Jorgensen, 1999).

Este método es útil para determinar la presencia o ausencia de actividad antifúngica de una muestra, bien sea un extracto bruto o una sustancia pura. No es un método cuantitativo ya que viene limitado por el grado de difusión que cada sustancia manifiesta en un medio acuoso (Freixa, 2001).

Los halos de inhibición de crecimiento de los productos ensayados se comparan con los de sustancias de referencia para establecer la sensibilidad del microorganismo utilizado en cada caso (Van den Berghe y Vlietinck, 1991).

Material y reactivos.

Medio de cultivo: Glucosa Sabouraud Agar (Cultimed-Panreac ref. 413802.1210).

Soporte físico: placas de Petri, 14 cm de diámetro (Rubilabor ref. 815.1120).

Discos estériles de celulosa, 13 mm, capacidad 100 µL (Difco ref. 1571-33).

Fármacos de referencia:

Anfotericina B (Sigma-Aldrich ref. A2411).

Nistatina (Sigma-Aldrich ref. N6261).

Protocolo experimental**1) Preparación del inóculo.**

En el caso de levaduras, se resuspenden en NaCl 0,9% una serie de colonias aisladas de un cultivo por agotamiento, con un tiempo de vida inferior a las 24 horas, hasta alcanzar una turbidez del 0,5 en la escala de McFarland (Paik, 1981), equivalente a 10^6 UFC/mL.

Por lo que se refiere a hongos filamentosos, se realiza una cosecha de esporas con tampón Tanquay a partir de cultivos en tubo inclinado de una semana de edad. Se cuantifican las unidades formadoras de colonias (UFC) por medio de la siembra en superficie, en placas de Petri, de alícuotas de diferentes diluciones de la suspensión de esporas obtenida y ajustada a 10^6 UFC/mL.

En una placa de Petri que contiene un medio de cultivo sólido rico, se siembra en superficie un inóculo mediante torunda estéril. Se deja reposar hasta total absorción de la humedad superficial.

2) Preparación de los fármacos de referencia.

Se ha preparado una disolución de 1 mg/mL de cada fármaco de referencia en DMSO y se han depositado 20 μ L en un disco estéril.

3) Preparación de los extractos.

Para realizar el "screening" de actividad antifúngica, se han preparado disoluciones de 50 y 100 mg/mL de cada extracto con el disolvente adecuado y se

han depositado 100 μL de cada una en un disco estéril, es decir, dosis de 5 y 10 mg de extracto bruto/disco.

En el caso del aceite esencial se han depositado 5 y 10 μL .

4) Disposición de los productos a ensayar en placas de Petri.

En cada placa de Petri se depositan dos discos impregnados con nistatina y anfotericina B, y se distribuyen de forma equidistante hasta cinco discos más con las muestras a ensayar.

5) Incubación y lectura de los resultados.

Las placas de Petri se dejan reposar en nevera (4 °C) durante 1 h, para favorecer la difusión de las sustancias, sin que se produzca crecimiento fúngico y, a continuación, se incuban a 30 °C. Se realizan lecturas del diámetro del halo de inhibición del crecimiento a las 48 y 72 h. Transcurrida una semana, se destruyen por esterilización en autoclave.

4.6.4. Bioautografía

La bioautografía está considerada como el método más eficaz para la detección de compuestos antimicrobianos, ya que permite la localización de la actividad en una matriz compleja y, establece las condiciones óptimas para el aislamiento biodirigido de los constituyentes activos (Betina, 1973; Rahalison *et al.*, 1991; Ríos *et al.*, 1988).

Los ensayos bioautográficos pueden ser de tres tipos (Ríos *et al.*, 1988):

a) Bioautografía directa:

Los microorganismos crecen directamente sobre el cromatofolio en el cual se han separado previamente los componentes de la muestra a ensayar (Homans y Fuchs, 1970). Esta técnica es muy sensible a la localización exacta de los

compuestos activos en la placa cromatográfica; sin embargo, su uso queda limitado a microorganismos capaces de crecer sobre ella.

b) Bioautografía por contacto:

Se trata de una técnica de difusión en agar en la que los compuestos de una muestra, previamente separados por CCF, son transferidos desde el cromatofolio a una placa de Petri con un medio de cultivo sólido, previamente inoculado, por contacto directo. En esta técnica, el proceso de transferencia puede llevar a zonas de inhibición grandes que disminuyen la sensibilidad y la capacidad de discriminar entre compuestos activos con Rf similares.

c) Bioautografía de inmersión:

Sobre un cromatofolio, en el cual se ha realizado una CCF de la muestra problema, se deposita una fina capa de medio de cultivo inoculado, previamente a la solidificación del mismo. Este método es un híbrido de los dos anteriores.

En nuestro estudio, se ha empleado la bioautografía por contacto (Ríos *et al.*, 1988). Es un método menos sensible que el antifungigrama debido a la corta exposición del inóculo a los posibles principios antifúngicos y puede producir interferencias debidas a la naturaleza de la capa fina. Se ha utilizado, principalmente, en el aislamiento biodirigido de los compuestos responsables de la actividad del aceite esencial y de los extractos y, como método complementario al antifungigrama, para detectar la presencia de actividad debida a productos que se encuentran en muy baja concentración en el extracto bruto, quedando enmascarada su actividad, o bien que coexisten con algún otro compuesto que antagoniza dicha actividad.

Material y reactivos.

Medio de cultivo: Glucosa Sabouraud Agar (Cultimed-Panreac ref. 413802.1210).

Soporte físico: placas de Petri, 12 x 12 cm (Rubilabor ref. 816.2252).

Cromatofolios CCF de Silicagel 60 F₂₅₄ de 0,2 mm de espesor (Merck ref. 5554 y SDS ref. CCM 221254).

Protocolo experimental

1) Preparación del inóculo.

Se opera de igual forma que en el antifungigrama.

2) Preparación de las CCF.

Para realizar la bioautografía es necesario desarrollar una CCF de la muestra a ensayar escogiendo un sistema de eluyente que asegure la máxima distribución de los componentes por el cromatofolio.

La cantidad de muestra empleada en la CCF varía en cada caso, según el grado de fraccionamiento del extracto. En el caso de productos extractivos se han sembrado 3 y 5 mg, previamente disueltos en el disolvente apropiado, en bandas de 2 y 4 cm, respectivamente.

Paralelamente, se realiza una CCF testimonio, para el posterior estudio de las características cromatográficas de las bandas de inhibición.

3) Disposición de las CCF en placas de Petri.

El cromatofolio ya desarrollado se deposita sobre la placa de Petri con precaución, para evitar que se produzcan bolsas de aire entre ésta y la superficie del agar que impidan la migración de materia.

4) Incubación y lectura de los resultados.

Las placas de Petri se dejan reposar en nevera (4 °C) durante 1 h para favorecer la difusión de las sustancias sin crecimiento fúngico. A continuación, se retiran los cromatofolios de la superficie del medio de cultivo y se incuban a 30 °C. Se realizan lecturas a las 48 y 72 h. y se comparan las bandas de inhibición con las

bandas cromatograficas obtenidas en la CCF testimonio. Transcurrida una semana, se destruyen por esterilización en autoclave.

Para realizar la bioautografía frente a *Trichophyton mentagrophytes* y *Mycrosporium gypseum* para determinar las fracciones activas del aceite esencial, se han preparado disoluciones al 20% en hexano del aceite esencial, de las fracciones y del α -pineno y se han sembrado en bandas de 0,8 cm.

De cada CCF se han preparado 4 ejemplares: Una CCF para realizar el ensayo de actividad frente a cada hongo, y dos CCF de referencia que han sido reveladas con la solución de anisaldehído y con el reactivo de Godine.

4.6.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los métodos por dilución están orientados a establecer la concentración mínima del agente antimicrobiano que se requiere para inhibir el crecimiento o matar el microorganismo; generalmente, se expresa en $\mu\text{g/mL}$. Los agentes antimicrobianos se ensayan realizando una serie de diluciones 1:1 (\log_2). A la menor concentración que inhibe el crecimiento de un microorganismo se le atribuye el valor de la CMI (Jorgensen, 1999; Ríos *et al.*, 1988; Van den Berghe y Vlietinck, 1991).

Los métodos por dilución pueden realizarse en medio líquido, donde se distinguen dos modalidades: la macrodilución, que incluye aquellos ensayos en que el volumen total de medio de cultivo para cada dilución es $> 1,0 \text{ mL}$; y la microdilución, en la que, frecuentemente, se trabaja con volúmenes de $0,1 \text{ mL}$ en microplacas (Hadacek y Greger, 2000; Jorgensen, 1999). En nuestro estudio, se ha empleado como método para determinar la CMI la microdilución en medio líquido.

Material y reactivos.

Medio de cultivo: Sabouraud, Medio Líquido (Cultimed - Panreac ref. 413.804.1210).

Soporte físico: microplacas 96-pocillos, fondo plano (Rubilabor ref. 822.0005).

Fármacos de referencia:

Anfotericina B, (Sigma-Aldrich ref. A2411).

Nistatina, (Sigma-Aldrich ref. N6261).

Ketoconazol, (Sigma-Aldrich ref. K1003).

Clotrimazol, (Sigma-Aldrich ref. C6019).

Protocolo experimental

1) Preparación de inóculo.

0,5 mL de una suspensión de levaduras o esporas ajustada a 10^6 UFC/mL, obtenida como en los casos anteriores, se añaden a 50 mL de medio de cultivo líquido.

2) Preparación de los fármacos de referencia.

Se prepara una disolución inicial de cada fármaco de referencia en DMSO a concentración de 0,8 mg/mL y, a continuación, se efectúa una disolución 1:9 en eppendorf diluyendo en el medio de cultivo líquido estéril. La disolución obtenida tiene una concentración de 80 μ g/mL y es la primera de una serie de 12 diluciones 1:1, que se obtienen a continuación, al adicionar 0,5 mL de la dilución anterior a un volumen igual de medio de cultivo líquido estéril.

3) Preparación de los productos a ensayar.

Se ha preparado una disolución inicial de 25,6 mg/mL del producto en el disolvente más apropiado. Estos disolventes han sido previamente ensayados para descartar que tengan una actividad antifúngica propia. La primera dilución de la serie se ha obtenido mediante una dilución 1:9 en medio de cultivo líquido estéril (2,56 mg/mL), a partir de esta primera dilución se han realizado 12 diluciones 1:1 que se

han obtenido al adicionar 0,5 mL de la dilución anterior a un volumen igual de medio de cultivo líquido estéril.

4) Disposición de los productos a ensayar en microplacas.

Para la determinación de la CMI, se emplean microplacas de 12 x 8 pocillos de fondo plano. En estos dispositivos se puede valorar la actividad antifúngica de hasta cinco sustancias, una por cada fila. Dos filas de las restantes se reservan para las diluciones de los fármacos de referencia y la última se destina a la comprobación de la esterilidad del medio de cultivo y del crecimiento del inóculo.

En cada fila de la microplaca se depositan 10 μ L de cada dilución de la serie de cada sustancia a ensayar y se añaden 90 μ L de medio de cultivo líquido previamente inoculado. En el paso anterior se ha realizado una dilución 1:10, por lo que la concentración en el primer pocillo es de 256 μ g/mL para las sustancias a valorar y de 8 μ g/mL para los fármacos de referencia.

5) Incubación y lectura de los resultados.

La microplaca se incuba a 30 °C durante 48 h. La lectura se realiza por visualización directa de la placa por duplicado.

4.6.6. Concentración mínima fungicida (CMF)

La CMF es una prueba necesaria, ya que si bien la CMI es aquella concentración en la que no se observa crecimiento fúngico a simple vista, pueden quedar células viables cuando el producto no es antibiótico o antifúngico al 100%.

La determinación de la CMF se puede realizar por extensión de las dos modalidades de la técnica de la CMI, es decir, de la macrodilución y microdilución indistintamente. En nuestro estudio, se ha determinado la CMF por extensión de la microdilución en medio líquido. El método utilizado es una adaptación del descrito por Balows y col. (1991).

Se asigna la CMF a aquella concentración que haya inhibido como mínimo el 99.99% del crecimiento fúngico.

Material y reactivos.

Medio de cultivo: Glucosa Sabouraud Agar (Cultimed-Panreac ref. 413802.1210).

Soporte físico: placas de Petri, 9 cm de diámetro (Rubilabor ref. 812.1480).

Protocolo experimental

Para la determinación de la CMF, no es necesaria la preparación de: inóculo, fármacos de referencia y agentes antimicóticos.

1) Disposición de los productos a ensayar en placas de Petri.

Se emplean placas de Petri redondas con un medio sólido adecuado, donde se siembran en extensión 10 μ L del contenido del pocillo (microplaca) al que se ha asignado la CMI. Se siembran además las dos concentraciones superiores en otras dos placas de Petri más por duplicado.

2) Incubación y lectura de los resultados.

Las placas se incuban a 30 °C durante 48 h. La lectura se realiza por visualización directa de la placa. La CMF corresponde a la concentración de muestra de la placa de Petri donde no se observa crecimiento fúngico.

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Screening de actividad antifúngica

Para establecer la actividad antifúngica de la raíz y rizoma de *F. hermonis*, se han obtenido diferentes productos extractivos: el aceite esencial, el extracto acuoso por decocción, y extractos obtenidos con disolventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, metanol y agua, según el protocolo descrito en el Capítulo 4. En la tabla 5.1 se relacionan los productos extractivos preparados a partir del material vegetal y el rendimiento obtenido para cada uno de ellos.

Producto extractivo	Tipo de extracción	Rendimiento (%)
Aceite esencial	Destilación	1,52 (v/p)
Hexánico	Maceración	13,24 (p/p)
CH ₂ Cl ₂	Soxhlet	10,48 (p/p)
MeOH	Maceración	11,48 (p/p)
H ₂ O	Decocción	7,28 (p/p)
Decocción	Decocción	22,68 (p/p)

Tabla 5. 1. Tabla de rendimientos de extractos y aceite esencial.

La investigación preliminar de la actividad antifúngica se ha realizado mediante el ensayo del antifungigrama, según la técnica descrita en el apartado 4.6.3. En cada caso, la prueba se ha realizado por triplicado empleando dos dosis de extracto: 5 y 10 mg/disco, frente a cada una de las 8 cepas fúngicas indicadas en el apartado 4.6.2. En el caso del aceite esencial se han aplicado 5 y 10 µL/disco. Como fármacos de referencia se han utilizado nistatina y anfotericina B a la dosis de 20 µg/disco.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.2. En el caso del aceite esencial, transcurridas las 48 h de incubación, se aprecian halos de inhibición del crecimiento fúngico en el caso de las levaduras y especialmente del dermatofito *Tricophyton mentagrophytes*. Para este último, el halo de inhibición no ha podido ser medido ya que excedía las dimensiones de la placa, lo cual indica que el aceite esencial manifiesta una marcada actividad antifúngica. Por lo que se refiere a los extractos, únicamente han mostrado una cierta actividad los extractos metanólico y acuoso frente a *Candida lactis-condensi*.

La determinación de las CMI y CMF evidencia actividad del aceite esencial frente a todas las cepas ensayadas, con valores comprendidos entre 32 y 128 µg/mL. La mayor actividad se ha verificado frente a los dermatofitos *Tricophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum*, este último con valores equivalentes de CMI y CMF (32 µg/mL). También coincidieron las CMI y CMF para *C. lactis-condensi* (64 µg/mL), *C. albicans* (128 µg/mL) y *S. cerevisiae* (128 µg/mL). En el caso de *T. mentagrophytes*, *P. purpurogenum*, *A. niger* y *A. fumigatus* los valores de CMF fueron el doble que los de la CMI: 64 y 32, 128 y 64, 128 y 64, y 256 y 128 µg/mL, respectivamente (véase artículo del apartado 5.2.1).

Contrariamente a los resultados obtenidos con el antifungigrama, en la determinación de las CMI y CMF los extractos hexánico y diclorometánico inhiben el crecimiento de los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*, siendo el primero de ellos la cepa más sensible con valores de CMI de 32 µg/mL para ambos extractos y CMF de 32 µg/mL en el caso del extracto diclorometánico y de 64 µg/mL en el caso del hexánico. En cambio, los extractos metanólico y acuoso prácticamente no muestran actividad antifúngica, con CMI y CMF ≥ 256 µg/mL (ver artículo del apartado 5.3.1.). Ello puede deberse al hecho de que en el ensayo del antifungigrama los productos ensayados difunden a través del agar de forma diferente según sea su polaridad, de modo que en el caso de los más lipófilos (extractos hexánico y diclorometánico) la actividad podría quedar enmascarada (Jacob y Walker, 2005).

Tipo Extracto	Dosis	Diámetro del halo de inhibición (mm)						
		An	Af	Pp	Tm	Cl	Ca	Sc
Aceite esencial	5 µl	-	-	-	Nm	20	14	16
	10 µl	-	-	-	Nm	33	18	35
Decocción acuosa	5 mg/disco	-	-	-	-	-	-	-
	10 mg/disco	-	-	-	-	-	-	-
Hexánico	5 mg/disco	-	-	-	-	-	-	-
	10 mg/disco	-	-	-	-	-	-	-
Diclorometánico	5 mg/disco	-	-	-	-	-	-	-
	10 mg/disco	-	-	-	-	-	-	-
Metanólico	5 mg/disco	-	-	-	-	18	-	-
	10 mg/disco	-	-	-	-	20	-	-
Acuoso	5 mg/disco	-	-	-	-	16	-	-
	10 mg/disco	-	-	-	-	18	-	-
Fármacos de referencia								
Nistatina	20 µg/disco	19	19	21	Nm	28	19	27
Anfotericina B	20 µg/disco	17	15	15	Nm	17	15	16

An: *Aspergillus niger*; **Af:** *Aspergillus fumigatus*; **Pp:** *Penicillium purpurogenum*; **Tm:** *Tricophyton mentagrophytes*; **Cl:** *Candida lactis-condensii*; **Ca:** *Candida albicans*; **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*; **Nm:** No medible; -: No hay actividad a las dosis ensayadas.

Tabla 5. 2. Resultados del ensayo del antifungigrama del aceite esencial y de los extractos.

Así pues, la evaluación de la actividad antifúngica de los diferentes productos extractivos ha permitido seleccionar el aceite esencial y los extractos hexánico y diclorometánico para profundizar en la investigación de sus componentes activos.

5.2. Investigación del aceite esencial de *F. hermonis*

Los resultados obtenidos en la investigación de la composición química y actividad antifúngica del aceite esencial de *F. hermonis* han sido objeto del artículo “*Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of Ferula hermonis*”, publicado en la revista *Phytochemistry*, que se adjunta en el apartado 5.2.1.

Como complemento a los resultados publicados, se han determinado una serie de índices físicos que completan la caracterización del aceite esencial (apartado 5.2.2).

El apartado 5.2.3 reúne información adicional sobre el análisis y fraccionamiento del aceite esencial, así como relativa al aislamiento y caracterización de la estructura de los principios activos.

5.2.1. Composición y actividad antifúngica del aceite esencial de la raíz y rizoma de *F. hermonis*

Resumen: El análisis del aceite esencial de las raíces y rizoma de *Ferula hermonis* Boiss. (Apiaceae) por GC-FID, GC-MS y ¹³C-RMN ha permitido la identificación de 79 constituyentes, que representan más del 90% del total de la muestra. El componente mayoritario es el α -pineno (43,3%), seguido de α -bisabolol (11,1%) y un compuesto acetilénico inusual, 3,5-nonadiino (4,4%). La actividad antifúngica del aceite esencial, antes y después de su fraccionamiento por cromatografía en columna, se ha ensayado frente a diversas levaduras y hongos filamentosos y dermatofitos. La purificación de las fracciones activas ha proporcionado 3,5-nonadiino, α -bisabolol, angelato de jaeschkeanadiol, óxido de α -bisabolol B y *trans*- verbenol, así como dos fracciones purificadas: una de ellas (JB73) con 73% de benzoato de jaeschkeanadiol y la otra con 50% de espatulenol. La determinación de los valores de CMI y CMF de todos estos productos ha

evidenciado una potente actividad antifúngica para JB73 y 3,5-nonadiino. En particular, frente al dermatofito *Tricophyton mentagrophytes*, los valores CMI y CMF han sido de 0,25 µg/mL para JB73 y de 8 µg/mL para el 3,5-nonadiino, siendo el primero más activo que los fármacos de referencia, anfotericina B y nistatina.



Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytochem

Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*

Abdel-Hadi Al-Ja'fari^{a,c}, Roser Vila^a, Blanca Freixa^a, Felix Tomi^b, Joseph Casanova^b, Joan Costa^c, Salvador Cañigual^{a,*}

^a Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

^b Équipe Chimie et Biomasse, UMR CNRS 6834, Université de Corse, Route des Sanguinaires, 20000 Ajaccio, France

^c Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Unitat Docent Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, 08916 Badalona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2011

Received in revised form 19 April 2011

Available online 24 May 2011

Keywords:

Ferula hermonis

Essential oil

α -Pinene

3,5-Nonadiyne

Jaeschkeanadiol benzoate

Antifungal activity

Dermatophytes

ABSTRACT

The analysis of the essential oil from rhizome and roots of *Ferula hermonis* Boiss. (Apiaceae) by GC–FID, GC–MS and ¹³C NMR allowed the identification of 79 constituents, more than 90% of the oil, the major one being α -pinene (43.3%), followed by α -bisabolol (11.1%) and the unusual acetylenic compound 3,5-nonadiyne (4.4%).

The antifungal activity of the essential oil before and after fractionation was assayed against several yeasts and filamentous fungi. Purification of the active fractions afforded 3,5-nonadiyne, α -bisabolol, jaeschkeanadiol angelate, α -bisabolol oxide B and *trans*-verbenol, as well as two purified fractions, one of them (JB73) with 73% of jaeschkeanadiol benzoate and the other with 50% of spathulenol. Determination of MIC and MFC values of all these products evidenced strong antifungal activities for JB73 and 3,5-nonadiyne. Particularly, against the dermatophyte *Tricophyton mentagrophytes*, MIC and MFC values were 0.25 μ g/ml for JB73, and 8 μ g/ml for 3,5-nonadiyne, the former being more active than amphotericin B and nystatin.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During the last decades the incidence of fungal infections in humans, in particular those involving skin and mucosal surfaces, has increased considerably, especially in tropical and subtropical countries, dermatophytes and *Candida* sp. being the most frequent pathogens. Furthermore, a dramatic increase of cases of immunocompromised patients which frequently develop opportunistic and superficial mycoses has been also reported in the last years (Pfaller and Diekema, 2007). Fungi produce serious invasive mycoses in individuals submitted to organ transplants or antineoplastic chemotherapy, those with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), extremely aged persons and patients in intensive care units, among others (Mathew and Nath, 2009). Thus, fungal diseases have emerged as important public health problems with a high economic cost. Although several antimycotic drugs are available at present, its use is limited by a number of factors such as low potency, poor solubility, drug toxicity and emergence of resistant strains due in part to their intensive prophylactic use (Bastert et al., 2001). Therefore, despite the progress in human medicine, there is a distinct need for the discovery of alternative new, safer and more effective antifungal agents (Abad et al., 2007).

* Corresponding author. Tel.: +34 93 4024531; fax: +34 93 4035982.

E-mail address: s.canigual@ub.edu (S. Cañigual).

Plants used in Traditional Medicine usually constitute an important source of new biologically active compounds (Portillo et al., 2001; Svetaz et al., 2010). Natural products, either as pure compounds or as standardized plant extracts, provide unlimited opportunities for new drug leads because of the unmatched availability of chemical diversity (Cos et al., 2006). In recent years, many studies on the evaluation of antifungal activities of plant extracts have been carried out and a number of reports on new antifungal agents from plants have been reported (Aqil et al., 2010; Freixa et al., 2001; Portillo et al., 2005; Thevissen et al., 2007). From all of them, essential oils constitute one of the most promising groups, not only for their own activity but also because of the synergism when administered in combination with synthetic drugs, allowing a dose reduction of the latter (Pyun and Shin, 2006; Rosato et al., 2008).

The genus *Ferula* (Apiaceae), known as a good source of biologically active compounds, comprises about 170 species widely distributed throughout the Mediterranean area and Central Asia (Pimenov and Leonov, 1993). Many of them have been employed since antiquity as sources of scented gum-resins used either for medicinal or culinary purposes. Several species of *Ferula* are appreciated in traditional medicine for the treatment of skin infections, stomach disorders, fever, dysentery, hysterias and as aphrodisiac (Al-Yahya et al., 1998; Gamal-Eldeen and Hegazy, 2010).

Hormonal effects and, more recently, cytotoxic and cancer preventing properties have been also investigated in plants of this genus (Lhuillier et al., 2005). Some of these activities have been related to sesquiterpene derivatives, mainly to those of the daucane type, such as ferutin (Zanoli et al., 2005; Zavatti et al., 2006), a potent phytoestrogen which acts as an agonist for both estrogen receptors (ER α and ER β) (Ikeda et al., 2002).

Particularly, *F. hermonis* Boiss., a perennial shrub that grows on the Hermon mountain, between Lebanon and Syria commonly known as “Shirsh-el-Zallouh” which means hairy root, is used in the Middle East to improve sexual behaviour in the treatment of frigidity and impotence (Auzi et al., 2008; El-Taher et al., 2001; Lev and Amar, 2002). Although some papers dealing on the sesquiterpene composition of different extracts (Al-Shae'r et al., 2001; Auzi et al., 2008; Diab et al., 2001a,b; Galal, 2000; Galal et al., 2001; Lhuillier et al., 2005) as well as on its antibacterial and insecticidal activities (Al-Nahar et al., 2006; Al-Shae'r et al., 2001; Galal et al., 2001; Hilan et al., 2007) have been previously published, little is known about the composition of its essential oil and its antifungal activity. Only seven constituents (meaning ca. 61% of the oil) were identified by Al-Nahar et al. (2006) in a GC–MS analysis of the essential oil from root, α -bisabolol (23.0%) and α -farnesene (12.7%) being the major ones. A slight activity against *Aspergillus niger*, *A. flavus* and *Fusarium oxysporum* was also reported. On the other hand, Hilan et al. (2007), based on a GC–FID analysis and correlation of the retention times with those of pure standards, showed α -pinene (31%) as the main constituent of the essential oil from the root of *F. hermonis*.

With the aim of searching for new antifungal agents and to potentiate the use of natural resources, the present work deals with the study of the essential oil from the rhizome and roots of *F. hermonis*, in particular its chemical composition and antifungal activity against several strains in view of characterising the active constituents.

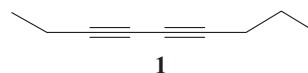
2. Results and discussion

The rhizome and roots of *Ferula hermonis* submitted to hydrodistillation for 3.5 h gave an essential oil yield of 1.5% (v/w). A first

screening of the antifungal activity of the oil by the paper disk agar diffusion method evidenced antimycotic activity against several fungi strains, which was confirmed by determination of the MIC values, ranging from 32 to 128 μ g/ml (Table 1). The strongest activity was demonstrated against the dermatophytes *T. mentagrophytes* and *M. gypseum*, the latter showing the same MIC and MFC values (32 μ g/ml). MIC and MFC were also coincident for *C. lactis-condensi* (64 μ g/ml), *C. albicans* (128 μ g/ml) and *S. cerevisiae* (128 μ g/ml). The MFC values for *T. mentagrophytes*, *P. purpurogenum*, *A. niger* and *A. fumigatus* were about two-fold the MIC values.

Bioguided fractionation of the essential oil was performed with two aims: improvement of the identification of its constituents through GC–FID, GC–MS and 13 C NMR analyses of the fractions obtained, and assessment of the fractions and/or the constituents responsible for the antifungal activity. Preparative column chromatography using silicagel 60 as stationary phase eluted with a step gradient of hexane–EtOAc afforded 27 fractions.

GC, GC–MS and 13 C NMR analysis of the total oil and the fractions obtained by CC allowed the identification of 79 constituents, meaning more than 90% of the total sample (Table 2). From them, 55 compounds were identified as sesquiterpenes, whereas only 21 were monoterpenes. The major constituent was α -pinene (43.3%), followed by α -bisabolol (11.1%), compound **1** (4.4%), β -farnesene (3.2%) and δ -cadinene (2%).



The identity of compound **1**, which was the major constituent of the active fraction 10, could not be definitely assigned from the retention indices, the MS and the 13 C NMR spectrum, so further fractionation was needed in order to isolate this constituent whose structure was finally elucidated as 3,5-nonadiyne (**1**). This unusual acetylenic compound has only been reported twice before, in the essential oils from the roots of *Selinum tenuifolium* (Dev et al., 1984) and *Cachrys ferulacea* (Dokovic et al., 2004) (Apiaceae) where it reached percentages higher than 80%. 3,5-Nonadiyne has been found to selectively inhibit endogenous nitric oxide

Table 1
Antifungal activity of essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis* and some of its major constituents.

Fungi strains ^a		Samples ^b									Positive controls ^c			
		EOFH	α P	Nd	α B	α BO	tV	JA90	JB73	S50	A	N	K	C
C.a.	MIC ^d	128	128	>256	64	128	128	128	128	64	1	4	>8	8
	MFC ^e	128	128	>256	64	128	128	>256	128	64	1	2	>8	>8
C.l.	MIC	64	64	>256	64	64	128	128	128	32	0.5	2	0.25	0.125
	MFC	64	64	>256	64	128	128	128	128	64	1	2	0.5	0.25
S.c.	MIC	128	128	>256	128	128	128	128	128	128	4	8	0.125	0.125
	MFC	128	128	>256	128	128	128	128	128	128	>8	>8	2	2
T.m.	MIC	32	64	8	16	64	32	32	0.25	32	0.5	2	0.25	0.0625
	MFC	64	64	8	32	64	32	32	0.25	32	0.5	2	0.25	0.0625
M.g.	MIC	32	32	8	16	64	32	32	64	32	1	4	8	0.125
	MFC	32	32	16	16	128	32	64	128	32	1	8	>8	0.25
A.n.	MIC	64	128	>256	64	128	128	128	128	64	1	4	>8	2
	MFC	128	128	>256	128	128	128	>256	256	128	1	4	>8	2
A.f.	MIC	128	128	>256	64	128	128	128	128	64	1	4	8	1
	MFC	256	128	>256	128	128	128	>256	256	256	2	4	8	1
P.p.	MIC	64	>256	>256	>256	>256	>256	64	>256	32	2	4	4	2
	MFC	128	>256	>256	>256	>256	>256	128	>256	32	8	8	4	2

^a C.a.: *Candida albicans*; C.l.: *C. lactis-condensi*; S.c.: *Saccharomyces cerevisiae*; T.m.: *Tricophyton mentagrophytes*; M.g.: *Microsporium gypseum*; A.n.: *Aspergillus niger*; A.f.: *A. fumigatus*; P.p.: *Penicillium purpurogenum*.

^b EOFH: Essential oil of *Ferula hermonis*; α P: α -pinene; Nd: 3,5-nonadiyne; α B: α -bisabolol; α BO: α -bisabolol oxide B; tV: *trans*-verbenol; JA90: jaeschkeanadiol angelate 90%; JB73: jaeschkeanadiol benzoate 73%; S50: spathulenol 50%.

^c A: amphotericin B; N: nistatyn; K: ketoconazole; C: clotrimazole.

^d MIC: Minimum inhibitory concentration (μ g/ml).

^e MFC: Minimum fungicidal concentration (μ g/ml).

Table 2
Composition of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*.

Components	Retention indices ^a				%	Identification methods ^b
	A	B	C	D		
α -Pinene	1021	935	111	214	43.4	A, B, C, D, E, F
Camphene	1052	939	122	216	0.2	A, B, C, D, E
Hexanal	1091	<800	131	116	0.1	A, B, C, D, E
β -Pinene	1102	963	140	230	1.4	A, B, C, D, E, F
Verbenene	1116	942	150	218	0.4	A, B, C, D, E, F
3-Carene	1137	995	165	247	0.4	A, B, C, D, E, F
β -Myrcene	1159	980	180	239	0.2	A, B, C, D, E
Limonene	1189	1013	201	256	0.2	A, B, C, D, E, F
p-Cymene	1263	1004	239	251	0.2	A, B, C, D, E
3,5-Nonadiyne	1433	1059	322	278	4.4	A, B, C, D, E, F
α -Cubebene	1445	1354	328	419	0.2	A, B, C, D, E, F
α -Copaene	1476	–	344	–	0.3	A, C, E, F
Daucene	1478	–	345	–	0.4	A, C, E, F
α -Gurjunene	1514	1443	361	461	t	A, B, C, D, E
γ -Gurjunene	1533	1605	369	554	0.3	A, B, C, D, E
Aristolene	1552	–	379	–	0.2	A, C, E, F
Pinocarvone	1554	1135	381	316	0.2	A, B, C, D, E, F
cis- α -Bergamotene	1558	–	381	–	t	A, C, E
Bornyl acetate	1567	–	388	–	t	A, C, E
trans- α -Bergamotene	1575	–	390	–	0.4	A, C, E, F
β -Elemene	1579	1365	391	422	0.3	A, B, C, D, E
β -Gurjunene	1584	1369	394	435	0.1	A, B, C, D, E, F
Terpinen-4-ol	1587	1158	398	321	t	A, B, C, D, E, F
Aromadendrene	1590	1400	400	442	1.2	A, B, C, D, E, F
Myrtenal	1611	–	405	–	0.3	A, C, E, F
trans-Pinocarveol	1640	1110	416	303	0.5	A, B, C, D, E, F
cis-Verbenol	1643	–	417	–	0.6	A, C, E, F
trans- β -Farnesene	1660	1433	424	455	3.2	A, B, C, D, E, F
trans-Verbenol	1666	1121	426	307	1.9	A, B, C, D, E, F
β -Cubebene	1669	1459	428	467	t	C, D, E
γ -Muurolene	1676	–	429	–	0.3	A, C, E, F
Ledene	1677	–	430	–	0.2	A, C, E, F
α -Terpineol	1684	1169	432	324	t	A, B, C, D, E, F
Verbenone	1686	1167	434	332	1.0	A, B, C, D, E, F
β -Selinene	1704	1452	439	465	0.5	A, B, C, D, E, F
α -Selinene	1709	1462	442	472	0.4	A, B, C, D, E, F
α -Muurolene	1713	1466	444	475	0.3	A, B, C, D, E, F
β -Bisabolene	1717	1482	447	483	1.1	A, B, C, D, E, F
Bicyclogermacrene	1717	1462	447	472	1.0	A, B, C, D, E, F
γ -Cadinene	1737	1482	461	483	1.7	A, B, C, D, E, F
δ -Cadinene	1737	1500	461	491	1.5	A, B, C, D, E, F
Selina-3,7(11)-diene	1748	–	469	–	t	A, C, E, F
ar-Curcumene	1756	1450	472	465	0.6	A, B, C, D, E, F
trans- α -Bisabolene	1756	1522	472	508	0.5	A, B, C, D, E, F
α -Cadinene	1768	–	478	–	t	A, C, E, F
Myrtenol	1776	–	483	–	0.3	A, C, E, F
Germacrene B	1800	–	–	–	t	A, E
cis-Calamenene	1808	–	506	–	t	A, C, E
trans-Calamenene	1813	–	507	–	t	A, C, E, F
trans-Carveol	1828	1189	514	342	0.2	A, B, C, D, E, F
Thymyl acetate	1847	–	524	–	t	A, C, E
α -Calacorene	1891	1515	551	500	0.3	A, B, C, D, E, F
α -Copaene-11-ol	2031	–	611	–	0.4	A, C, E
cis,trans-Farnesol	2037	1539	613	526	0.4	A, B, C, D, E
trans-Dauc-8-en-4 β -ol	2039	–	614	–	t	A, C, E, F
Epicubenol	2041	–	615	–	t	A, C, E, F
Germacradien-11-ol	2043	–	617	–	0.2	A, C, E, F
Globulol	2045	–	618	–	t	A, C, E
Viridiflorol	2050	1549	620	525	0.1	A, B, C, D, E, F
Cubenol	2065	–	624	–	t	A, C, E
Bisabolol oxide	2090	–	641	–	0.9	A, C, E
Spathulenol	2100	1542	646	521	1.1	A, B, C, D, E, F
α -Bisabolol oxide B	2107	1623	649	564	1.0	A, B, C, D, E, F
T-Cadinol	2148	1612	668	559	0.4	A, B, C, D, E, F
T-Muurolol	2164	1612	675	563	0.1	A, B, C, D, E, F
α -Bisabolol	2195	1658	693	580	11.1	A, B, C, D, E, F
α -Cadinol	2207	–	700	–	0.1	A, C, E, F
β -Eudesmol	2207	–	702	565	t	A, C, D, E
Myristicin	2224	1462	705	502	0.3	A, B, C, D, E
α -Humulen-10-ol	2280	1618	730	562	1.3	A, B, C, D, E, F
Jaeschkeanadiol angelate	>2300	–	866	–	0.1	C, E, F
Jaeschkeanadiol	>2300	1721	872	609	1.9	B, C, D, E, F
Jaeschkeanadiol benzoate	>2300	>2300	>1000	910	1.2	D, E, F

Table 2 (continued)

Components	Retention indices ^a				%	Identification methods ^b
	A	B	C	D		
p-Cymene-8-ol ^c	–	1154	–	325	0.4	B, D, E
γ -Selinene ^c	–	1350	–	417	0.1	B, D, E
Selina-4,11-diene ^d	–	–	–	–	t	F
β -Bisabolol ^d	–	–	–	–	t	F
Cadinadien-8-ol ^d	–	–	–	–	t	F
Selin-11-en-4 α -ol ^d	–	–	–	–	t	F
Monoterpene hydrocarbons					46.4	
Oxygenated monoterpenes					5.5	
Sesquiterpene hydrocarbons					15.4	
Oxygenated sesquiterpenes					20.7	
Others					4.8	
Total identified					92.8	

Compounds listed by elution order in the polar column except the last six constituents.

t: traces ($\leq 0.05\%$).

