



RESUMEN.

El presente trabajo se realizó con la finalidad de que la metodología desarrollada para la determinación de la actividad antibacteriana de *Hypericum laricifolium*, pueda ser aplicada para el estudio de otras especies del género *Hypericum*. En la investigación se determinó la actividad antibacteriana de los extractos y de las fracciones del *Hypericum laricifolium* recolectados en tres lugares de la provincia del Azuay frente a *Staphylococcus aureus*, considerando una posible influencia en variación de la actividad antibacteriana entre los extractos debido al factor lugar.

Los extractos metanólicos de las partes aéreas de las plantas, se obtuvieron por percolación, evaporación del solvente y liofilización. Las fracciones de los extractos crudos, se obtuvieron por cromatografía en columna y por la unión de bandas según su similitud.

Para el análisis microbiológico, se utilizó el método de microdilución en placa, que permite la cuantificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), basada en el crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones del extracto y fracciones, que actúan como posibles antimicrobianos. Los indicadores de la actividad antibacteriana, determinados mediante la técnica de microdilución fueron, CMI-50, CMI-90 y los extractos positivos se caracterizaron según su acción en bacteriostáticos y bactericidas.



Los resultados obtenidos revelan que tanto los extractos y algunas de las fracciones presentan actividad antibacteriana frente al el *S. aureus*.

Las fracciones positivas, resultado del análisis microbiológico se ensayaron en HPLC y TLC para determinación de Hiperforina responsable de la actividad antibacteriana.

Palabras Claves: *Hypericum laricifolium*, Microdilución, Cromatografía.



ÍNDICE.

INTRODUCCIÓN.	8
CAPÍTULO I	15
1. MARCO TEÓRICO.....	16
1.1. PLANTAS MEDICINALES.	16
1.1.1. GENERALIDADES.	16
1.2. PROCESAMIENTO DE LAS DROGAS VEGETALES.	17
1.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA.	17
1.2.2. RECOLECCIÓN.....	18
1.2.3. TRANSPORTE.	19
1.2.4. SELECCIÓN.	19
1.2.5. LAVADO.	19
1.2.6. CONSERVACIÓN DE LAS DROGAS.....	19
1.2.7. ALMACENAMIENTO.	22
1.2.8. OBTENCIÓN DE DROGAS Y PRINCIPIOS ACTIVOS.	23
1.3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE COMPONENTES. ...	26
1.3.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	26
1.3.2. CONCEPTO DE CROMATOGRAFÍA.....	26
1.3.3. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS O TECNICAS CROMATOGRÁFICAS.	27
1.3.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	28
1.4. METABOLITOS SECUNDARIOS.	31
1.4.1. FENOLES Y POLIFENOLES, FENOLES SIMPLES Y ÁCIDOS FENÓLICOS.....	32
1.4.2. QUINONAS.....	33
1.4.3. FLAVONOIDES (FLAVONAS, FLAVONOIDES Y FLAVONOLAS).	34
1.4.4. TANINOS.....	34
1.4.5. CUMARINAS.	35
1.4.6. TERPENOS Y ACEITES ESENCIALES.	35
1.4.7. ALCALOIDES.	35
1.4.8. LECTINAS Y POLOPÉPTIDOS.....	36
1.5. HYPERICUM.....	36
1.5.1. ETIMOLOGÍA.....	36
1.5.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA TAXONÓMICA.	37
1.5.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:.....	37



1.5.5. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS.....	38
1.5.6. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA.	38
1.5.7. ESPECIES:.....	38
1.6. PRINCIPIOS ACTIVOS.....	40
1.6.1. NAFTODIANTRONAS.	40
1.6.2. FLOROGLUCINOL.	41
CAPÍTULO II	42
2. MATERIALES Y MÉTODOS.	43
2.1. LOCALIZACIÓN.....	43
2.2. MATERIALES.	43
2.3. MÉTODOS.	44
2.3.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	44
2.3.2. ÁREA DE ESTUDIO Y RECOLECCIÓN.....	44
2.3.3. LAVADO.	45
2.3.4. DESECACIÓN.	45
2.3.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.	46
2.3.6. AGOTAMIENTO DE LA DROGA.....	48
2.3.7. PREPARACION DE EXTRACTOS.....	48
2.3.8. LIOFILIZACIÓN DE EXTRACTOS.....	49
2.3.7. TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN:	50
2.3.8. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.	54
2.3.9. CONCENTRACIÓN DE FRACCIONES.....	55
2.3.10. CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	57
2.3.11. VISUALIZACIÓN DE LA HIPERFORINA.....	57
2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
2.4.1. ANÁLISIS DE VARIANCIAS (ANOVA) CON UN SOLO FACTOR PARA LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DEL HYPERICUM LARICIFOLIUM.....	58
2.4.2. COMANDOS PARA EL PROGRAMA “R”.	59
CAPÍTULO III	61
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES.	81
RECOMENDACIONES.	82



ANEXOS	84
BIBLIOGRAFÍA.	88



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Andrea Soledad Abril Novillo, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Andrea Soledad Abril Novillo
010483751-3



Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Andrea Soledad Abril Novillo, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Andrea Soledad Abril Novillo
010483751-3



Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Jessica Priscila Calle López, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

JJ CALLE LÓPEZ

Jessica Priscila Calle López
010283849-7



Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Jessica Priscila Calle López, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

J. CALLE LÓPEZ

Jessica Priscila Calle López
010283849-7



Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“VALIDACIÓN DE LA METÓDICA PARA EL ANÁLISIS DE
FRACCIONES DE EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA”.**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORES:

ANDREA SOLEDAD ABRIL NOVILLO
JÉSSICA PRISCILA CALLE LÓPEZ

DIRECTOR:

DR. FABIÁN LEÓN TAMARIZ PHD.

CUENCA-2012



DEDICATORIA.

A Dios, a mis padres y hermanos, por ser mi fortaleza, por darme su amor incondicional y por brindarme su apoyo, comprensión y confianza.

Andrea.

A Dios por este regalo tan maravilloso la vida, a mis padres por todo el sacrificio y el apoyo que me han brindado, a mi hermana por sus consejos y a mi amigo novio y esposo por estar junto a mí.

Jéssica



AGRADECIMIENTO.

Son muchas las personas a las que nos gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de nuestra vida. A todas aquellas que formaron parte directa o indirectamente, de este proyecto, para que se haga realidad.

A nuestros padres y hermanos por acompañarnos, darnos ánimo y entender nuestras ausencias y malos momentos.

De manera especial queremos agradecer a nuestro director de tesis Dr. Fabián León Tamariz PhD por aceptar ser nuestro guía en la realización de este proyecto y por su capacidad para orientar nuestras ideas por el camino correcto, gracias por el tiempo, paciencia, sabiduría brindados a lo largo de esta etapa.

De igual manera hacemos extensivo este agradecimiento a todas las personas que forman parte del proyecto VLIR de plantas medicinales, Dra. Isabel Wilches, Dra. Lourdes Jerves, Dra. Nancy Cuzco, Dra. Eugenia Peñaherrera, Dra. Rafaella Ansaloni, Dra. Lorena Cordero, Ing. Vladimiro Tobar, gracias por su ayuda sus consejos y apoyo.

Gracias a todos.



INTRODUCCIÓN.

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación y la curación de enfermedades. Las llamadas plantas medicinales eran veneradas por las virtudes algunas de las veces mágicas que se les atribuían, los conocimientos sobre las mismas eran transmitidos de generación en generación. En la actualidad cientos de plantas medicinales y sus productos derivados son utilizadas en medicina, la ciencia moderna analiza y estudia los efectos terapéuticos de las plantas, con el fin de precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, sin disminuir la confianza en la naturaleza. Generando de esta forma la necesidad de aislar nuevos principios activos de plantas con actividad antibacteriana que puedan ayudar a solucionar en parte los problemas sanitarios. Para lograr este objetivo, la utilización de métodos de análisis y separación confiables como son las técnicas cromatográficas sobre los extractos vegetales y sus principios activos es una práctica científica común que, sin embargo, requiere de una estandarización y validación previa con el fin de generalizar su aplicación como herramienta analítica en la evaluación farmacológica de las plantas medicinales.

Debido a la inquietud generada el objetivo principal de esta tesis se basa en ser un preámbulo de estudios posteriores en el análisis y aislamiento de extractos y fracciones metanólicas del *Hypericum sp.* Siguiendo una metodología prolija desde el comienzo con la finalidad de poder emplear este trabajo como una herramienta en cualquier investigación que siga estos lineamientos.



En el desarrollo de la presente tesis se abordó de forma exclusiva la metodología empleada para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos y fracciones del *Hypericum laricifolium*.



Capítulo I



1. MARCOTEÓRICO.

1.1. PLANTAS MEDICINALES.

1.1.1. GENERALIDADES.

El uso de las plantas medicinales ha sido desde la antigüedad de gran importancia para el hombre pues en ellas encontró a más del alimento, propiedades con las que se podía curar o mitigar ciertas enfermedades, transmitiendo estos conocimientos de generación en generación. (Hernández & Gally Jordá, 1981)(Hasegawa, 1991)

En la actualidad las plantas son utilizadas en la medicina, como materia prima para la producción de extractos o para la extracción de principios activos con actividad farmacológica que puedan de alguna manera servir para la terapia, prevención y aplicación en enfermedades. Por lo tanto, los estudios sobre plantas medicinales han adquirido cada vez mayor importancia, así como también las técnicas que se utilizan para reconocer los principios activos de las plantas. Además cabe recalcar que el crecimiento constante de la población, la aparición de nuevas variaciones en ciertas enfermedades y el no hallar la cura para otras, ha hecho que el uso de las plantas medicinales sea cada vez más necesario. (Castillo & Bobadilla, 2008) (Hoogesteger, 1994) (Sharapin, 2000) (Yaniv & Bachrach, 2005)

A continuación se detalla conceptos básicos sobre plantas medicinales, droga vegetal y principios activos que nos ayudan a entender su importancia:



Planta medicinal: Las plantas medicinales son aquellas que poseen en alguna de sus partes o en toda la planta actividad farmacológica, es decir tiene la propiedad de curar, atenuar o prevenir alguna enfermedad, pudiendo hacer uso de esta con fines médicos. (Jover Botella & García Bermejo, 2003)

Droga vegetal: Representa cada una de las partes activas de la planta vegetal o algún tipo de sustancia secretada por ella, que es responsable de su utilidad terapéutica. (Cortes & Ort, 2003) (Jover Botella & García Bermejo, 2003)

- **Principio activo:** Los principios activos son aquellas sustancias de composición química establecida (aisladas), a las que se les atribuye la acción farmacológica de la droga vegetal. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario (Cortes & Ort, 2003)

1.2. PROCESAMIENTO DE LAS DROGAS VEGETALES.

1.2.1. IDENTIFICACIÓN DE LA PLANTA.

Las plantas son conocidas generalmente por dos nombres, el vulgar, que es propio de cada región o lugar en donde se encuentra la planta, y el nombre científico que es universal y sirve para su identificación. Esta identificación debe



ser establecida por una persona idónea que sepa de la materia (farmacognosista, botánico) y usando como fuente de referencia un herbario indexado. (Paz, 1992)

1.2.2. RECOLECCIÓN.

La recolección se debe realizar en la época del año adecuada, donde exista mayor concentración de los principios activos. El momento del día es importante se debe realizar en horas de la mañana evitando llegar al medio día porque existe más calor y no se lo debe realizar en las noches por la mayor humedad, además dependiendo de la planta se puede recolectar en su etapa de vida joven, madura, vieja o florida. (World Health Organization, 2003)

Al momento de recolectar debemos escoger las plantas que se encuentren en mejor estado, sin restos de polvo, tierra u otros productos que puedan interferir de alguna manera en los análisis posteriores. Se recomienda en la mayoría de los casos recolectar solo las partes de interés de la planta medicinal y no de manera indiscriminada ya que estaríamos poniendo en riesgo la población vegetal silvestre. (Roldán, 2006) (World Health Organization, 2003)

Las partes de las plantas a utilizar deberían ser recolectadas teniendo en cuenta lo siguiente:

- Las hojas se recolectan cuando el proceso de fotosíntesis es más activo, es decir cuando se presentan más verdes, antes de la floración, durante la floración y antes de la maduración de los frutos.