^a A: n-Alkane indices in Supelcowax™-10; B: n-Alkane indices in SPB-1™; C: FAME indices in Supelcowax™-10; D: FAME indices in SPB-1™.

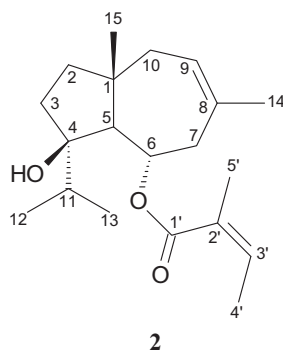
^b Identification methods: E: GC-MS, F: ¹³C-NMR analysis of the total oil and/or after fractionation.

^c Constituents only detected in the SPB-1™ column.

^d Constituents identified from the ¹³C NMR shift data after fractionation of the essential oil.

release ($IC_{50} = 6.7 \pm 0.8 \mu M$) by rat peritoneal macrophages at doses that do not inhibit T cell proliferation, activity that has been related to the highly lipophilic nature of the compound (Dokovic et al., 2004).

It should be noted that some daucane sesquiterpene derivatives were identified in the essential oil investigated, in particular: jaeschkeanadiol (ferutinol), jaeschkeanadiol benzoate (teferidin) and jaeschkeanadiol angelate (**2**), which were identified from their MS and ¹³C NMR spectral data. To our knowledge, in the case of jaeschkeanadiol angelate (**2**), it is the first time that this daucane ester is described in *F. hermonis* and that its ¹³C NMR chemical shifts are reported. This sesquiterpene was firstly isolated from *Ferula elaeochytris* (Miski et al., 1983) and later on reported in other *Ferula* sp.



A number of papers dealing on the composition of the essential oils from different plant parts of *Ferula* sp. can be found in the literature, from which only two concerned preliminary analysis of the volatile oil from root of *F. hermonis* (Al-Nahar et al., 2006; Hilan et al., 2007). Particularly, in the essential oil from roots different composition patterns have been reported depending on the species. In some of them, like in our sample from *F. hermonis*, the main constituents identified were monoterpene hydrocarbons, such as α -pinene in *F. penninervis* (80.2%) (Goryaev et al., 1971) and *F. hermonis* (Hilan et al., 2007) (31%), and β -pinene in *F. galbaniflua* (58.8%) (Rustaiyan et al., 2002). Other compounds reported as major components in the volatile oil from subterranean parts were oxygenated monoterpenes like methyl thymol (41.2%) in *F. oopoda* (Karim et al., 1979), sesquiterpene hydrocarbons such as E- β -farne-

sene (8.4%) and α -zingiberene (6.9%) in *F. glauca* (Maggi et al., 2009), sulphur-containing compounds (25.8%) in *F. persica* (Iran-shahi et al., 2006) as well as phenylpropanoids like myristicin in *F. oopoda* and *F. persica* (11.2% and 8.9%, respectively) or elemicin (9%) in *F. glauca*.

α -Pinene has also been reported as major constituent in the essential oils from aerial parts of several species of *Ferula*, particularly from the flowering tops and seeds of *F. hermonis* (Hilan et al., 2007).

The agar overlay bioautographic assay of the 27 fractions showed growth inhibition zones of different intensities in the case of fraction 2, fraction 10, and from fraction 17–27. In fraction 2 the activity was directly related to α -pinene, the major constituent of the oil, whereas 3,5-nonadiyne (**1**) was the main active constituent of fraction 10. Table 3 shows the main constituents of the active fractions 17–27. A new fractionation of a higher amount of essential oil was needed in order to isolate the major constituents of these fractions. In this way, α -bisabolol, α -bisabolol oxide B, *trans*-verbenol, jaeschkeanadiol angelate (**2**), and two purified fractions one of them (JB73) with 73% of jaeschkeanadiol benzoate and the other with 50% of spathulenol were obtained.

The antifungal activities of these constituents, as well as those of α -pinene and 3,5-nonadiyne (**1**) were determined against three yeasts and five filamentous fungi strains. Results are shown in Table 1. The human pathogen dermatophytes assayed, *M. gypseum* and *T. mentagrophytes*, were the most sensitive strains, MIC and MFC values ranging from 0.25 to 128 $\mu g/ml$. The most active products were found to be JB73, 3,5-nonadiyne (**1**) and α -bisabolol.

The most potent activity was demonstrated by JB73 against *T. mentagrophytes*, with the same MIC and MFC values of 0.25 $\mu g/ml$, equivalent to that one of ketoconazole (0.25 $\mu g/ml$) and superior to amphotericin B (0.5 $\mu g/ml$) and nystatin (2 $\mu g/ml$). On the contrary, the activity of this constituent against *M. gypseum* was quite lower, with MIC and MFC values of 64 and 128 $\mu g/ml$, respectively. Both dermatophytes were highly sensitive to 3,5-nonadiyne whose MIC and MFC's for *T. mentagrophytes* were 8 $\mu g/ml$, whereas in the case of *M. gypseum* MFC value was about two-fold the MIC value (8 and 16 $\mu g/ml$, respectively). 3,5-Nonadiyne did not show any activity against the other strains assayed. In the case of α -bisabolol, fungicidal and fungistatic activity against both dermatophyte strains was exhibited between 16 and 32 $\mu g/ml$.

α -Pinene, α -bisabolol oxide B, *trans*-verbenol, jaeschkeanadiol angelate (**2**) and the fraction with 50% spathulenol evidenced a

Table 3Main constituents (percentages $\geq 1\%$) of the active fractions of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*.

Constituents	% in Fractions										
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
<i>cis</i> -Verbenol	-	-	-	-	-	-	17.5	4.2	-	-	-
Unidentified oxygenated monoterpene	-	-	-	-	-	-	5.2	6.0	-	-	-
<i>trans</i> -Pinocarveol	-	-	-	-	12.8	14.6	-	-	-	-	-
<i>trans</i> -Verbenol	-	-	-	-	-	-	-	-	2.9	68.5	99.7
Verbenone	-	-	-	-	-	-	-	5.2	22.8	19.6	-
<i>p</i> -Mentha-1,5-dien-8-ol	-	-	-	-	-	-	-	7.3	17.2	5.9	-
Myrtenol	-	-	-	-	-	-	-	8.0	4.6	-	-
<i>trans</i> -Carveol	-	-	-	-	-	-	3.9	7.7	3.6	-	-
α -Copaene-11-ol	-	-	-	-	-	15.9	14.2	-	-	-	-
Germacradien-11-ol	-	-	-	1.7	2.3	-	-	-	-	-	-
Globulol	-	-	-	-	-	-	-	3.6	4.6	-	-
Viridiflorol	-	-	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-
Spathulenol	-	-	-	22.8	33.3	2.5	-	-	-	-	-
α -Bisabolol oxide B	-	-	-	-	-	27.5	15.0	-	-	-	-
T-Cadinol	-	1.0	14.3	-	-	-	-	-	-	-	-
T-Muurolool	-	-	-	3.3	2.6	-	-	-	-	-	-
α -Bisabolol	75.7	93.6	66.2	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Cadinol	-	-	-	-	-	-	-	6.7	4.7	-	-
β -Eudesmol	-	-	-	2.0	1.4	-	-	-	-	-	-
Cadinadien-8-ol	-	-	4.2	-	-	-	-	-	-	-	-
Selin-11-en-4 α -ol	-	-	-	-	-	-	3.4	5.1	-	-	-
Unidentified oxygenated sesquiterpene	-	-	-	-	-	-	21.9	22.7	-	-	-
α -Humulen-10-ol	-	-	-	47.8	35.9	-	-	-	-	-	-
Jaeschkeanadiol	-	-	-	-	-	-	-	-	15.8	5.9	-
Jaeschkeanadiol benzoate	20.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	96.4	94.6	84.7	77.6	90.0	60.5	81.1	76.5	76.2	99.9	99.7

moderate activity against *T. mentagrophytes* and *M. gypseum* with MIC and MFC values ranging from 32 to 64 $\mu\text{g/ml}$, except in the case of α -bisabolol oxide B whose MFC against *M. gypseum* was 128 $\mu\text{g/ml}$. These values were comparable to the ones exhibited by the total essential oil against the same strains.

Furthermore, the MIC value against *C. lactis-condensi* and the MIC and MFC values against *P. purpurogenum* for the fraction with 50% spathulenol were 32 $\mu\text{g/ml}$.

The MIC and MFC values determined against the other fungi strains assayed ranged between 64 and $>256 \mu\text{g/ml}$, *P. purpurogenum* being the most resistant strain.

3. Conclusion

In conclusion, the composition and antifungal activity of the essential oil from *Ferula hermonis* evidence this species as a potential source of interesting antifungal agents. The exhaustive analysis of the essential oil combined with successive bioguided fractionations afforded different active products among which 3,5-nonadiyne (**1**), α -bisabolol and a fraction with 73% jaeschkeanadiol benzoate were the most active against the dermatophytes *M. gypseum* and *T. mentagrophytes*. Particularly, the fraction with the latter compound showed the strongest activity with MIC and MFC values superior or equivalent to those of the positive controls.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

Silica gel 60 (35–70 μm , SDS, France) was used for preparative column chromatography (CC), Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia Biotech, Sweden) was used for separation and purification on CC and precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates (SDS, France) were used for TLC.

NMR spectra of **1** were recorded in CDCl₃, on a Varian VNMRS 400 MHz spectrometer using tetramethylsilane (TMS) as internal

standard. MS were obtained with Agilent Technologies 5973 and 5975 Inert XL mass spectrometers.

NMR spectra of the essential oil and fractions were recorded on a Bruker AVANCE 400 Fourier Transform spectrometer, equipped with a 5 mm probe, in deuterated chloroform, with all shifts referred to internal TMS.

Sabouraud dextrose agar (Panreac, Spain) and Sabouraud dextrose broth (Adsa, Spain) were used as culture media for the antifungal assays. Sterile paper disks were provided by Difco (diameter: 13 mm, Ref. 1571-33). Nystatin, amphotericin B, ketoconazole and clotrimazole were purchased from Sigma Chemical (USA).

4.2. Plant material

Air-dried rhizome and roots of *Ferula hermonis* Boiss. (Apiaceae) were provided by The Jordanian Pharmaceutical Manufacturing Co. (Naor, Jordan). Voucher specimens were identified and deposited at the Herbarium of the University of Barcelona under No. BCN 51579.

4.3. Isolation of the essential oil

The essential oil was obtained by hydrodistillation of plant material for 3.5 h, using a Clevenger apparatus, according to the standard procedure described in the European Pharmacopeia (Council of Europe, 2007). It was as dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and stored at 4 °C till use.

4.4. Fractionation of the essential oil

Essential oil (3.3 g) of *F. hermonis* were submitted to fractionation by preparative column chromatography of silicagel 60 (60 \times 4.5 cm) eluted with a gradient of hexane-EtOAc from (100:0) to (50:50). Twenty-seven fractions were obtained and submitted to GC-FID, GC-MS and ¹³C NMR analyses as well as to antifungal assays.

4.5. Isolation and identification of 3,5-nonadiyne (1)

Successive (3x) fractionation of 10.1 g of essential oil through silicagel 60 eluting with a gradient of hexane-EtOAc from (100:0) to (50:50), followed by final purification through Sephadex® LH-20 eluted with hexane-CH₂Cl₂ (50:50), afforded 17.8 mg of the unknown compound **1** which represented 4.4% of the total essential oil.

Structure elucidation of **1** was achieved using standard spectroscopic techniques: ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, EI-MS and CI-MS. For complete assignments of ¹H and ¹³C NMR signals, COSY, HMBC and HSQC 2D-NMR methods were applied.

4.6. Isolation of major constituents of active fractions

Essential oil (20 g) of *F. hermonis* were fractionated over silicagel 60 (45 × 8 cm) using hexane-EtOAc from (100:0) to (50:50) as mobile phase affording 28 fractions which were analyzed by GC and GC-MS.

Fractions 12–14 were joined (1.56 g) and submitted to fractionation through silicagel (80 × 1.4 cm) with hexane: EtOAc from (100:0) to (50:50) yielding 748.3 mg of α -bisabolol.

Fractions 15–19 (585.5 mg) were chromatographed over silicagel (100 × 2 cm) with the same gradient as above. Ten fractions were obtained, from which fraction III afforded 8 mg of jaeschkeanadiol angelate (**2**). Fraction V (6.2 mg) was mainly constituted by spathulenol (50.5%) and T-muurolool (29%). Successive fractionation of fractions VI and VII (154 mg) over silicagel eluting with CH₂Cl₂ gave 15.2 mg of α -bisabolol oxide B and a fraction (JB73, 16.2 mg) with 73% of jaeschkeanadiol benzoate, 16% of α -bisabolol oxide B and 10% of eudesmol.

Finally, fraction 21 (420 mg) gave, after successive fractionation over silicagel (70 × 1 cm) using CH₂Cl₂ as mobile phase, 16.7 mg of *trans*-verbenol.

Prior to the GC-FID and GC-MS analyses, as well as to the antifungal assays, all products were submitted to a final purification over Sephadex® LH-20 eluting with hexane.

4.7. GC-FID and GC-MS analysis

The essential oil and its fractions were analysed by GC-FID and GC-MS using two fused silica capillary columns (60 m × 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m film thickness) of different stationary phases: Supelcowax™ 10 and SPB-1™. GC-FID analyses were performed on a Hewlett-Packard 6890 instrument, equipped with a HP ChemStation data processor software, using the following analytical conditions: carrier gas, Helium; flow rate, 1 ml/min; oven temperature programmed from 50 °C (initial isotherm of 8 min) to 120 °C (isotherm of 10 min) and to 230 °C (final isotherm of 17 min) at 4 °C/min; injector temperature, 250 °C; detector temperature, 270 °C; split ratio 1:80. The complexity of the composition of the essential oil, mainly of the sesquiterpene fraction, required a two step oven temperature program in order to achieve a good resolution, avoiding overlapping of the peaks as far as possible. The essential oil was injected undiluted (0.1 μ l). Mass spectra were obtained with a computerized system constituted by a GC Hewlett-Packard 6890 coupled to a mass selective detector Hewlett-Packard 5973N, using the same analytical conditions as above. MS was operated in the EI mode at an ionizing voltage of 70 eV over an *m/z* range from 35 to 400 amu.

4.8. ¹³C NMR analysis of the essential oil and fractions

¹³C NMR spectra of the essential oil or the fractions obtained by column chromatography were recorded with the following parameters: pulse width = 4 μ s (flip angle 45°); acquisition time = 2.7 s

for 128 K data table with a spectral width of 25,000 Hz (250 ppm); CPD mode decoupling; digital resolution = 0.183 Hz/pt. The number of accumulated scans was 3000 for each sample (20–40 mg of the sample depending of the available amount, in 0.5 mL of CDCl₃).

4.9. Identification and quantification

Identification of components was achieved from the data obtained from the analyses of the essential oil and the column chromatography fractions by means of:

- Comparison of their GC linear retention indices (RI) in two stationary phases, determined in relation to a homologous series of *n*-alkanes (8–23 carbons) and a homologous series of fatty acid methyl esters (FAME indices), with those of authentic compounds or literature data.
- Comparison of fragmentation patterns in the mass spectra with those stored in our own library or in the GC-MS mass spectral library.
- Comparison of the signals in the ¹³C NMR spectra of the essential oil and fractions with those of reference spectra compiled in the laboratory spectral library, with the help of a laboratory-made software (Tomi and Casanova, 2006).

Quantification of each compound was performed on the basis of their GC peak areas on the two columns, using the normalisation procedure without corrections for response factor.

4.10. Spectral data of jaeschkeanadiol angelate (2)

¹³C NMR (CDCl₃): δ 15.81 (C-4'), 17.46 (C-13), 18.51 (C-12), 20.12 (C-15, 5'), 26.45 (C-14), 31.61 (C-3), 37.03 (C-11), 40.95, 41.30, 41.52 (C-2,7,10), 43.38 (C-1), 59.94 (C-5), 70.35 (C-6), 86.21 (C-4), 125.20 (C-9), 127.84, 138.93 (C-2',3'), 133.56 (C-8), 168.35 (C-1'). EIMS (GC-MS) 70 eV, *m/z* (rel. int.): 277 [M-C₃H₇]⁺ (26), 220 [M-C₅H₇O₂-H]⁺ (3), 177 [M-C₃H₇-C₅H₇O₂-H]⁺ (99), 159 [M-C₃H₇-C₅H₇O₂-H-H₂O]⁺ (90), 134 (58), 121 (40), 83 [C₅H₇O]⁺ (100), 55 [C₅H₇O-CO]⁺ (62).

4.11. Antifungal activity

The antifungal activity of the essential oil as well as of its fractions and major constituents was assayed against several yeasts and filamentous fungi strains.

4.11.1. Microorganisms, growth conditions, and preparation of fungal inocula

Aspergillus fumigatus CECT 2071, *A. niger* CECT 2574, *Candida albicans* CECT 1394, *C. lactis condensans* CECT 1075, *Microsporium gypseum* CECT 2908, *Penicillium purpurogenum* CECT 20436, *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1324 and *Trichophyton mentagrophytes* CECT 2795 were provided by the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia, Spain. Strains were grown on Sabouraud dextrose agar plates for 24 h at 30 °C. Cell suspensions of yeasts in sterile NaCl 0.9% were adjusted at 0.5 McFarland to obtain approximately 10⁶ CFU/ml. Spore suspensions of dermatophytes were adjusted at 10⁶ CFU/ml by plating 10 μ l of 4- and 5-times serially diluted suspensions and counting germinated spores/dilution.

4.11.2. Paper disk-agar diffusion method

Antimycotic activity the essential oil of *F. hermonis* was first evaluated by the paper disk-agar diffusion method (Barry and Thornberry, 1991). Test plates (diameter: 15 cm) were prepared with Sabouraud dextrose agar medium and inoculated in surface

with a cell suspension in sterile dissolution of 0.9% saline in the case of yeasts, and with a spore suspension in Tanquay buffer in case of filamentous fungi. In both cases, the concentration was adjusted to 10^6 CFU/ml.

Sterile paper disks impregnated with 100 μ l of extract dilutions at concentrations of 50 and 100 mg/ml, as previously reported (Portillo et al., 2001), or with 20 μ l of a solution of 1 mg/ml of amphotericin B or nystatin as standard compounds, were applied over the test plates. The diameters of the growth inhibition zones around each disk were measured after incubation at 30 °C for 48 h. For each extract, 3 replicate trials were conducted against each fungus.

4.11.3. Overlay bioautographic method

A bioautographic agar overlay method was used for the detection of the antifungal activity of the fractions (Rahalison et al., 1991). Developed TLC plates of each fraction on precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates eluted with hexane-EtOAc (6:4) and (9:1) or CH₂Cl₂:MeOH (98:2) were placed over an inoculated Sabouraud dextrose agar medium (test plates dimensions: 12 × 12 cm), during 1 h at 4 °C. After removing TLC, test plates were incubated at 30 °C for 48 h to visualize growth inhibition. Assays were performed against *T. mentagrophythes* and *M. gypseum*.

4.11.4. Minimal inhibitory concentration (MIC)

The MIC was determined by a standard two-fold dilution technique (Murray et al., 1999). Sabouraud dextrose broth was used as medium for yeasts and dermatophytes.

Samples were first dissolved in dimethylformamide (2.56 mg/ml) and the fungistatic activity was determined by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC) from diluted aqueous samples of 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 and 0.125 μ g/ml. All the experiments were performed in triplicate and the results expressed as mean values. Nystatin, amphotericin B, ketoconazole and clotrimazole were included (at an initial concentration of 0.8 mg/ml) as positive antifungal controls.

4.11.5. Minimal fungicidal concentration (MFC)

The MFC was established technically by extending the MIC (microdilution method) (Balues et al., 1991). Mixtures of the fungus with samples which in MIC studies showed no visible growth in the last three wells after 48 h of incubation were subcultured onto Sabouraud dextrose agar medium plates using an inoculum of 0.01 ml. Plates were incubated at 37 °C for 48 h. The MFC was regarded as the lowest concentration that prevented the growth of any fungal colony on the solid medium.

Acknowledgements

Authors are grateful to AA Badwan (The Jordanian Pharmaceutical Manufacturing Co., Naor, Jordan) and TS El-Thaher (ARAGEN Biotechnology, Naor, Jordan) for providing plant material, and to Prof. M. Bou Dagher Kharrat (Département Sciences de la Vie et de la Terre, Université Saint Joseph, Beyrouth, Lebanon) for the botanical identification. Thanks are also due to the Fundación María Francisca de Roviralta (Barcelona, Spain) for financial support.

References

Abad, M.J., Ansuategui, M., Bermejo, P., 2007. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc* 7, 116–145.
Al-Nahar, H.A., Ismaeil, A., Bishr, M.M., Gaafar, M.M., Abbass, A.A., 2006. GC–MS analysis and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula harmoni* L. (Zaloo). *J. Pharm. Sci.* 20, 17–19.

Al-Shae'r, M., Darwish, R.M., Aburjai, T., 2001. Antimicrobial sesquiterpene from the roots of *Ferula harmonis*. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti* 12, 255–264.
Al-Yahya, M.A., Muhammad, I., Mirza, H.H., El-Ferally, F.S., 1998. Antibacterial constituents from rhizomes of *Ferula communis*. *Phytother. Res.* 12, 335–339.
Aqil, F., Zahin, M., Ahmad, I., Owais, M., Khan, M.S.A., Bansal, S.S., Farooq, S., 2010. Antifungal activity of medicinal plant extracts and phytochemicals: a review. In: Ahmal, I., Owais, M., Shahid, M., Aqil, F. (Eds.), *Combating fungal infections. Problems and remedy* (Chapter 19). Springer, Heidelberg, pp. 449–484.
Auzi, A.A., Gray, A.I., Salem, M.M., Badwan, A.A., Sarker, S.D., 2008. Feruhermonins A–C: three daucane esters from the seeds of *Ferula hermonis* (Apiaceae). *J. Asian Nat. Prod. Res.* 10, 701–707.
Balues, A., Hausler, W., Hevmann, L.K., Iyenbery, H.D., Shadomy, H.J., 1991. *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, DC.
Barry, A.L., Thornsberry, C., 1991. Susceptibility test: diffusion test procedures. In: Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 1526–1542.
Bastert, J., Schaller, M., Korting, H.C., Evans, E.G.V., 2001. Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17, 81–91.
Cos, P., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.* 106, 290–302.
Council of Europe, 2007. *European Pharmacopoeia*, vol. 1, 6th ed. Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe, Strasbourg, pp. 251–252.
Dev, V., Oka, M., Mathela, C.S., Murari, N.D., Stevens, T.H., 1984. The volatile constituents of the roots of *Selinum tenuifolium*. *J. Nat. Prod.* 47, 904–905.
Diab, Y., Dolmazon, R., Bessière, J.M., 2001a. Daucane aryl esters composition from the Lebanese *Ferula hermonis* Boiss (Zaloo root). *Flav. Fragr. J.* 16, 120–122.
Diab, Y., Dolmazon, R., Fenet, B., 2001b. 2,3-Epoxyjaeschkeanadiol 5-benzoate from *Ferula hermonis* Boiss. *Flav. Fragr. J.* 16, 397–400.
Dokovic, D.D., Bulatovic, V.M., Bozic, B.D., Kataranovski, M.V., Zrakic, T.M., Kovacevic, N.N., 2004. 3, 5-Nonadiyne isolated from the rhizome of *Cachrys ferulacea* inhibits endogenous nitric oxide release by rat peritoneal macrophages. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 853–854.
El-Taiber, T.S., Mtalka, K.Z., Taha, H.A., Badwan, A.A., 2001. *Ferula hermonis* "Zaloo" and enhancing erectile function in rats: efficacy and toxicity study. *Int. J. Impot. Res.* 13, 247–251.
Freixa, B., Vila, R., Ferro, E.A., Adzet, T., Cañigueral, S., 2001. Antifungal principles from *Piper fulvescens*. *Planta Med.* 67, 873–875.
Galal, A., 2000. Sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Pharmazie* 55, 961–962.
Galal, A.M., Abourashed, E.A., Ross, S.A., ElSohly, M.A., Al-Said, M.S., El-Ferally, F.S., 2001. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *J. Nat. Prod.* 64, 399–400.
Gamal-Eldeen, A., Hegazy, M.-E.F., 2010. A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Nat. Prod. Res.* 24, 246–257.
Goryaev, M.I., Sharipova, F.S., Tikhonova, L.K., El'chibekova, L.A., 1971. Substances present in essential oils. LIII. Comparative study of the chemical composition of essential oils of the above ground and root parts of *Ferula peminervis* plants. *Izvest. Akad. Nauk Kazak. SSR Ser. Khim.* 21, 49–53.
Hilan, C., Sfeir, R., El Hage, R., Jawich, D., Frem, M.F., Jawhar, K., 2007. Evaluation of the antibacterial activities of *Ferula hermonis* (Boiss.). *Lebanese Sci. J.* 8, 135–151.
Ikeda, K., Arai, Y., Otsuka, H., Nomoto, S., Horiguchi, H., Kato, S., Kayama, F., 2002. Terpenoids found in the Umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER and ER: differential transcription activity between ferutinin-liganded ER and ER. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 354–360.
Iranshahi, M., Amin, G., Sourmaghi, M.S., Shafiee, A., Hadjiakhoondi, A., 2006. Sulphur-containing compounds in the essential oil of the root of *Ferula persica* Willd. *Var. persica*. *Flavour Fragr. J.* 21, 260–261.
Karim, A., Ashraf, M., Bhatti, M.K., 1979. Studies of the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part XXVI. *Ferula oopoda* Boiss Buhse, oil from seeds, stalks and roots. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* 22, 198–201.
Lev, E., Amar, Z., 2002. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* 82, 131–145.
Lhuillier, A., Fabre, N., Cheble, E., Oueida, F., Maurel, S., Valentin, A., Fourasté, L., Moullis, C., 2005. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *J. Nat. Prod.* 68, 468–471.
Maggi, F., Lucarini, D., Tirillini, B., Sagratini, G., Papa, F., Vittori, S., 2009. Chemical analysis of the essential oil of *Ferula glauca* L. (Apiaceae) growing in Marche (central Italy). *(Biochem. Syst. Ecol.* 37, 432–441.
Mathew, B.P., Nath, M., 2009. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem* 4, 310–323.
Miski, M., Ulubelen, A., Mabry, T.J., 1983. Six sesquiterpene alcohol esters from *Ferula elaeochoyris*. *Phytochemistry* 22, 2231–2233.
Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H., 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, seventh ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, DC.
Pfaller, M.A., Diekema, D.J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133–163.

- Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., Cañigüeral, S., 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 76, 93–98.
- Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Ferro, E., Parella, T., Casanova, J., Cañigüeral, S., 2005. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. *J. Ethnopharmacol.* 97, 49–52.
- Pimenov, M.G., Leonov, M.V., 1993. The genera of the Umbelliferae. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pyun, M.S., Shin, S., 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Tricophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13, 394–400.
- Rahalison, L., Hamburger, M., Hostettmann, K., Monod, M., Frenk, E., 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Anal.* 2, 199–203.
- Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15, 635–638.
- Rustaiyan, A., Monfared, A., Masoudi, S., Ameri, N., 2002. Essential oils of the stem and root of *Ferula galbaniflua* Boiss. et Busse. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 14, 286–287.
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S.A., Gupta, M., 2010. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *J. Ethnopharmacol.* 127, 137–158.
- Thevissen, K., Kristensen, H.H., Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., François, I.E.J.A., 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discovery Today* 12, 966–971.
- Tomi, F., Casanova, J., 2006. ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae: a review. *Acta Hort.* 723, 185–192.
- Zanoli, P., Rivasi, M., Zavatti, M., Brusiani, F., Vezzalini, F., Baraldi, M., 2005. Activity of single components of *Ferula hermonis* on male rat sexual behavior. *Int. J. Impot. Res.* 17, 513–518.
- Zavatti, M., Montanari, C., Zanoli, P., 2006. Role of ferutin in the impairment of female sexual function induced by *Ferula hermonis*. *Physiol. Behav.* 89, 656–661.

5.2.2. Índices físicos

a) Densidad relativa

La media de la densidad relativa determinada ha sido: $0,866 \pm 0,001$.

b) Índice de refracción

El índice de refracción medido para el aceite esencial ha sido: $1,490 \pm 0,007$.

c) Rotación óptica

La rotación óptica ha sido: $+32,40 \pm 1,39$.

5.2.3. Fraccionamiento del aceite esencial y caracterización de los principios activos

El análisis preliminar del aceite esencial de la raíz y rizoma de *F. hermonis* por GC-FID y GC-MS muestra un perfil complejo (figura 5.1.) con abundancia de picos correspondientes a sesquiterpenos, en especial oxigenados, en el último tercio del cromatograma.

Por este motivo, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el *screening* de actividad antifúngica, se ha realizado un fraccionamiento biodirigido del aceite esencial con dos objetivos principales:

- Profundizar en la identificación de sus constituyentes a partir de los análisis GC-FID, GC-MS y ^{13}C -RMN de las fracciones obtenidas.
- Caracterizar las fracciones y/o compuestos responsables de la actividad.

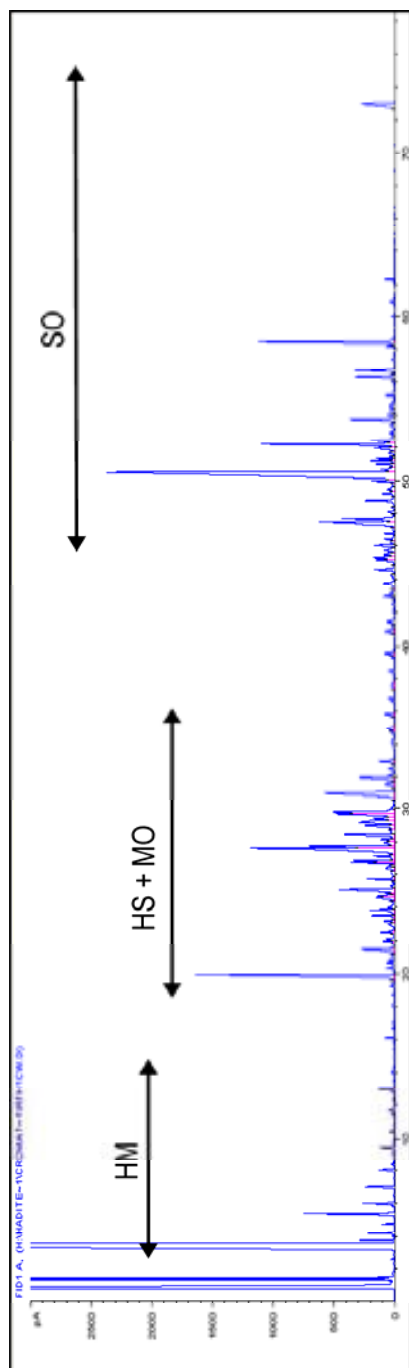


Figura 5. 1. Perfil cromatográfico (GC-FID; columna: Supelcowax™ 10) del aceite esencial de *F. hermonis* .

HM: Hidrocarburos monoterpénicos, **HS:** hidrocarburos sesquiterpénicos, **MO:** Monoterpenos oxigenados y **SO:** Sesquiterpenos oxigenados

En resumen, a partir de 3,3 g de aceite esencial sometidos a cromatografía en columna clásica de silicagel eluyendo con un gradiente de hexano:AcOEt (100:0) → (50:50) se han obtenido 27 fracciones (figura 5.2.). El análisis exhaustivo de las mismas, así como del aceite esencial total, por GC-FID, GC-MS y ¹³C-RMN ha permitido identificar 79 componentes que corresponden a más del 90% del total de la esencia. De ellos, 55 (36.1%) son sesquiterpenos y únicamente 21 (51,9%) son monoterpenos. El componente mayoritario es el α -pineno (43,3%), seguido de α -bisabolol (11,1%), compuesto **1** (4,4%) y β -farneseno (3,2%) (véase apartado 5.2.1).

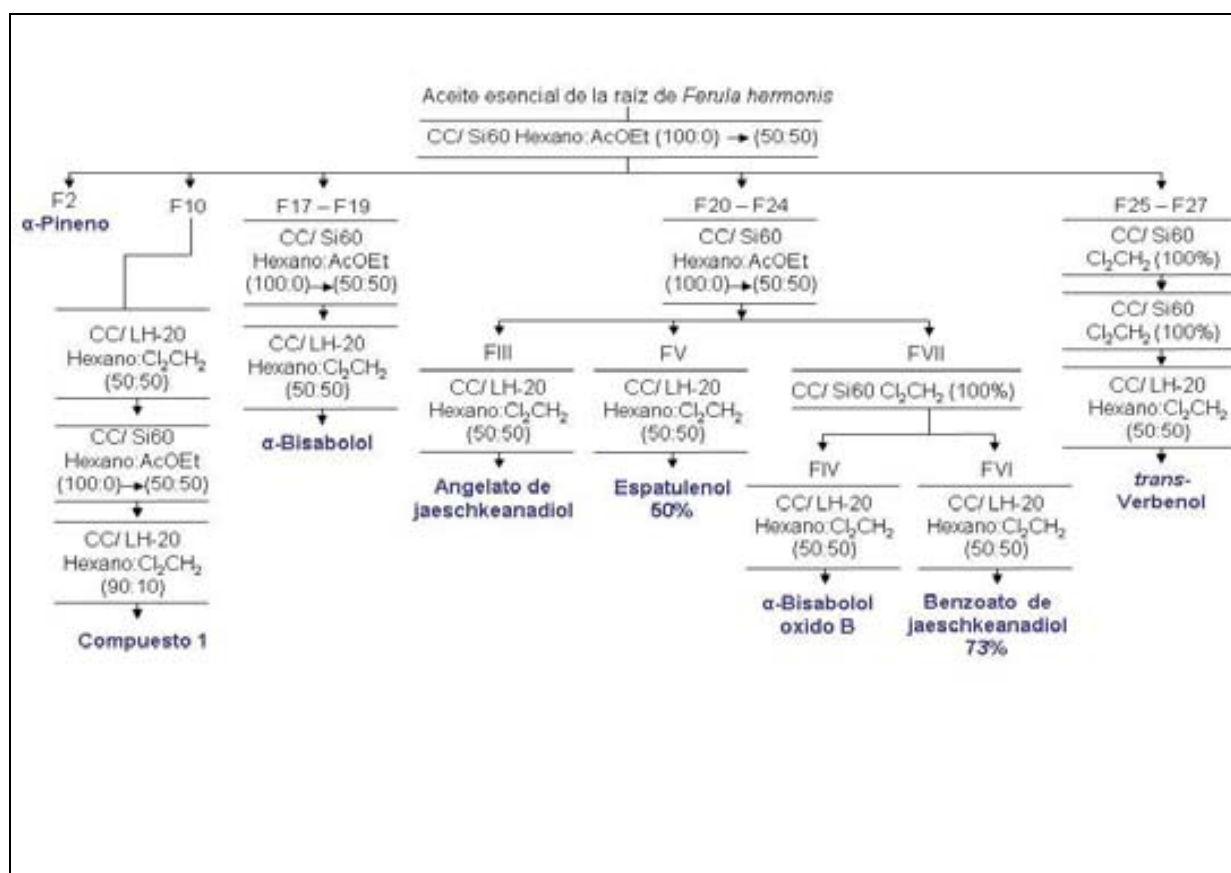


Figura 5. 2. Fraccionamiento del aceite esencial de *F. hermonis*.

Aislamiento e identificación del compuesto 1 AE

Uno de los constituyentes del aceite esencial, compuesto **1 AE** (4,4%), que resultó ser el componente mayoritario de la fracción 10, no pudo ser identificado a partir de sus índices de retención, espectro de masas y de ^{13}C -RMN. Por ello, ha sido necesario efectuar un nuevo fraccionamiento de la esencia (figura 5.3.) con el fin de aislarlo y elucidar su estructura.

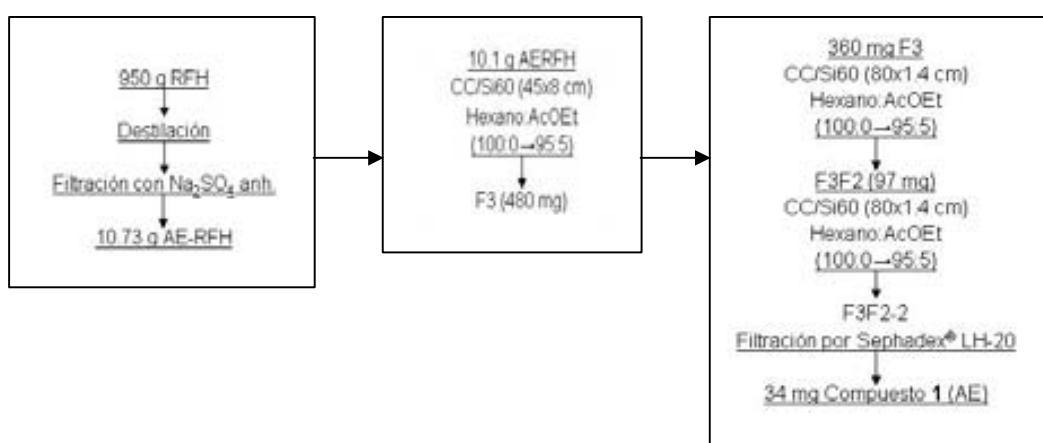


Figura 5. 3. Aislamiento del compuesto 1 AE

La estructura de **1 AE** (figura 5.4.) ha podido ser establecida a partir de sus espectros de EI-MS (figura 5.5.), ^1H -RMN (figuras 5.6. y 5.7.), ^{13}C -RMN (figuras 5.8. y 5.9.), DEPT (figura 5.10.), COSY H,H (figura 5.11.), HSQC (figura 5.12.), HMBC (figura 5.13.), siendo identificada como el 3,5-nonadiino. En la tabla 5.3. se muestran los datos de RMN del compuesto 1 AE y los descritos en la bibliografía para el 3,5-nonadiino.

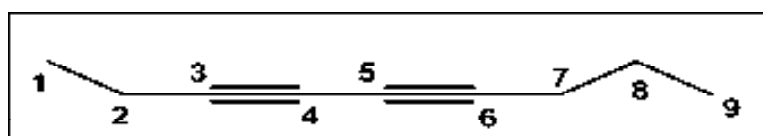


Figura 5. 4. Estructura química del 3,5-nonadiino.

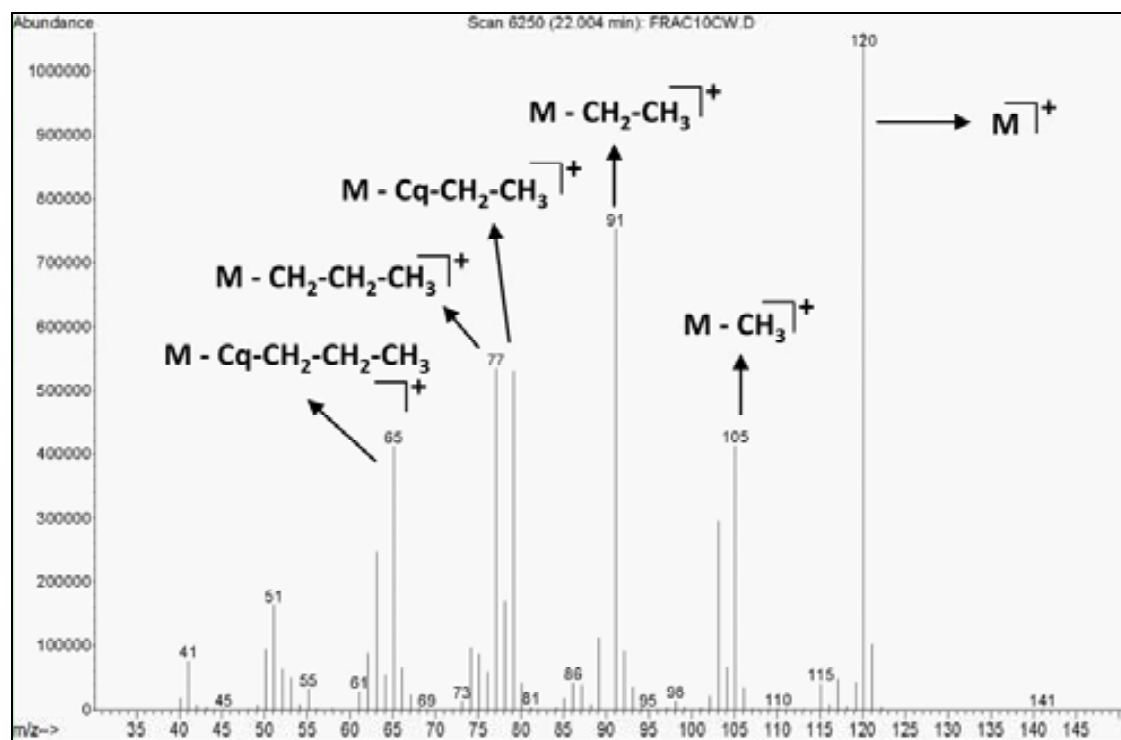


Figura 5.5. Espectro de EI-MS del compuesto 1 AE.

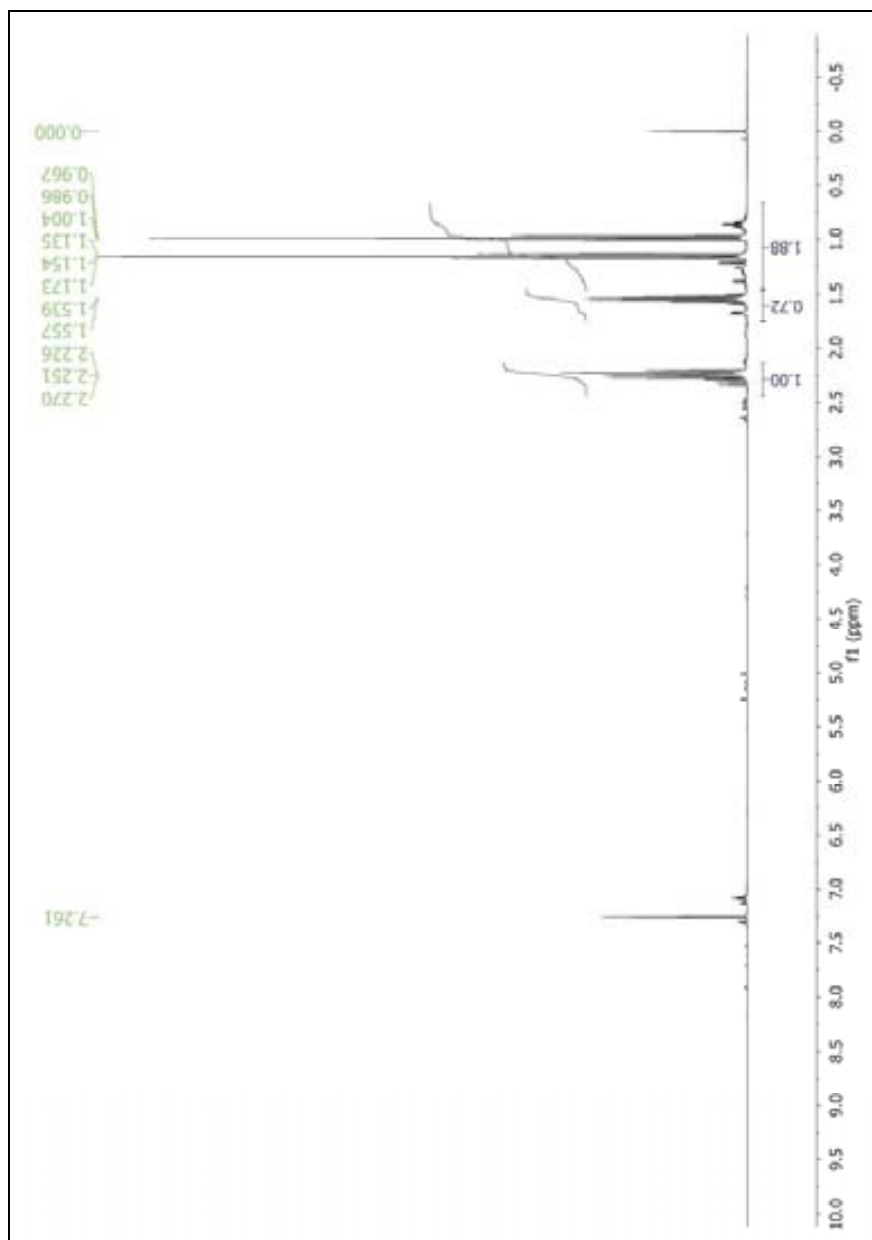


Figura 5.6. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 1 AE

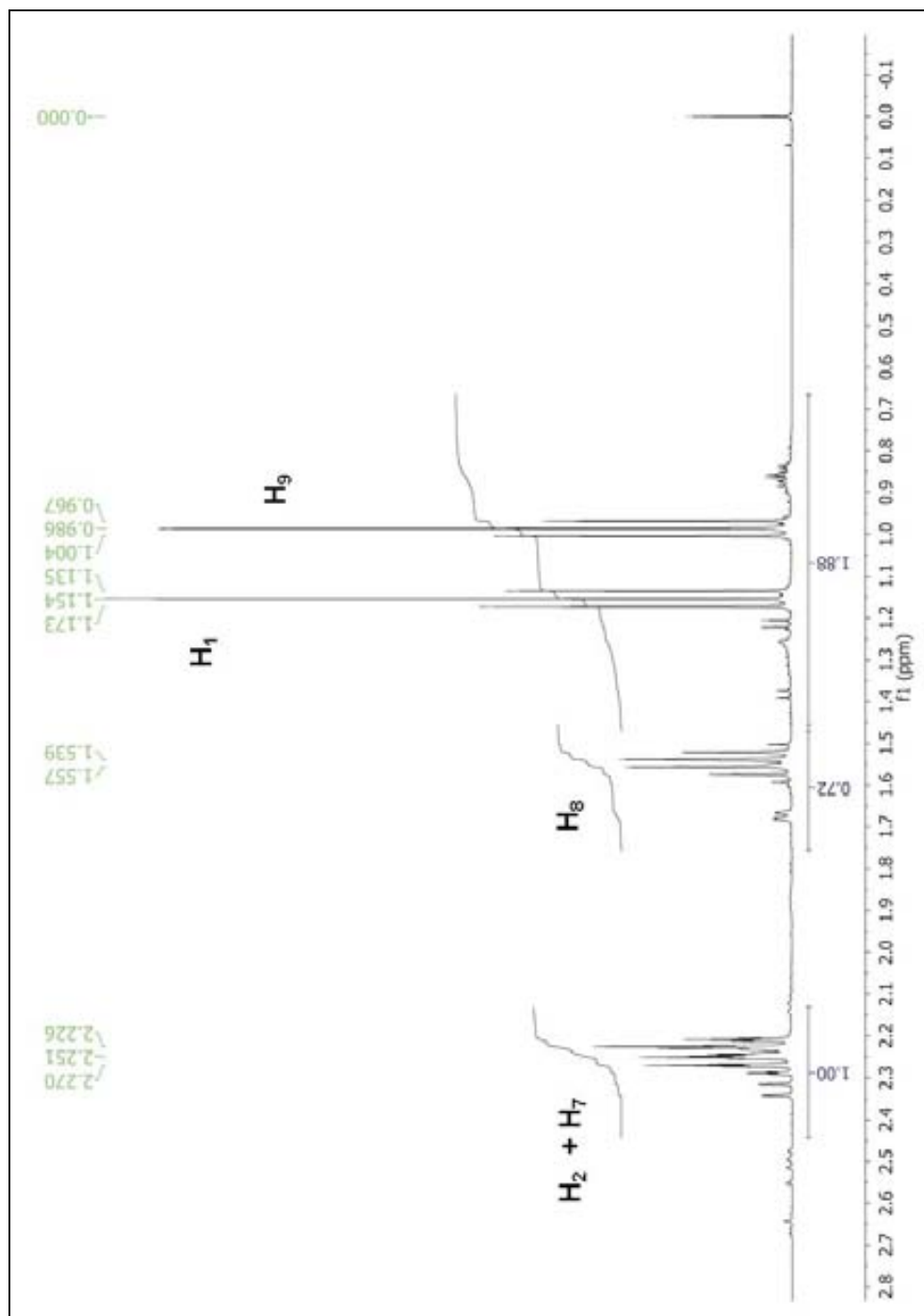


Figura 5.7. Espectro de ^1H -RMN (400 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 1 AE. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0 a 3,0 ppm.

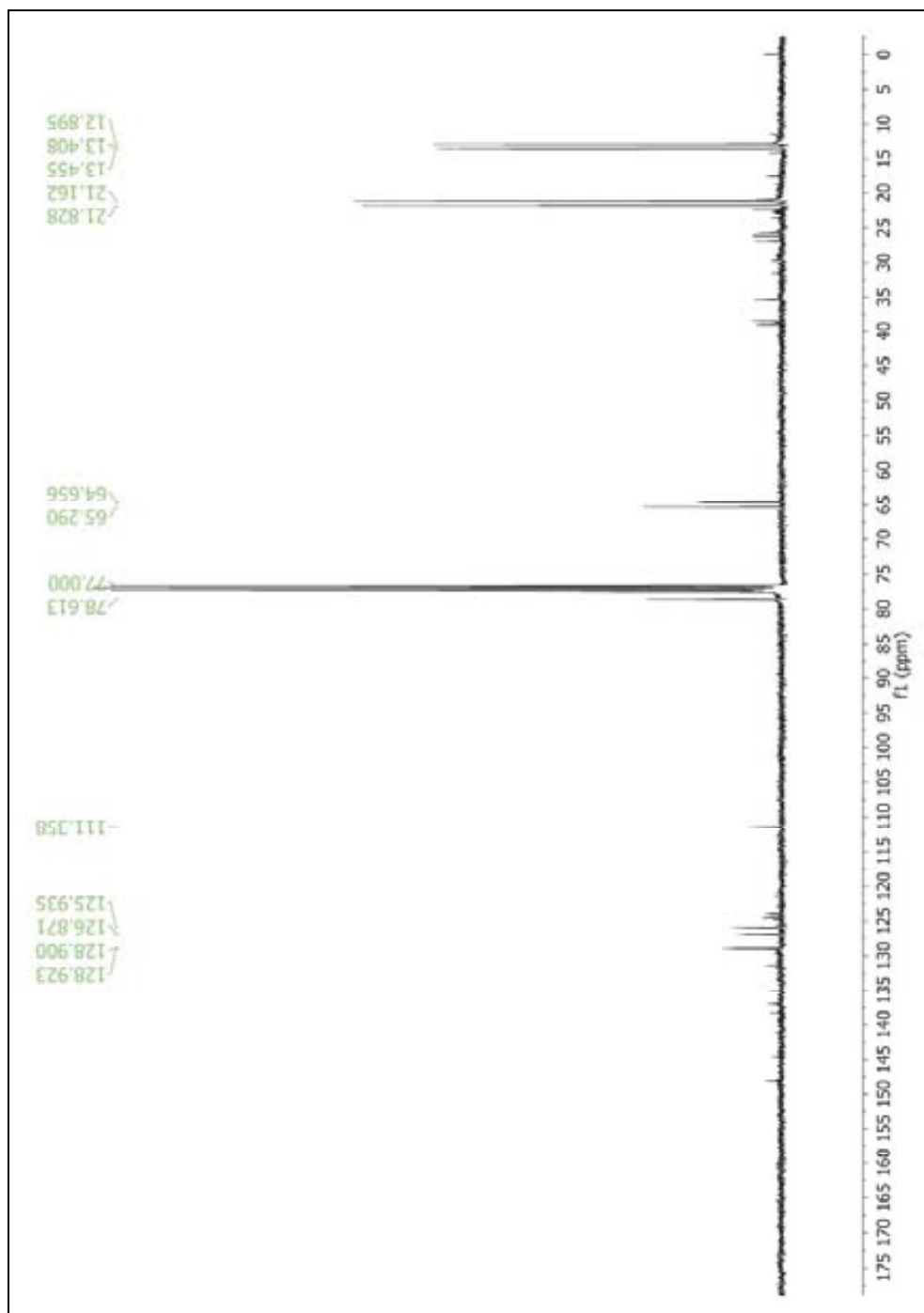


Figura 5.8. Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz, CHCl_3 -d, 25 °C) del compuesto 1 AE.

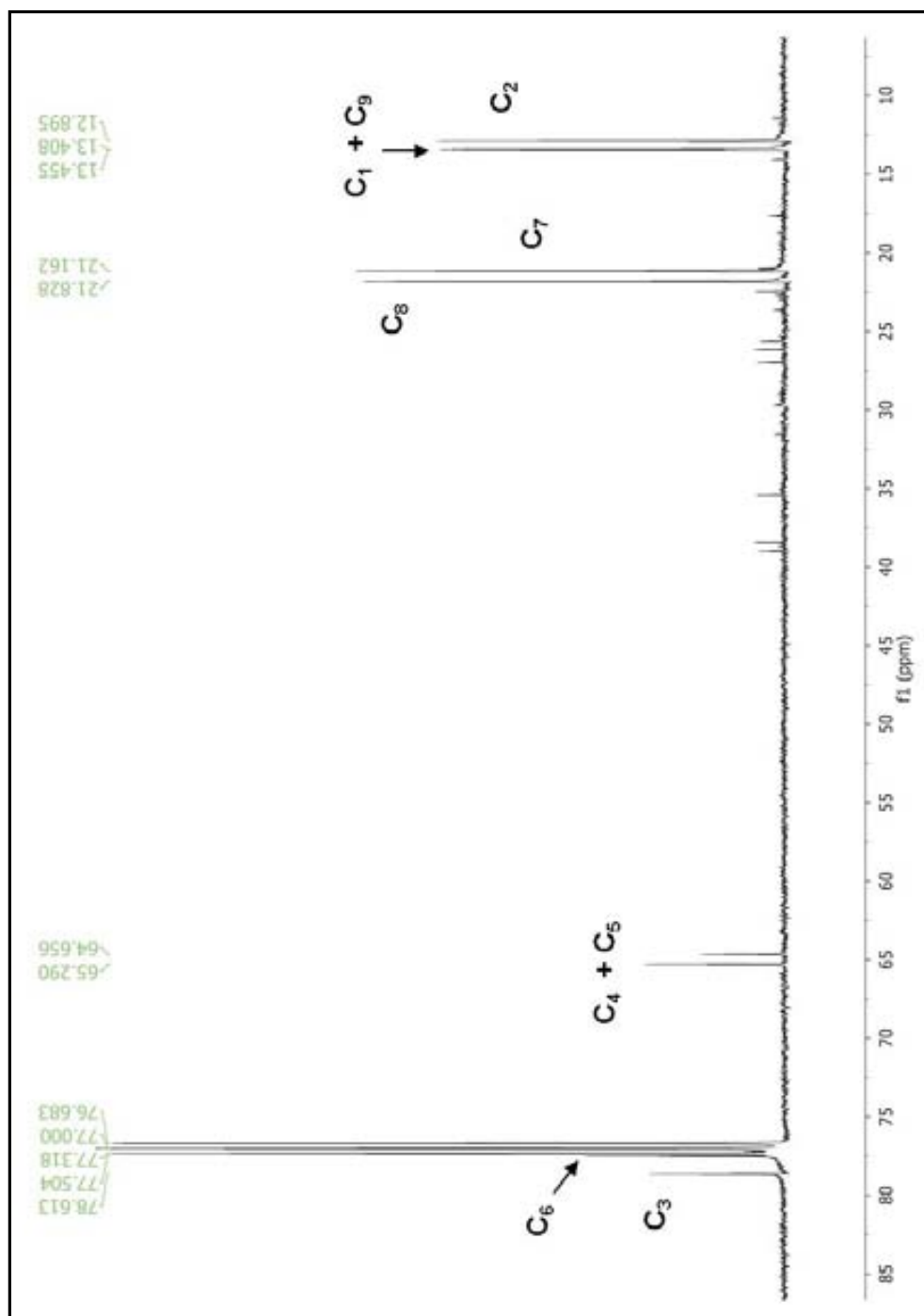


Figura 5.9. Espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 1 AE. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0 a 90,0 ppm.

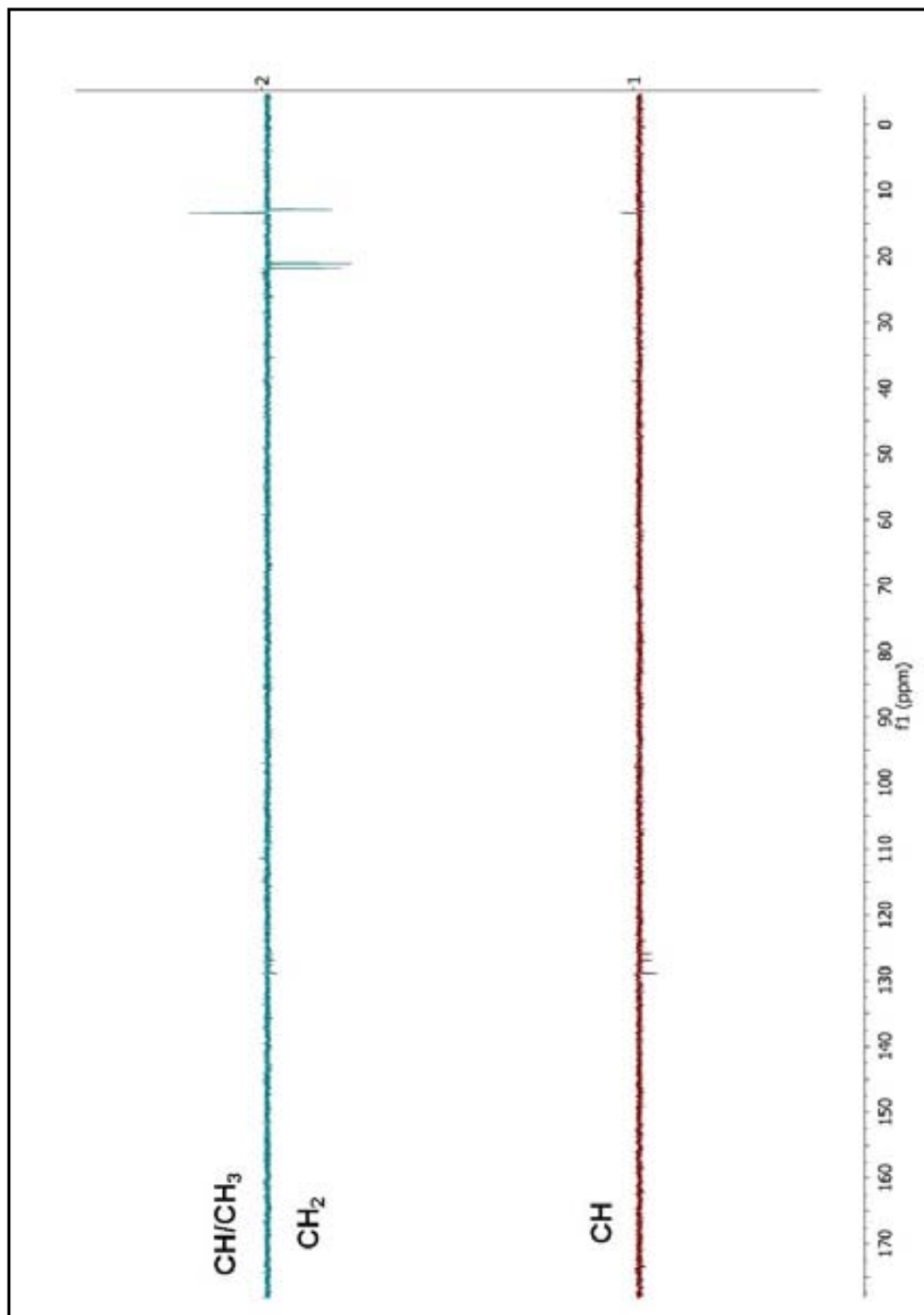


Figura 5.10. Espectro de DEPT (400 MHz, CHCl₃-d, 25 °C) del compuesto 1 AE

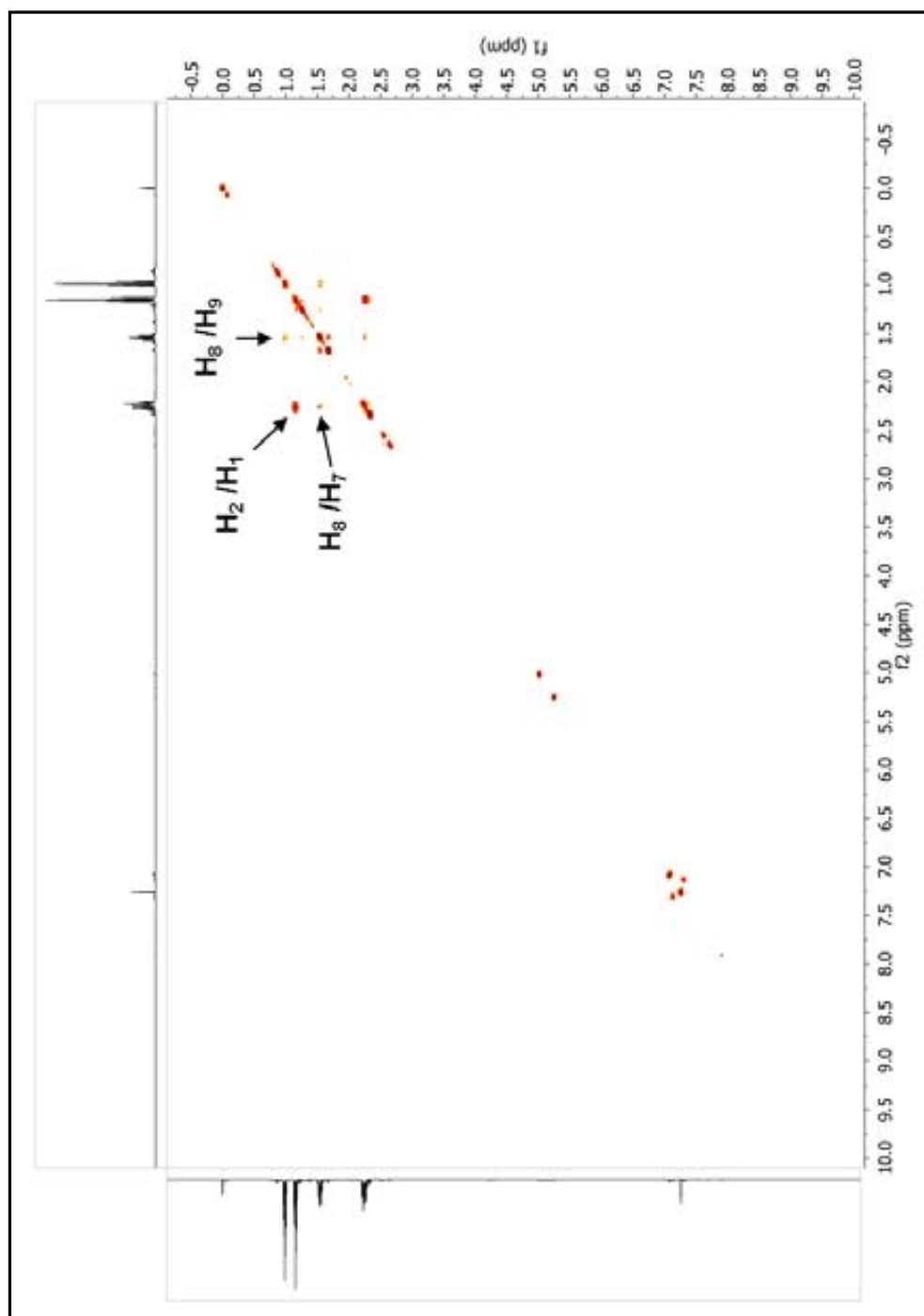


Figura 5.11. Espectro de COSY (400 MHz, CHCl₃-d, 25 °C) del compuesto 1 AE

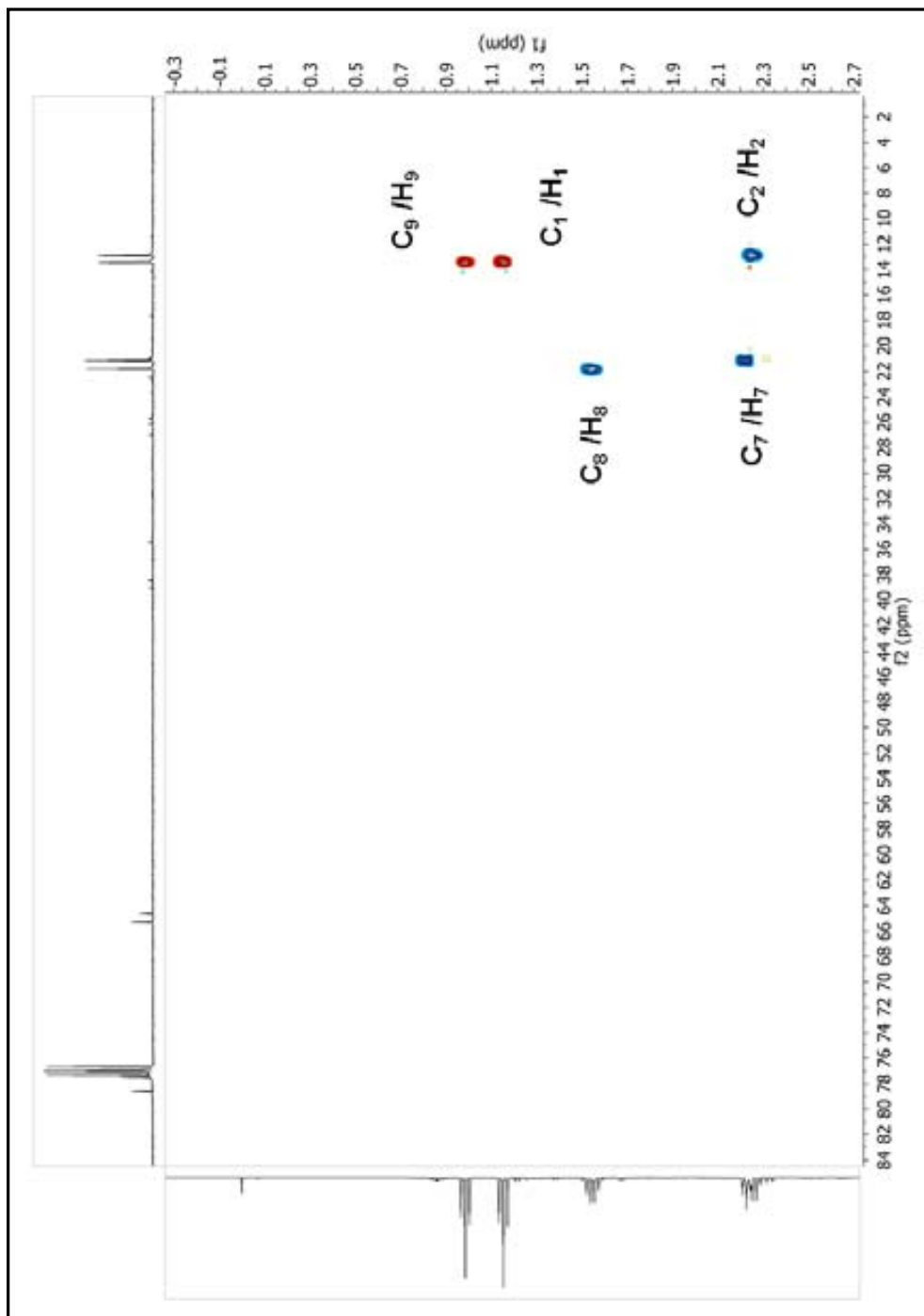


Figura 5.12. Espectro de HSQC (400 MHz, CHCl₃-d, 25 °C) del compuesto 1 AE. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0 a 3,0 ppm y de 0 a 90,0 ppm.

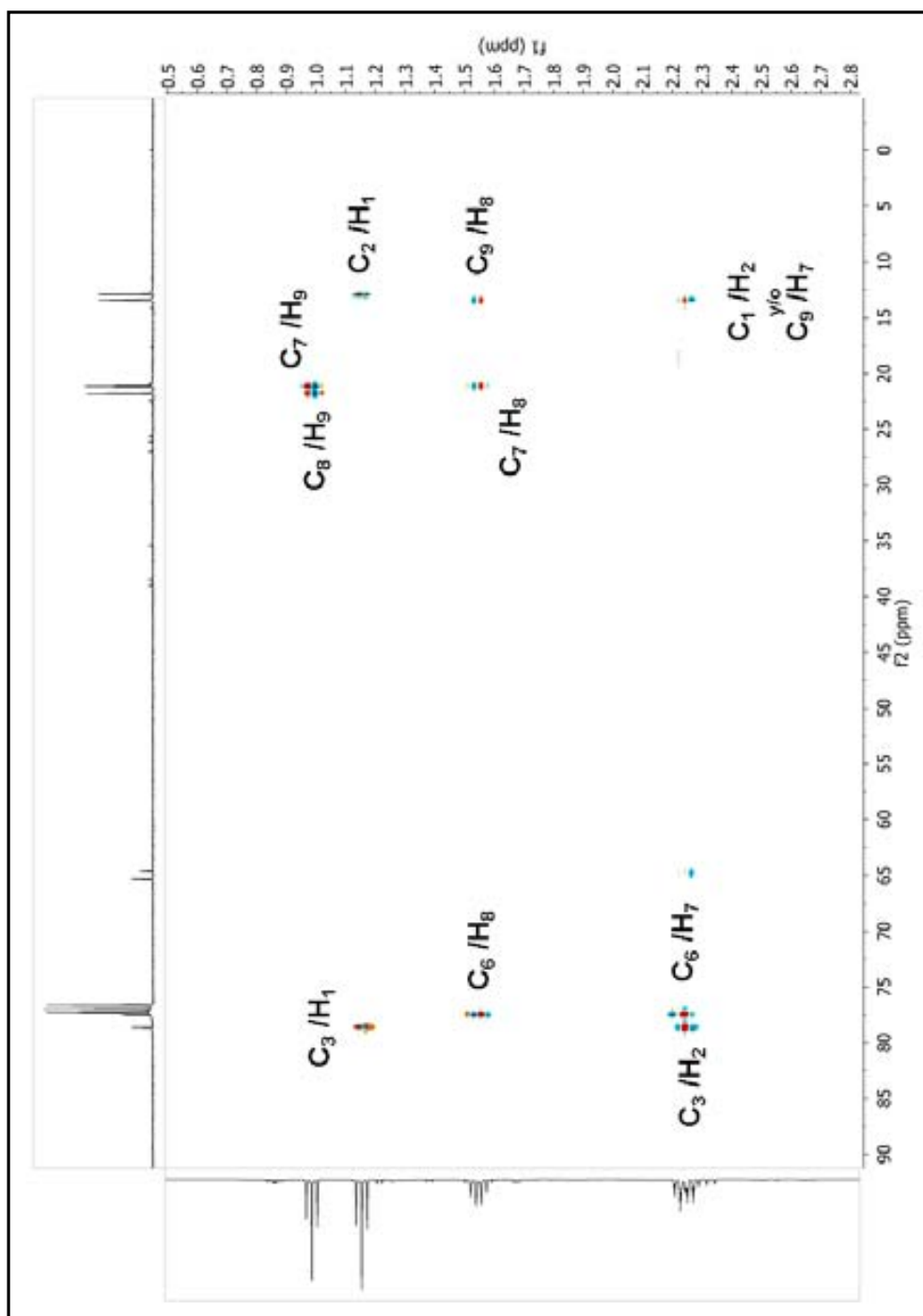


Figura 5.13. Espectro de HMBC (400 MHz, $CHCl_3$ -d, 25 °C) del compuesto 1 AE. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0 a 3,0 ppm y de 0 a 90,0 ppm.