- Las raíces se deben recolectar una vez que las partes aéreas se hayan marchitado por completo, tratando en lo posible de no cortar la raíz principal sino las laterales.
- Las flores se deben recolectar antes y durante la polinización.
- No deben ser recolectadas cuando están bañadas de rocío de la mañana o de lluvia. (Durango, 2009)

1.2.3. TRANSPORTE.

El transporte de las plantas se realiza en recipientes aireados (bolsas de malla, bolsas de papel periódico) para evitar el comienzo de pudrición por condensación del agua. El transporte debe ser realizado en el menor tiempo posible al lugar de procesamiento de la droga para evitar cambios en la calidad, apariencia externa y carga microbiana de la droga vegetal. (Muñoz, 1987)

1.2.4. SELECCIÓN.

Es la separación manual de los órganos de la planta que van a ser analizados de las partes que se encuentran en mal estado (manchas, señales de insectos, hongos o material defectuoso). (Muñoz, 1987)

1.2.5. LAVADO.

Permite la eliminación del material extraño de la planta (tierra, insectos, hojas secas, etc.) por medio de la aplicación de una corriente de agua potable y la aplicación final de agua destilada, al órgano vegetal seleccionado. (Muñoz, 1987)



1.2.6. CONSERVACIÓN DE LAS DROGAS.

Es necesario conservar la droga hasta el momento de su empleo o procesamiento, es importante considerar que una vez que se ha cortado la planta, esta experimenta un proceso de alteración que puede influir directamente en la actividad terapéutica de la droga vegetal. Estas alteraciones se deben a reacciones de naturaleza enzimática (hidrólisis, oxidaciones, polimerizaciones, etc.) que se producen en presencia de agua y que de una u otra manera afectan directamente a los principios activos, además de los procesos de putrefacción y enmohecimiento que afectan también la calidad de la droga. Para una buena conservación, lo principal es la eliminación de agua mediante el proceso de desecación consiguiendo así una inhibición de las reacciones enzimáticas y al mismo tiempo evitando la proliferación de hongos y bacterias. (López Briz & Salvador Martínez, 2007)

A continuación se describen las principales causas de las alteraciones que producen degradación de la especie vegetal:

1.2.6.1. Causas de alteración interna: Las principales causas son las alteraciones enzimáticas, las cuales catalizan reacciones que llevan a la degradación de la especie vegetal. Estas son más activas cuando la droga recolectada posee cantidades de agua superiores al 70%. Las reacciones enzimáticas más comunes son: hidrólisis de glúcidos, de ésteres, de heterósidos; oxidaciones; condensaciones y polimerizaciones; isomerizaciones y racemizaciones. (Durango, 2009)



1.2.6.2. Causas de alteración externa: Las más comunes son el calor, las radiaciones, la humedad, el ataque de parásitos, microorganismos, insectos, entre otros, son factores que se deben tener en cuenta en el proceso de almacenamiento y conservación de la droga vegetal. (Durango, 2009)

Para conservar las drogas vegetales evitando la acción enzimática podemos realizar dos procesos como son la inhibición enzimática y la inactivación enzimática que se describen a continuación:

a) **Inhibición enzimática:** Es un proceso reversible en el que se elimina el agua de la planta hasta un valor inferior al 10%, al disminuir la presencia de agua las enzimas se inhiben conservando la planta, aquí podemos usar procedimientos tales como la desecación natural y artificial o la liofilización.

- **Desecación natural:** Es un proceso más lento y económico, pero no tan efectivo. Se realiza al aire libre y bajo el sol (de manera indirecta), al aire libre y bajo sombra, dependiendo del clima el proceso toma de 10 a 20 días. (Muñoz, 1987) (Durango, 2009)
- **Desecación artificial:** Resulta mejor que el anterior pues permite el control de la temperatura, humedad ambiental y tiempo de



operación. Podemos ayudarnos de túneles de secado, torres de secado, estufas al vacío, radiación infrarroja (alteración de los principios activos). (Muñoz, 1987) (Durango, 2009)

- **Liofilización:** Es una desecación por sublimación directa del agua vegetal, previamente congelado a -20° a -80°C , sublimar aplicando vacío y calentando. El agua pasa de sólido a vapor y quedando la droga con una cantidad mínima de agua y con aspecto esponjoso. (Muñoz, 1987) (Durango, 2009)

b) **Inactivación enzimática:** Es un proceso irreversible basado en destruir las enzimas logrando de esta forma que pierdan la capacidad catalizadora y al inactivarse no se realiza la degradación de la droga. Para esto usamos vapores líquidos como agua, alcoholes o calor seco, pero en lo posible tratando de hallar el mejor mecanismo para no alterar los principios activos de la planta medicinal. (Muñoz, 1987), (Durango, 2009)

1.2.7. ALMACENAMIENTO.

El almacenamiento de las drogas vegetales o partes de la droga va a depender de las características que presente cada una de ellas y de la cantidad a procesar. Si es de gran volumen, se almacenará en sacos de papel, cajas forradas de papel o sacos de tela, en cualquier caso lo que se debe hacer es evitar el contacto con la



luz y la humedad. Algo muy importante que no se debe olvidar es revisarla periódicamente. (Jover Botella & García Bermejo, 2003)

No se debe almacenar por largos periodos de tiempo ya que dependiendo de la droga y de su composición pueden poseer sustancias volátiles que al pasar el tiempo se pierden. (Roldán, 2006)

1.2.8. OBTENCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS.

Es necesario el conocimiento de diferentes técnicas y de fuentes potenciales para la obtención de extractos o de principios activos a partir de una droga o de un precursor de origen natural, entre estos tenemos:

1.2.8.1. Métodos extractivos a partir de la droga:

1.2.8.1.1. Procesos de extracción: Primero se debe definir la selectividad del solvente a utilizar, es decir si se quiere obtener un extracto cuya constitución química contenga la mayor parte de los componentes químicos de la planta o solo componentes químicos con una determinada característica o de un solo grupo químico. Por lo tanto se orienta hacia diferentes solventes según sea el caso, pero con un mismo fin, aislar los principios activos directamente a partir de las drogas. (Sharapin, 2000)

Entre los métodos extractivos, se encuentra la extracción con solventes que se describe de forma detallada a continuación:

- **Extracción con solventes:** El proceso extractivo consiste en poner en contacto la droga seca en el solvente para reconstituir el estado de la célula



ya que el solvente penetra en la célula y despiden el aire contenido en el citoplasma con lo que inicia el proceso extractivo. (Sharapin, 2000)

La extracción con solventes es uno de los métodos que se emplea con más frecuencia para la obtención de principios activos, pero se debe tener en cuenta diversos factores:

- **Características de la droga:** Se debe trabajar con drogas desecadas y con un grado de división adecuado (mayor en drogas duras como las cortezas y menor en drogas blandas como flores y hojas) para facilitar el máximo contacto entre los principios activos y el disolvente. (Durango, 2009)
- **Naturaleza del solvente:** Principalmente se utilizan en las extracciones el agua y las mezclas hidroalcohólicas (agua y alcohol etílico) en proporción variable. También es posible utilizar otros solventes orgánicos como acetona, éter etílico, hexano, propilenglicol, entre otros. El agua es un buen solvente de muchos principios activos de las drogas, pero por esta misma razón, resulta generalmente poco selectivo. Además muchos principios activos se hidrolizan en agua. (Durango, 2009)
- **Temperatura:** El aumento de la temperatura puede favorecer la extracción de principios activos de las drogas porque aumenta su solubilidad en los solventes utilizados, pero a su vez, puede dar paso a la degradación de



dichos compuestos, por lo que es necesario controlarla para obtener una máxima extracción sin pérdidas de compuestos activos. En ningún caso se pueden utilizar temperaturas elevadas para extraer principios activos termolábiles. (Durango, 2009)

- **Tiempo de contacto entre la droga y el disolvente:** Depende de las características propias de cada droga y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, entre otros). (Durango, 2009)

Tipos de extracciones: Los diferentes tipos de extracciones se pueden englobar en dos grupos.

- a) **Extracción discontinua o simultánea:** Se realiza el contacto del solvente con la droga, y al suceder esto la difusión de los principios activos se producirá en todas las direcciones hasta alcanzar el equilibrio. (Durango, 2009)
- b) **Extracción continua o progresiva:** El solvente utilizado para la extracción se va renovando y actúa en una sola dirección. Son métodos que consisten en poner en contacto la droga con el solvente adecuado y mantener en todo momento el desequilibrio entre la concentración de principio activo en la droga y en el solvente para que se produzca la difusión celular. (Durango, 2009)



1.2.8.2. Concentración de líquidos extractivos: Los líquidos extractivos que se obtienen en la mayoría de los casos se concentran eliminando parcial o totalmente el solvente mediante los dos métodos siguientes: al vacío utilizando un rotavapor, se trabaja a temperaturas inferiores a 40°C y en ausencia de oxígeno. Se aplica para concentrar líquidos extractivos obtenidos con solventes orgánicos y mezclas hidroalcohólicas y mediante liofilización. (Durango, 2009)

1.3. MÉTODOS DE SEPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE COMPONENTES.

Dentro de los varios métodos físico-químicos por los cuales se puede llevar a cabo la separación y aislamiento de los componentes de las plantas, se encuentran los no cromatográficos (sublimación, destilación, liberaciones fraccionadas, cristalización fraccionada) y los métodos cromatográficos, que se describen a continuación. (Kuklinski, 2000). (Robison & Robison, 2001)(William Charles, 1991)

1.3.1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

Los métodos cromatográficos permiten la separación de los componentes de una mezcla homogénea, así también la identificación debido a que el tiempo de retención cromatográfico es característico de cada componente y la cuantificación de los constituyentes. (Robison & Robison, 2001) (Kuklinski, 2000)

1.3.2. CONCEPTO DE CROMATOGRAFÍA.



“La cromatografía es la ciencia y el arte de separar entre sí los componentes de una sustancia. La separación se consigue a través de una gran variedad de técnicas cuyas bases moleculares tienen diferencias diversas (separación de moléculas según su carga, tamaño, masa molecular, potencial redox, disposición de enlaces).” (Robison & Robison, 2001)

La cromatografía encuentra fundamento en el equilibrio de los componentes los cuales se encuentran, presentes en dos fases que no son miscibles entre sí. La fase móvil puede ser gas, líquido o fluido supercrítico, se encarga del transporte del analito (muestra) a través de la fase estacionaria. En la superficie de la fase estacionaria, suceden varias interacciones químicas con el analito, las cuales van a depender de la naturaleza de la fase estacionaria y de la fase móvil. Como fase estacionaria, se pueden utilizar minerales, polímeros orgánicos e inorgánicos o sólidos recubiertos de líquidos. (Robison & Robison, 2001)

1.3.3. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS O TÉCNICAS CROMATOGRAFÍCAS.

La clasificación es variada según: la naturaleza física de las fases, el procedimiento utilizado, fenómenos físico-químicos. (Robison & Robison, 2001)

Según la naturaleza física de las fases se clasifica en:

- Cromatografía de gases.
- Cromatografía de fluidos supercríticos.
- Cromatografía líquida. (Robison & Robison, 2001)



A continuación se va a describir de forma detallada la cromatografía líquida:

1.3.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.

La fase móvil está comprendida por un líquido y la fase estacionaria pueden ser un sólido o un líquido. (Kuklinski, 2000) (Robison & Robison, 2001).

Existen varias clasificaciones de la cromatografía líquida debido a la variedad de posibilidades de su fase móvil y estacionaria. A continuación se describirá la clasificación según la dirección de flujo de la fase móvil y según la eficacia de la separación. (Robison & Robison, 2001)

Según la clasificación por la eficacia de la separación se dividen en:

1.3.4.1. CROMATOGRAFÍA PLANA O EN CAPA FINA.

La fase estacionaria es un sólido formada por una capa fina de pocos milímetros de espesor (250µm), el cual está fijado sobre un soporte sólido (aluminio, plástico o vidrio). Además la fase estacionaria puede contener adsorbentes fluorescentes, que ayudan a la visualización de la placa cromatográfica en la luz ultravioleta (254 o 365nm). (Robison & Robison, 2001) (Kuklinski, 2000) (Remington, 2000)

El analito de estudio se coloca en la parte inferior de la fase estacionaria una vez realizado este paso se coloca la placa cromatográfica, verticalmente en un recipiente herméticamente cerrado que contiene la fase móvil. La fase móvil fluye hacia arriba (por capilaridad) arrastrando los componentes a diferentes velocidades, produciendo la separación de los mismos. (Robison & Robison, 2001). (Remington, 2000)



1.3.4.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN COLUMNA.

La fase estacionaria se encuentra dentro de una columna cromatográfica dispuesta verticalmente, en la que se coloca el analito (disuelto en la fase móvil u otro disolvente) en la parte superior de la misma y hace fluir la fase móvil a través de la columna, dependiendo de la afinidad a la fase estacionaria se van a ir separando los componentes de la mezcla obteniendo de esta forma fracciones. Cada uno de los componentes de la muestra avanza por la columna a velocidades características. La gravedad va a producir que los componentes de la mezcla eluyan.

Al final del proceso se obtienen varias fracciones, las cuales se pueden utilizar en cromatografía de capa fina para probar la eficacia de la separación. (Kuklinski, 2000). (United States Pharmacopeial Convention, 2005)

1.3.4.3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Se emplean columnas de pocos milímetros de diámetro (2-5 mm), la fase móvil es suministrada por un sistema de bombeo a altas presiones (200-300 atm), logrando tasas de flujo de mililitros por minuto. La fase móvil puede estar comprendida por solventes orgánicos puros, soluciones acuosas de sales o por búferes. Los solventes deben presentar la mayor pureza, para evitar el daño de la columna cromatográfica. Se pueden emplear como fases móviles mezclas isocrática o gradientes dependiendo de la naturaleza del soluto a analizar. (Remington, 2000) (Kuklinski, 2000)



La temperatura de la columna puede aumentar la eficacia de la separación de los componentes de la mezcla, se suele emplear temperaturas entre los 20-60°C, tomando en cuenta las características de la fase móvil, estacionaria y el analito.

La detección del soluto (pequeñas cantidades) se puede realizar mediante un sistema monitorizado, la detección se da por medio de diferentes métodos o principios (adsorción ultravioleta, espectrometría de masas, índice de refracción, fluorescencia o conductancia eléctrica). (Robison & Robison, 2001) (Kuklinski, 2000) (Willian Charles, 1991) (United States Pharmacopeial Convention, 2005)

Según la clasificación por la interacción entre la fase estacionaria y el soluto se divide en:

1.3.4.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE NORMAL.

Se basa en la polaridad de la fase móvil y de la fase estacionaria. La fase estacionaria tiene mayor polaridad que la fase móvil. (Robison & Robison, 2001)

La fase estacionaria esta compredida por lo general por polímeros inorgánicos (gran número de poros), como los óxidos de silicio hidratados (sílice o gel de sílice) y por polímeros de óxido de aluminio hidratados (alúmina). El volumen de elución esta determinado por la polaridad de la fase móvil, mientras la fase móvil sea más polar, los solutos (analitos menos polares) se moverán más rápidamente, y eluirán antes. (Robison & Robison, 2001).

1.3.4.5. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN FASE REVERSA.



La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Existe dos posibilidades de tipos de fases estacionarias, las que estan formadas por grupos no polares unidos a la sílice (cadenas de 18 carbonos) mientras mas larga sea la cadena carbonada, la fase estacionaria se vuelve más apolar y las que estan formadas por partículas esféricas de polímeros orgánicos (poliestireno y divinilbenceno) que forman enlaces rígidos que resiten las deformaciones a altas presiones. (Robison & Robison, 2001) (Marcano & Hsegawa, 2002)

1.4. METABOLITOS SECUNDARIOS.

La plantas producen alrededor de 100.000 moléculas de bajo peso molecular conocidas como metabolitos secundarios, los cuales se diferencian de los primarios porque no son esenciales para la vida de los vegetales, pero permiten la defensa en situaciones de estrés como el ataque de microorganismos, insectos y otros animales. (Cowan, 1999)(Evans, 1991)

Las variables climáticas que afectan principalmente en el rendimineto de los metabolitos secundarios de las plantas son: temperatura, humedad, radiación solar (luz y calor), vientos y composicion química del suelo.(Dominguez, 1973)

Los metabolitos secundarios utilizan tres rutas biosintéticas para su obtención como son: la ruta del ácido sikímico y de los poliacetatos, ruta del ácido mevalónico y la ruta del metabolismo del nitrógeno. Algunos de los metabolitos secundarios están restringidos a una especie en particular, órgano específico, o se generan en un periodo específico del desarrollo de la planta. Sus estructuras químicas son complejas, coordinan el desarrollo de la planta, influyen en la actividad de otras células.(Evans, 1991)



Entre los metabolitos secundarios existe una gran variedad de sustancias aromáticas, la mayoría son fenoles o sus derivados de oxígenos sustituidos. (Cowan, 1999) (Evans, 1991).

Debido a que los metabolitos secundarios protegen a la planta frente al ataque de microorganismos, generan sustancias antimicrobianas de gran importancia, en la actualidad. Se conoce un porcentaje muy pequeño de los compuestos naturales con actividad antibacteriana, estas sustancias pueden utilizarse directamente o como base de síntesis para nuevos principios útiles en el tratamiento de infecciones. (Domingo & Lopez-Brea, 2003) (Cowan, 1999)

Los principales grupos con actividad antimicrobiana se describen a continuación:

1.4.1. FENOLES, POLIFENOLES Y ÁCIDOS FENÓLICOS.

Presentan un anillo fenólico, que contiene un grupo hidroxílico libre o sustituido, su origen biosintético se da por la ruta del ácido sikímico y ruta del ácido mevalónico. Los fenoles sencillos se encuentran en las plantas en forma de heterósidos, estos son poco frecuentes. Los ácidos fenólicos se agrupan dentro de los derivados del ácido benzoico (ácido salicílico, ácido gálico) y derivados del ácido cinámico (ácido caféico, ácido cumárico). Los ácidos fenólicos son abundantes en la naturaleza, se pueden encontrar en forma libre, formando parte de ésteres con el ácido quínico y fenólico o unidos a azúcares (Kuklinski, 2000).

La acción antibacteriana se cree que está relacionada con los grupos hidroxilo, por lo que si hay un aumento en la hidroxilación, aumentara la toxicidad. La inhibición enzimática se da por interacciones no específicas con las proteínas bacterianas o

por reacciones con los grupos sulfhidrilo. Los grupos fenoles son considerados como bacteriostáticos. En la Figura 1.1 se presenta la estructura química del ácido caféico. (Araujo Díaz & Salas Asencio, 2007) (Cowan, 1999)

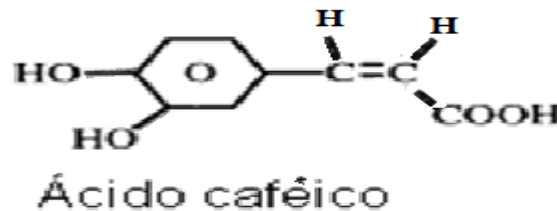


Fig. 1.1 Estructura química del ácido caféico.

1.4.2. QUINONAS.

Están compuestos por anillos aromáticos que presentan dos sustituciones cetónicas. Su distribución en la naturaleza es amplia, entre los compuestos que tienen estructura quinónica están: las benzoquinonas, naftoquinonas (actividad antibacteriana), antraquinonas, fenantraquinonas, antracilonas (Kuklinski, 2000). (Domingo & Lopez-Brea, 2003) (Araujo Díaz & Salas Asencio, 2007)

Producen radicales libres y generan complejos irreversibles. Las quinonas tienen un amplio rango de la actividad antibacteriana, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas. (Cowan, 1999). La estructura de algunas quinonas se presenta en la Figura 1.2.

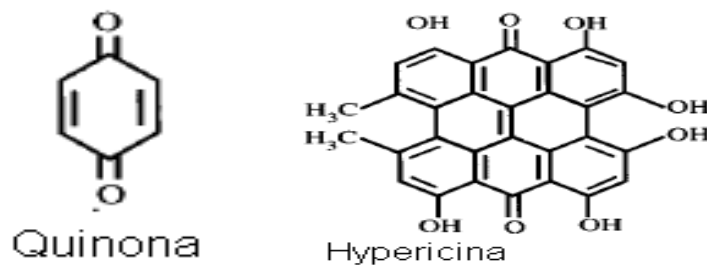


Fig. 1.2 Estructura química de las quinonas (hipericina)

1.4.3. FLAVONOIDES, FLAVONAS Y FLAVONOLES.

Presentan dos anillos aromáticos que se unen entre sí por una cadena carbonada ciclada a través de un oxígeno, se las puede encontrar libres, o unidos a azúcares, proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido sikímico y de los policétidos. Se encuentran ampliamente distribuidos en todos los vegetales, sobre todo en sus partes aéreas. (Kuklinski, 2000).