Compuesto 1AE				3,5-Nonadiino		
Nº	¹³ C δ	DEPT	¹ H δ (mult., int., J (Hz))	nº	¹³ C δ	¹ H δ (mult., int., J (Hz))
3	78,61	Cq	-	6	78,33	-
6	77,50	Cq	-	3	77,26	-
4 ó 5	65,29	Cq	-	4 ó 5	65,3	-
4 ó 5	64,65	Cq	-	5 ó 4	64,6	-
8	21,82	CH ₂	1,55 (sext, 2H, J=7,3 Hz)	7 ó 2	21,8	2,23 (tt, 2H, J ₁ =7,3, J ₂ =1,1 Hz)
7	21,16	CH ₂	2,20 – 2,35 (m, 4H)	2 ó 7	21,0	2,26 (tq, 2H, J ₁ =7,4, J ₂ =1,1 Hz)
1	13,45	CH ₃	1,15 (t, 3H, J=7,6 Hz)	9	13,3	1,15 (t, 3H, J=7,4 Hz)
9	13,41	CH ₃	0,99 (t, 3H, J=7,4 Hz)	1	13,3	0,99 (t, 3H, J=7,3 Hz)
2	12,89	CH ₂	2,20 – 2,35 (m, 4H)	8	12,8	1,55 (sx, 2H, J=7,3 Hz)

Tabla 5. 3. Datos espectrales en RMN (¹H 400 MHz, ¹³C 400 MHz, CHCl₃-d, 25°C, δ en ppm) del compuesto **1 AE** y del 3,5-nonadiino (Dokovic *et al* 2004)

El 3,5-nonadiino es un compuesto acetilénico poco usual que sólo ha sido descrito dos veces en la naturaleza, en los aceites esenciales de las raíces de dos Apiáceas: *Selinum tenuifolium* (Dev et al., 1984) y *Cachrys ferulacea* (Dokovic et al., 2004), en los cuales llega a alcanzar porcentajes superiores al 80% del total de la esencia. Se trata de un inhibidor selectivo de la liberación de óxido nítrico en macrófagos peritoneales de rata, a dosis que no inhiben la proliferación de las células T. Esta actividad ha sido relacionada con su marcado carácter lipófilo (Dokovic et al., 2004).

Estudio de la actividad de las fracciones por bioautografía y caracterización de los compuestos activos

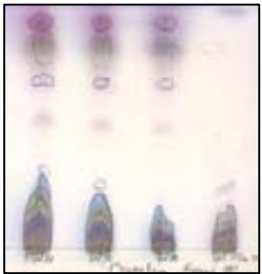
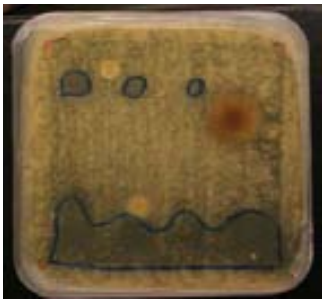
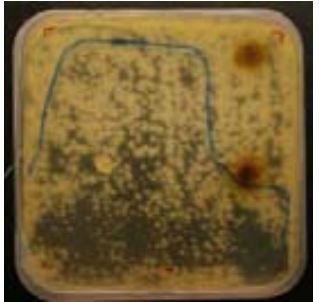
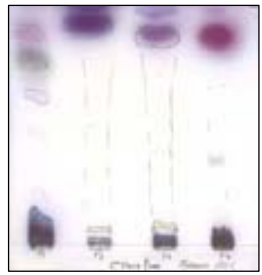



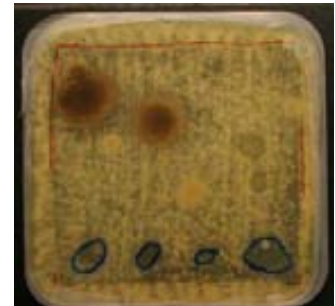

El ensayo de bioautografía de las 27 fracciones frente a los hongos *T. mentagrophytes* y *M. gypseum* evidenció zonas de inhibición del crecimiento en el caso de la fracción 2, de la fracción 10 y de las fracciones 17 a la 27.

En la figura 5.14. se muestran las imágenes de los resultados obtenidos. En ella aparecen en el extremo izquierdo las placas de cromatografía en capa fina reveladas con el reactivo de Godine y a su derecha, en la misma fila, las correspondientes bioautografías frente a *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*. En estas últimas, las zonas de inhibición de crecimiento fúngico que se apreciaron a las 48 h de incubación aparecen marcadas con rotulador. Cabe señalar que las fotografías se tomaron a las 144 h, observándose que, a pesar del tiempo transcurrido, en la mayoría de las placas la actividad antimicótica se mantiene en mayor o menor grado.

En la fracción 2 la actividad se encuentra directamente relacionada con el α -pineno que es el componente mayoritario del aceite esencial, en tanto que el 3,5-nonadiino (**1 AE**) resultó ser el principal constituyente activo de la fracción 10.

La tabla 3 del artículo (véase apartado 5.2.1) muestra los componentes mayoritarios de las fracciones activas 17 a 27, identificados a partir de su análisis por GC-FID, GC-MS y ^{13}C -RMN. Con el objetivo de aislarlos y poder ensayar su actividad antifúngica, se ha efectuado un nuevo fraccionamiento del aceite esencial de la raíz de *F. hermonis*. En esta ocasión, se ha partido de 20 g de esencia, los cuales tras sucesivos fraccionamientos han permitido aislar α -bisabolol (748,3 mg), angelato de jaeschkeanadiol (8 mg), óxido de α -bisabolol B (15,2 mg), *trans*-verbenol (16.7 mg) y dos fracciones purificadas, una de ellas con 73% de benzoato de jaeschkeanadiol (JB73; 16,2 mg) y otra con un 50% de espatulenol (6,2 mg) (ver figura 5.2.). La actividad antifúngica de todos los compuestos aislados y fracciones purificadas se ha caracterizado a partir de la determinación de los valores de CMI y CMF frente a

diferentes cepas de hongos, entre los cuales se incluyen tanto levaduras como hongos filamentosos y dermatofitos.

No.	CCF	Bioautografía <i>T.m.</i>	Bioautografía <i>M.g.</i>
1			
2			
3			

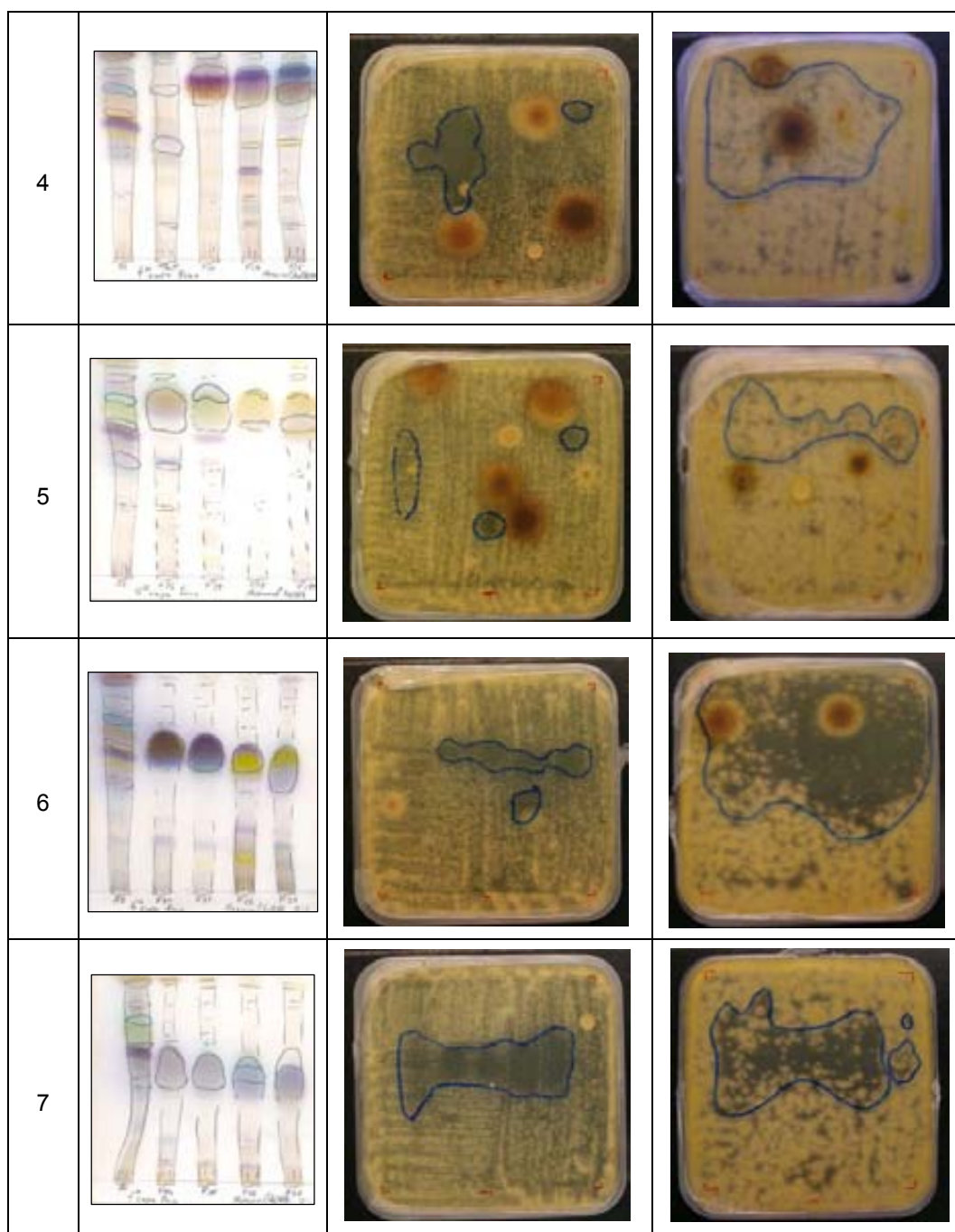


Figura 5. 14. Bioautografías de AE-RFH y sus fracciones (F2-F27) frente a *Trichophyton mentagrophytes* (*Tm*) y *Mycosporum gypseum* (*Mg*).

CCF 1: 3 μ L, 2 μ L, 1 μ L de AE-RFH y 1 μ L α -pineno. **CCF 2:** 1 μ L de AE-RFH, F2, F3 y F4. **CCF 3:** 1 μ L de AE-RFH, F8, F10-1 y F10-2. **CCF 4:** 1 μ L de AE-RFH, α -pineno, F13, F14 y F15. **CCF 5:** 1 μ L de AE-RFH, F16, F17, F18, F19. **CCF 6:** 1 μ L de AE-RFH, F20, F21, F22, F23. **CCF 7:** 1 μ L de AE-RFH, F24, F25, F26, F27. Fase móvil CCF 1 y 2: Hexano 100%; CCF 3 a 7: Hexano:AcOEt (8:2). Revelado: Reactivo Godine.

Los resultados y discusión se muestran en el apartado 5.2.1. En resumen, los productos más activos son JB73, 3,5-nonadiino y α -bisabolol. La actividad más potente corresponde a JB73 frente a *T. mentagrophytes*, con CMI y CMF de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, equivalentes a las del ketoconazol e inferiores a las de la anfotericina B (0,5 $\mu\text{g/mL}$) y nistatina (2 $\mu\text{g/mL}$). Por el contrario, la actividad de JB73 frente a *M. gypseum* es menor, con valores de CMI y CMF de 64 y 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ambos dermatofitos son altamente sensibles al 3,5-nonadiino, cuyas CMI y CMF para *T. mentagrophytes* son de 8 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en el caso de *M. gypseum* el valor de la CMF fue el doble que el de la CMI (16 y 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). El α -bisabolol, por su parte, muestra actividad fungicida y fungistática frente a las dos cepas de dermatofitos entre 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$.

Entre los otros productos activos, sobresale la fracción con 50% de espatulenol cuyas CMI frente a *C. lactis-condensi* y CMI y CMF frente a *P. purpurogenum* son de 32 $\mu\text{g/mL}$.

Es la primera vez que se describe actividad antifúngica para el 3,5-nonadiino, el benzoato de jaeshkeanadiol y el angelato de jaeschkeanadiol.

5.3. Investigación de los extractos hexánico y diclorometánico

Los resultados obtenidos en la investigación de los extractos activos hexánico y diclorometánico han sido publicados en “*Antifungal compounds from the rhizome and roots of Ferula hermonis*” en la revista *Phytotherapy Research*, artículo que se adjunta en el apartado 5.3.1. En el apartado 5.3.2 se incluye información adicional sobre el fraccionamiento de los extractos y la elucidación de la estructura de los compuestos activos.

5.3.1. Compuestos antifúngicos de los extractos

Resumen: La actividad antifúngica de los extractos hexánico, diclorometánico, metanólico y acuoso de las raíces y rizoma de *Ferula hermonis* Boiss. se ha ensayado *in vitro* mediante el método del antifungigrama frente a un panel de hongos oportunistas patógenos humanos. Entre ellos, los extractos hexánico y diclorometánico han mostrado la mayor actividad, en particular, frente a los dermatofitos *Microsporum gypseum* y *Tricophyton mentagrophytes*, así como frente a la levadura *Candida lactis-condensi*. El fraccionamiento biodirigido de ambos extractos, utilizando el método de la bioautografía, ha conducido al aislamiento de dos compuestos con actividad antifúngica que han sido identificados como p-hidroxibenzoato de jaeschkeanadiol (ferutinina) y benzoato de jaeschkeanadiol (teferidina), dos ésteres sesquiterpénicos derivados del daucano. La determinación de los valores de CMI y CMF de ambos compuestos ha evidenciado una actividad antifúngica más potente para la ferutinina que para la teferidina. Particularmente, *T. mentagrophytes* ha resultado ser la cepa más sensible con valores de CMI y CMF comprendidos entre 8 y 256 µg/mL.

Antifungal Compounds from the Rhizome and Roots of *Ferula hermonis*

Abdel-Hadi Al-Ja'fari,^{1,2} Roser Vila,¹ Blanca Freixa,¹ Joan Costa² and Salvador Cañigueral^{1*}

¹Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, ES-08028 Barcelona, Spain

²Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Unitat Docent Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, ES-08916 Badalona, Spain

The antifungal activity of hexane, dichloromethane, methanol and aqueous extracts from the rhizome and root of *Ferula hermonis* was assayed *in vitro* by the agar disk diffusion method against a panel of human opportunistic and pathogenic fungi. Among them, the hexane and dichloromethane extracts showed the highest activity particularly against the dermatophytes *Microsporum gypseum* and *Tricophyton mentagrophytes* as well as the yeast *Candida lactis-condensi*. Activity-guided fractionation of both extracts using an agar overlay bioautographic method led to the isolation of two antifungal compounds which were identified as the daucane aryl esters jaeschkeanadiol *p*-hydroxybenzoate (ferutinin) and jaeschkeanadiol benzoate (teferidin). Determination of minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) values of both compounds evidenced a stronger antifungal activity for ferutinin than for teferidin. Particularly, *T. mentagrophytes* was the most sensitive strain with MIC and MFC values ranging from 8 to 256 µg/mL. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: *Ferula hermonis*; jaeschkeanadiol *p*-hydroxybenzoate; jaeschkeanadiol benzoate; antifungal activity; dermatophytes.

INTRODUCTION

Fungal diseases have emerged as important public health problems with a high economic cost. Fungal infections in humans, in particular those involving skin and mucosal surfaces, have increased considerably in the last decades, especially in tropical and subtropical countries, dermatophytes and *Candida* sp. being the most frequent pathogens. Furthermore, a dramatic increase of cases of immunocompromised patients which frequently develop opportunistic and superficial mycoses has been also reported in the last years (Pfalter and Diekema, 2007).

Although at present several antimycotic drugs are available, its use is limited by a number of factors such as low potency, poor solubility, drug toxicity and emergence of resistant strains due in part to their intensive prophylactic use (Bastert *et al.*, 2001). Therefore, despite the progress in human medicine, there is a distinct need for the discovery of alternative new, safer and more effective antifungal agents (Abad *et al.*, 2007).

Natural products, either as pure compounds or as standardized herbal extracts, provide unlimited opportunities for new drug leads because of the unmatched availability of chemical diversity (Cos *et al.*, 2006). In recent years, many studies on the evaluation of antifungal activities of plant extracts have been carried out, and a number of reports on new antifungal agents from plants have been reported (Lang and Buchbauer, 2012; Abad *et al.*, 2007).

The genus *Ferula* (Apiaceae), known as a good source of biologically active compounds, comprises about 170 species widely distributed throughout the Mediterranean area and Central Asia. Many of them have been employed since antiquity as sources of scented gum-resins used either for medicinal or culinary purposes. Several species of *Ferula* are appreciated in traditional medicine for the treatment of skin infections, stomach disorders, fever, dysentery, hysterias and as aphrodisiac (Al-Yahya *et al.*, 1998; Gamal-Eldeen and Hegazy, 2010). Hormonal effects and, more recently, cytotoxic and cancer preventing properties have been also investigated in plants of this genus (Lhuillier *et al.*, 2005; Poli *et al.*, 2005). Some of these activities have been related to sesquiterpene derivatives, mainly to those of the daucane type, such as ferutinin (Zanoli *et al.*, 2005; Zavatti *et al.*, 2006), a potent phytoestrogen which acts as an agonist for both estrogen receptors, ER α and ER β (Ikeda *et al.*, 2002).

Particularly, *F. hermonis* Boiss. (in some papers referred as *F. harmonis*), a perennial shrub that grows on the Hermon mountain, between Lebanon and Syria, commonly known as 'Shirsh-el-Zallouh' which means hairy root, is used in the Middle East to improve sexual behavior in the treatment of frigidity and impotence (Auzi *et al.*, 2008; El-Taher *et al.*, 2001; Lev and Amar, 2002). Although some papers dealing on the sesquiterpene composition of different extracts (Al-Sha'er *et al.*, 2001; Auzi *et al.*, 2008; Diab *et al.*, 2001a, 2001b; Galal, 2000; Galal *et al.*, 2001; Ibraheim *et al.*, 2011; Lhuillier *et al.*, 2005) as well as on its antibacterial and insecticidal activities (Al-Nahar *et al.*, 2006; Al-Sha'er *et al.*, 2001; Galal *et al.*, 2001; Hilan *et al.*, 2007; Ibraheim *et al.*, 2011) have been previously published, little is known about its antifungal activity.

* Correspondence to: Salvador Cañigueral, Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII, s/n, ES-08028 Barcelona, Spain.
E-mail: s.canigueral@ub.edu

With the aim of searching for new antifungal agents and to potentiate the use of natural resources, we recently report on the composition and antifungal activity of its essential oil against several yeasts and filamentous fungi. Particularly, a purified fraction with 73% of jaeschkeanadiol benzoate and the constituent 3,5-nonadiyne evidenced strong antifungal activity against the dermatophyte *T. mentagrophytes* (Al-Ja'fari *et al.*, 2011).

In order to further investigate on the antimycotic constituents of this species, the activity of different extracts from the rhizome and roots of *F. hermonis* was assayed against a panel of human opportunistic and pathogenic fungi, and a bioguided fractionation was performed to characterize the active fractions and/or constituents.

MATERIALS AND METHODS

General experimental procedures. Silica gel 60 (35–70 μm , SDS, France) and Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia Biotech, Sweden) were used for preparative column chromatography. Precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates were used for analytical thin layer chromatography (TLC) (SDS, France) and for preparative TLC (20 \times 20 cm; 2 mm thickness; Merck, Germany).

NMR spectra of **1** and **2** were recorded in CDCl₃, on a Varian VNMRs 400 MHz spectrometer using tetramethylsilane (TMS) as internal standard. MS were obtained with Agilent Technologies 5973 and 5975 Inert XL mass spectrometers.

Sabouraud dextrose agar (Panreac, Spain) and Sabouraud dextrose broth (Adsa, Spain) were used as culture media for the antifungal assays. Sterile paper disks were provided by Difco (diameter: 13 mm, ref. 1571–33). Nystatin, amphotericin B, ketoconazole and clotrimazole were purchased from Sigma Chemical (USA).

Plant material. Air-dried rhizome and roots of *Ferula hermonis* Boiss. (Apiaceae) were provided by The Jordanian Pharmaceutical Manufacturing Co. (Naor, Jordan). Voucher specimens were identified and deposited at the Herbarium of the University of Barcelona under No. BCN 51579.

Preparation of extracts. Powdered air-dried plant material was successively submitted to extraction with increasing polarity solvents: hexane, dichloromethane, methanol and water. Additionally, an aqueous decoction was also obtained.

The hexane extract was obtained by maceration of the plant material (25 g) in hexane at room temperature, shaking for 18 h. The extract was filtered and the dried plant residue submitted to dichloromethane extraction in a Soxhlet apparatus over 12 h. Once the extract was filtered, the extracted plant material was dried and later left to soak in methanol 95% at room temperature and shaken over 18 h. Then, the crude methanol extract was filtered, and the plant residue was dried and extracted with boiling water for 3 h.

All the filtered extracts were concentrated in vacuum to dryness. Methanol and aqueous extracts were subsequently lyophilized.

An additional aqueous extract was obtained by decoction of the plant material (25 g) in distilled water over 3 h. The solution was filtered, evaporated and lyophilized.

Fractionation of the hexane and dichloromethane extracts. Preparative TLC performed with the hexane extract (265 mg) on five precoated silica gel plates using hexane:EtOAc (75:25) as mobile phase gave eight fractions: F-1 to F-8. Subsequent fractionation of F-5 (131 mg) by column chromatography on Sephadex[®] LH-20 (column size 80 \times 1 cm) using Cl₂CH₂:MeOH (1:1) as mobile phase and on silica gel 60 (column size 85 \times 1.4 cm) eluting with hexane:EtOAc (80:20) finally afforded 61.7 mg of compound **1**.

2 g of the dichloromethane extract was submitted to preparative flash-chromatography (column size 60 \times 4.5 cm) on silica gel 60 eluted with a gradient of petroleum ether:EtOAc:MeOH from (95:5:0) to (35:55:10) giving 18 fractions. Fraction 2 (130 mg) further submitted to column chromatography on Sephadex[®] LH-20 (column size 85 \times 1.4 cm), using Cl₂CH₂:MeOH (1:1) as mobile phase, allowed the isolation of compound **2** (27 mg). Final purification of fraction 6 (921 mg) through Sephadex[®] LH-20 gave 915 mg of pure compound **1**.

Structure elucidation. Structure elucidation of **1** and **2** was achieved using standard spectroscopic techniques: ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, EI-MS and CI-MS. For complete assignments of ¹H and ¹³C NMR signals, COSY, HMBC and HSQC 2D-NMR methods were applied.

Antifungal activity. The antifungal activity of the extracts as well as of its fractions and major constituents was assayed against eight yeasts and filamentous fungi strains.

Microorganisms, growth conditions, and preparation of fungal inocula. *Aspergillus fumigatus* CECT 2071, *A. niger* CECT 2574, *Candida albicans* CECT 1394, *C. lactis-condensi* CECT 1075, *Microsporium gypseum* CECT 2908, *Penicillium purpurogenum* CECT 20436, *Saccharomyces cerevisiae* CECT 1324 and *Trichophyton mentagrophytes* CECT 2795 were provided by the Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Valencia, Spain. Strains were grown on Sabouraud dextrose agar plates for 24 h at 30°C. Cell suspensions of yeasts in sterile NaCl 0.9% were adjusted at 0.5 McFarland to obtain approximately 10⁶ CFU/mL. Spore suspensions of filamentous fungi were adjusted at 10⁶ CFU/mL by plating 10 μL of four- and five-times serially diluted suspensions and counting germinated spores/dilution.

Paper disk-agar diffusion method. Antimycotic activities of the hexane, dichloromethane, methanol and aqueous extracts from the rhizome and roots of *F. hermonis* were first evaluated by the paper disk-agar diffusion method (Barry and Thornsberry, 1991). Test plates (diameter: 15 cm) were prepared with Sabouraud dextrose agar medium and inoculated in surface with cells and spores suspensions of yeasts and filamentous fungi.

Sterile paper disks impregnated with 100 μL of extract dilutions at concentrations of 50 and 100 mg/mL, as

previously reported (Portillo *et al.*, 2001), or with 20 μL of a solution of 1 mg/mL of amphotericin B or nystatin as active reference compounds, were applied over the test plates. The diameters of the growth inhibition zones around each disk were measured after incubation at 30 °C for 48 h. For each extract, three replicate trials were conducted against each fungus.

Overlay bioautographic method. A bioautographic agar overlay method was used for the detection of the antifungal activity of the fractions of the extracts (Rahalison *et al.*, 1991). Developed TLC plates of each fraction on precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates eluted with hexane-EtOAc (6:4) and (9:1) or CH₂Cl₂:MeOH (98:2) were placed over an inoculated Sabouraud dextrose agar medium (test plates dimensions: 12 x 12 cm), for 1 h at 4 °C. After removing TLC, test plates were incubated at 30 °C for 48 h to visualize growth inhibition. Assays were performed against the dermatophytes *T. mentagrophytes* and *M. gypseum* and the yeasts *C. albicans*, *C. lactis-condensi* and *S. cerevisiae*.

Minimal inhibitory concentration. The minimal inhibitory concentration (MIC) was determined by a standard two-fold dilution technique (Murray *et al.*, 1999). Sabouraud dextrose broth was used as medium for yeasts and dermatophytes.

Samples were first dissolved in dimethylformamide (2.56 mg/mL) and the fungistatic activity was determined by measuring the MIC from diluted aqueous samples of 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 and 0.125 $\mu\text{g/mL}$. All the experiments were performed in triplicate and the results expressed as mean values. Nystatin, amphotericin B, ketoconazole and clotrimazole were included (at an initial concentration of 0.8 mg/mL) as active reference substances. MIC values \leq 256 $\mu\text{g/mL}$ were considered active.

Minimal fungicidal concentration. The minimal fungicidal concentration (MFC) was established technically by extending the MIC (microdilution method) (Balows *et al.*, 1991). Mixtures of the fungus with samples which in MIC studies showed no visible growth in the last three wells after 48 h of incubation were subcultured onto Sabouraud dextrose agar medium plates using an inoculum of 0.01 mL. Plates were incubated at 37 °C for 48 h. The MFC was regarded as the lowest concentration that prevented the growth of any fungal colony on the solid medium.

RESULTS AND DISCUSSION

The rhizome and roots of *Ferula hermonis* submitted to an extraction with increasing polarity solvents and to an aqueous decoction afforded five different crude extracts whose yields are given in Table 1, on basis of dried plant material.

A first screening of the antifungal activity of the extracts by the paper disk-agar diffusion method against a panel of human opportunistic and pathogenic fungi evidenced antimycotic activity against some of them, which was confirmed by determination of the MIC values, ranging from 32 to 256 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2). The strongest

activity was obtained against dermatophytes, particularly *T. mentagrophytes*, which showed equal MIC and MFC values (32 $\mu\text{g/mL}$) for the dichloromethane extract and an MFC value about two-fold the MIC value in the case of the hexane extract (64 and 32 $\mu\text{g/mL}$, respectively). *M. gypseum* showed for both extracts MIC values of 128 $\mu\text{g/mL}$ and MFC values of 256 $\mu\text{g/mL}$. MIC and MFC values for methanol and aqueous extracts were \geq 256 $\mu\text{g/mL}$, being *T. mentagrophytes* the most sensitive strain.

Bioguided fractionation of the hexane extract by preparative TLC afforded eight fractions from which the major one (F-5, 131 mg) showed the strongest activity in the agar overlay bioautographic assay, which was directly related to a dark blue-colored spot detected at R_f 0.75 in the TLC (silica gel; hexane:EtOAc (6:4)) chromatogram after spraying with vanillin-sulphuric acid reagent. Repeated alternate fractionation of F-5 by means of silicagel 60 and Sephadex™ LH-20 column chromatography allowed the isolation of the active compound **1**.

Fractionation of the dichloromethane extract by flash-chromatography on silicagel afforded 18 fractions, F-2 (130 mg) and particularly F-6 (921 mg) being the major ones. Further fractionation of F-2 through Sephadex® LH-20 led to the isolation of compound **2**, whereas final purification of F-6 resulted in compound **1**.

The structures of compounds **1** and **2** were elucidated by standard spectroscopic techniques as jaeschkeanadiol *p*-hydroxybenzoate and jaeschkeanadiol benzoate, two known daucane aryl esters called ferutin and teferidin, respectively (Fig. 1) (Diab *et al.*, 2001a; Galal *et al.*, 2001). Ferutin, for which a weak activity against *Aspergillus niger* has been previously reported (Al-Shae'r *et al.*, 2001), was isolated for the first time from the roots of *Ferula ovina* (Saidkhozhaev and Nikonov, 1974). Teferidin was described from the fruits of *Ferula tenuisecta* (Saidkhozhaev and Nikonov, 1976), and we did not find any antimycotic activity previously reported in the literature.

Results on the antifungal activity of both compounds are shown in Table 2. Ferutin evidenced strong antimycotic activity against *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* and *C. lactis-condensi*. Its MFC value against *T. mentagrophytes* was about two-fold the MIC value (16 and 8 $\mu\text{g/mL}$, respectively), whereas in the case of the other two strains, equal values were obtained for MIC and MFC: 16 $\mu\text{g/mL}$ for *M. gypseum* and 32 $\mu\text{g/mL}$ for *C. lactis-condensi*. In the case of teferidin, a weaker activity in front of *T. mentagrophytes* was found (MIC 128 $\mu\text{g/mL}$; MFC 256 $\mu\text{g/mL}$). These results suggest that the presence of a phenolic hydroxyl in the acidic moiety of the ester, in the case of jaeschkeanadiol *p*-hydroxybenzoate, enhances the antifungal activity.

Table 1. Extract yields from the rhizome and root of *Ferula hermonis*

Extract	Yield (% wt/wt)
Hexane	13.2
Dichloromethane	10.5
Methanol	11.5
Aqueous	7.3
Decoction	22.7

Table 2. Antifungal activity of extracts, ferutinin and teferidin from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*

Fungi strains ^a		Extracts ^b					Compounds ^c		Active reference substances ^d			
		H	DCL	MeOH	W	D	1	2	A	N	K	C
<i>C.a.</i>	MIC ^e	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	1	4	>8	4
	MFC ^f	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	1	4	>8	4
<i>C.l.</i>	MIC	256	256	>256	>256	>256	32	>256	0.5	2	0.5	0.125
	MFC	256	256	>256	>256	>256	32	>256	0.5	2	0.5	0.125
<i>S.c.</i>	MIC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	4	8	0.25	0.125
	MFC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	8	8	1	0.5
<i>T.m.</i>	MIC	32	32	256	256	256	8	128	2	4	0.25	0.125
	MFC	64	32	256	256	256	16	256	2	4	0.5	0.125
<i>M.g.</i>	MIC	128	128	>256	>256	>256	16	>256	4	8	8	0.25
	MFC	256	256	>256	>256	>256	16	>256	4	8	8	0.5
<i>A.n.</i>	MIC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	4	8	>8	4
	MFC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	4	8	>8	4
<i>A.f.</i>	MIC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	4	8	8	1
	MFC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	4	8	8	1
<i>P.p.</i>	MIC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	8	8	4	2
	MFC	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	8	8	4	2

^aFungi strains: *C.a.*: *Candida albicans*; *C.l.*: *C. lactis-condensi*; *S.c.*: *Saccharomyces cerevisiae*; *T.m.*: *Tricophyton mentagrophytes*; *M.g.*: *Microsporium gypseum*; *A.n.*: *Aspergillus niger*; *A.f.*: *A. fumigatus*; *P.p.*: *Penicillium purpurogenum*.

^bExtracts: **H**: Hexane extract; **DCL**: Dichloromethane extract; **MeOH**: Methanolic extract; **W**: Aqueous extract; **D**: Decoction.

^cCompounds: **1**: Ferutinin; **2**: Teferidin.

^dActive reference substances: **A**: amphotericin B; **N**: nistatyn; **K**: ketoconazole; **C**: clotrimazole.

^eMIC: Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$).

^fMFC: Minimal fungicidal concentration ($\mu\text{g/mL}$).

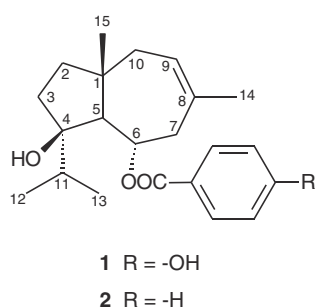


Figure 1. Structure of jaeschkeanadiol *p*-hydroxybenzoate (ferutinin, 1) and jaeschkeanadiol benzoate (teferidin, 2).

This would be consistent with the fact that compounds with phenolic structures, like carvacrol, eugenol and thymol show stronger antimicrobial activities than those lacking a phenol group, as for example *p*-cymene (Dorman and Deans, 2000; Ultee *et al.*, 2002; Lang and Buchbauer, 2012).

Thus, it can be stated that hexane and dichloromethane extracts of the rhizome and roots of *F. hermonis* have antifungal activity mainly against *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* and *C. lactis-condensi*, and that ferutinin and teferidin are active constituents of these extracts. In an earlier paper, the activity against plant pathogenic fungi was reported for different crude extracts of *F. hermonis*, the ethyl acetate extract showing the highest inhibitory effect against all fungi tested (Al Mughraby and Aburjai, 2003). It should be noted that some daucane sesquiterpene derivatives have been previously identified in the essential oil of *F. hermonis*, in particular: jaeschkeanadiol (ferutinin), jaeschkeanadiol

benzoate (teferidin) and jaeschkeanadiol angelate. Both the volatile oil and the two latter compounds exhibited a remarkable antimycotic activity against the human pathogenic dermatophytes *T. mentagrophytes* and *M. gypseum* (Al-Ja'fari *et al.*, 2011).

In conclusion, results obtained from this study together with those previously reported (Al-Ja'fari *et al.*, 2011) evidence that the rhizome and roots of *F. hermonis* have outstanding antifungal activity against human opportunistic pathogenic fungi, which at least is partly due to the presence of daucane sesquiterpene esters, such as jaeschkeanadiol *p*-hydroxybenzoate (ferutinin) and jaeschkeanadiol benzoate (teferidin). These compounds, together with the essential oil of this species, could be of interest for the pharmaceutical industry for developing new antimycotic agents particularly useful in the treatment of dermatophyte infections.