La actividad se cree que se produce por la formación de complejos con las proteínas extracelulares, presenta una acción antibacteriana similar a la de las quinonas. (Cowan, 1999). (Araujo Díaz & Salas Asencio, 2007)

1.4.4. TANINOS.

Son compuestos hidrosolubles, de estructura polifenólica, entre sus principales propiedades se encuentran la de precipitar proteínas alcaloides, celulosa, gelatina, curtir las pieles y su poder astringente. Se encuentran casi en todas las partes de las plantas (hojas, frutos, corteza y raíces). Los taninos se dividen en dos grupos: taninos hidrolizables (polifenoles unidos a una molécula de azúcar) que son la base del ácido gálico y taninos condensados (catéquinos o proantocianidinas). (Kuklinski, 2000) (Cowan, 1999) (Araujo Díaz & Salas Asencio, 2007)



Los taninos producen estimulación de las células fagocitarias y una amplia gama de acciones antifecciosas como: interacción con las adhesinas, proteínas de la pared celular y la capacidad de unirse a polisacáridos. (Cowan, 1999).

1.4.5. CUMARINAS.

Son derivados de la benzo- α -pirona, se encuentran muy distribuidos en los vegetales, proceden de la ruta del ácido shikímico, presentan propiedades antibiótica, antiinflamatoria y vasodilatadora. Se ha visto que tiene acción antiviral, asimismo, otras cumarinas tienen actividad antimicrobiana sobre *Cándida albicans*. (Cowan, 1999) (Kuklinski, 2000). (Accame, 2000)

1.4.6. TERPENOS Y ACEITES ESENCIALES.

Son productos volátiles de estructura compleja y diversa, los vegetales en los que se encuentra presentan un aroma agradable, se sintetizan a partir de unidades de acetato. (Cowan, 1999).(Kuklinski, 2000).

Presentan actividad contra las bacterias, virus, hongos y protozoarios, su actividad antimicrobiana se cree que se debe al daño de la membrana celular, de naturaleza lipofílica. (Cowan, 1999). (Araujo Díaz & Salas Asencio, 2007)

1.4.7. ALCALOIDES.

Sustancias nitrogenadas de carácter básico, presentan una estructura compleja, se forman a partir de aminoácidos. Proceden del metabolismo secundario, no se



encuentran presentes en todos los vegetales, se localizan en los tejidos periféricos (corteza, raíces, hojas y semillas). (Kuklinski, 2000)

Se cree que los alcaloides son útiles contra la infección por VIH, infecciones intestinales, diarrea (actúa sobre el tiempo de transito del bolo alimenticio en el intestino delgado) y presente actividad antimicrobiana (Giardia, Tripanosoma y Plasmodium). (Cowan, 1999).

1.4.8. LECTINAS Y POLIPÉPTIDOS.

Tiene grupos con carga positiva y contienen enlaces disulfuro, su posible efecto antimicrobiano se fundamenta en que forman canales iónicos en la membrana del microorganismo o por la inhibición enzimática competitiva de la adhesión de proteínas a los receptores de los polisacáridos. (Cowan, 1999).

1.5. *HYPERICUM*.

El género *Hypericum* perteneciente a la familia *Clusiaceae* que comprende alrededor de 1350 especies en 47 géneros encontrados alrededor del mundo.

El género *Hypericum* se utiliza hace más de 200 años por presentar importantes efectos biológicos y farmacológicos, como antivirales, antioxidantes, citotóxicos, antidepresivos y antibacterianos. (Saz Peiró, Gálvez Galve, & Ort, 2010) (Humani Achata & Ruiz Qui, 2005) (Patočka, 2003)

1.5.1. ETIMOLOGÍA.



El nombre hipérico proviene del prefijo griego “hyperikon” que significa sobre las imágenes o por encima de una aparición, nombre derivado de las propiedades mágicas a las cuales se le atribuía durante la edad media, de hacer huir a los malos espíritus y a las apariciones. (Saz Peiró, Gálvez Galve, & Ort, 2010)

1.5.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA TAXONÓMICA.

Superdivisión: *Spermatophyta*.

División: *Magnoliophyta*.

Clase: *Magnoliopsidae*.

Sub-clase: *Dillenidae*.

Orden: *Theales*.

Familia: *Clusiaceae* (*Hypericaceae*).

Género: *Hypericum*.

1.5.3 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Son arbustos pequeños, glabros o con pelos simples, miden entre 20 cm y 1m de altura; la raíz es muy ramificada, leñosa alargada; tallo de corteza leñosa, se ramifica sobre todo en la parte superior; hojas numerosas, opuestas, sésiles, ovaladas alargadas con numerosas glándulas, unidas en la base. Inflorescencia de numerosas flores, amarillas; sépalos 5, con glándulas lineares o puntiformes; pétalos 5; estambres en 5 fascículos, anteras amarillas o anaranjadas, brillantes; ovario súpero, 3–5 lóculos, numerosos óvulos; estilos 3–5, libres. El fruto ovoide

con tres cámaras en su interior contiene numerosas semillas de color negro, pequeñas y redondeadas. (Saz Peiró, Gálvez Galve, & Ort, 2010) (Humani Achata & Ruiz Qui, 2005).



Fig. 1.3. *Hypericum perforatum*.

1.5.5. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS.

Tiene un olor aromático, de sabor amargo agrio. (Sanz Piero, y otros, 2010)

1.5.6. DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA.

El *Hypericum* es propio del norte y sur de África, el sur de América, Asia, Australia, Europa y Nueva Zelanda. (Sanz Piero, y otros, 2010).

1.5.7. ESPECIES:

El género *Hypericum* consta de casi 400 especies, las cuales presentan una morfología diferente y se encuentra distribuida en todo el mundo. (Patočka, 2003).

1.5.7.1 *HYPERICUM LARICIFOLIUM*.

Nombre científico: *Hypericum laricifolium*.

Familia: *Clusiaceae*

Nombres comunes: Romerillo, matequillcana, escobilla, bora.



Fig. 1.4. *Hypericum laricifolium*. (Recolectado en la provincia del Azuay-Cumbe, en Enero 2011)

1.5.7.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Es una de las especies más abundantes y distribuidas ampliamente. Pueden crecer en las planicies y laderas montañosas, en climas húmedos. En el Ecuador se la puede encontrar a los 2200 a 4300 msnm. (Ulloa & Moller Jorgensen, 2005)

1.5.7.3. PARTE UTILIZADA.

Partes aéreas (flores, hojas). (Ulloa & Moller Jorgensen, 2005)

1.5.7.4. USOS.

Leña, en el Perú se la utiliza como material colorante, para teñir el algodón y para curar el paludismo. (Ulloa & Moller Jorgensen, 2005)



1.6. PRINCIPIOS ACTIVOS.

Algunas de las especies de *Hypericum* presenta los siguientes principios activos, los cuales difieren en su porcentajes según su especie: naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina, isohipericina, protohipericina), flavonoides (hiperósido, rutósido, quercitrósido, isoquercitrósido), ácidos fenólicos (caféico, clorogénico, gentísico, ferúlico), proantocianidoles, derivados del floroglucinol (hiperforina, adhiperforina). Aceite esencial rico en α pineno y otros monoterpenos, abundantes taninos, fitosteroles y cumarinas.(Saz Peiró, Gálvez Galve, & Ort, 2010)

A continuación se describirán los compuestos típicos del género *Hypericum* que se encuentran en mayor porcentaje:

1.6.1. NAFTODIANTRONAS.

1.6.1.1. HIPERICINA.

Son compuestos típicos del genero *Hypericum*. La hipericina se deriva del metabolismo de compuestos atranoides, denominados foto derivados (pothohypericina, pseudopothohypericina), compuestos inestables en presencia de la luz, dando lugar a compuestos estables como son la hipericina y pseudohipericina. La ciclopseudohipericina es el resultado de la oxidación de la pseudohipericina. Las naftodiantronas son casi solubles en todos los solventes. La hipericina como la pseudohipericina son insolubles en el agua a temperatura ambiente, su solubilidad aumenta a temperaturas altas. La hipericina y pseudohipericina inhiben la proteína C quinasa y muestran actividad

antiproliferativa contra las células además produce la inhibición la receptación de la serotonina. (Patočka, 2003)

1.6.2. FLOROGLUCINOL.

1.6.2.2. HIPERFORINA.

La hiperforina es un derivado del floroglucinol, lipofílico, inestable a luz y al calor, se encuentra en un gran porcentaje en las partes aéreas del género *Hypericum* (2-4,4%). La hiperforina es considerada como un antioxidante, anticarcenigénico, antidepresivo, antiinflamatorio y antibacteriano. (Zanoli, 2004)(Patočka, 2003)

La hiperforina inhibe varios sistemas neurotransmisores. Inhibe la receptación de la serotonina, dopamina, noradrelina y los receptores GABA, por lo que es considerado como un potente antidepresivo. (Patočka, 2003). La estructura química de la hiperforina se presenta en la Figura 1.5.

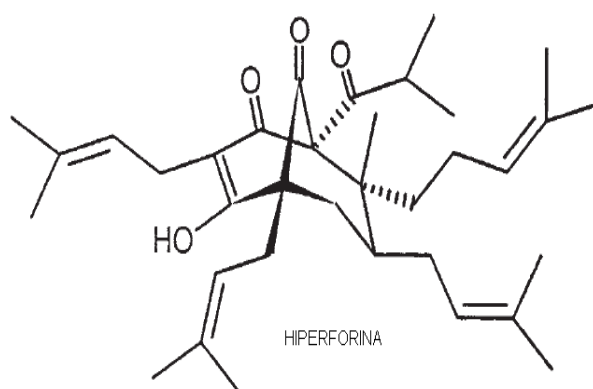


Fig. 1.5. Estructura química de la hiperforina (floroglucinol)



Capítulo II



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LOCALIZACIÓN.

Las actividades prácticas se llevaron a cabo en los laboratorios pertenecientes al Proyecto VLIR, ubicados en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca. Se usaron los laboratorios de procesamiento de Plantas, Fitoquímica y Microbiología.

2.2. MATERIALES.

Los materiales que se usaron en el proceso de la investigación fueron los siguientes:

2.2.1. Materia prima: Se utilizaron para el estudio las partes aéreas de los arbustos de la especie *Hypericum laricifolium* recolectados en diferentes lugares de la provincia del Azuay.

2.2.2. Reactivos: Metanol absoluto 99,9% (Mallinckrodt Chemicals, Chile), Metanol calidad HPLC (Sigma-Aldrich Alemania), Ácido fosfórico 85%, Acetonitrilo calidad HPLC, Acetato de Etilo, n-Hexano y di metil sulfóxido (DMSO) fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Alemania). Tripticasa Soya Agar y Tripticasa Soya Caldo se obtuvieron de (Becton Dickinson and Company Sparks, U.S.A), Hiperforina, $C_{35}H_{52}O_4-C_{12}H_{23}N$, pureza para HPLC >99% (Sigma Aldrich, U.S.A), Agua destilada obtenida de los equipos de ósmosis inversa ThermoScientific Barnstead RO y MiliQ Milipore Elix (UV) (Molsheim Francia)



2.3. MÉTODOS.

2.3.1. IDENTIFICACIÓN.

La identificación y caracterización botánica de la planta en estudio fue realizada por la Dra. Rafaella Ansaloni en el Herbario Azuay (HA).

2.3.2. ÁREA DE ESTUDIO Y RECOLECCIÓN.

Se procedió a la selección del área de recolección, ubicada en la provincia del Azuay (zona montañosa), a una altura entre los 2000-3000 msnm.

Para la recolección, se identificó a la especie vegetal, de acuerdo a las características botánicas, descritas en la bibliografía y con ayuda de la Dra. Rafaella Ansaloni. Se realizó la recolección de forma manual, obteniendo una muestra representativa y manteniendo la misma metodología, de recolección.

La recolección se efectuó en tres lugares distintos de la provincia del Azuay, recolectándose 2 arbustos por lugar, en bolsas de papel, con su respectiva identificación (nombre común, científico, fecha, lugar) como se presenta en la tabla 2.1.

Las plantas se recolectaron en la mañana, en el mes de enero (floración de *Hypericum laricifolium*).

Tabla 2.1. Datos de recolección del *Hypericum laricifolium*.

Ubicación.	Altura.	Código	Longitud.
Portete-Azuay	2705,0 msnm.	HLA0001	39 SUR 12'70",79S OESTE 0,8'69".
	2705,0 msnm.	HLB0002	39 SUR 12'70",79S OESTE 0,8'69".
Gualapugro-Tarqui-Azuay	2888,0 msnm	HLC0003	17 71 94 36 E. 96 65 45 0 N
	2817,0 msnm.	HLD0004	17 71 94 50 E. 96 65 46 5 N.
Totorillas-Cumbe-Azuay	3008,0 msnm.	HLE0005	17 72 15 88 E. 96 61 48 9 N
	3001,0 msnm.	HLF0006	17 72 13 30 E. 96 61 52 3 N

2.3.3. LAVADO.

Antes del lavado se realizó la selección de la droga vegetal en buen estado. Se procedió a su limpieza con agua potable, para la eliminación de residuos de tierra, polvo u otro material, se sumergió a la droga en agua destilada por 10 minutos, posteriormente se colocó la droga limpia y espaciada adecuadamente en bandejas cubiertas con papel periódico para escurrir el agua por un período de tiempo de 24 horas.

2.3.4. DESECACIÓN.

Luego del proceso la droga fue pesada en una balanza de precisión Metter Toledo Pb 1502-L (Switzerland). Posteriormente se pasa a la desecación artificial.



2.3.4.1. Desección artificial: Para la desecación artificial se colocó la droga en bandejas de acero inoxidable, provisto de una malla, la cual fue previamente sanitizada con alcohol etílico (70%), luego se ubicó en la estufa (Pro 3, Cuenca, Ecuador) a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Durante el proceso de secado se debe controlar el peso de la droga durante, el pesaje debe hacerse cada 24-36 horas hasta obtener un peso constante, cuando se haya obtenido el peso constante se coloca a la droga en bolsas de papel con su correspondiente identificación.

2.3.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.

2.3.5.1. Trituración: Se colocó la droga vegetal (hojas, flores) en la licuadora durante 5 segundos con intervalos hasta obtener un tamaño en este caso de 3 a 5 mm ya que se utilizó las partes aéreas de la planta.

2.3.5.2. Humectación: Se pesó 10 gramos de la droga triturada, posteriormente se colocó en frascos de vidrio con su respectiva identificación. La droga se humectó con metanol (99,9%), *el Hypericum laricifolium* necesita para su humectación un promedio de 5,86mL de metanol.



Se dejó reposar la droga durante 15 horas. Durante el proceso de humectación de la droga, se armó el equipo de percolación (sanitizado alcohol al 70%). Se colocó en la base del percolador una capa fina de algodón hidrofílico ligeramente humectado con metanol.

2.3.5.3. Percolación: Una vez que se ha cumplido el tiempo de humectación de la droga, se debe traspasar al percolador previamente armado, presionando un poco a la droga. Seguidamente se coloca sobre la droga papel filtro y las perlas de vidrio, con la ayuda de la varilla se vierte el metanol hasta un nivel de 1 cm sobre la superficie de la droga, se debe comprobar la salida del líquido, una vez realizado este proceso se debe dejar en maceración y protegido de la luz por 24 horas. Luego del transcurso de este tiempo se recoge un volumen correspondiente al 75% del peso de la droga a razón de 1 mL por minuto o 20 gotas por minuto en un tubo de vidrio tapa rosca rotulado con el nombre de la droga, código, fecha, operador (V_1). La droga se mantuvo humectada en todo el proceso de percolación, hasta llegar a reacción negativa, recoger el volumen (V_2) en el vaso de precipitación, protegiendo siempre a la droga de la luz. Comprobar el agotamiento de la droga (reacción negativa-cromatografía capa fina).

2.3.6. AGOTAMIENTO DE LA DROGA.

Se realizó un corrimiento sobre placas de sílica gel (TLC sílica gel GOF254 Merck Damstadt, Alemania.) empleando como fase móvil una mezcla de etilo acetato: metanol: agua (100:13,5:10).

Se recogió alrededor de 250 μL del extracto del percolador (agotamiento de la droga), de dos extractos, los mismos que con ayuda de un capilar se colocaron en la fase estacionaria, separados entre sí por 1 cm, también se colocaron los extractos correspondientes del V_1 como referencia. Las placas fueron analizadas bajo luz UV corta (254 nm) hasta comprobar el agotamiento de la droga como se presenta en la figura 2.1.

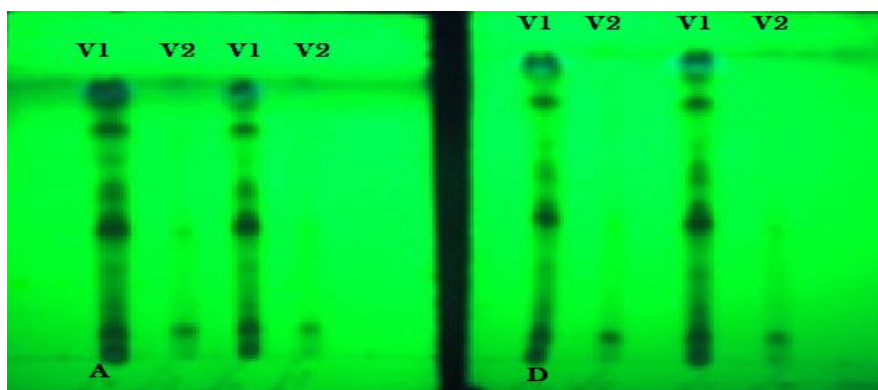


Fig. 2.1. Placa cromatográfica V_1 V_2 V_1 V_2 que muestra el agotamiento de la droga V_1 (referencia) frente a V_2 (volumen recolectado en el percolador) de los extractos A y D.

2.3.7. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.

El V_2 de cada extracto fue concentrado a 40°C en rota vapor (Rota vapLaborota, Alemania) a presión reducida hasta sequedad. Una vez eliminado el solvente se agregó la fracción V_1 y se procedió de la misma forma. El extracto seco remanente

en las paredes del balón fue redisoluelto con 15 mL de metanol y traspasado a un tubo tapa rosca hasta su posterior liofilización. Los tubos fueron almacenados en refrigeración con su respectiva identificación.

2.3.8. LIOFILIZACIÓN DE EXTRACTOS.

Para el proceso de liofilización se eliminó el solvente empleado en la disolución del extracto (metanol) mediante una corriente de N_2 hasta obtener un volumen final de 5mL. Se traspasó este volumen a los tubos de liofilización previamente identificados y pesados, se agregó 20 mL de agua purificada y se colocó los tubos en un Biofreezer a $-78^{\circ}C$ (Denmark) hasta conseguir una masa congelada distribuida homogéneamente en el tubo de liofilización. Esta distribución homogénea se logró aproximadamente de 15 a 20 minutos. Se almacenaron los tubos por un lapso mínimo de 6 horas en el biofreezer y se procedió a cargar el liofilizador Labconco (Kansas City, Missouri) como se muestra en la Figura 2.2. Se liofilizó las muestras por un período de 20-24 horas según PNT FUN 004 del Proyecto VLIR de Plantas Medicinales. Luego de este lapso se pesó cada tubo con el extracto seco, con una espátula se raspó todo el extracto seco de las paredes y se pasó a un tubo de tapa rosca previamente pesado y etiquetado; por último se guarda en el Biofreezer a $-80^{\circ}C$ hasta el momento de utilizar.





Fig.2.2 Equipo de Liofilización FreezoneLabconco (Kansas City, Missouri)

2.3.7. TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN:

2.3.7.1. PREPARACIÓN DEL CRIOSTOCK:

Se comenzó con la rotulación de las cajas petri con TSA (tripticase soya agar) , con el nombre de las cepas y la fecha, seguidamente se extrae la cepa pura del biofreezer (Laboratorio de Fitoquímica, Proyecto VLIR), la cual se descongela y se homogeniza. Se colocó 100 μ L de la cepa en el centro de la caja petri y se incubó a 35 ± 2 °C por 24 horas.

Luego de transcurrido el tiempo se colecta las colonias, las cuales se suspendieron en 15 mL de agua destilada, se prepara una serie de diluciones que contienen 0,9 mL de agua estéril y 100 μ L de suspensión bacteriana. La suspensión bacteriana homogenizada (100 μ L) se pasó del tubo 1 al tubo 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo 10.

De cada una de las diluciones se tomaron 100 μ L previamente homogenizados y se siembra, con la debida identificación. Se incubó a 35 ± 2 °C por 24 horas.

Después del transcurso de las 24 horas se realizó el conteo de las ufc/mL, de las 10 cajas y los cálculos respectivos para la preparación de los cryotubos. Se debe realizar un control de los cryotubos (valor teórico para la solución de concentración conocida *S. aureus* , 5×10^5), dependiendo de la cantidad a prepararse.

Los cryotubos contienen, la suspensión bacteriana de *S. aureus*, TSB, glicerina (10%).



2.3.7.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y FRACCIONES.

Se pesó 5mg (± 2) de cada uno de los extractos y las fracciones, y se los llevó a concentración de 20 mg/mL en DMSO, para lograr que se disuelvan se colocó en el rotador de tubos (24 horas) y en el baño Maria. Verificamos que se haya disuelto toda la droga seca en el DMSO.

2.3.7.3. PREPARACIÓN DE LA PLACA DE DMSO.

Se utilizó la cámara de seguridad biológica clase II (LABCONCO PONFER®) previamente sanitizada con etanol al 70% y se colocaron todos los materiales (placas fondo plano, placas fondo v, pipetas automaticas, DMSO). Se colocó en una placa fondo plano el agua estéril y el DMSO por separado, con su respectiva identificación . Luego se pasó con exactitud en la medida 30 μ L de DMSO desde la columna 3 hasta la 6 y de la 7 hasta la 11 (procedimiento por duplicado), seguidamente se colocó 20 μ L de DMSO y 20 μ L de extracto en los pocillos de la columna 2 y 7, posteriormente se pasó 10 μ L de los extractos homogenizados de la columna 2 a la 3 (DMSO) y a la columna 3 a la 8 procedimiento por duplicado) y así sucesivamente, siempre manteniendo la homogenización . La placa de DMSO se debe guardar protegida de la luz y a temperatura ambiente.



2.3.7.4. PREPARACION DE LA PLACA DE AGUA.

Se colocó desde la columna 2 hasta la 11, en placas de fondo plano, 80 μ L de agua estéril y se homogenizó previamente la placa de DMSO.