Acknowledgements

Authors are grateful to AA Badwan (The Jordanian Pharmaceutical Manufacturing Co., Naor, Jordan) and TS El-Thaher (ARAGEN Biotechnology, Naor, Jordan) for providing plant material, and to Prof. M. Bou Dagher Kharrat (Département Sciences de la Vie et de la Terre, Université Saint Joseph, Beyrouth, Lebanon) for the botanical identification. Thanks are also due to the Fundación María Francisca de Roviralta (Barcelona, Spain) for financial support.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Abad MJ, Ansuategui M, Bermejo P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. *ARKIVOC* **7**: 116–145.
- Al-Ja'fari AH, Vila R, Freixa B, et al. 2011. Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytochemistry* **72**: 1406–1413.
- Al-Mughrabi KI, Aburjai TA. 2003. Fungitoxic activity of root extracts from *Ferula hermonis*. *Phytopathol Mediterr* **42**: 141–148.
- Al-Nahar HA, Ismaeil A, Bishr MM, Gaafar MM, Abbass AA. 2006. GC-MS analysis and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula harmoni* L. (Zaloo). *Alex J Pharm Sci* **20**: 17–19.
- Al-Shae'r M, Darwish RM, Aburjai T. 2001. Antimicrobial sesquiterpene from the roots of *Ferula hermonis*. *Acta Technologica et Legis Medicamenti* **12**: 255–264.
- Al-Yahya MA, Muhammad I, Mirza HH, El-Ferally FS. 1998. Antibacterial constituents from rhizomes of *Ferula communis*. *Phytother Res* **12**: 335–339.
- Auzi AA, Gray AI, Salem MM, Badwan AA, Sarker SD. 2008. Feruhermonins A-C: three daucane esters from the seeds of *Ferula hermonis* (Apiaceae). *J Asian Nat Prod Res* **10**: 701–707.
- Balows A, Hausler WJ, Herrmann LK, Isenberg HD, Shadomy HJ. 1991. *Manual of Clinical Microbiology* (5th edn). American Society for Microbiology, ASM Press: Washington D.C.
- Barry AL, Thornsberry C. 1991. Susceptibility test: Diffusion test procedures. In *Manual of Clinical Microbiology* (5th edn), Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ (eds). American Society for Microbiology, ASM Press: Washington D.C.: 1526–1542.
- Bastert J, Schaller M, Korting HC, Evans EGV. 2001. Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. *Int J Antimicrob Agents* **17**: 81–91.
- Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* **106**: 290–302.
- Diab Y, Dolmazon R, Bessière JM. 2001a. Daucane aryl esters composition from the Lebanese *Ferula hermonis* Boiss. (zallooh root). *Flavour Fragr J* **16**: 120–122.
- Diab Y, Dolmazon R, Fenet B. 2001b. 2,3-Epoxyjaescheanadiol 5-benzoate from *Ferula hermonis* Boiss. *Flavour Fragr J* **16**: 397–400.
- Dorman HJD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* **88**: 308–316.
- El-Taher TS, Mtalka KZ, Taha HA, Badwan AA. 2001. *Ferula hermonis* "Zallooh" and enhancing erectile function in rats: efficacy and toxicity study. *Int J Impot Res* **13**: 247–251.
- Galal A. 2000. Sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Pharmazie* **55**: 961–962.
- Galal AM, Abourashed EA, Ross SA, ElSohly MA, Al-Said MS, El-Ferally FS. 2001. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *J Nat Prod* **64**: 399–400.
- Gamal-Eldeen A, Hegazy M-EF. 2010. A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Nat Prod Res* **24**: 246–257.
- Hilan C, Sfeir R, El Hage R, Jawich D, Frem MF, Jawhar K. 2007. Evaluation of the antibacterial activities of *Ferula hermonis* (Boiss.). *Lebanese Sci J* **8**: 135–151.
- Ibraheim ZZ, Abdel-Mageed WM, Dai H, Guo H, Zhang L, Jaspars M. 2011. Antimicrobial antioxidant daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Phytother Res* in press, DOI: 10.1002/ptr.3609.
- Ikeda K, Arai Y, Otsuka H, et al. 2002. Terpenoids found in the Umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER α and ER β : differential transcription activity between ferutinine-liganded ER α and ER β . *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 354–360.
- Lang G, Buchbauer G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour Fragr J* **27**: 13–39.
- Lev E, Amar Z. 2002. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *J Ethnopharmacol* **82**: 131–145.
- Lhuillier A, Fabre N, Cheble E, et al. 2005. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *J Nat Prod* **68**: 468–471.
- Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. 1999. *Manual of Clinical Microbiology* (7th edn). American Society for Microbiology, ASM Press: Washington D.C.
- Pfaller MA, Diekema DJ. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133–163.
- Poli F, Appendino G, Sacchetti G, Ballero M, Maggiano N, Raneletti FO. 2005. Antiproliferative effects of daucane esters from *Ferula communis* and *F. arrigonii* on human colon cancer cell lines. *Phytother Res* **19**: 152–157.
- Portillo A, Vila R, Freixa B, Adzet T, Cañigueral S. 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol* **76**: 93–98.
- Rahalisson L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem Anal* **2**: 199–203.
- Saidkhozhaev AI, Nikonov GK. 1974. Components of the roots of *Ferula ovina*. *Khim Priir Soedin* **4**: 526–527.
- Saidkhozhaev AI, Nikonov GK. 1976. The structure of teferidin, a new ester from the fruit of *Ferula tenuisecta*. *Khim Priir Soedin* **1**: 105–106.
- Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1561–1568.
- Zanoli P, Rivasi M, Zavatti M, Brusiani F, Vezzalini F, Baraldi M. 2005. Activity of single components of *Ferula hermonis* on male rat sexual behavior. *Int J Impot Res* **17**: 513–518.
- Zavatti M, Montanari C, Zanoli P. 2006. Role of ferutinin in the impairment of female sexual function induced by *Ferula hermonis*. *Physiol Behav* **89**: 656–661.

5.3.2. Fraccionamiento de los extractos hexánico y diclorometánico y caracterización de los compuestos activos

La determinación de la CMI y CMF para los diferentes tipos de extractos, evidenció una interesante actividad antifúngica en el caso del extracto hexánico y del extracto diclorometánico. Ambos resultaron especialmente activos frente a los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *M. gypseum* con valores de CMI y CMF entre 32 y 128 µg/mL (véase apartado 5.1 y 5.3.1)

El fraccionamiento biodirigido del **extracto hexánico** mediante cromatografía en capa fina preparativa dio como resultado ocho fracciones. De ellas, la mayoritaria (F-5, 131 mg) mostró la mayor actividad, que según el ensayo de la bioautografía se encuentra directamente relacionada con una mancha de color azul oscuro (Rf 0.75) que aparece en la CCF de silicagel desarrollada con hexano:AcOEt (6:4) tras revelar con el reactivo de vanilina sulfúrica. El sucesivo fraccionamiento de F-5 mediante cromatografía en columna de silicagel y Sephadex[®] LH-20 permitió el aislamiento del compuesto activo **1 Ext.**

A partir del **extracto diclorometánico**, tras un primer fraccionamiento mediante cromatografía “flash” de silicagel, se obtuvieron dos fracciones mayoritarias: F-2 (130 mg) y F-6 (921 mg). El subsiguiente fraccionamiento de F-2 a través de Sephadex[®] LH-20 llevó al aislamiento del compuesto **2 Ext.** Por su parte, la purificación final de F-6 permitió obtener un compuesto, cuyos espectros de MS y RMN mostraron que se trataba del mismo producto aislado a partir del extracto hexánico (**1 Ext.**).

La estructura de **1 Ext.** (figura 5.15) ha podido ser establecida a partir de sus espectros de EI-MS (figura 5.16.), ¹H-RMN (figuras 5.17., 5.18. y 5.19.), ¹³C-RMN (figuras 5.20., 5.21. y 5.22.), DEPT (figura 5.23.), COSY H,H (figura 5.24.), HMBC (figura 5.25.), HSQC (figura 5.26.), siendo identificada como la del p-hidroxibenzoato de jaeschkeanadiol, denominado también ferutinina. En la tabla 5.4. se muestran los

datos de RMN del compuesto **1 Ext.** y los descritos en la bibliografía para la ferutinina.

La estructura de **2 Ext.** (figura 5.15) ha sido deducida a partir de los espectros de EI-MS (figura 5.27.), ^1H -RMN (figuras 5.28., 5.29., 5.30. y 5.31.), ^{13}C -RMN (figuras 5.32., 5.33. y 5.34), DEPT (figura 5.35.), COSY H,H (figura 5.36.), HSQC (figura 5.37.), HMBC (figura 5.38.). De este modo, el compuesto **2 Ext.** ha sido identificado como el benzoato de jaeschkeanadiol o teferidina. En la tabla 5.5. se muestran los datos de RMN del compuesto **2 Ext.** y los descritos en la bibliografía para la teferidina.

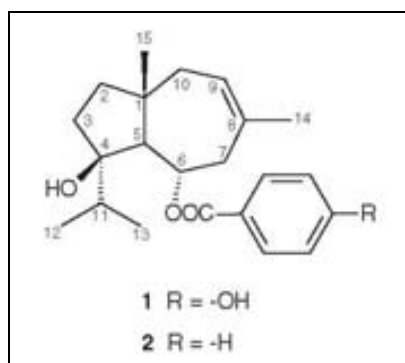


Figura 5.15. Estructura química de la ferutinina (1) y la teferidina (2).

La ferutinina y la teferidina son dos ésteres derivados del daucano, identificados anteriormente en *Ferula* sp. (Diab et al., 2001; Galal et al., 2001), para los cuales no se había descrito anteriormente actividad antifúngica, únicamente en el caso de la ferutinina una débil actividad frente a *Aspergillus niger* (Al-Shae'r et al., 2001).

En nuestros ensayos (véase apartado 5.3.1), la ferutinina ha mostrado una intensa actividad antifúngica frente a *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* y *C. lactis-condensi*, con valores de CMI y CMF comprendidos entre 8 y 32 $\mu\text{g/mL}$. En el caso

de la teferidina la actividad ha sido más débil. Ello sugiere que la presencia del grupo hidroxilo fenólico en el caso de la ferutinina potencia la actividad, lo cual estaría de acuerdo con el hecho de que los compuestos fenólicos, tales como carvacrol, eugenol o timol, poseen actividad antimicrobiana más potente que los no fenólicos, como por ejemplo el p-cimeno (Dorman y Deans, 2000; Lang y Buchbauer, 2012; Ultee *et al.*, 2002).

Espectros de MS y RMN del compuesto 1 Ext.

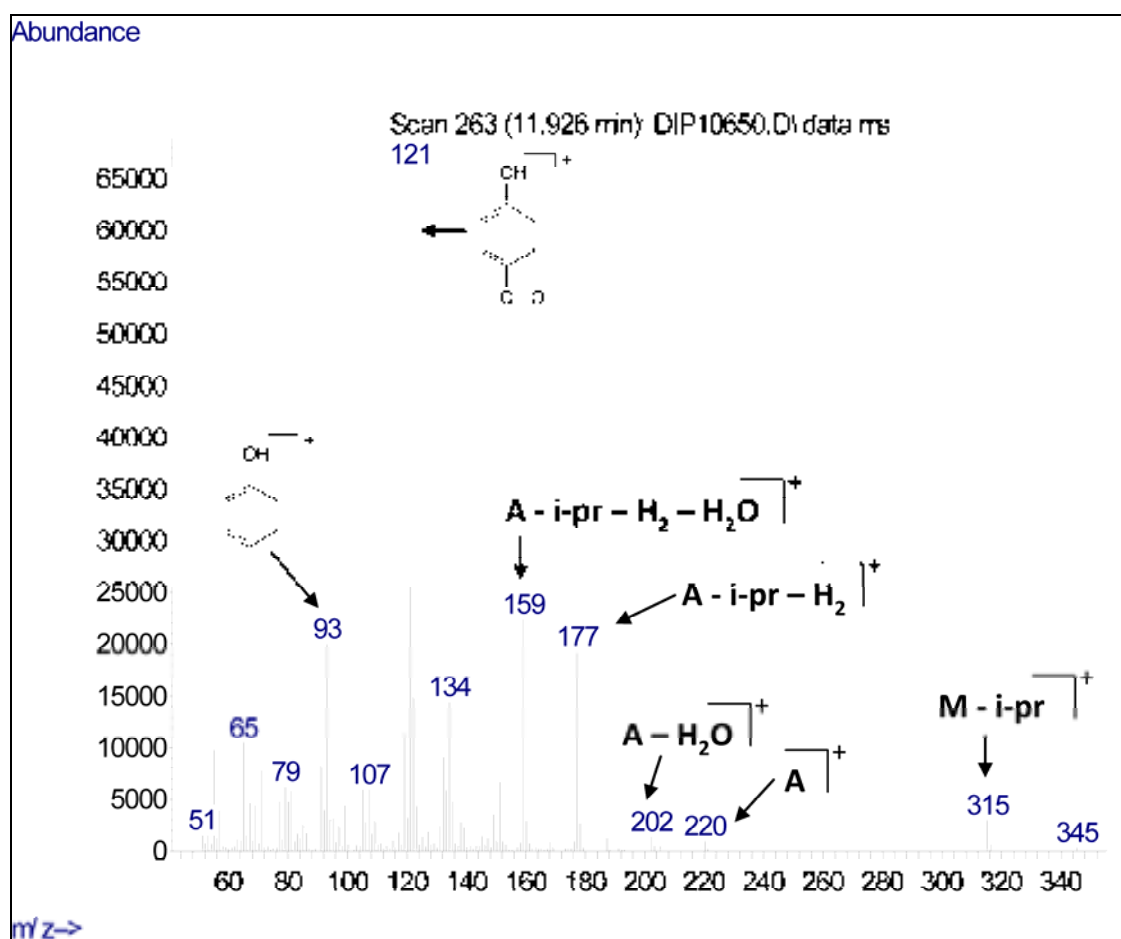


Figura 5.16. Espectro de EI-MS del compuesto 1Ext. M: molécula; A: aglicón sesquiterpénico.

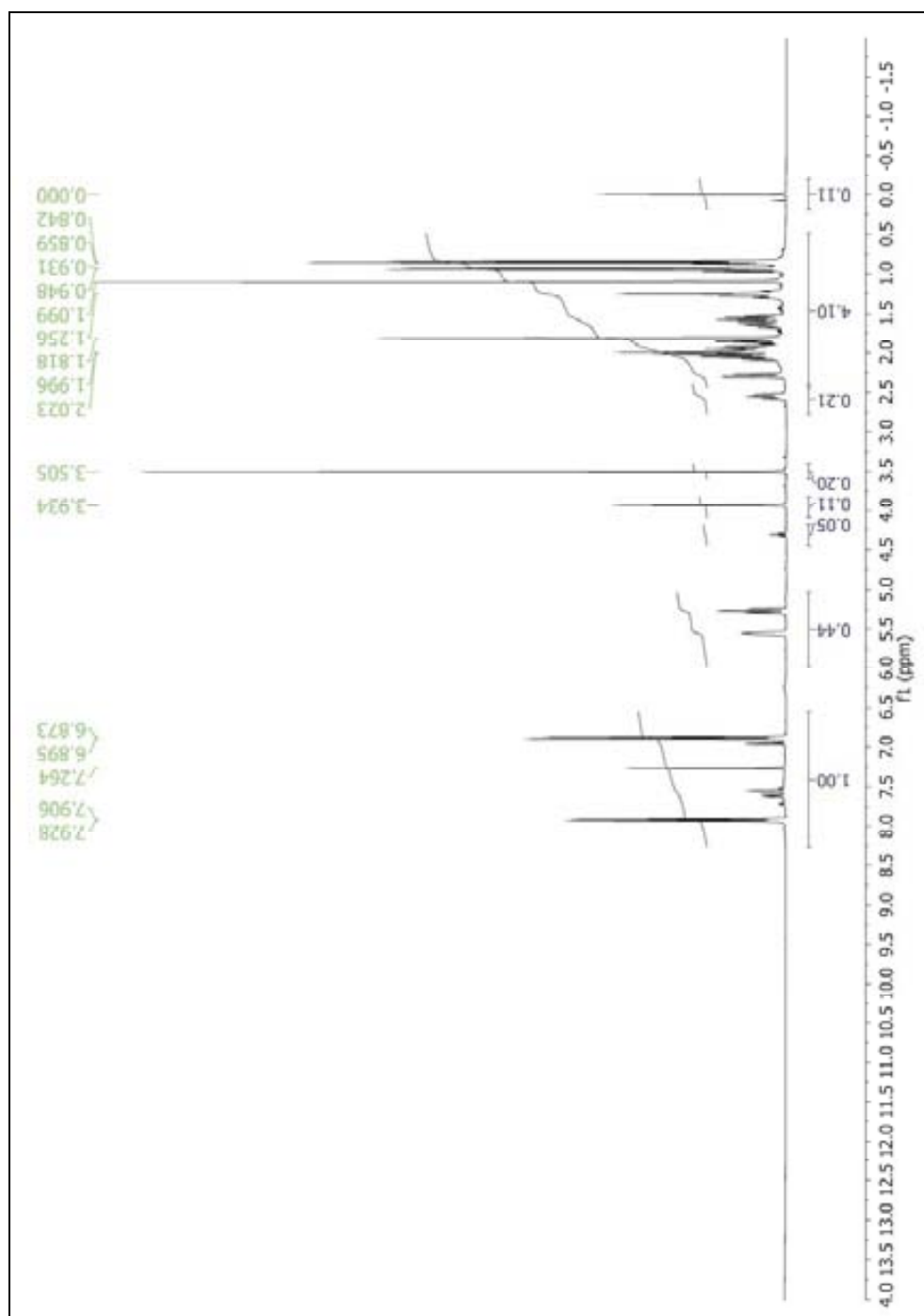


Figura 5.17. Espectro de $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 $^\circ\text{C}$) del compuesto 1 Ext

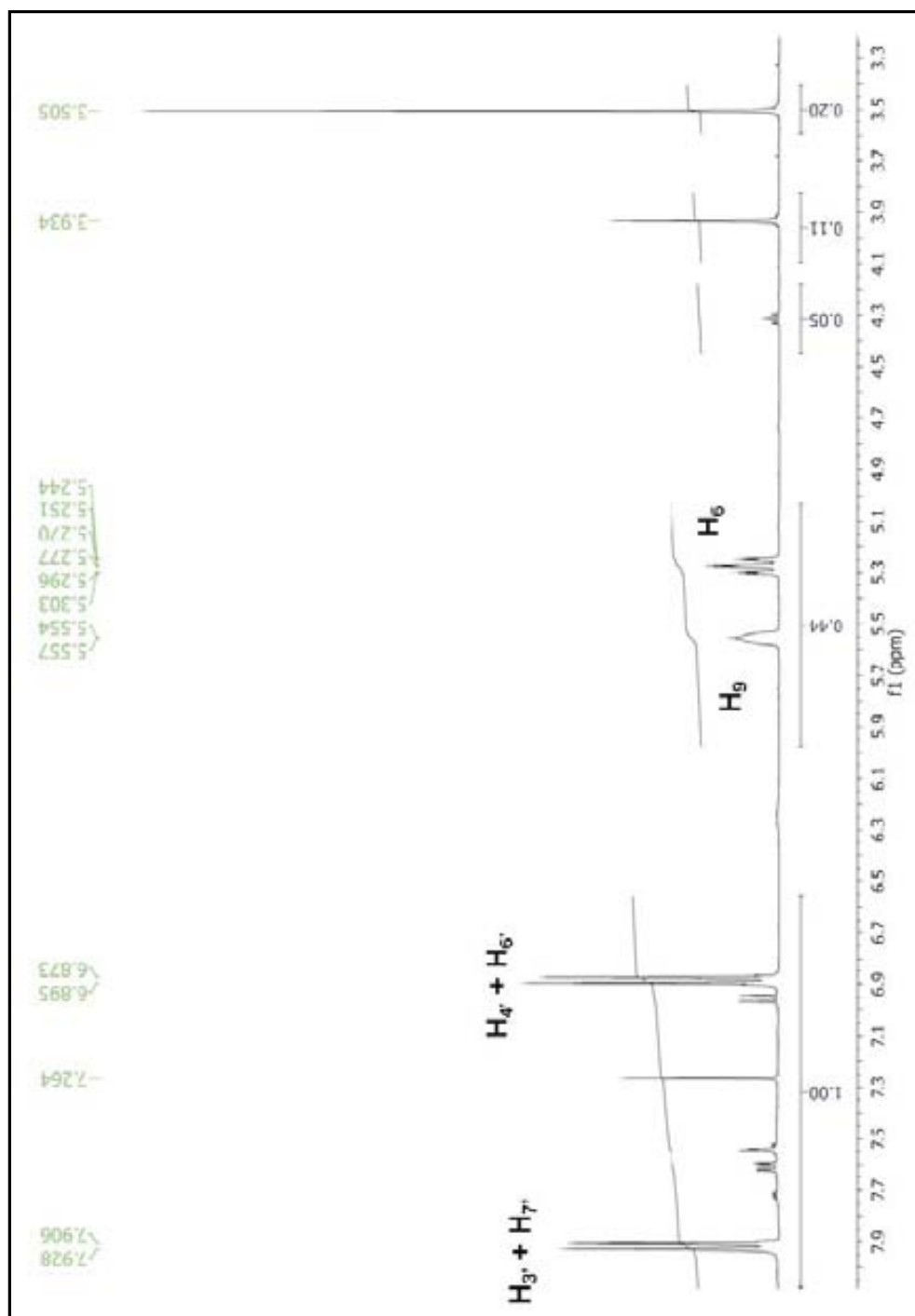


Figura 5.18. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto **1 Ext.** Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 3,2 a 8,0 ppm.

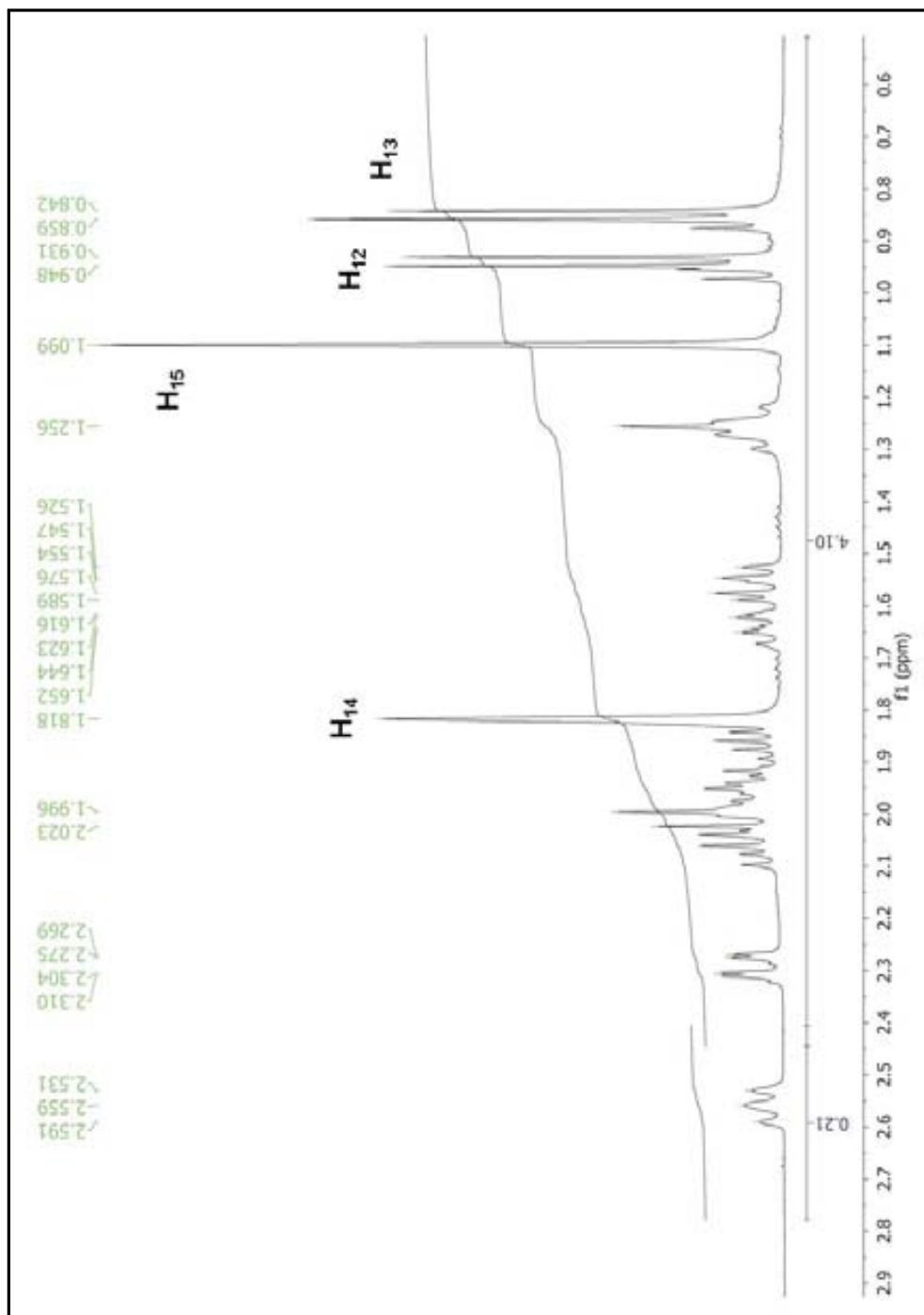


Figura 5.19. Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 1 Ext. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0,5 a 3,0 ppm.

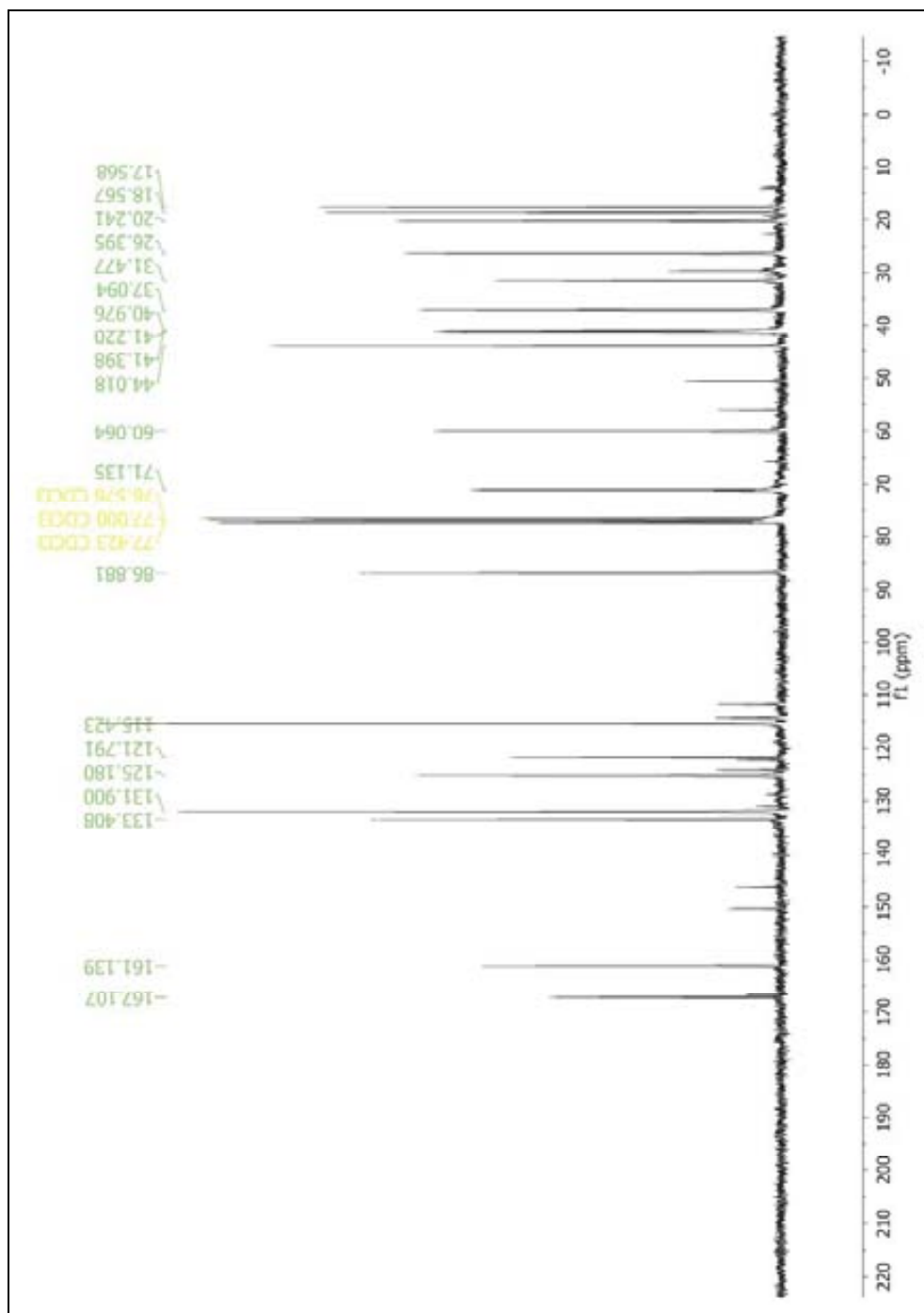


Figura 5.20. Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CHCl_3 -d, 25 °C) del compuesto 1 Ext.

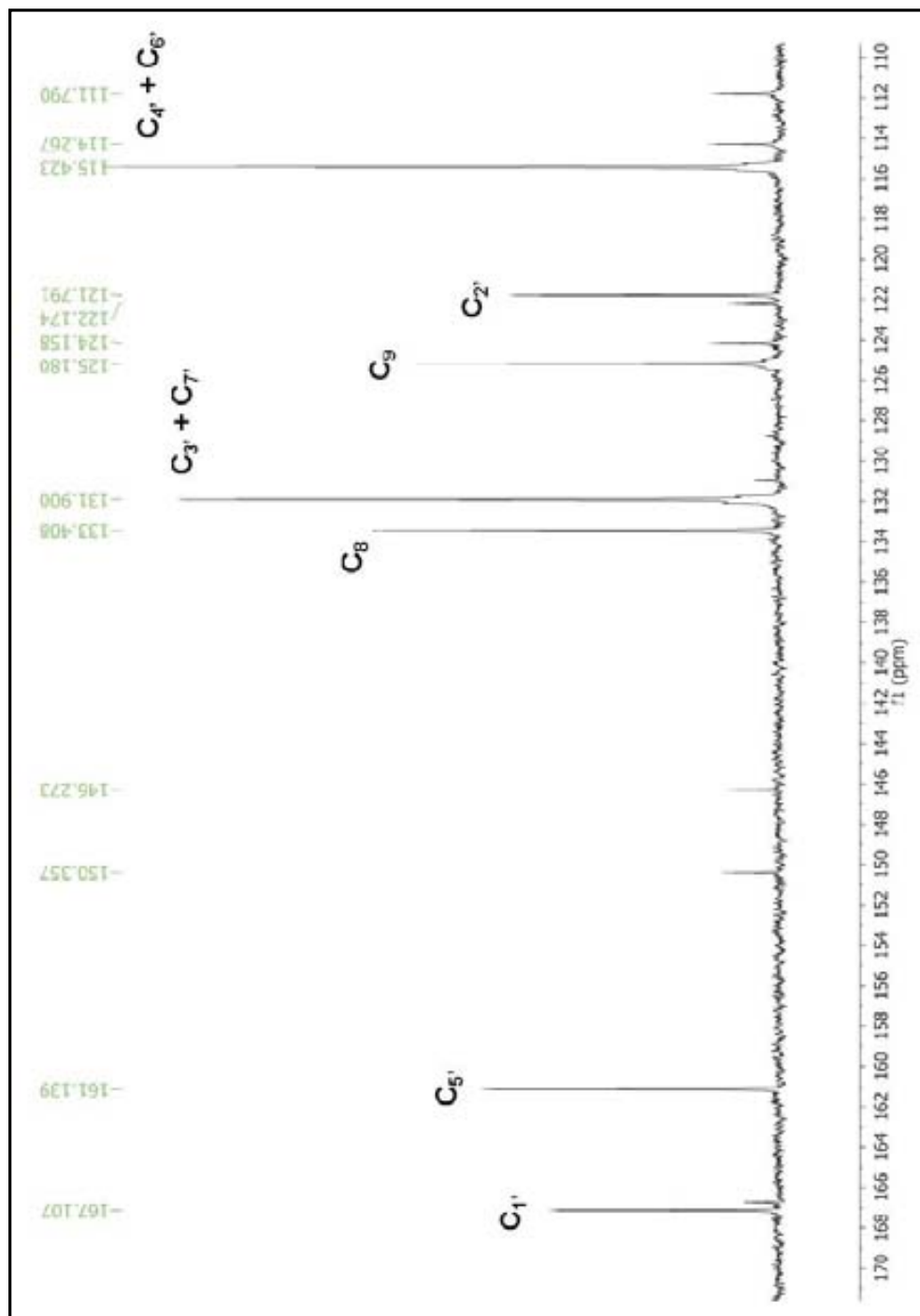


Figura 5.21. Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CHCl_3 -d, 25 °C) del compuesto 1 Ext. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 100 a 180 ppm.

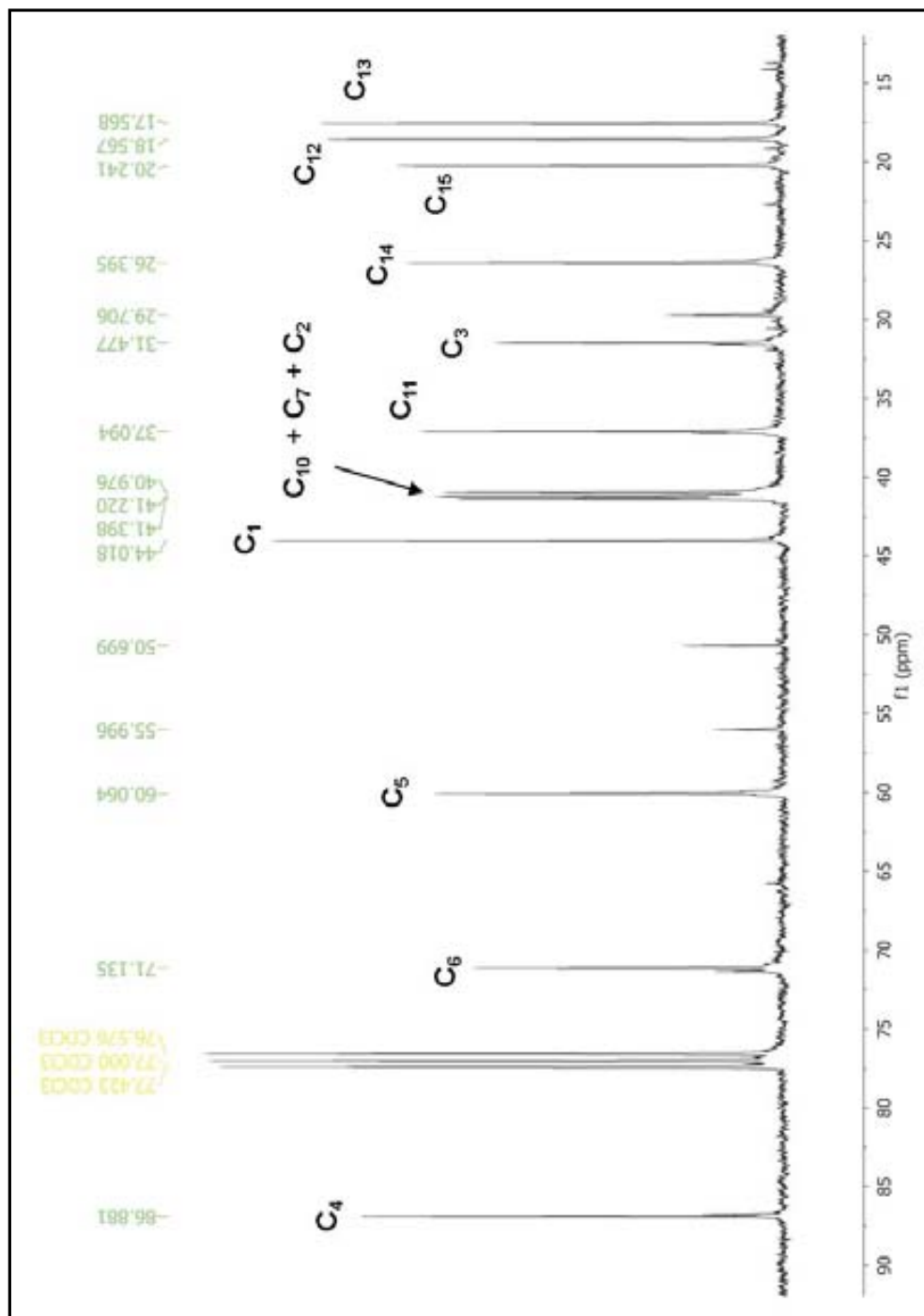


Figura 5.22. Espectro de ^{13}C -RMN (300 MHz, CHCl_3 -d, 25 °C) del compuesto 1 Ext. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0 a 95,0 ppm.

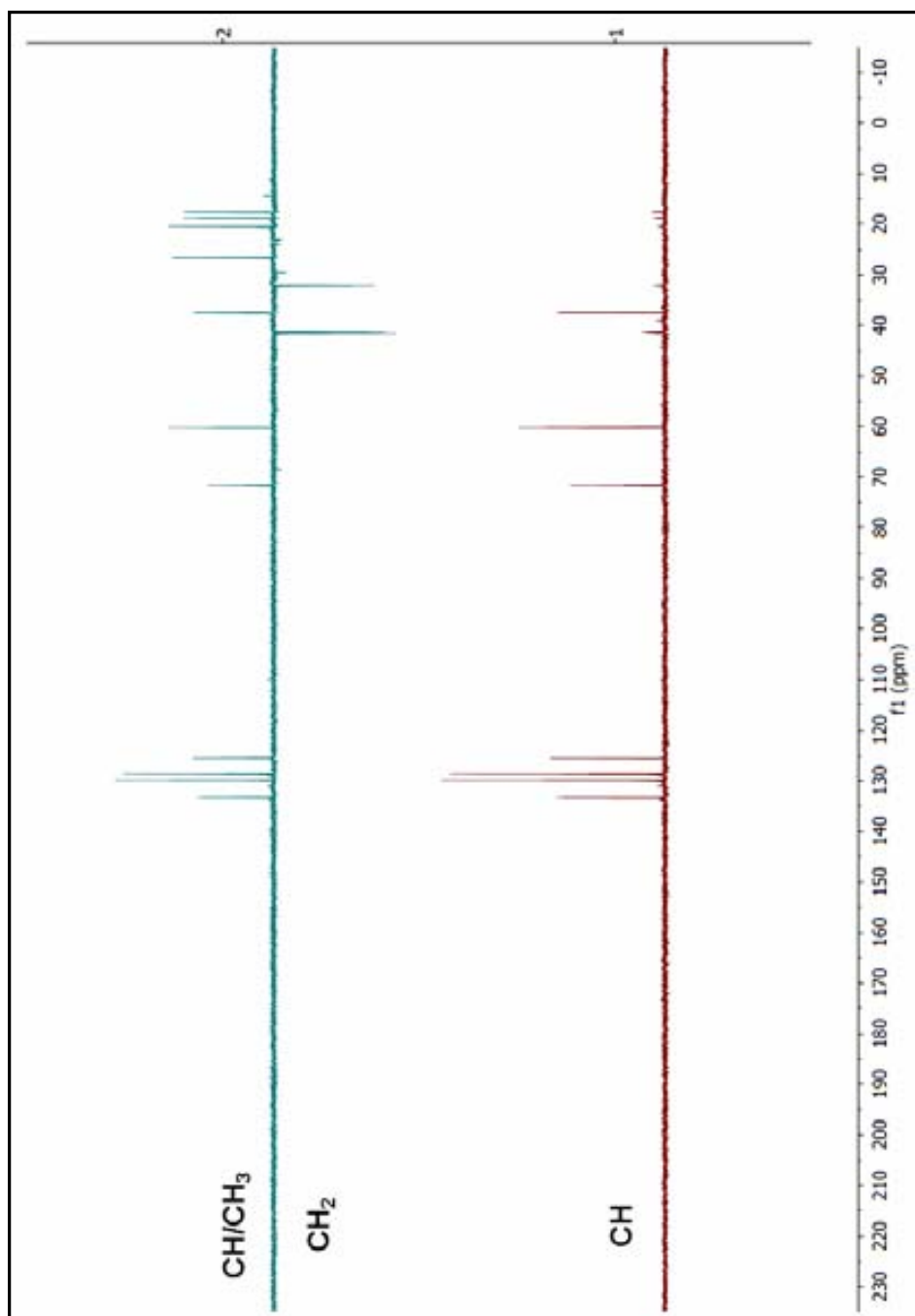


Figura 5.23. Espectro de DEPT del compuesto 1 Ext.

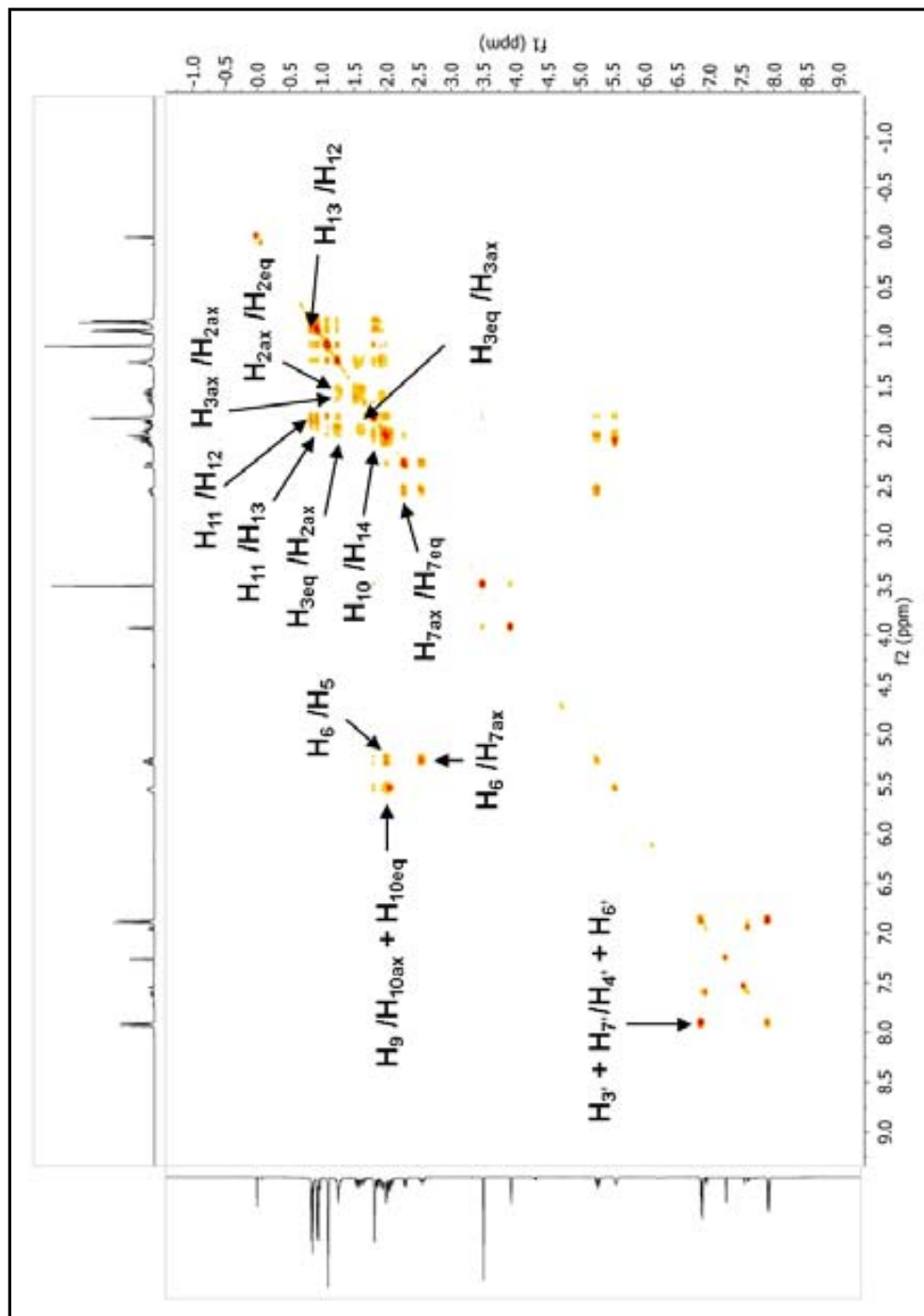


Figura 5.24. Espectro de COSY (400 MHz, CHCl₃-d, 25 °C) del compuesto 1 Ext.

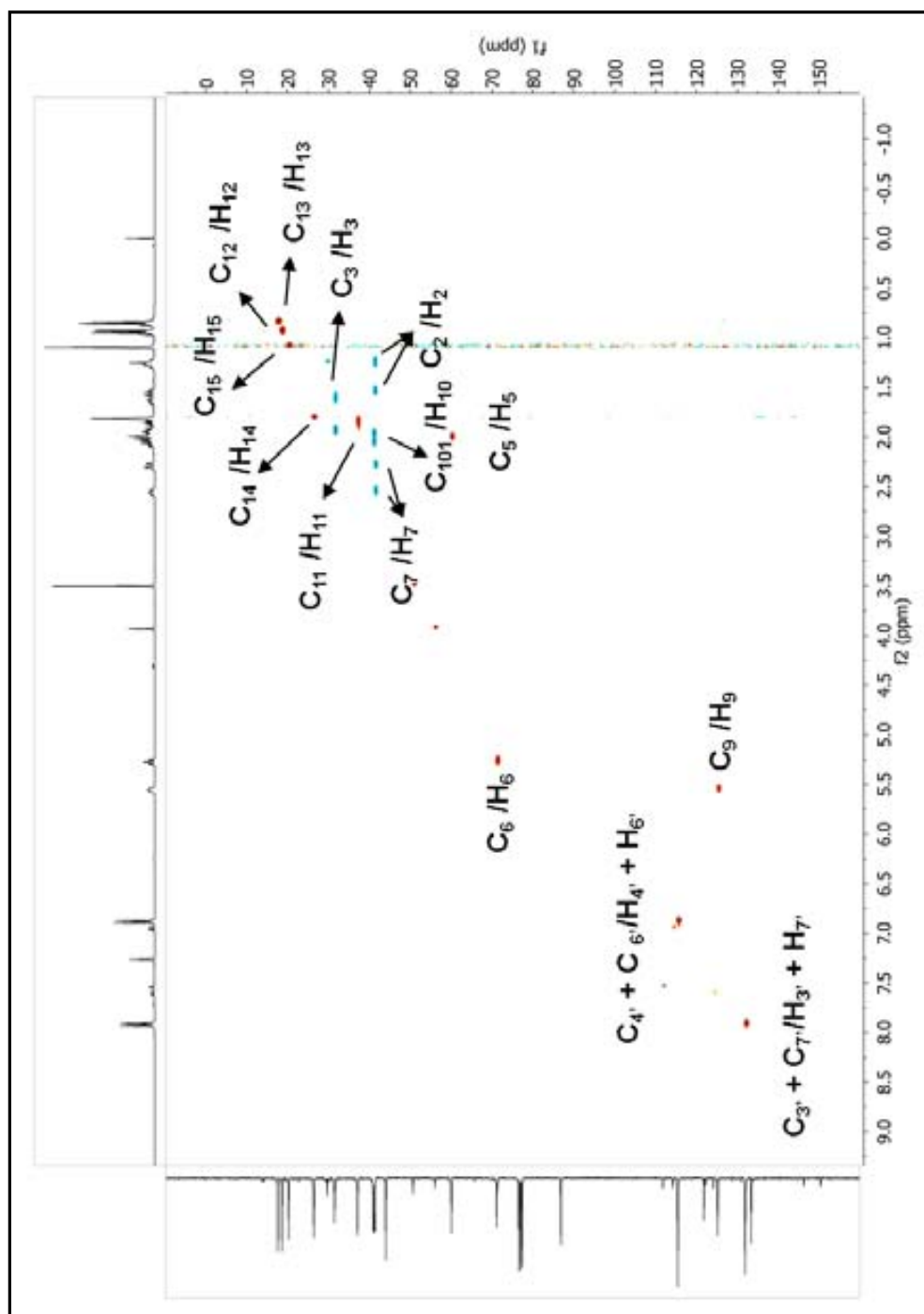


Figura 5.25. Espectro de HSQC (400 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 1 Ext.

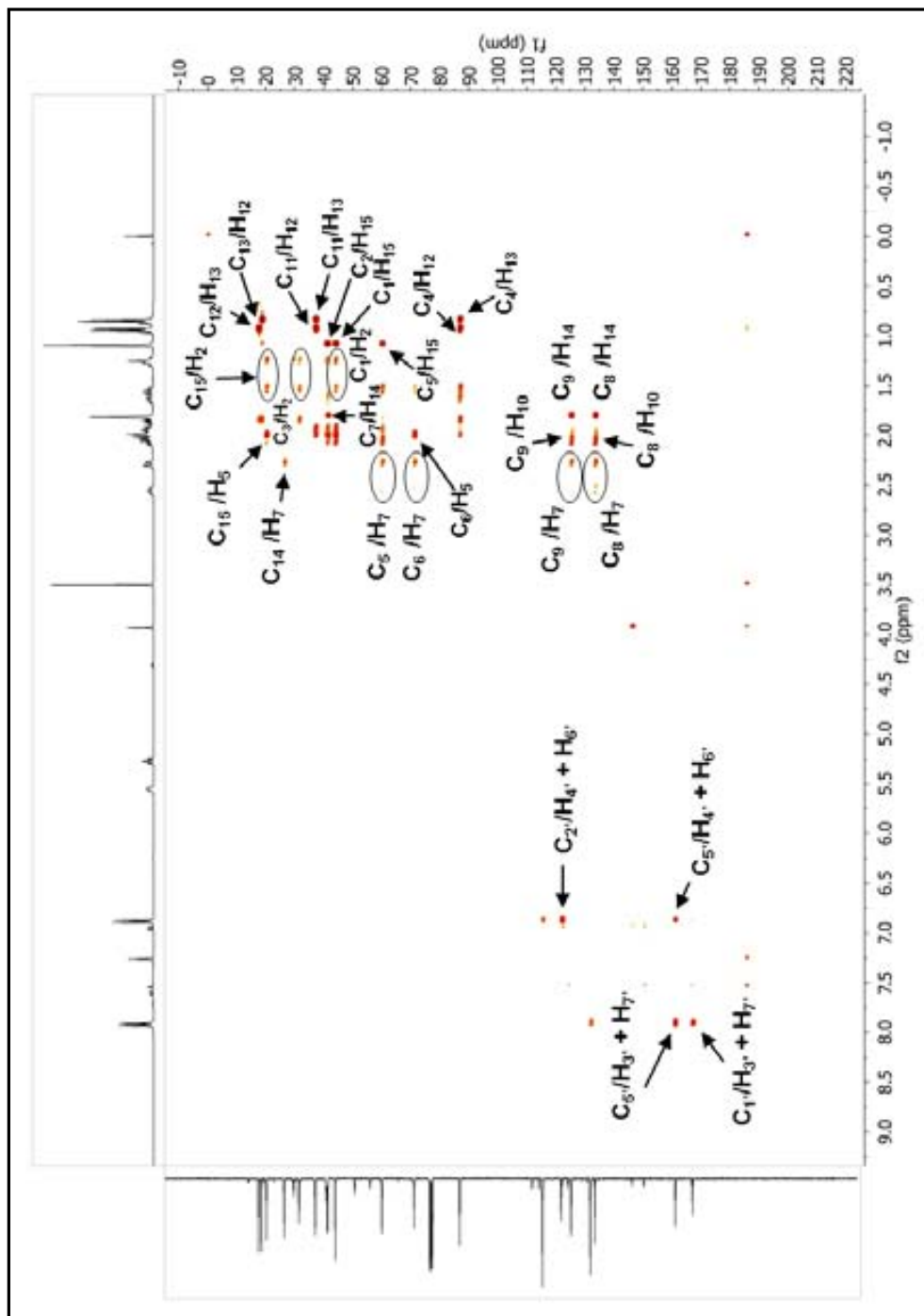


Figura 5.26. Espectro de HMBC (400 MHz, CHCl₃-d, 25 °C) del compuesto 1 Ext.

Compuesto 1 Ext.				p-Hidroxibenzoato de jaeschkeanadiol		
Nº	¹³ C δ	DEPT	¹ H δ (mult., int., J (Hz))	nº	¹³ C δ	¹ H δ (mult., int., J (Hz))
1'	167,13	Cq	-	1'	167,26	-
5'	161,16	Cq	-	5'	161,07	-
8	133,42	Cq	-	3	133,51	-
3' y 7'	131,91	CH ₂	7,92 (d, 2H, J=6,6)	3' y 7'	132,04	6,89 (d, 2H, J=8,7)
9	125,18	CH	5,55 (s ancho, 1H)	2	125,28	5,56 (br, 1H)
2'	121,79	Cq	-	2'	122,05	-
4' y 6'	115,42	CH ₂	6,88 (d, 2H, J=6,6)	4' y 6'	115,52	7,92 (d, 2H, J=8,7)
4	86,89	Cq	-	10	86,98	-
6	71,14	CH	5,27 (td, 1H, J ₁ =7,80, J ₂ =2,1)	5	71,24	5,27 (ddd, 1H, J ₁ =10,5, J ₂ =10,5, J ₃ =2,8)
5	60,06	CH	n.d.	6	60,11	2,01 (d, 1H, J=10,5)
1	44,02	Cq	-	7	n.d.	-
10	41,40	CH ₂	n.d.	1	41,49	1,97 (m, 2H) 2,07 (dd, 1H, J ₁ =14,0, J ₂ =8,0)
7	41,22	CH ₂	2,29 (dd, 1H, J ₁ =10,5, J ₂ =1,8) 2,56 (t ancho, 1H, J ₁ =9,0)	4	41,24	2,29 (dd, 1H, J ₁ =14,0, J ₂ =2,8) 2,57 (dd, 1H, J ₁ =14,0, J ₂ =10,5)
2	40,98	CH ₂	n.d.	8	40,10	n.d.
11	37,09	CH	n.d.	11	37,10	n.d.
3	31,47	CH ₂	n.d.	9	31,49	n.d.
14	26,39	CH ₃	1,81 (s, 3H)	14	26,38	1,81 (s, 3H)
15	20,24	CH ₃	1,01 (s, 3H)	15	20,24	1,01 (s, 3H)
12	18,56	CH ₃	0,94 (d, 3H, J=5,1)	12	18,55	0,94 (d, 3H, J=6,7)
13	17,56	CH ₃	0,85 (d, 3H, J=5,1)	13	17,56	0,85 (d, 3H, J=6,7)

Tabla 5. 4. Comparación de datos espectrales en RMN (¹H 300 MHz, ¹³C 300 MHz, CHCl₃-d, 300°K, δ en ppm) del compuesto 1 Ext. y del p-hidroxibenzoato de jaeschkeanadiol (o ferutinina) (Diab *et al.*, 2001), n.d.; no determinado.

Espectros de MS y RMN del compuesto 2 Ext.

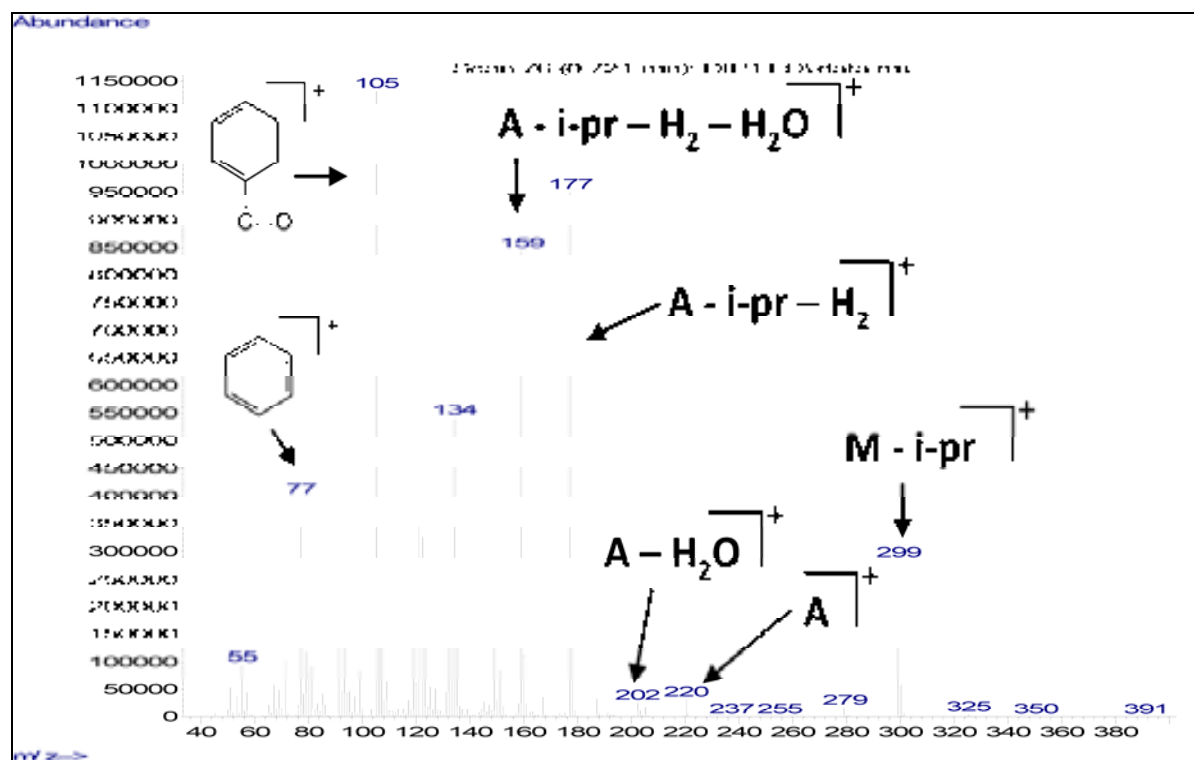


Figura 5.27. Espectro de EI-MS del compuesto 1Ext. M: molécula; A: aglicón sesquiterpénico.

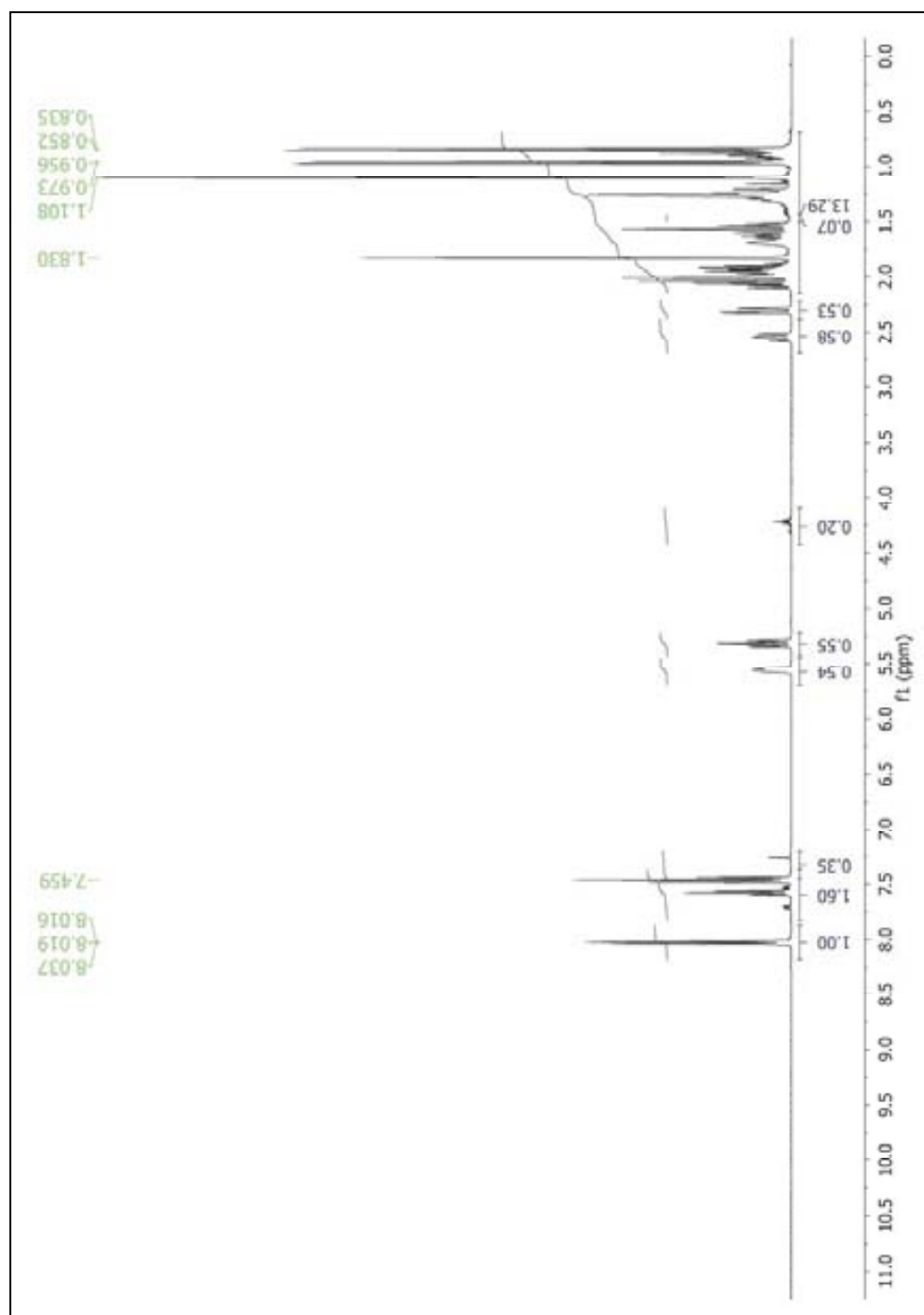


Figura 5.28. Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 2 Ext.

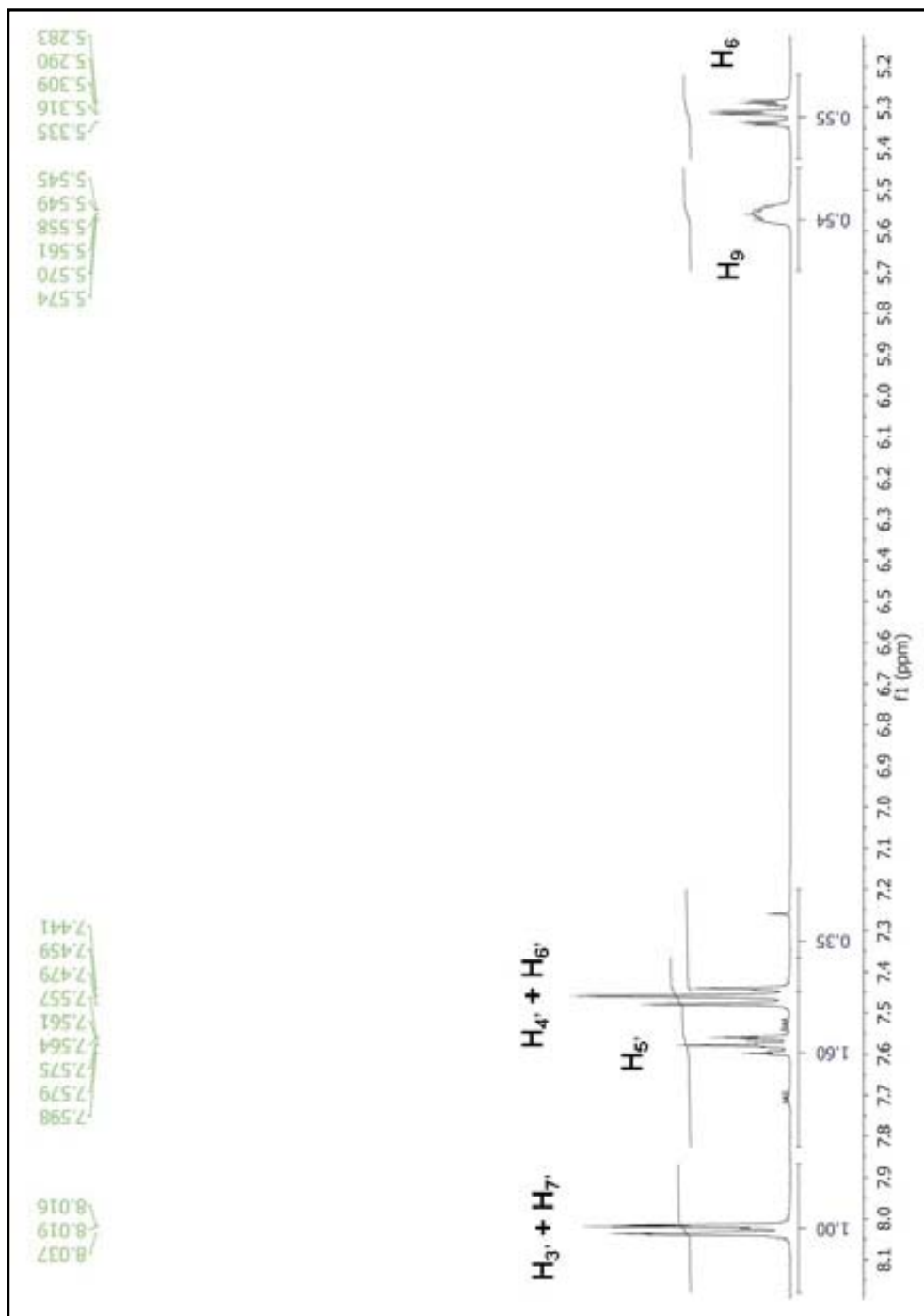


Figura 5.29. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto **2 Ext.** Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 5,0 a 8,2 ppm.

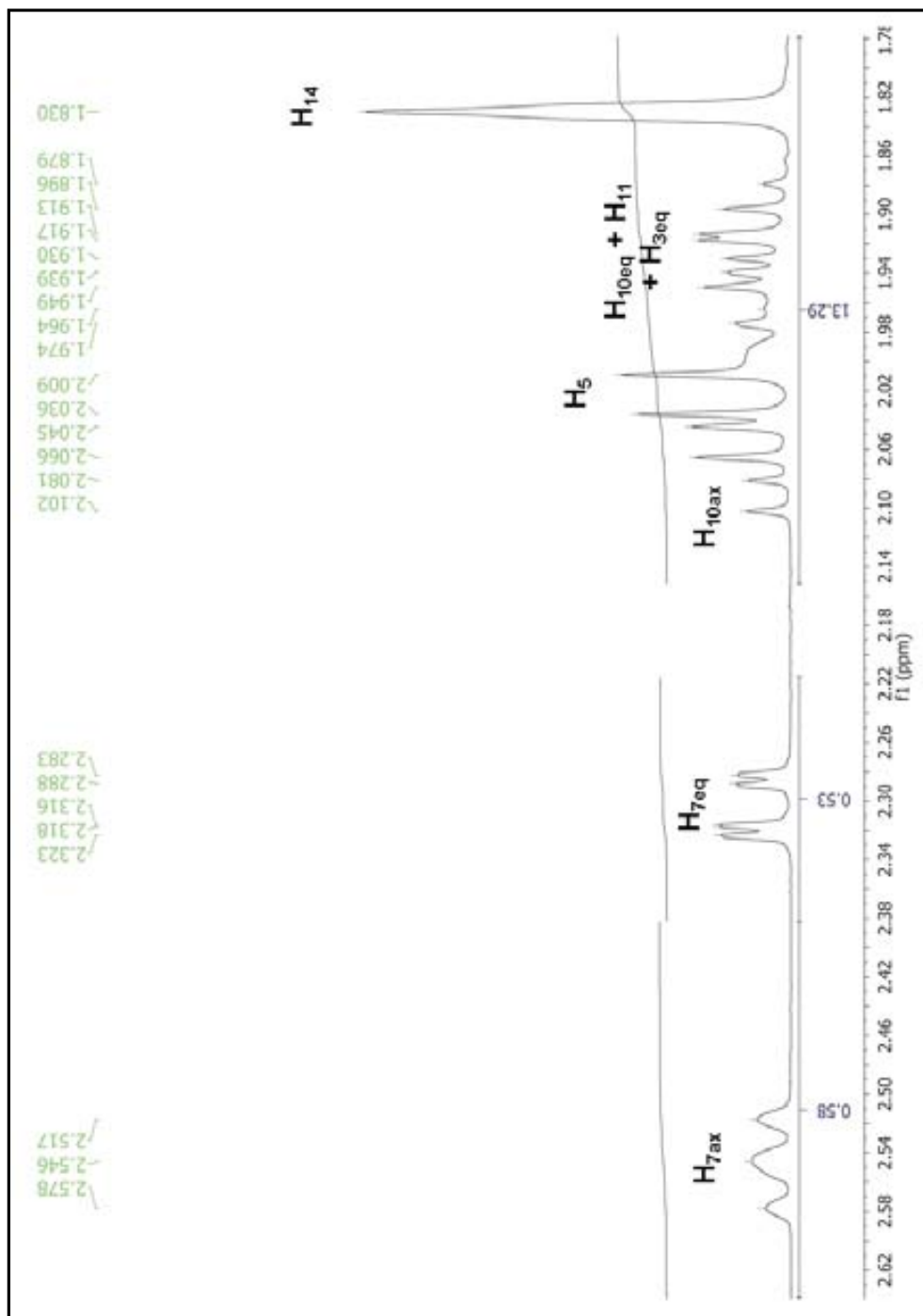


Figura 5.30. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25°C) del compuesto **2 Ext.** Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 1,7 a 2,7 ppm.

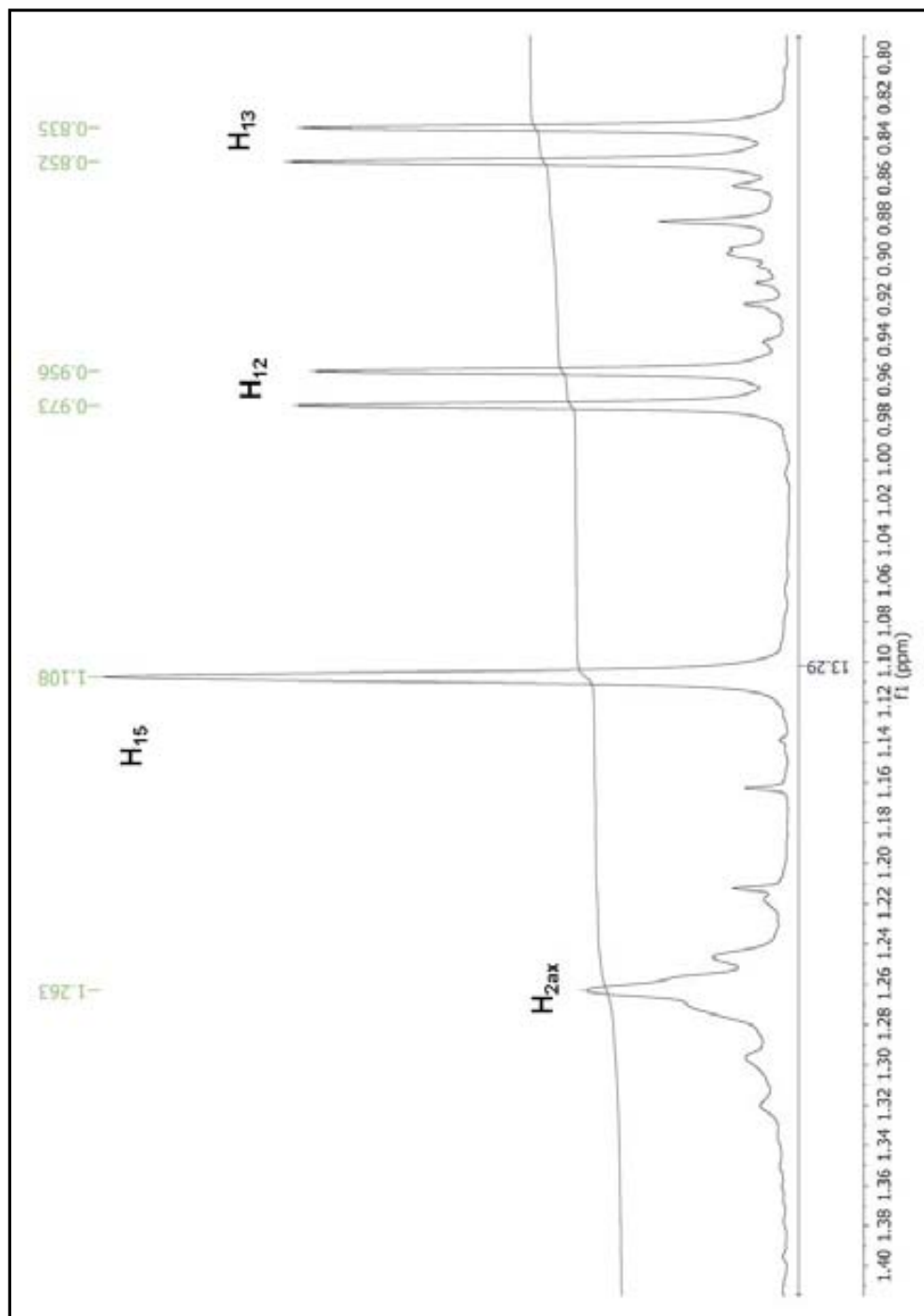


Figura 5.31. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$) del compuesto **2 Ext.** Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0 a 1,5 ppm.