Se pasaron 11,76 μ L de la placa de DMSO a la placa de agua desde el de menor a mayor concentración y se homogeniza. La placa de agua se debe guardar protegida de la luz y a -4°C .

2.3.7.5. PREPARACION DE LA PLACA TEST.

Se pasaron 10 μ L de la placa de agua previamente homogenizada, a la placa test desde la dilución más baja a la más alta, a su correspondiente. En la placa test se determina, a más de la acción antibacteriana del extracto o fracción, la viabilidad de la bacteria (*S. aureus*) y la esterilidad del medio. En la columna 12 se coloca el control del antibiótico (ampicilina o ciprofloxacina), previamente preparados en diluciones decrecientes.

Se colocó TSB en la placa test en los 4 pocillos de la columna 1 desde abajo hacia arriba, permitiendo tener un control negativo. Según los cálculos obtenidos para la cantidad de pocillos de la placa (96 pocillos), se procedió a realizar la suspensión bacteriana (cryostock + TSB) tomando en cuenta el valor obtenido para el cryostock de *S. aureus*. Una vez preparada la suspensión bacteriana se colocó 200 μ L en todos los pocillos restantes. Las placas se incuban por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Todo el material contaminado dentro de la cámara se debe colocar en una solución clorada, para evitar la contaminación de la zona de trabajo.

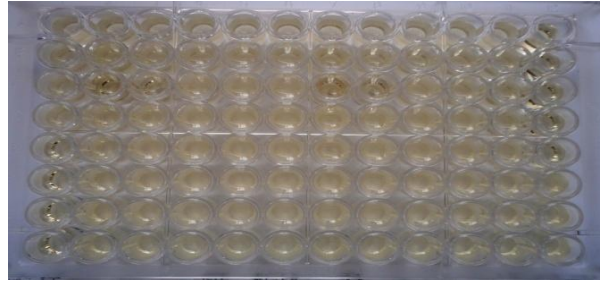


Fig 2.3. Placa test incubada por 24 horas.

2.3.7.6. LECTURA DE LA PLACA TEST.

Se retira de la estufa las placas con el mayor cuidado posible, se lleva a homogenizar y de inmediato leemos con la ayuda del equipo de MICROELISA (Elx800 Universal Microplate Reader). Realizamos los cálculos correspondientes (% de inhibición, CMI) y una vez analizados los resultados procedemos a sembrar las muestras que dieron positivo, es decir, en los que hubo inhibición. Se sembró (TSA) 100μL del pocillo que dio positivo (previamente homogenizado), y se lleva a la estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Se efectuó la lectura a las 24-48 horas. El procedimiento de la técnica de microdilución en placa se realizó tanto a los extractos puros, como a las fracciones obtenidas y al patrón de hiperforina.

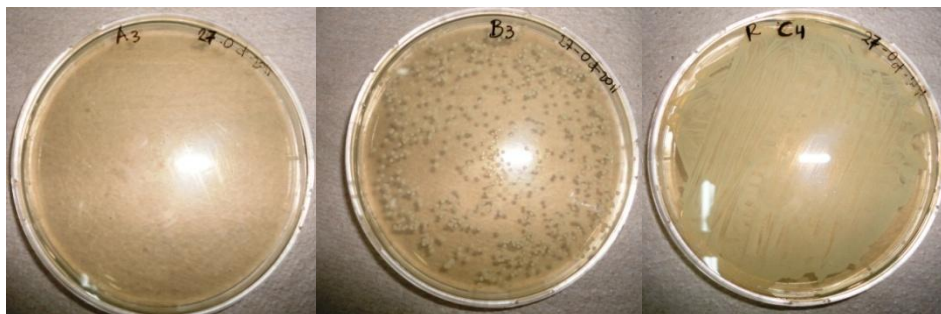




Fig. 2.4. Determinación de la acción bacteriostática y bactericida de los extractos y fracciones.

La siembra del inóculo de los pocillos que producen inhibición nos permiten la caracterización del agente antimicrobiano ya sea bacteriostático (crecimiento de colonias) o bactericida (inhibición completa del crecimiento bacteriano).

2.3.8. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.

Fase móvil: Se empleó hexano, acetato de etilo, metanol y agua en diferentes porcentajes.

Tabla 2.6 Solventes utilizados como fase móvil.

1	Hexano	75 partes
	Acetato de etilo	25 partes
2	Hexano	50 partes
	Acetato de etilo	25 partes
	Metanol	25 partes
3	Hexano	20 partes
	Acetato de etilo	40 partes
	Metanol	40 partes
4	Acetato de etilo	40 partes
	Metanol	55 partes
	Agua destilada	5 partes
5	Agua destilada	5 partes
	Metanol	95 partes

Fase estacionaria: se pesó 10g de sílica en un vaso de precipitación.



Analito: 100mg de extracto puro seco (diluido en metanol) de cada una de las muestras.

Preparación de la fase estacionaria: Se colocó en el fondo de la columna lana de vidrio (pequeña porción). La columna se armó bajo campana, sobre un soporte metálico procurando que se encuentre verticalmente, alineada. Aparte en un vaso de precipitación se colocó la sílica, disuelta con 70 mL de hexano, la cual se traspasó cuantitativamente con la ayuda de una varilla a la columna, Seguidamente se abrió la llave de la columna, para contribuir en la formación de la fase estacionaria. Se dejó reposar durante 24 horas.

Carga de la muestra: Luego de transcurrido el tiempo se colocó con la ayuda de una pipeta Pasteur la muestra que previamente fue preparada (100 mg de extracto puro, disuelto en 500 μ L de metanol). La muestra debe ser colocada con cuidado sobre la fase estacionaria.

Se colocó 40 mL de la fase móvil (1) con la ayuda de la varilla evitando que se levante la fase estacionaria, se abrió la llave y una vez que avanzó el analito por la fase estacionaria, se empezó a recolectar a razón de 4 mL (fracciones) en tubos previamente numerados. Cuando se acaba el solvente (1) se procede a colocar el siguiente (2) y así sucesivamente, obteniendo un promedio de 50 tubos para cada extracto puro.

2.3.9. CONCENTRACIÓN DE FRACCIONES.

Una vez terminado el proceso de fraccionamiento (cromatografía de columna), llevamos los tubos obtenidos al concentrador (eliminar solvente) Rapid

VapLabconco (Kansas City, Missouri), por un periodo de 6 horas. Una vez concentrada la fracción colocamos 250 μ L de metanol y realizamos una placa de TLC con cada una de las fracciones obtenidas, para visibilizar a las mismas. (El procedimiento de cromatografía en capa fina se explica en punto 2.1.3.8.) Una vez que se visualizan las fracciones similares se unen y se vuelven a concentrar con su respectiva identificación.

A continuación se vuelven a probar cada una de las fracciones con la técnica de microdilución en placa para comprobar que fracción es la que presenta actividad inhibitoria, de igual forma con el patrón de Hiperforina.



Fig. 2.5. Determinación de la actividad bacteriostática de la hiperforina.



2.3.10. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

La cromatografía se desarrolló en un cromatografo Agilent (G400AA y Japón y Alemania) equipado con una columna Chromolith Rp-18 de 10 x 4.6 mm Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil consistió en una mezcla isocrática de acetonitrilo: agua con un 0.01% de ácido fosfórico (75:25) con una velocidad de flujo de 1 mL/min. El volumen inyectado fue de 20 µL y para la detección de los componentes se empleó un detector de arreglo de diodos (DAD). Para la presentación de los cromatogramas se utilizó una longitud de onda de 280 nm. Se inyectó un patrón de Hiperforina (Sigma, Alemania) en una concentración de 1 mg/mL y muestras activas (5 mg/mL de metanol calidad HPLC).

2.3.11. VISUALIZACIÓN DE LA HIPERFORINA.

Para la visualización de la Hiperforina se aplicó cromatografía en capa fina. Se colocaron en la placa cromatográfica las fracciones positivas (con acción antibacteriana), tomando como referencia a la hiperforina. La fase móvil empleada fue hexano; acetato de etilo (9:1), como sustancia reveladora se utilizó anisaldehído; ácido sulfúrico; ácido acético (1:2:100). La placa se observó a 365nm , su Rf fue de 0,37.

$$R_f = \frac{\text{distancia desde el punto de aplicación hasta la mancha}}{\text{distancia desde el punto de aplicación frente al disolvente}}$$

$$R_f = \frac{3}{8} = 0,375. \quad \text{Patron de Hiperforina.}$$



2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico se realizó en base a los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria (CMI-50) frente al *S. aureus* expresado en µg/mL. Las CMI-50 de los extractos metanólicos del *Hypericum laricifolium*, igual que sus fracciones se analizó con la técnica de ANOVA con un solo factor, que en el caso de los extractos se tomó en cuenta el factor lugar, y en las fracciones el factor fracción. Todo el análisis estadístico se realizó con un nivel de confianza 0,05 (5%).

Los resultados de CMI-50 para los extractos y las fracciones fueron introducidos en el programa “R” a través de comandos que permitieron obtener las tablas de análisis de varianza

2.4.1. ANÁLISIS DE VARIANCIAS (ANOVA) CON UN SOLO FACTOR PARA LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES DEL *HYPERICUM LARICIFOLIUM*.

El ANOVA (análisis de variancias) es una técnica mediante la cual se puede verificar si dos o más medidas muestrales fueron extraídas de la misma población o de poblaciones con el mismo valor. El ANOVA nos permite estimar y probar hipótesis en respecto a las a variancias poblacionales y a las medias de las poblaciones, siendo posible probar la hipótesis nula (H_0) en la que todas las medias de la población son iguales, con respecto a la hipótesis alternativa (H_a) en la cual por lo menos un par de los miembros son diferentes. (Wayne W, 1996)

Las hipótesis planteadas para nuestro estudio estadístico fueron las siguientes:

Para los extractos metanólicos del *Hypericum laricifolium*.



- Ho: El factor (lugar) no induce diferencias en la CI (concentración inhibitoria) de los extractos del *Hypericum laricifolium*.
- Ha: El factor (lugar) induce diferencias en la CI, de los extractos del *Hypericum laricifolium*.

Para las fracciones metanólicas del *Hypericum laricifolium*.

- Ho: No hay diferencias entre la CMI-50 frente *S. aureus* de cada una de las fracciones obtenidas, de los extractos del *Hypericum laricifolium*.
- Ha: Las CMI-50 es diferente entre cada una de las fracciones obtenidas de los extractos del *Hypericum laricifolium*.