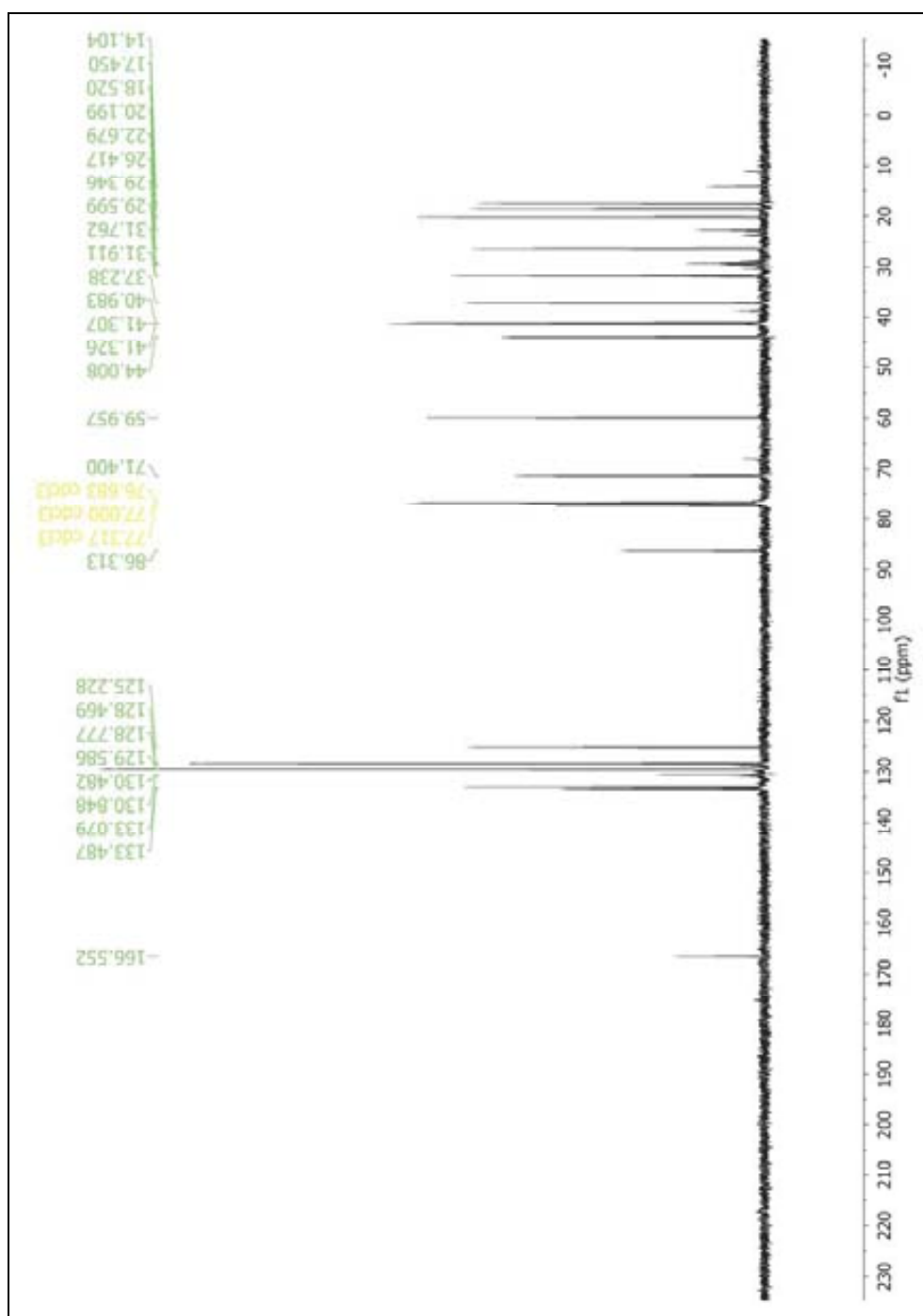


Figura 5.32. Espectro de ^{13}C -RMN (500 MHz, CHCl_3 -d, 25 °C) del compuesto 2 Ext.

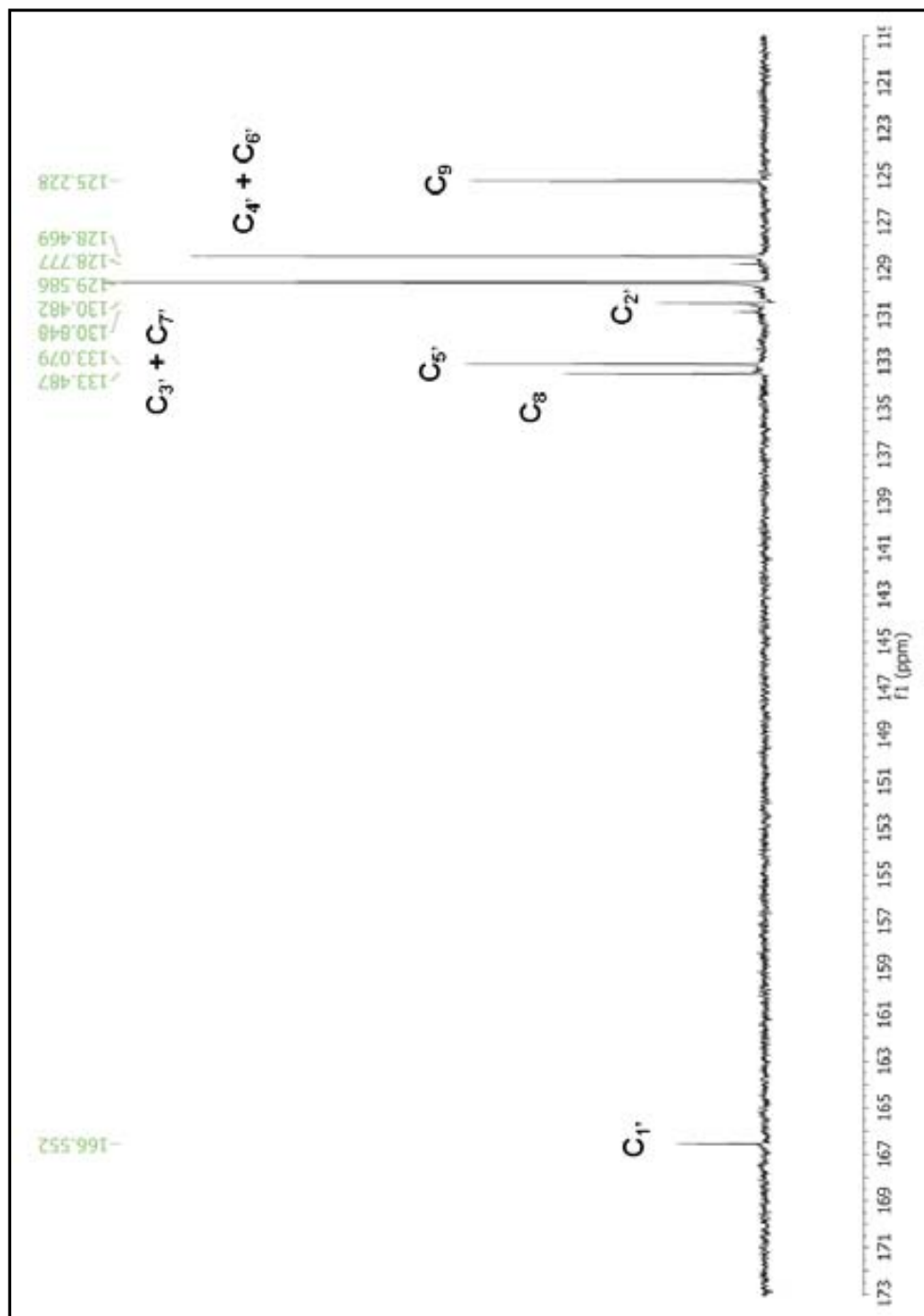


Figura 5.33. Espectro de ^{13}C -RMN (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto **2 Ext.** Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 119 a 173 ppm.

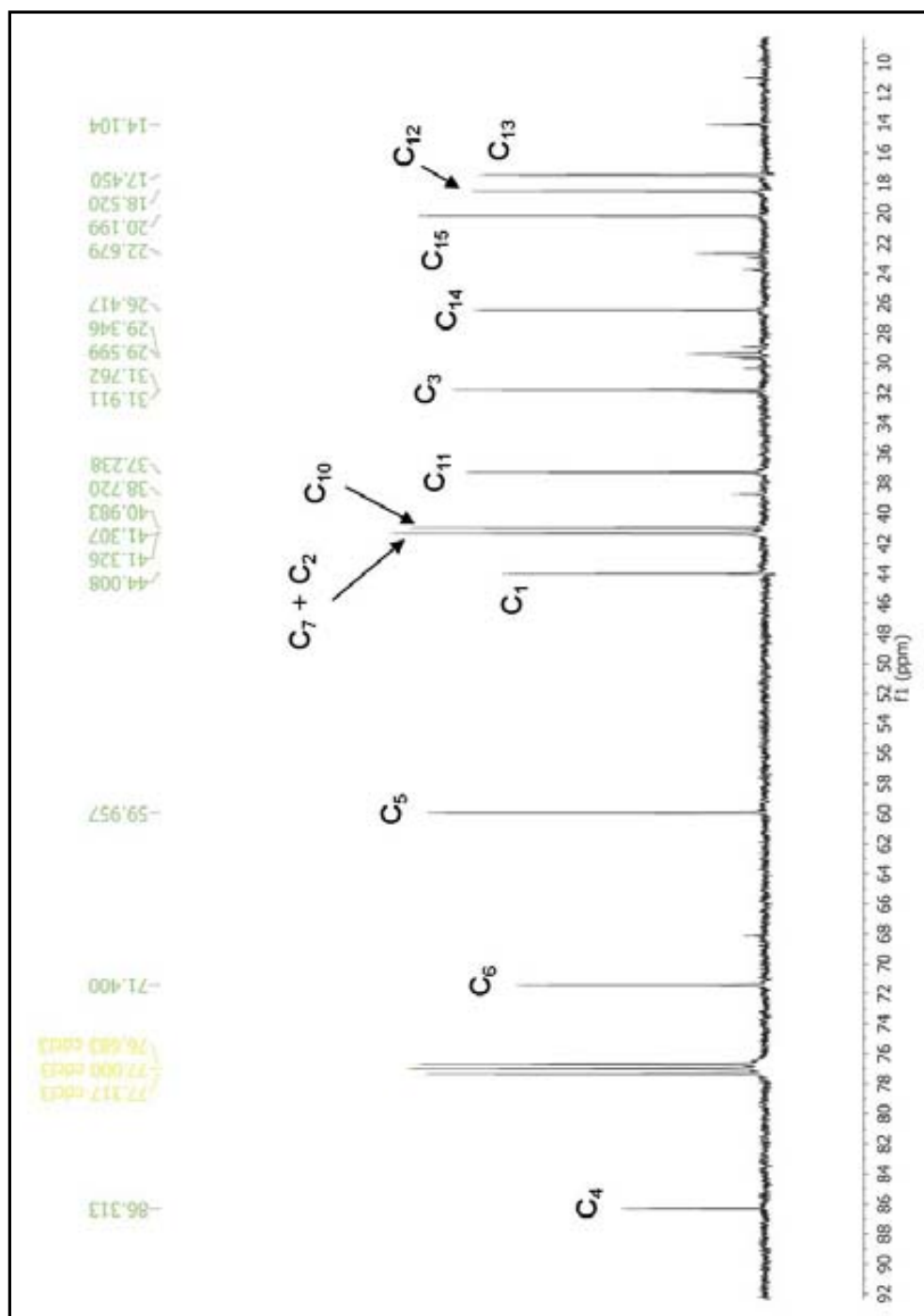


Figura 5.34. Espectro de ^{13}C -RMN (500 MHz, CHCl_3 -d, 25 $^\circ\text{C}$) del compuesto **2** Ext. Ampliación rangos de desplazamientos químicos de 0 a 92 ppm.

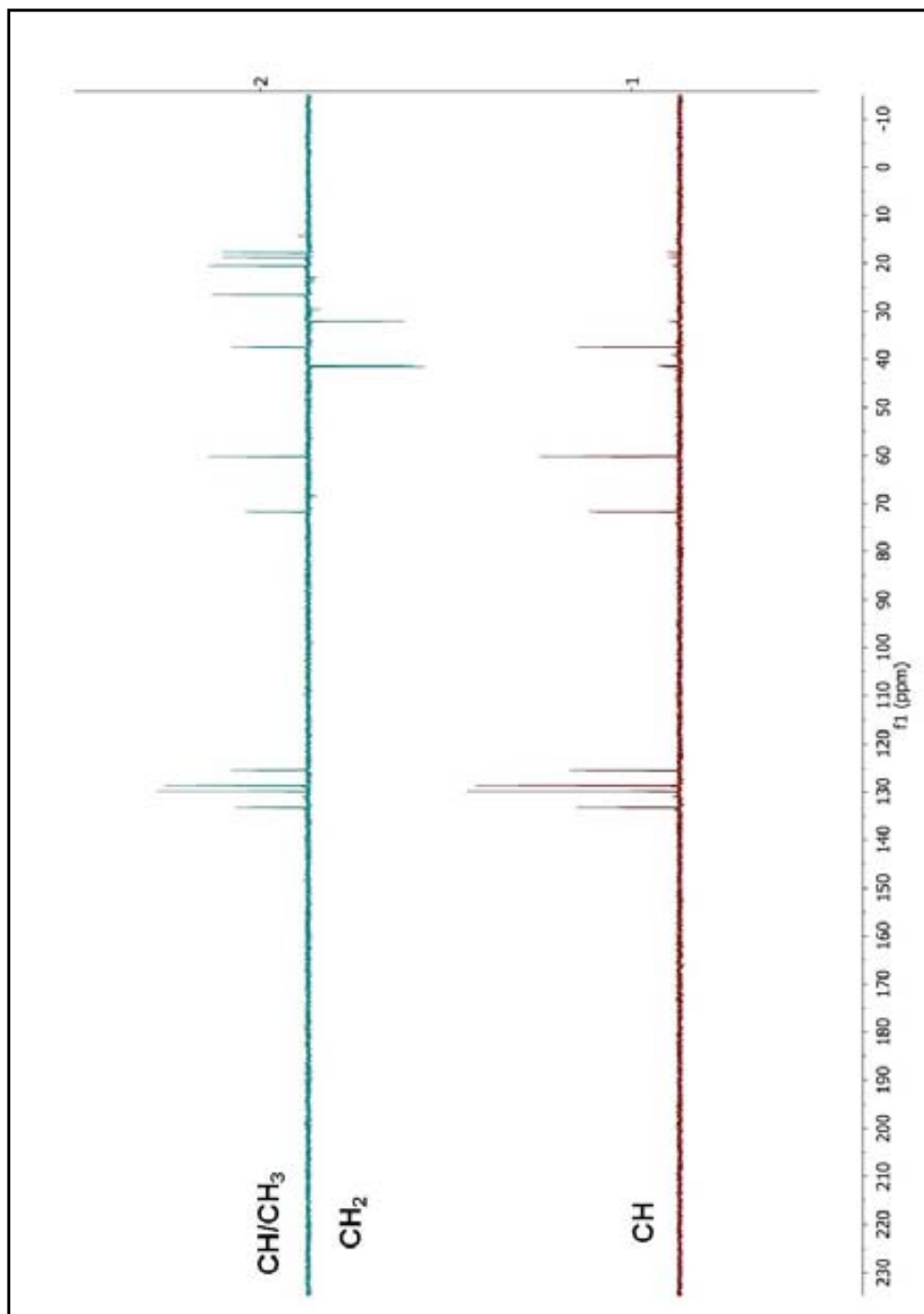


Figura 5.35. Espectro de DEPT (500 MHz, CHCl₃-d, 25 °C) del compuesto 2 Ext.

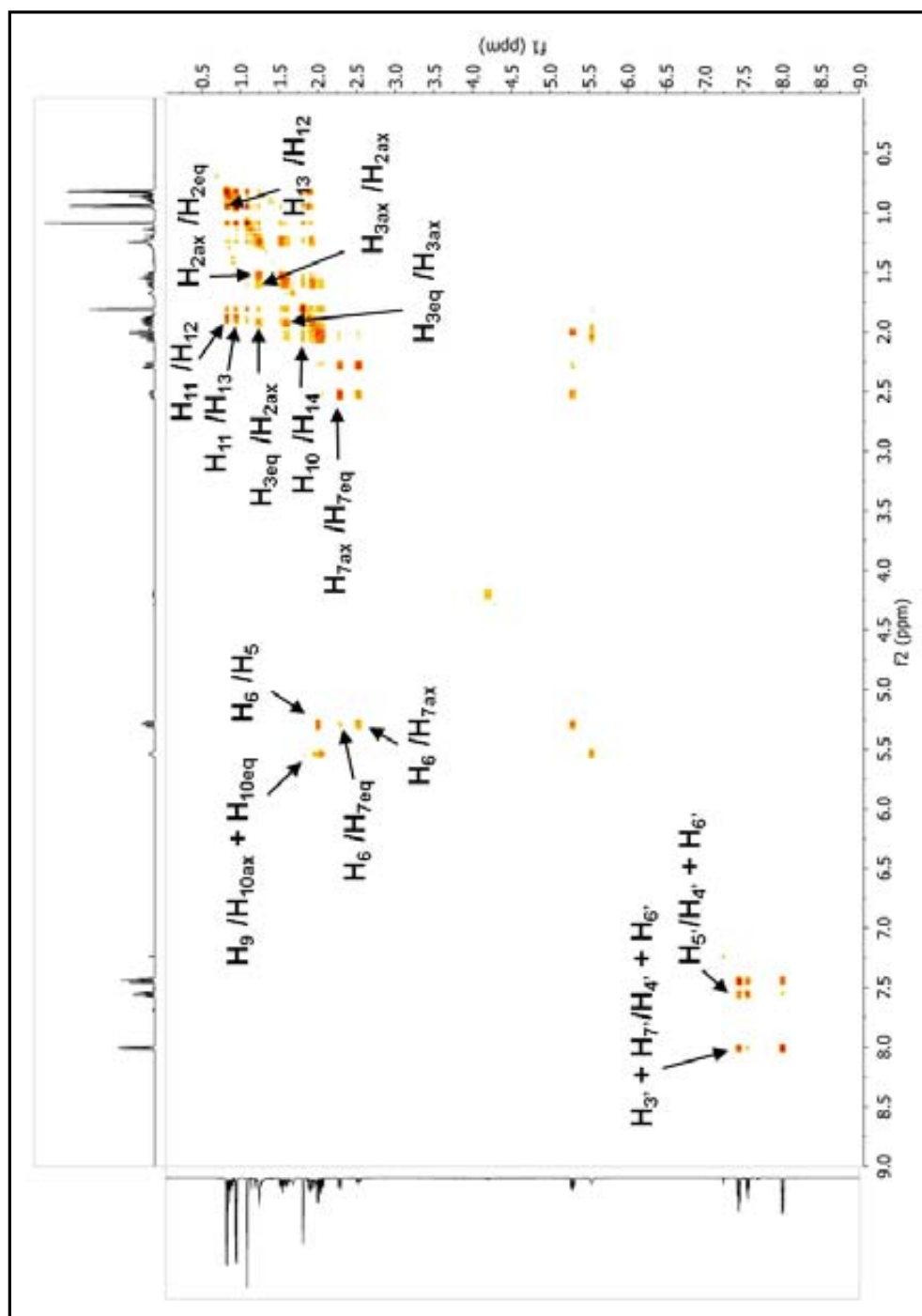


Figura 5.36. Espectro de COSY (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 2 Ext.

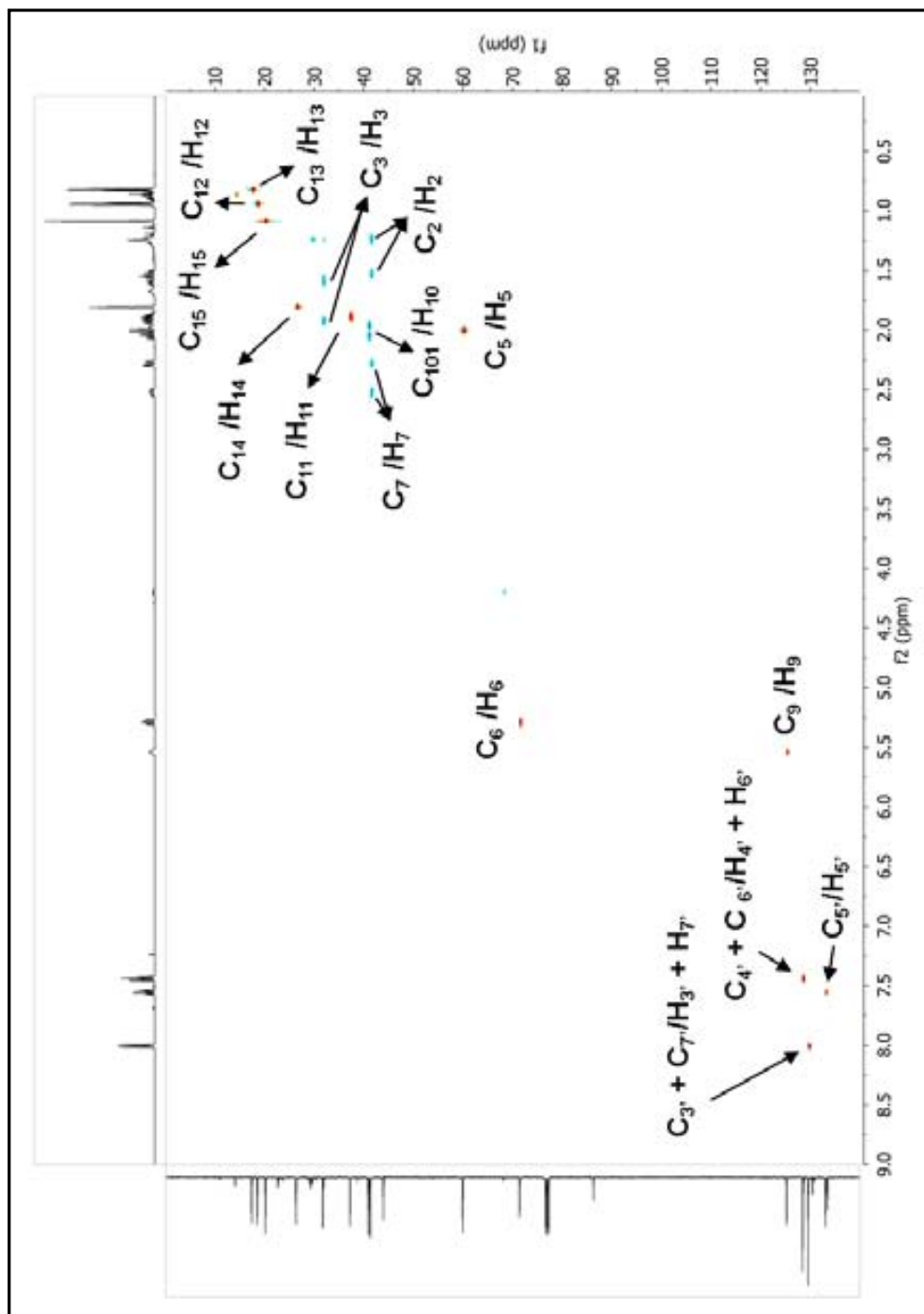


Figura 5.37. Espectro de HSQC (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 2 Ext.

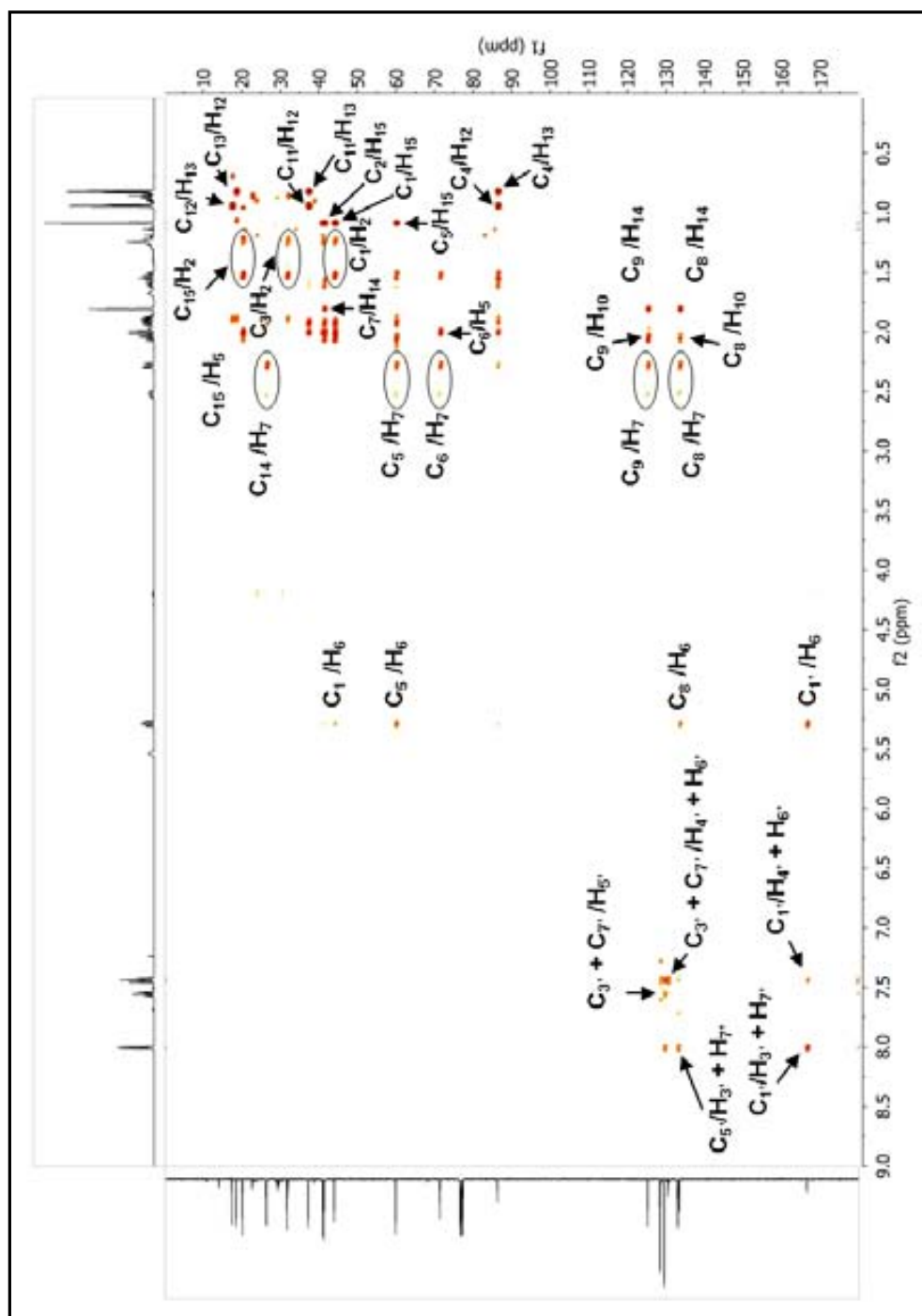


Figura 5.38. Espectro de HMBC (500 MHz, $\text{CHCl}_3\text{-d}$, 25 °C) del compuesto 2 Ext.

Compuesto 2 Ext.				Benzoato de jaeschkeanadiol		
Nº	¹³ C δ	DEPT	¹ H δ (mult., int., J (Hz))	nº	¹³ C δ	¹ H δ (mult., int., J (Hz))
1'	166,56	Cq	-	1'	166,62	-
8	133,49	Cq	-	3	133,55	-
5'	133,09	CH	7,56 (tt, 1H, J ₁ = 7, 25, J ₂ =1,5)	5'	133,14	7,42-7,62 (br, 3H)
2'	130,49	Cq	-	2'	130,56	-
3' y 7'	129,59	CH x 2	8,01 (dd, 2H J ₁ = 8,5, J ₂ =1,5)	3' y 7'	129,65	8,01-8,06 (br, 2H)
4' y 6'	128,47	CH x 2	7,44 (tt, 2H, J ₁ = 7,75, J ₂ =1,5)	4' y 6'	128,53	7,42-7,62 (br, 3H)
9	125,24	CH	5,54 (m, 1H)	2	125,29	5,56 (br, 1H)
4	86,31	Cq	-	10	86,38	-
4			1,68 (s ancho)			-
6	71,39	CH	5,29 (td, 1H, J ₁ = 10,5, J ₂ =3,0)	5	71,47	5,32 (ddd, 1H, J ₁ =11,6, J ₂ =10,4, J ₃ =2,9)
5	59,96	CH	2,00 (d, 1H, J = 10,5)	6	60,01	2,01 (d, 1H, J=10,5)
1	44,01	Cq	-	7	44,06	-
7	41,32	CH ₂	2,53 (t ancho, 1H, J = 12,0) 2,28 (dd, 1H, J ₁ = 14,0, J ₂ =3,0, J ₃ =1,0)	4	41,38	1,97 (m, 1H) 2,07 (dd, 1H, J ₁ =14,0, J ₂ =8,0)
2	41,32	CH ₂	1,53 (dd, 1H, J ₁ = 11,0, J ₂ =8,5) 1,2 aprox. (m, 1H)	8	41,37	2,29 (dd, 1H, J ₁ =14,0, J ₂ =2,8) 2,57 (dd, 1H, J ₁ =14,0, J ₂ =10,5)
10	40,97	CH ₂	2,05 (dd, 1H, J ₁ = 14,5, J ₂ =8,5) 1,97 (banda ancha, 1H)	1	40,05	n.d.
11	37,23	CH	1,9 aprox. (m, 1H)	11	37,30	n.d.
3	31,75	CH ₂	1,59 (ddd, 1H, J ₁ = 14,25, J ₂ =11,25, J ₃ =8,5) 1,9 aprox. (m, 1H)	9	31,83	n.d.
14	26,41	CH ₃	1,80 (s, 3H)	14	26,47	1,83 (s, 3H)
15	20,19	CH ₃	1,08 (s, 3H)	15	20,26	1,11 (s, 3H)
12	18,51	CH ₃	0,94 (d, 3H, J = 7)	12	18,57	0,97 (d, 3H, J=6,8)
13	17,44	CH ₃	0,82 (d, 3H, J = 7)	13	17,50	0,85 (d, 3H, J=6,8)

Tabla 5. 5. Comparación de datos espectrales en RMN (¹H 300 MHz, ¹³C 300 MHz, CHCl₃-d, 300°K, δ en ppm) del compuesto 2 Ext. y benzoato de jaeschkeanadiol (o teferidina) (Diab *et al.*, 2001), n.d.; no determinado.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

-
1. La evaluación de la actividad de diferentes productos extractivos obtenidos a partir de la raíz y rizoma de *Ferula hermonis* frente a diversas cepas de hongos oportunistas y patógenos humanos ha evidenciado que el aceite esencial es activo frente a todos los hongos ensayados, con CMI y CMF comprendidas entre 32 y 128 $\mu\text{g/mL}$. La mayor actividad se ha verificado frente a los dermatofitos *Tricophyton mentagrophytes* y *Microsporum gypseum*, este último con valores equivalentes de CMI y CMF (32 $\mu\text{g/mL}$).
 2. Los extractos hexánico y diclorometánico inhiben el crecimiento de los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*, siendo el primero de ellos la cepa más sensible con valores de CMI de 32 $\mu\text{g/mL}$ para ambos extractos y CMF de 32 $\mu\text{g/mL}$ en el caso del extracto diclorometánico y de 64 $\mu\text{g/mL}$ en el caso del hexánico. Los extractos metanólico y acuoso prácticamente no muestran actividad antifúngica, con CMI y CMF $\geq 256 \mu\text{g/mL}$.
 3. El análisis exhaustivo del aceite esencial, mediante GC-FID, GC-MS y ^{13}C -RMN, ha permitido identificar 79 compuestos que corresponden al 92,8% del total de la esencia. De ellos, 55 (36.1%) son sesquiterpenos y únicamente 21 (51,9%) son monoterpenos. El componente mayoritario es el α -pineno (43,3%), seguido de α -bisabolol (11,1%), 3,5-nonadiino (4,4%) y β -farneseno (3,2%).
 4. Es la primera vez que se describe la presencia de 3,5-nonadiino en el género *Ferula*. Se trata de un compuesto acetilénico poco usual, identificado con anterioridad únicamente en el aceite esencial de las raíces de dos Apiáceas: *Selinum tenuifolium* y *Cachrys ferulacea*.
 5. Entre los sesquiterpenos identificados en el aceite esencial se encuentran diversos ésteres derivados del núcleo del daucano. En particular: jaeschkeanadiol (ferutinol), benzoato de jaeschkeanadiol (teferidina) y angelato de jaeschkeanadiol. Este último es la primera vez que se describe en *F. hermonis*.

6. Los principales responsables de la actividad antifúngica del aceite esencial, obtenidos tras sucesivos fraccionamientos biodirigidos, son: α -pineno, 3,5-nonadiino, α -bisabolol, óxido de α -bisabolol B, *trans*-verbenol, angelato de jaeschkeanadiol y dos fracciones purificadas, una de ellas con 73% de benzoato de jaeschkeanadiol (JB73) y otra con un 50% de espatulenol. La actividad de cada uno de ellos se determinó frente a tres levaduras y cinco hongos filamentosos, siendo los más sensibles los dermatofitos *T. mentagrophytes* y *M. gypseum*, cuyos valores de CMI y CMF oscilan entre 0,25 y 128 $\mu\text{g/mL}$. La cepa más resistente ha sido *Penicillium purpurogenum*.

Los productos más activos son JB73, 3,5-nonadiino y α -bisabolol. La actividad más potente corresponde a JB73 frente a *T. mentagrophytes*, con CMI y CMF de 0,25 $\mu\text{g/mL}$, equivalentes a las del ketoconazol e inferiores a las de la anfotericina B (0,5 $\mu\text{g/mL}$) y nistatina (2 $\mu\text{g/mL}$). Por el contrario, la actividad de JB73 frente a *M. gypseum* es menor, con valores de CMI y CMF de 64 y 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Ambos dermatofitos son altamente sensibles al 3,5-nonadiino, cuyas CMI y CMF para *T. mentagrophytes* son de 8 $\mu\text{g/mL}$, mientras que en el caso de *M. gypseum* el valor de la CMF fue el doble que el de la CMI (16 y 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). El α -bisabolol, por su parte, muestra actividad fungicida y fungistática frente a las dos cepas de dermatofitos entre 16 y 32 $\mu\text{g/mL}$.

Entre los otros productos activos, sobresale la fracción con 50% de espatulenol cuyas CMI frente a *C. lactis-condensi* y CMI y CMF frente a *P. purpurogenum* son de 32 $\mu\text{g/mL}$.

De todos ellos, es la primera vez que se describe actividad antifúngica para el 3,5-nonadiino, el benzoato de jaeschkeanadiol y el angelato de jaeschkeanadiol.

7. El fraccionamiento biodirigido de los extractos hexánico y diclorometánico ha conducido al aislamiento de benzoato de jaeschkeanadiol (teferidina) y p-hidroxibenzoato de jaeschkeanadiol (ferutinina) como principales responsables de su

actividad antifúngica. De ellos, el último es el más potente, especialmente frente a *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* y *C. lactis-condensi*, cuyos valores de CMI y CMF oscilan entre 8 y 32 $\mu\text{g/mL}$, lo cual sugiere que el grupo hidroxilo fenólico participa de forma importante en la actividad.

Así pues, los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian el rizoma y las raíces de *F. hermonis* como una fuente potencial de agentes antifúngicos. Tanto su aceite esencial como los ésteres de sesquiterpenos derivados del daucano constituyen productos de posible interés para la industria farmacéutica para el desarrollo de nuevos antimicóticos, útiles particularmente en el tratamiento de infecciones producidas por dermatofitos.