Interpretación ANOVA:

La aceptación o rechazo de las hipótesis van a depender del nivel de confianza (5%), frente a la probabilidad asociada; si está es menor al nivel de confianza se rechaza la Ho. También va a influir en la aceptación o rechazo de las hipótesis, el valor obtenido de F experimental ya que si éste es mayor al valor F crítico, se rechaza Ho. (Wayne W, 1996)

2.4.2. COMANDOS PARA EL PROGRAMA “R”.

R es lenguaje de programación utilizado para el análisis estadístico, es manejado a través de comandos (propio lenguaje), que permite obtener los resultados deseados. (Bustos, Rodriguez, & Cantor, 2008) (Sáez Castillo, 2010)

Los comandos utilizados para el análisis de la varianza de los extractos y las fracciones se indican a continuación:



```
table<-read.table(file.choose(),header=TRUE,dec=".")
```

```
>attach(table)
```

```
>fr<-factor(lugar)
```

```
>mu<-factor(muestra)
```

```
>re<-factor(rep)
```

```
>result<-aov(cmi~fr)
```

```
> Summary (result)
```

```
table<-read.table(file.choose(),header=TRUE,dec=".")
```

```
> attach (table)
```

```
>fr<-factor(frac)
```

```
>re<-factor(rep)
```

```
>result<-aov(cmi~fr)
```

```
>summary(result)
```



Capítulo III



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En numerosos trabajos publicados se han investigado las propiedades del género *Hypericum*, principalmente las antibacterianas. En los cuales se reporta la actividad antimicrobiana de extractos crudos metanólicos del *Hypericum* y su uso tradicional como antibacteriano externo. (Dall'Agnol&Ort, 2005)

Se han estudiado varias especies entre las principales se encuentra el ***Hypericum perforatum, triquetrifolium, empetrifolium mysorense, patulum, scabrum***. El método más utilizado para determinación de la actividad antibacteriana aplicado en los diferentes estudios realizados fue el de difusión en agar frente a varias cepas bacterianas (gram positivos, gram negativos). Los resultados de los estudios muestran que los miembros del género *Hypericum* presentan actividad sobre los gram positivos en especial frente al *S. aureus*. Se ha reportado como responsable de la actividad antibacteriana a la hiperforina uno de los constituyentes químicos que se encuentra en mayor cantidad. (Ghasemi & Ort, 2011) (Pulok & Ort, 2002)(Avato & Ort , 2003)

Por tal motivo nuestro estudio se basó en la determinación de la actividad antibacteriana del *Hypericum laricifolium*, tanto de sus extractos crudos, como de sus fracciones. Para ello se usaron extractos y fracciones metanólicos de *Hypericum laricifolium*, y el patrón de Hiperforina a los cuales, se aplicó la técnica de microdilución en placa con el fin de obtener la CMI frente a *S. aureus*. Los resultados obtenidos se resumen en las tablas a continuación:

Tabla 3.1. CMI de los extractos del *Hypericum laricifolium* obtenidos de tres lugares diferentes frente a *S. aureus*.

Lugar ¹	Planta ²	Partes utilizadas ³	S. aureus		Caracterización del Agente antimicrobiano
			CIM (mg/mL) ⁴		
			CMI 50(µg/mL)	CMI 90(µg/mL)	
Portete	A. <i>Hypericum laricifolium</i>	Aéreas.	47,120	>64	
	B. <i>Hypericum laricifolium</i>	Aéreas.	29,101	>64	Bacteriostático
Tarqui	C. <i>Hypericum laricifolium</i>	Aéreas.	23,459	>64	Bacteriostático
	D. <i>Hypericum laricifolium</i>	Aéreas.	17,791	>64	Bacteriostático
Cumbe	E. <i>Hypericum laricifolium</i>	Aéreas.	14,792	>64	Bacteriostático
	F. <i>Hypericum laricifolium</i>	Aéreas.	28,215	>64	Bacteriostático

¹Indica el lugar de procedencia ²planta obtenida de cada uno de los lugares a alturas similares, ³ partes utilizadas de la planta, ⁴ concentración mínima de los extractos capaces de inhibir el 50% y 90% de la población bacteriana de *S. aureus* expresado en μg/mL probadas en 5 diluciones diferentes (64, 16, 4, 1, 0,25 mg/mL) ⁵caracterización del agente antimicrobiano debido al crecimiento o inhibición.

Tabla 3.2. Interpretación de las concentraciones mínimas inhibitorias para el 50% de la población bacteriana (CMI-50).

CMI 50% de la población bacteriana ¹	Interpretación ²
>30μg /mL	Inactivo
30-5μg/ mL	Ligeramente activo
< 5μg/ mL	Activo

¹Indica la concentración mínima capaz de inhibir 50% de la población bacteriana expresada en μg/mL ²Interpretación de cada uno de los de los valores.

Los extractos obtenidos de las especies *Hypericum laricifolium* recolectadas en los lugares Tarqui y Cumbe fueron ligeramente activos (30-5 μg/mL) frente a *S. aureus*, según la tabla 3.1 y 3.2 los cuales fueron ensayados a concentraciones decrecientes mediante la técnica de microdilución en placa dando un % de inhibición alto en las diluciones menores, mientras que de los extractos obtenidos de las especies del *Hypericum laricifolium* del lugar Portete una de las muestras



fue inactiva ($>30 \mu\text{g/mL}$) y la otra presentó una ligera actividad frente a *S. aureus*, todo el ensayo se realizó por cuadruplicado.

En la tabla 3.1 también se puede observar en los resultados obtenidos de la siembra del inóculo de los extractos ligeramente activos B, C, D, E y F, se obtuvo el crecimiento, demostrando en la caracterización del agente antimicrobiano su actividad bacteriostática frente a *S. aureus*

Los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria fueron analizados estadísticamente mediante la técnica ANOVA, con el fin de determinar si existe diferencia en la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de los diferentes lugares.

Tabla 3.3 Análisis de la varianza según el factor lugar de los extractos metanólicos del *Hypericum laricifolium*.

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR(>F)
Lugar	2	144,2	723.57	9,1689	0.001373 **
Residuales	21	1657.2	78.92		
Significado de los códigos 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1					

Por los valores expuestos en la tabla 3.3 se deduce lo siguiente: dado que el valor de la probabilidad es de 0,1373% se rechaza la hipótesis nula, debido a que el valor de la probabilidad es menor al valor del nivel de confianza (5%) y se acepta la hipótesis alternativa, el lugar si influye en la CMI de los extractos metanólicos del *Hypericum laricifolium* .La diferencia puede deberse a variables que nos se pudieron controlar durante el proceso de recolección (naturaleza del suelo,



cantidad de agua, entorno), debido que las plantas recolectadas fueron silvestres, porque el contenido de principios activos es variable.

Dall'Agnol y Col. reportan la actividad antibacteriana de los extractos crudos metanólicos de seis especies del género *Hypericum*, en la que todas presentaron actividad frente al *S. aureus*. Las especies con mayor actividad fueron: el *H. caprifoliatum*, *H. myrianthu*, *H. polyanthemum* (Dall'Agnol&Ort, 2005).

Pulok & Col. evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos de dos variedades de *Hypericum* por medio del método de difusión en agar. Se utilizaron extractos clorofórmicos, metanólicos, etc del *Hypericum mysorense* y *patulum*, demostrándose que todos los extractos presentan poder antibacteriano principalmente contra los gram positivos.(Pulok, Mukherjee, Saritha, & Suresh, 2002).

A pesar que las técnicas (difusión en agar) empleadas en los estudios antes mencionados son totalmente diferentes a la empleada en nuestro estudio, a igual que las concentraciones, se puede apreciar la actividad antibacteriana que este género presenta. En ambos casos se ensayaron con cepas de *S. aureus*, presentando una buena actividad antibacteriana. Los extractos metanólicos del *Hypericum laricifolium* de nuestro estudio, resultaron con actividad frente a el *S. aureus*, comparable con los estudios antes señalados, además no todas las muestras presentaron igual CMI, como en nuestro estudio ya que esto se debe a variables, que influyen en la concentración de los principios activos, antes mencionados.

Obtención de fracciones de los extractos puros del *Hypericum laricifolium*.

De los extractos puros se obtuvieron por medio de cromatografía de columna 7 a 8 fracciones en el caso de los extractos A, B, C y D tomando en cuenta la similitud de las bandas que se observaron en las placas cromatográficas en UV 254 nm y de los extractos E y F se obtuvieron 4 fracciones en cada uno de los casos considerando la similitud de las bandas y se aumentaron los parámetros de unión. A continuación se muestran las fracciones obtenidas y los parámetros de unión de las mismas.

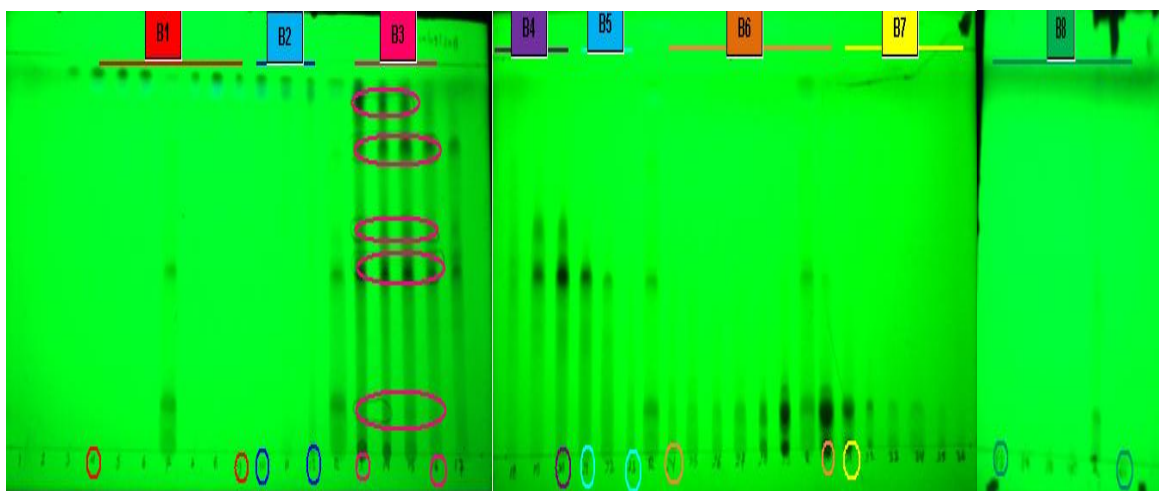


Fig. 3.1 Placa cromatográfica las fracciones del extracto B visualizados a 254nm. Se indica la forma de unión según la similitud de las bandas para la obtención de las fracciones del extracto puro.

Tabla 3.4 Fracciones obtenidas de los extractos puros(A, B, C, D) del *Hypericum laricifolium*.

Tubos obtenidos ¹	Unión de fracciones ²	Código ³
A (1-42)	4 a 9	A.1
	10 a 11	A.2
	12 a 16	A.3
	17 a 19	A.4
	21 a 23	A.5
	24 a 28	A.6
	29 a 36	A.7
	37 a 40	A.8
B (1-41)	4 a 9	B.1
	10 a 12	B.2
	13 a 16	B.3
	17 a 20	B.4
	21 a 23	B.5
	24 a 30	B.6
	31 a 36	B.7
	37 a 41	B.8
C (1-39)	4 a 6	C.1
	7 a 10	C.2
	11 a 12	C.3
	13 a 18	C.4
	19 a 23	C.5
	24 a 26	C.6
	27 a 29	C.7
	30 a 39	C.8
D (1-39)	4 a 8	D.1
	9 a 11	D.2
	12 a 15	D.3
	16 a 22	D.4
	23 a 26	D.5
	28 a 33	D.6
	34 a 39	D.7

¹ Indica el número de tubos obtenidos en cromatografía de columna ² la unión de los tubos según la similitud de las bandas que se observaron en las placas cromatográficas a 254nm.