CAPITULO 7

BIBLIOGRAFÍA

1. Abad, M.J., Ansuategui, M., Bermejo, P., 2007. Active antifungal substances from natural sources. *Arkivoc* 7, 116-145.
2. Abourashed, E.A., Galal, A.M., El-Ferally, F.S., Khan, I.A., 2001. Separation and quantification of the major daucane esters of *Ferula hermonis* by HPLC. *Planta Med.* 67, 681–682.
3. Abourashed, E.A., Galal, A.M., Shibl, A.M., 2011. Antimycobacterial activity of ferutinin alone and in combination with antitubercular drugs against a rapidly growing surrogate of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Res.* 25, 1142-1149.
4. Agrawal, P.K., 1992. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307-3330.
5. Ahmad, M., Maqbool, J. R., Sabir, A. W., Bhatti, M. K., 1987. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part LIV. *Ferula jaeschkeana* seeds and stalk oil. *Pakistan J. Sci. Ind. R.* 30(9), 667-668.
6. Akhgar, M.R., Rustaiyan, A., 2005. Essential oils of *Ferula microcolea* (Boiss.) Boiss. and *Ferula hirtella* Boiss. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 17, 237-238.
7. Al-Banna, L., Darwish, R.M., Aburjai, T., 2003. Effect of plant extracts and essential oils on root-knot nematode. *Phytopathol Mediterr* 42, 123–128.
8. Allouh, M.Z., 2011. Effect of *Ferula hermonis* root extract on rat skeletal muscle adaptation to exercise. *Exp. Biol.M.* 236, 1373–1378.
9. Al-Mughrabi, K.I., Aburjai, T.A., 2003. Fungitoxic activity of root extracts from *Ferula hermonis*. *Phytopathol Mediterr* 42: 141–148.
10. Al-Najar, H.A., Ismaeil, A., Bishr, M.M., Gaafar, M.M., Abbass, A.A., 2006. GC-MS Analysis and Antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula hermonis* L. (Zaloo). *Alex. J. Pharm. Sci.* 20, 17-19.
11. Al-sha'er, M., Darwish, R.M., Aburjai, T., 2001. Antimicrobial sesquiterpene from the roots of *Ferula hermonis*. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti*, XII, 255-264.
12. Al-Yahya, M.A., Muhammad, I., Mirza, H.H., El-Ferally, F.S., 1998. Antibacterial constituents from rhizomes of *Ferula communis*. *Phytother. Res.* 12, 335-339.
13. Aoun, E., Rima, J., Chidiac, G., Hanna, K., 2005. High-performance liquid chromatographic and spectrofluorometric determination of α -tocopherol in a

- natural plant: *Ferula hermonis* (zallooh root). J. food Compos. Ana. 18, 607–615.
14. Aqil, F., Zahin, M., Ahmad, I., Owais, M., Khan, M.S.A., Bansal, S.S., Farooq, S., 2010. Antifungal activity of medicinal plant extracts and phytochemicals: a review. In Ahmal, I., Owais, M., Shahid, M., Aqil, F. (Eds.), *Combating fungal infections. Problems and remedy* (Chapter 19). Springer, Heidelberg, pp. 449-484.
 15. Asakawa, Y., Hashimoto, T., Toyota, M., Nagashima, F., Irita, M., Yoshida, M., 1998. Novel sesqui- and diterpenoids from some selected liverworts. 29th International Symposium on Essential Oils, Frankfurt.
 16. Ashraf, M., Aziz, J., Mahmood, S., Bhatti, M. K., 1979a. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part XXIV. *Ferula costata* (Ghuttai) seed oil. Pakistan J. Sci. Ind. R. 22 (1-2), 89-91.
 17. Ashraf, M., Bhatti, M. K., 1979b. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part XXII. *Ferula foetida* Regel (Ushi) seed oil. Pakistan J. Sci. Ind. R. 22 (1-2), 84-86.
 18. Ashraf, M., Zaidi, S. A., Bhatti, M. K., 1979c. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part XXIII. *Ferula narthex* Boiss. l (Rao) seed oil. Pakistan J. Sci. Ind. R. 22 (1-2), 87-88.
 19. Auzi, A.A., Gray, A.I., Salem, M.M., Badwan, A.A., Sarker, S.D., 2008. Feruhermonins A-C: three daucane esters from the seeds of *Ferula hermonis* (Apiaceae). J. Asian Nat. Prod. Res. 10, 701-707.
 20. Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, L.K., Isenberg, H.D., Shadomy, H.J. 1991. *Manual of Clinical Microbiology* (5th edn). American Society for Microbiology, ASM Press: Washington D.C.
 21. Bastert, J., Schaller, M., Korting, H.C., Evans, E.G.V., 2001. Current and future approaches to antimycotic treatment in the era of resistant fungi and immunocompromised hosts. Int. J. Antimicrob. Agents 17, 81–91.
 22. Başer, K.H.C., Özek, T., Demirci, B., Kürkçüoğlu, M., Aytaç, Z., Duman, H., 2000. Composition of the essential oils of *Zosima absinthifolia* (Vent.) Link and *Ferula elaeochytris* Korovin from Turkey. Flavour Fragr. J. 15, 371-372.
 23. Beale, M.H., 1991. Biosynthesis of C5-C20 terpenoid compounds. Nat. Prod. Rep. 8, 441-454.
 24. Belaiche, T., Tantaoui-Eleraki, A., Ibrahimy, A., 1995. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. Sciences des aliments 15, 571-578.

-
25. Belz, R., 1981. Infra-red spectroscopy. Isolation and concentration of volatiles from the product phase, in: Maarse, H., Belz, R. (Eds.), Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research. Akademie-Verlag, Heidelberg, pp. 61-94.
26. Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ayadi, A., Ihlal, M., 1984. Method to study antimicrobial effects of essential oils: Application to the antifungal activity of Six Moroccan essences. *J. Food Protect.* 47, 748-752.
27. Benjlali, B., 1986. Sur trois plantes aromatiques et médicinales du Maroc: armoises, thym et origan. Chimie de leurs huiles essentielles, chimiotaxonomie et propriétés antimicrobiennes. Tesis Doctoral. Institut Agronomique et Veterinaire Hassan II. Maroc.
28. Betina, V., 1973. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatogr.* 78, 41-51.
29. Bocchi, M., Garlaschelli, L., Vidari, G., Mellerio, G., 1992. New farnesane sesquiterpenes from *Hebeloma senescens*. *J. Nat. Prod.* 55, 428-431.
30. Brasseur, T., Angenot, L., 1986. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol-PEG 400, un intéressant réactif de révélation des flavonoïdes. *J. Chromatogr.* 351, 351-355.
31. Breitmaier, E., 1993. Structure elucidation by NMR in organic chemistry. A practical guide. Wiley & Sons eds. Chichester, U.K.
32. Brieskorn, C.H., Nobeles, P., 1983. Two furanoid sesquiterpenes from the essential oil of *myrrh*. *Phytochem.* 22, 187-189.
33. Bruneton, J., 1995. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Lavoisier ed. Tec & Doc., Paris.
34. Caldwell, M., Archibald, F., 1987. The effect of the hypoferremic response on iron acquisition by and growth of murine lymphoma cells. *Biochem. Cell Biol.* 65, 651-657.
35. Chaplin, M.F., Kennedy, J.F., 1986. Carbohydrate analysis. A practical approach, in: The Practical Approach Series. IRL Press Limited, Oxford.
36. Colman-Saizarbitoria, T., Boutros, P., Amesty, A., Bahsas, A., Mathison, Y., Garrido, M.R., Israel, A., 2006. Ferutinin stimulates nitric oxide synthase activity in median eminence of the rat. *J. Ethnopharmacol.* 106, 327-332.
37. Cordell, G.A., 1977. Recent experimental and clinical data concerning antitumor and cytotoxic agents from plants. new natural products and plant

- drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity, Proceedings in Life Sciences, 54-81.
38. Cos, P., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D., Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. J. Ethnopharmacol. 106, 290–302.
39. Council of Europe, 2007. European Pharmacopeia, vol. 1, 6th ed. Directorate for the Quality of Medicines and Health Care of the Council of Europe, Strasbourg, pp.251–252.
40. Council of Europe, 2014 European Pharmacopoeia 8.1.
41. Cox, P.A., 1990. Ethnopharmacology and the Search for New Drugs, in: Chadwick, D.J., Marsh, J., (Eds.) Ciba Foundation Symposium n° 154- Bioactive Compounds from Plants. Wiley and Sons, New Jersey, pp. 40-55.
42. Craker, L.E., 1990. Herbs and volatile oils. Herb Spice Med. Plant. Diag. 8, 1-5.
43. Cruz, I., Cheetham, J.J., Arnason, J.T., Yack, J.E., Smith, M.L. 2014. Alkamides from *Echinacea* disrupt the fungal cell wall-membrane complex. Phytomedicine, 21: 435-442.
44. Cruz, T., Cabo, M.M., Castillo, M.J., Jimenez, J., Ruiz, C., Ramos-Cormenzana, A., 1993. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of different samples of *Thymus baeticus* boiss. Phytoter. Res. 7, 92-94.
45. Dai, B., Qiu, C., 1992. Comparison of constituents of essential oils from two species of *Ferula* in Chinese traditional drugs by GC-MS. Yaowu Fenxi Zazhi 12(5), 285-288.
46. Dalmases, P., Bonet, J.J., 1984. Técnicas de cromatografía líquido-sólido en columna. Afinidad 141, 11-126.
47. Deans, S.G., Svoboda, K.P., 1990. The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. Flavour Fragr. J. 5, 187-190.
48. Deighton, N., Glidewell, S.M., Deans, S.G., Goodman, B.A., 1993. Identification by EPR spectroscopy of carvacrol and thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. J. Sci. Food Agric. 63, 221-225.
49. Derome, A.E., 1989. The use of NMR spectroscopy in the structure determination of natural products: Two dimensional methods. Nat. Prod. Rep. 6, 111.

-
- 50.Dev, V., Oka, M., Mathela, C. S., Murari, N. D., Stevens, T. H., 1984. The volatile constituents of the roots of *selinum tenuifolium*. J. Nat. Prod. 47, 5, 904-905.
- 51.Di Santo, R., 2010. Natural products as antifungal agents against clinically relevant pathogens. Nat. Prod. Rep., 27, 1084-1098.
- 52.Diab, Y., Dolmazon, R., Bessière, J. M., 2001a. Daucane esters composition from the Lebanese *Ferula hermonis* Boiss. (zallooh root). Flavour Fragr. J. 16, 120-122.
- 53.Diab, Y., Dolmazon, R., Fenet, B., 2001b. 2,3- α -Epoxyjaeschkeanadiol 5-benzoate from *Ferula hermonis* Boiss. Flavour Fragr. J. 16, 397-400.
- 54.Dokovic, D. D., Bulatovic, V. M., Bozic, B. D., Kataranovski, M. V., Zratic, T. M., Kovacevic, N. N., 2004. 3, 5-Nonadiyne isolation from the rhizome of *Cachrys ferulacea* inhibits endogenous Nitric oxide release by rat peritoneal macrophages. Chem. Pharm. Bull. 52 (7) 853-854.
- 55.Dorman, H.J.D., Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 88: 308-316.
- 56.Elisabetsky, E., 1991. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. J. Ethnopharmacol. 32, 235-239.
- 57.El-Thaher, T.S., Matalka, K.Z., Taha, H.A., Badwan, A.A., 2001. *Ferula hermonis* 'zallouh' and enhancing erectile function in rats: efficacy and toxicity study. Int. J. Impot. Res. 13, 247-251.
- 58.Farag, R.S., Daw, Z.Y., Abo-Raya, S.H., 1989. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of Aflatoxins in a synthetic medium. J. Food Sci. 54, 74-76.
- 59.Farnsworth, N.R., Soejarto, D.D., 1991. Global importance of medicinal plants. Conservation of medicinal plants in: Akerele, O. (Eds.) Cambridge University Press, 25-50.
- 60.Ferrari, B., Tomi, F., Casanova, J., 2005. Composition and chemical variability of *Ferula communis* essential oil from Corsica. Flavour Fragr. J. 20, 180-185.
- 61.Filippini, M.H., Tomi, F., Casanova, J., 2000. Composition of the leaf oil of *Ferula arrigonii* Bocchieri. Flavour Fragr. J. 15, 195-198.
- 62.Forrest, J.E., Heacock, R.A., Forrest, T.P., 1972. Identification of the major components of the essential oil of mace. J. Chromatogr. A 69, 115-121.

63. Freeman, R.R., 1981. High Resolution Gas Chromatography, Second Edition. Hewlett-Packard Inc., Palo Alto, California.
64. Freixa, B., 2001. Búsqueda de principios antifúngicos de especies vegetales latinoamericanas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia, UB. Barcelona.
65. Galal, A., 2000. Sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. Pharmazie 55, 961-962.
66. Galal, A.M., Abourashed, E.A., Ross, S.A., ElSohly, M.A., Al-Said, M.S., El-Ferally, F.S., 2001. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. J. Nat. Prod. 64, 399-400.
67. Gamal-Eldeen, A., Hegazy, M.-E.F., 2010. A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. Nat. Prod. Res. 24, 246-257.
68. Gentry, A.H., 1993. Tropical Forest Biodiversity and the Potencial for New Medicinal Plants in: Kinghorn, A.D., Balandrin, M.F. (Eds.). ACS Symposium Series, 534. American Chemical Society, Washington, pp.13-24.
69. Geroushi, A., Auzi, A.A., Elhwuegi, A.S., Elzawam, F., Elsherif, A., Nahar, L., Sarker, S.D., 2011. Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*. Phytoter. Res. 25, 774-777.
70. Ghannadi, A., Amree, S., 2002. Volatile oil constituents of *Ferula gummosa* Boiss. from Kashan, Iran. J. Essent. Oil Res. 14, 420-421.
71. Ghannadi, A., Sajjadi, S.E., Beigihasan, A., 2002. Composition of the essential oil of *Ferula ovina* (Boiss.) Boiss. from Iran. Daru J. Pharm. Sci. 10, 165-167.
72. Ghosh, P., Sil, P., Thakur, F., 1987. Spray reagent for the detection of Coumarins and Flavonoids on thin-layer plates. J. Chromatogr. 403, 285-287.
73. Gonzalez-Sierra, M., Khalid, S.A., Duddeck, H., 1988. Interpretation of two-dimensional NMR spectra: a pedagogical approach. Fitoterapia 60, 100-122.
74. Gonzalez-Sierra, M., Khalid, S.S., Duddeck, H., 1989. Interpretation of two-dimensional NMR spectra: a pedagogical approach. Fitoterapia 60, 99.
75. Goryaev, M.I., Sharipova, F.S., Tikhonova, L.K., El'chibekova, L.A., 1971. Substances present in essential oils. LIII. Comparative study of the chemical composition of essential oils of the above ground and root parts of *Ferula penninervis* plants. Izvest. Akad. Nauk Kazak. SSR Ser. Khim. 21, 49-53.
76. Habibi, Z., Salehi, P., Yousefi, M., Hejazi, Y., Laleh, A., Mozaffarian, V., Masoudi, S., Rustaiyan, A., 2006a. Chemical composition and antimicrobial

-
- activity of the essential oils of *Ferula latisecta* and *Mozaffariania insignis* from Iran. Chem. Nat. Compd. 42 (6), 689-692.
77. Habibi, Z., Aghaie, H. R., Ghahermanzadeh, R., Masoudi, S., Rustaiyan, A., 2006b. Composition of the essential oils of *Ferula szowitsiana* DC. *Artemisia squamata* L. and *Rhabdosciadium petiolare* Boiss. and *Hauskn ex Boiss.* three umbelliferae herbs growing wild in Iran. J. Essent. Oil Res. 18(5), 503-505.
78. Hadacek, F., Greger, H., 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. Phytochem. Analysis 11, 137-147.
79. Hadidi, K.A., Aburjai, T., Battah, A.K., 2003. A comparative study of *Ferula hermonis* root extracts and sildenafil on copulatory behavior of male rats. Fitoterapia 74, 242–246.
80. Hall, I.H., Lee, K-H., Mar, E.C., Starnes, C.O., 1977. Antitumor agents. 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by Tenulin and Helenalin and related Cyclopentenones. J. Med. Chem. 20, 333-337.
81. Hanke, F.J., Kubo, I., 1989. Assigning ¹³C-NMR resonances of natural products. J. Nat. Prod. 52, 1237-1245.
82. Hanson, J.R., 1993. Diterpenoids. Nat. Prod. Rep. 10, 159-174.
83. Harborne, J.B., Turner, B.L., 1984. Plant, scents and odours, in: Plant chemosystematics. Academic Press, London.
84. Hauck, H.E., Mack, M., Jost, W., 1990. Sorbents and Precoated Layers in Thin-Layer Chromatography, in: Shermo, J., Fried, B. (Eds.), Handbook of Thin-Layer Chromatography. Ed., Dekker, New York.
85. Heywood, V.H., 1985. Las plantas con flores. Editorial Reverté, S.A., Barcelona.
86. Hilan, C., Sfeir, R., El Hage, R., Jawich, D., Frem, M.E., Jawher, K., 2007. Evaluation of the antibacterial activities of *Ferula hermonis* (Boiss.). Lebanese Sci. J. 8, 135-151.
87. Holmstedt, B., 1991. Historical perspective and future of ethnopharmacology. J. Ethnopharmacol. 32, 7-24.
88. Homady, M.H., 2001. Changes in the testicular and preutial gland structures of mice related to influence of *Ferula hermonis* extract. The Sciences 1, 108–112.

89. Homady, M.H., Khleifat, K.M., Tarawneh, K.A., Al.Raheil, I.A., 2002. Reproductive toxicity and infertility effect of *Ferula hermonis* extracts in mice. *Theriogenology* 57, 2247–2256.
90. Homans, A.L., Fuchs, A., 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.* 51, 325-327.
91. Hostettmann, K., Hostettmann, M., 1982. Isolation Techniques for Flavonoids, in Harborne, J.B., Mabry, T.J. (Eds.), *The flavonoids: Advances in Research*. Chapman & may, London, pp. 1-18.
92. Hostettmann, K., 1985. Isolation and identification of saponins and related terpenoid glycosides in: Vlietinck, A.J., Dommissse, R.A. (Eds.), *Advances in Medicinal Plant Research*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, pp. 225-241.
93. Hostettmann, K., Hostettmann, M., Marston, A., 1986. Preparative chromatography techniques. Springer-Verlag, Berlin, pp. 7-65.w
94. Ibraheim, Z.Z., Abdel-Mageed, W.M., Dai, H., Guo, H., Zhang, L., Jaspars, M., 2012a. Antimicrobial antioxidant daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Phytoter. Res.* 26, 579-589.
95. Ibraheim, Z.Z., Abdel-Mageed, W.M., Jaspars, M., 2012b. Triterpenoid saponins from *Ferula hermonis* Boiss. *Biochem. Syst. Ecol.* 40, 86-90.
96. Ikeda, K., Arao, Y., Otsuka, H., Nomoto, S., Horiguchi, H., Kato, S., Kayama, F., 2002. Terpenoids found in the Umbelliferae family act as agonists/antagonists for ER and ER: differential transcription activity between ferutinine-liganded ER and ER. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 354–360.
97. Iranshahi, M., Amin, G., Sourmaghi, M.S., Shafiee, A., Hadjiakhoondi, A., 2006. Sulphur-containing compounds in the essential oil of the root of *Ferula persica* Willd. Var. *persica*. *Flavour Fragr. J.* 21, 260-261.
98. Iranshahi, M., Hassanzadeh-Khayyat, M., Sahebkar, A., Famili, A., 2008. Chemical composition of the fruit oil of *Ferula flabelliloba*. *J. Essent. oil Bear. Pl.* 11(2), 143-147.
99. Izac, R.R., Bandurraga, M.M., Wasylyk, J.M., Dunn, F.W., Fenical, W., 1982. Germacrene derivatives from diverse marine soft-corals (Octocorallia). *Tetrahedron* 38, 301-304.

-
100. Izco, J., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J., Fernández, F., Gallardo, T., Llimona, X., Salvo, E., Talavera, S., Valdés, B., 2003. Botánica, Cuarta reimpresión. McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U., Madrid.
 101. Jacob, M. R., Walker, L. A. 2005. Natural Products and Antifungal Drug Discovery. In: Methods in Molecular Medicine, Vol. 118: Antifungal agents: Methods and Protocols. E. J. Ernst and P. D. Rogers (Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ.
 102. Janson, J.C., 1967. Adsorption phenomena on Sephadex. J. Chromatogr., 28, 12-20.
 103. Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., Baerheim-Svendsen, A., 1987. Antimicrobial activity of essential oils: A 1976-1986 Literature review. Aspects of the test methods. Planta Med. 53, 395-398.
 104. Jorgensen, J.H., Turnidge, J.D., Washington, J.A., 1999. Antibacterial susceptibility test: Dilution and disk diffusion methods, in: Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H. (Eds.), Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition. American Society for Microbiology. ASM Press, Washington D.C.
 105. Joustra, M., Soderovist, B., Fisher, L., 1967. Gel filtration in organic solvents. J. Chromatogr. 28, 21.
 106. Kapahi, B. K., Thappa, R. K., Aggarwal, S.- G., Sarin, Y. K., 1985. Essential oil of *Ferula jaesekheana* Vatke. PAFAI J. 7(1), 23-24.
 107. Karim, A., Bhatti, M. K., 1978. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part XIX. *Ferula ovina* Boiss. (Kamyan) oils distilled from the mature and the immature seeds and the roots of the plant. Pakistan J. Sci. Ind. R. 21, 75-77.
 108. Karim, A., Ashraf, M., Bhatti, M. K., 1979. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbelliferae. Part XXVI. *Ferula oopoda* Boiss Buhse, oil from seeds, stalks and roots. Pakistan J. Sci. Ind. R. 22, 198-201.
 109. Khan, M.S.A., Ahmad, I. 2011. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Tricophyton rubrum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90, 1083-1094.
 110. Khleifat, K., Homady, M.H., Tarawneh, K.A., Shakhanbeh, J., 2001. Effect *Ferula hermonis* extract on social aggression, fertility and some physiological parameters in prepubertal male mice. Endocr. J. 48, 473-482.

111. Kramer, R.E., 1984. Antioxidants in spices: Literature survey and identification clove. Technical report, Science & Advanced Technology Laboratory, Natick (Massachusetts). pp: 1-26.
112. Kuete, V., Wiench, B., Hegazy, M-E.F., Mohamed, T.A., Fankam, A.G., Shahat, A.A., Efferth, T., 2012. Antibacterial activity and cytotoxicity of selected Egyptian medicinal plants. *Planta Med.* 78, 193-199.
113. Lang, G., Buchbauer, G. 2012. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. *Flavour Fragr J* 27: 13–39.
114. Lev, E., Amar, Z., 2002. Ethnopharmacological survey of traditional drugs sold in the Kingdom of Jordan. *J. Ethnopharmacol.* 82, 131–145.
115. Lhuillier, A., Fabre, N., Cheble, E., Oueida, F., Maurel, S., Valentin, A., Fourasté, I., Moulis, C., 2005. Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *J. Nat. Prod.* 68, 468–471.
116. Luckner, M., 1990. Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals, 3rd ed. Springer-Verlag, Berlin.
117. Luthra, R., 1999. Redefined role of mevalonate isoprenoid pathway in terpenoid biosynthesis in higher plants. *Curr. Sci.* 76, 133-135.
118. Macrae, R., Robinson, P.K., Sadler, M.J., 1993. *Encyclopaedia of food science, Food technology and nutrition.* Academic Press, London.
119. Maggi, F., Lucarini, D., Tirillini, B., Sagratini, G., Papa, F., Vittori, S., 2009. Chemical análisis of the essential oil of *Ferula glauca* L. (Apiaceae) growing in Marche (central Italy). *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 432-441.
120. Majors, R.E., Enzweiler, T., 1989. Flash chromatography. *LC-GC Int.*, 2,10-15.
121. Mandava, N.B., Ito, Y., 1988. Counter-current chromatography: Theory and practice. Marcel Dekker Inc., New York.
122. Manguro, L.O.A., Mukonyi, K.M., Githiomi, J.K., 1996. Bisabolenes and Furanosesquiterpenoids of Kenyan *Commiphora kua* Resin. *Planta Med.* 62, 84-85.
123. Marston, A., Hostettmann, K., 1987. Antifungal, molluscicidal and cytotoxic compounds from plants used in traditional medicine, in: Hostettmann, K., Lea, P.J. (Eds.), *Biologically active natural products.* Clarendon Press, Oxford, pp. 65-83.

-
124. Martin, G.E., Crouch, R.C., 1991. Inverse-detected two dimensional NMR methods: Applications in natural products chemistry. *J. Nat. Prod.* 54, 1-70.
125. Massó, J.L., 1992. Contribución de la etnofarmacología a la obtención de nuevos fármacos de origen vegetal. Discurso en el acto de recepción como académico numerario de la Real Academia de Farmacia de Barcelona (9 de abril). Imprenta Palé, S.A. (Palafrugell).
126. Mathew, B.P., Nath, M., 2009. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *Chem. Med. Chem.* 4, 310–323.
127. Miski, M., Ulubelen, A., Mabry, T.J., 1983. Six sesquiterpene alcohol esters from *Ferula elaeochytris*. *Phytochemistry* 22, 2231–2233.
128. Mölleken, U., Sinnwell, V., Kubeczka, K-H., 1998. The essential oil composition of fruits from *Smyrniium perfoliatum*. *Phytochemistry* 47, 1079-1083.
129. Mundina, M., Vila, R., Tomi, F., Tomàs, X., Ciccio, J.F., Adzet, T., Casanova, J., Cañigüeral, S., 2001. Composition and chemical polymorphism of the essential oils from *Piper lanceaefolium*. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 739-748.
130. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C., Tenover, R.H., 1999. *Manual of Clinical Microbiology*, seventh ed. American Society for Microbiology, ASM Press, Washington, DC. Nakatani, N., 1992. Natural antioxidants from spices. American Chemical Society. Symposium series 507, 72-86.
131. Omidbaigi, R., Sefidkon, F., 2002. Essential oil content and composition of *Ferula gumosa* cultivated in Iran. *J. Essent. oil-Bear. Pl.* 5(3), 154-157.
132. Ozek, G., Ozek, T., Iscan, G., Baser, K. H-C., Duran, A., Hamzaoglu, E., 2007. Composition and antimicrobial activity of the oils of *Ferula szowitsiana* DC. from Turkey. *J. Essent. Oil Res.* 20(2), 186-190.
133. Paik, G., Suggs, M.T., 1981. Reactivos, Tinciones y Pruebas Diversas, in: Lennete, E.H., Spaulding, E.H., Truant, J.P. (Eds.), *Manual de Microbiología Clínica*, 5ª Edition. Ed. Salvat, Barcelona, pp. 943-961.
134. Plameira-de-Oliveira, A., Palmeira-de-Oliveira, R., Gaspar, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Martínez-de-Oliveira, J., Queiroz, J.A., Rodrigues, A.G. 2013. Association of *Thymbra capitata* essential oil and chitosan (TCCH hidrogel): a putative therapeutic tool for the treatment of vulvovaginal candidosis. *Flavour Fragr. J.*, 28, 354-359.
135. Pasto, D.J., Jonson, C.R., 1997. *Determinación de estructuras orgánicas*. Ed. Reverté, Barcelona, pp. 273-328.

136. Pfaller, M.A., Diekema, D.J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133–163.
137. Pharmacia Biotech, 1993. *Gel Filtration: Principles and Methods*.
138. Picman, A.K., 1986. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem. Syst. Ecol.* 14, 255-281.
139. Pina-Vaz, C., Gonçalves Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M. J., Martínez-de-Oliveira, J. 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds, *JEADV*, 18, 73-78.
140. Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M. J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A., Martínez-de-Oliveira, J. 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.*, 55, 1367-1373.
141. Plunkett, G. M., Chandler, G. T., Lowry II, P. P., Pinney, S. M., Sprenkle, T. S., 2004. Recent advances in understanding Apiaceae and a revised classification. *S. African J. Bot.* 70, 371-381.
142. Pimenov, M.G., Leonov, M.V., 1993. *The genera of the Umbelliferae*. Royal Botanic Gardens, Kew.
143. Poli, F., Appendino, G., Sacchetti, G., Ballero, M., Maggiano, N., Raneletti, F.O. 2005. Antiproliferative effects of daucane esters from *Ferula communis* and *F. arrigonii* on human colon cancer cell lines. *Phytoter. Res.* 19: 152–157.
144. Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T., Cañigüeral, S., 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 76, 93–98.
145. Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Ferro, E., Parella, T., Casanova, J., Cañigüeral, S., 2005. Antifungal sesquiterpene from the root of *Vernonanthura tweedieana*. *J. Ethnopharmacol.* 97, 49–52.
146. Potter, T.L., Fagerson, I.S., 1990. Composition of Coriander Leaf Volatiles. *J. Agric. Chem.* 38, 2054-2056.
147. Pourgholami, M.H., Majzoob, S., Javadi, M., Kauralinajed, M., Fanaee, G.H.R., Sayyah, M., 2000. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsivants effects in mice. *J. Ethnopharmacol.* 66, 211-215.
148. Prescott, T.A.K., Rigby, L.P., Veitch, N.C., Simmonds, S.J. 2014. The haploinsufficiency profile of α -hederin suggests a caspofungin-like antifungal mode of action. *Phytochemistry*, 101: 116-120.

-
149. Pyun, M.S., Shin, S., 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Tricophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine* 13, 394-400.
150. Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E., Hostettman, K., 1991. A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochem. Analysis* 2, 199-203.
151. Rahman, A., 1989. One and two dimensional NMR spectroscopy. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
152. Raja, D., Blanché, C., Vallès-Xirau, J., 1997. Contribution to the knowledge of the pharmaceutical ethnobotany of La Segarra Region (Catalonia, Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* 57, 149-160.
153. Recio, M.C., Ríos, J.L., Villar, A., 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1987-1988. *Phytoter. Res.* 3, 117-124.
154. Rios, J.L., Simeon, S., Jimenez, F.J., Zafra-Polo, M.C., Villar, A., 1986. Reagents for screening medicinal plants by thin-layer chromatography. A review. *Fitoterapia* 57, 153-162.
155. Rios, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. *Screening* methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 23, 127-149.
156. Rivier, L., Bruhn, J.G., 1979. Editorial. *J. Ethnopharmacol.* 1, 1.
157. Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L., Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. *Phytomedicine* 15, 635-638.
158. Rouzet, M., 1991. The pharmacist in the quality control of essential oils. *An. Bromatol.* 43, 257-266.
159. Rustaiyan, A., Assadian, F., Monfared, A., Masoudi, S., Yari, M., 2001a. Composition of the volatile oil of *Ferula stenocarpa* Boiss. & Hausskn. *J. Essent. Oil Res.* 13, 181-182.
160. Rustaiyan, A., Monfared, A., Masoudi, S., 2001b. The essential oil of *Ferula flabelliloba* Rech. F. et Aell. *J. Essent. Oil Res.* 13, 403-404.
161. Rustaiyan, A., Monfared, A., Masoudi, S., Ameri, N., 2002. Essential oils of the stem and root of *Ferula galbaniflua* Boiss. Et Buhse. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 14, 286-287.

162. Sadler, I.H., 1988. The use of NMR Spectroscopy in the structure determination of natural products: One dimensional methods. *Nat. Prod. Rep.* 5, 101-127.
163. Saidkhozhaev, A.I., Nikonov, G.K. 1974. Components of the roots of *Ferula ovina*. *Khim Prir Soedin* 4: 526–527.
164. Saidkhozhaev, A.I., Nikonov, G.K. 1976. The structure of teferidin, a new ester from the fruit of *Ferula tenuisecta*. *Khim Prir Soedin* 1: 105–106.
165. Sayyah, M., Kamalinejad, M., Hidage, R. B., Rustaiyan, A., 2001. Antiepileptic potential and composition of the fruit essential oil of *Ferula gummosa* Boiss. *Iran. Biomed. J.* 5(2&3), 69-72.
166. Schilcher, V.H., 1984. Äterische Öle Wirkungen und Nebenwirkungen. *Deutsche Apotheker Zeitung* 124, 1433-1442.
167. Sefidkon, F., Askari, F., Mirza, M., 1998. Essential oil composition of *Ferula assa-foetida* L. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* 10, 687-689.
168. Seibl, J., 1973. *Espectrometría de Masas*. Ed. Alhambra, Madrid.
169. Shoolery, J.N., 1984. Recent developments in ¹³C-NMR and proton-NMR. *J. Nat. Prod.* 47, 226-259.
170. Sinitsin, G. S., Suyunshalieva, U. Kh., Dembitskii, A. D., Krotova, G. I., Kovalenko, T. A., Khvalibova, S. B., 1982. Study of bioecology, phytochemistry and pharmacology of *Ferula iliensis*. *Vestnik Akademii Nauk Kazakhskoi* 4, 39-43.
171. Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H., Schimper, A.F.W., 2004. *Tratado de Botánica*, 35ª edición. Ediciones Omega, Barcelona.
172. Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S.A., Gupta, M., 2010. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *J. Ethnopharmacol.* 127, 137–158.
173. Tateo, F., Santamaria, L., Bianchi, L., Bianchi, A., 1989. Basil oil and tarragon oil: Composition and genotoxicity evaluation. *J. Essent. Oil Res.* 1, 111-118.
174. Ten Noever de Braw, M.C., Van Ingen, C., 1981. Combination of gas chromatography and mass spectrometry in: Maarse, H., Belz, R. (Eds.) *Isolation, separation and identification of volatile compounds in aroma research*. D. Reidel Publishing Co., Berlin, pp. 156-171.

-
175. Tharakan, B., Manyam, B.V., 2005. Review botanical therapies in sexual dysfunction. *Phytoter. Res.* 19, 457–463.
176. Thevissen, K., Kristensen, H.H., Thomma, B.P.H.J., Cammue, B.P.A., François, I.E.J.A., 2007. Therapeutic potential of antifungal plant and insect defensins. *Drug Discov. Today* 12, 966–971.
177. Tomi, F., Casanova, J., 2006. ¹³C-NMR as a tool for identification of individual components of essential oils from Labiatae: a review. *Acta Hort.* 723, 185–192.
178. Traboulsi, A.F., El-Haj, S., Tueni, M., Taoubi, K., Abi Nader, N., Mrad, A., 2005. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 61, 597–604.
179. Trease, G.E., Evans, W.C., 1991. *Farmacognosia*. Interamericana, McGraw-Hill Eds., México.
180. Ultee, A., Bennik, M.H.J., Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1561–1568.
181. Unger, K.K., Janzen, R., 1986. Packings and stationary phases in preparative column liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 373, 227-264.
182. Valcarcel, M., Gómez, A., 1990. Cromatografía líquida en columna in: *Técnicas analíticas de separación*. Editorial Reverté, Barcelona, pp. 485-586.
183. Vallés, J., Bonet, A., 1996. Panorámica de la recerca etnobotànica a la Península Ibèrica, les illes Balears i els Pirineus, in: Viñas, M. (Ed.), *La recerca a la Facultat de Farmàcia de Barcelona*, Universitat de Barcelona. Barcelona, pp. 241-250.
184. Van den Berghe, D.A., Vlietinck, A.J., 1991. Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents from Higher Plants, in: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*. Volume 6. Assays for Bioactivity. Academic Press Ltd., San Diego, pp. 47-69.
185. Vila, R., Freixa, B., Cañigüeral, S. 2013. Antifungal compounds from plants. In: Muñoz-Torrero, D., Cortés, A., Mariño, E.L. (Eds.) *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III*: 23-43. Transworld Research Network, Kerala (India).
186. Vila, R., Santana, A.I., Pérez-Rosés, R., Valderrama, A., Castelli, M.V., Mendonça, S., Zacchino, S., Gupta, M.P., Cañigüeral. 2011. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol. *Biores. Technol.*, 101, 2510-2514.

187. Wagner, H., Blatt, S., Zgainski, E.M., 1984. Plant Drug Análisis-a Thin Layer Chromatography Atlas. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, pp. 299-304
188. Zafra-Polo, M.C., Blazquez, M.A., 1991 Antiinflammatory activity of sesquiterpene lactones from *Artemisia barrelieri* in rats. *Phytoter. Res.* 5, 91-93.
189. Zanolli, P., Benelli, A., Rivasi, M., Baraldi, C., Vezzalini, F., Baraldi, M., 2003. Opposite effect of acute and subchronic treatments with *Ferula hermonis* on copulatory behavior of male rats. *Int. J. Impot. Res.* 15, 450–455.
190. Zanolli, P., Rivasi, M., Zavatti, M., Brusiani, F., Vezzalini, F., Baraldi, M., 2005a. Activity of single components of *Ferula hermonis* on male rat sexual behavior. *Int. J. Impot. Res.* 17, 513-518.
191. Zanolli, P., Zavatti, M., Rivasi, M., Baraldi, M., 2005b. *Ferula hermonis* impairs sexual behavior in hormone-primed female rats. *Physiol. Behav.* 86, 69–74.
192. Zavatti, M., Montanari, C., Zanolli, P., 2006. Role of ferutinin in the impairment of female sexual function induced by *Ferula hermonis*. *Physiol. Behav.* 89, 656–661.
193. Zavatti, M., Benelli, A., Montanari, C., Zanolli, P., 2009. The phytoestrogen ferutinin improves sexual behavior in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 16, 547-554.
194. Zuzarte, M., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Canhoto, J., Vale-Silva, L., Silva, M. J., Pinto, E., Salgueiro, L. 2011. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her. *J. Med. Microbiol.*, 60, 612-618.
195. Zuzarte, M., Vale-Silva, L., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Vaz, S., Canhoto, J., Pinto, E., Salgueiro, L. 2012. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31, 1359-1366.