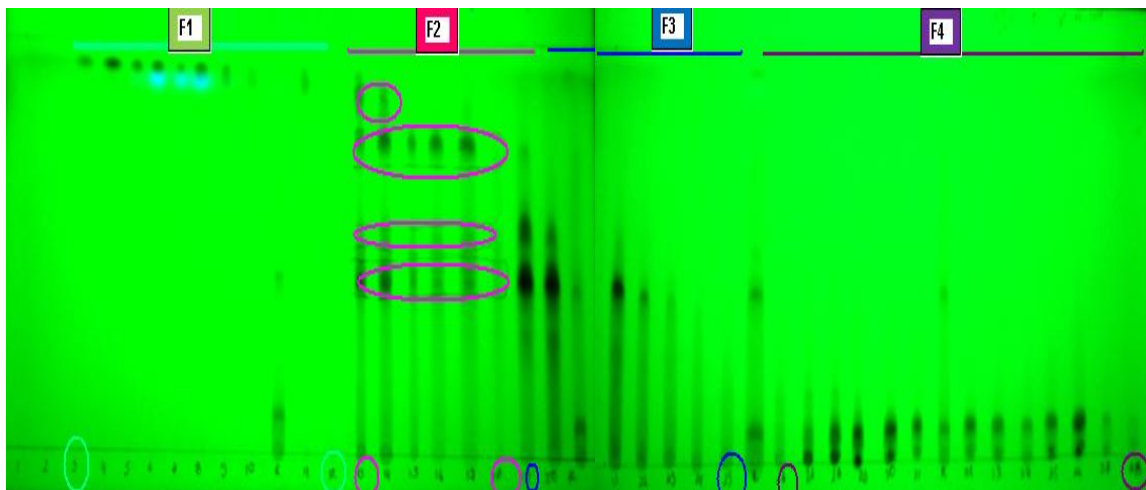


Fig. 3.2 Placa cromatográfica las fracciones del extracto F visualizados a 254nm. Se indica la forma de unión según la similitud de las bandas para la obtención de las fracciones del extracto puro.

Tabla 3.5 Fracciones obtenidas de los extractos puros(A, B, C, D) del *Hypericum laricifolium*.

Tubos obtenidos ¹	Unión de fracciones ²	Código. ³
E (1-38)	4 a 10	E.1
	12 a 20	E.2
	21 a 25	E.3
	26 a 36	E.4
F (1-39)	3 a 12	F.1
	13 a 18	F.2
	19 a 25	F.3
	26 a 38	F.4

¹ Indica el número de tubos obtenidos en cromatografía de columna ² la unión de los tubos según la similitud de las bandas que se observaron en las placas cromatográficas a 254nm



Se puede observar de las tablas y de las figuras expuestas anteriormente, que no en todos los casos se obtuvieron la misma cantidad de tubos durante la separación de las fracciones por medio de cromatografía en columna y la unión de las fracciones tampoco fue similar. Esto se debe principalmente al acomodamiento de la sílica gel en la columna cromatográfica ya que este se realizó manualmente.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante la técnica de microdilución en placa de las fracciones obtenidas de los extractos puros.

A igual que con los extractos puros, se ensayaron cada una de las fracciones con la técnica de microdilución en placa, el ensayo se realizó por duplicado y las fracciones que fueron ligeramente activas, se cuadriplicaron. Los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria se resumen a continuación en la tabla 3.6.

En la cual se Indica ¹El lugar de procedencia ²Planta obtenida de cada uno de los lugares a alturas similares, ³El número de fracciones obtenidas de cada uno de los extractos puros ⁴Concentración mínima de los extractos capaces de inhibir el 50% y 90% de la población bacteriana de *S. aureus* expresado en µg/mL probadas en 5 diluciones diferentes (64, 16, 4, 1, 0,25 mg/mL) ⁵Caracterización del agente antimicrobiano debido al crecimiento o inhibición.

Tabla 3.6. CMI de las fracciones del *Hypericum laricifolium*

Lugar ¹	Planta ²	Fracciones ³	<i>S. aureus</i>		Caracterización del agente antimicrobiano ⁵
			CIM (µg/mL) ⁴		
			CIM 50(µg/mL)	CIM 90(µg/mL)	
Portete	<i>A. Hypericum laricifolium</i>	A1	18,556	>64	
		A2	17,554	>64	
		A3	8,4504	>64	Bactericida
		A4	34,732	>64	
		A5	21,599	>64	
		A6	52,106	>64	
		A7	>64	>64	
Portete	<i>B. Hypericum laricifolium</i>	B1	>64	>64	
		B2	>64	>64	
		B3	16,86	>64	Bacteriostático
		B4	43,708	>64	
		B5	>64	>64	
		B6	>64	>64	
		B7	>64	>64	
Tarqui	<i>C. Hypericum laricifolium</i>	C1	58,688	>64	
		C2	43,255	>64	
		C3	35,832	>64	
		C4	11,248	>64	Bacteriostático
		C5	47,833	>64	
		C6	>64	>64	
		C7	>64	>64	
Tarqui	<i>D. Hypericum laricifolium</i>	D1	>64	>64	
		D2	39,986	>64	
		D3	6,2264	34,044	Bacteriostático
		D4	29,797	>64	
		D5	56,573	>64	
		D6	>64	>64	
		D7	51,288	>64	
Cumbe	<i>E. Hypericum laricifolium</i>	E1	45,658	>64	
		E2	12,593	>64	Bacteriostático
		E3	38,701	>64	
		E4	>64	>64	
Cumbe	<i>F. Hypericum laricifolium</i>	F1	21,55	>64	
		F2	9,7106	>64	Bacteriostático
		F3	>64	>64	
		F4	>64	>64	



Se ensayaron 7 de las fracciones de los extractos A y B que fueron recolectadas en el Portete, para determinar su actividad antibacteriana frente al *S. aureus*. Las fracciones (A_1 , A_2 , A_3 , A_4), presentaron una ligera actividad (30-5 $\mu\text{g/mL}$) a pesar que el extracto puro fue negativo, se ensayo debido a que el porcentaje de inhibición se encuentra en valores mayores a 60%. La fracción que presentó menor valor en la concentración mínima inhibitoria fue la fracción A_3 (8,450 $\mu\text{g/mL}$). En el caso de las fracciones B se obtuvo una sola fracción ligeramente positiva B_3 (16,86 $\mu\text{g/mL}$).

Se ensayaron 7 de las fracciones obtenidas de C y D procedentes de Tarqui se obtuvieron como CMI, para el caso de C_4 (11,248 $\mu\text{g/mL}$) ligeramente activa, y D_3 (6,2264 $\mu\text{g/mL}$), D_4 (29,797 $\mu\text{g/mL}$) en límite del rango.

Al igual que las anteriores se ensayaron las 4 fracciones obtenidas para el caso de E y F procedentes de Cumbe de las que se obtuvo E_2 (12,593 $\mu\text{g/mL}$), F_1 (21,55 $\mu\text{g/mL}$), F_2 (9,7106 $\mu\text{g/mL}$).

En las tablas a continuación se resumen el análisis estadístico aplicando la técnica ANOVA a los resultados obtenidos de las CMI de las fracciones de los diferentes extractos crudos:

Tabla 3.8 Análisis de la varianza para las fracciones obtenidas del extracto crudo A

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR(>F)
Fracción	5	2682,6	536,52	15,2070	0,001220 **
Residuales	7	246,97	35,28		
Significado de los códigos 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1					

Tabla 3.9. Análisis de la varianza para las fracciones obtenidas del extracto crudo B

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR(>F)
FRACCIÓN	1	864,94	864,94	164,8400	0,001020 **
RESIDUALES	3	15,74	5,25		
SIGNIFICADO DE LOS CÓDIGOS 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1					

Tabla 3.10. Análisis de la varianza para las fracciones obtenidas del extracto crudo C

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR(>F)
FRACCIÓN	3	2058,23	686,08	308,8000	4.293E-06 ***
RESIDUALES	5	11,11	2,22		
SIGNIFICADO DE LOS CÓDIGOS 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1					

Tabla 3.11. Análisis de la varianza para las fracciones obtenidas del extracto crudo D

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR(>F)
FRACCIÓN	4	3738,30597	934,5764926	34,0565358	0,0008046
RESIDUALES	5	137,209565	27,441913		
SIGNIFICADO DE LOS CÓDIGOS 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1					

Tabla 3.12. Análisis de la varianza para las fracciones obtenidas del extracto crudo E

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR(>F)
FRACCIÓN	2	1549,000	774,510	44,767	0,001829 **
RESIDUALES	4	69,200	17,300		
SIGNIFICADO DE LOS CÓDIGOS 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * 0.1 ' ' 1					

Tabla 3.13. Análisis de la varianza para las fracciones obtenidas del extracto crudo F

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PR(>F)
FRACCIÓN	1	181,399	181,399	236,8800	0,0005958 ***
RESIDUALES	3	2	0,766		
SIGNIFICADO DE LOS CÓDIGOS 0 **** 0.001 *** 0.01 ** 0.05 * . 0.1 ' ' 1					

Por los valores expuestos en la tabla 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12 se deduce lo siguiente: dado que el valor en todos los casos de la probabilidad es menor al valor del nivel de confianza (5%) se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, por lo tanto las fracciones obtenidas de cada uno de los extractos crudos del *Hypericum laricifolium* son diferentes.

La obtención de las fracciones tiene como fin el lograr aislar componentes diferentes, presentes en las plantas, por lo que el análisis estadístico revela que cada una de las fracciones son diferentes entre sí, debido a que se trata de compuestos diferentes.

A continuación se muestra en las tablas 3.14 y 3.15 el promedio de elución de cada una de las fracciones:



Tabla 3.14 Porcentaje de elución de las fracciones obtenidas de los diferentes extractos crudos A, B, C y D.

Fracciones ¹	%de elución ²
A1	14,2857
A2	25
A3	33,3333
A4	42,8571
A5	52,381
A6	61,9048
A7	77,381
B1	15,8537
B2	26,8293
B3	35,3659
B4	45,122
B5	53,6585
B6	65,8537
B7	81,7073
C1	12,8205
C2	21,7949
C3	29,4872
C4	39,7436
C5	53,8462
C6	64,1026
C7	71,7949
D1	15,3846
D2	25,641
D3	34,6154
D4	48,7179
D5	62,8205
D6	78,2051
D7	93,5897

¹Indica las fracciones obtenidas de cada uno de los extractos crudos. ²Indica el porcentaje de elución.

Tabla 3.15 Porcentaje de elución de las fracciones obtenidas de los diferentes extractos crudos E y F

Fracciones	% de elución
E1	18,4211
E2	42,1053
E3	60,5263
E4	81,5789
F1	19,2308
F2	39,7436
F3	56,4103
F4	94,8718

Se puede observar que las fracciones con valores menores en su CMI (A_3 , B_3 , C_4 , y D_3) eluyen al 36% de la elución total, por lo que podemos deducir que el *Hypericum laricifolium* presenta sus compuestos activos frente *S. aureus* en el 36% de la elución total siempre y cuando se tomen los mismo parámetros de unión y se obtenga la misma cantidad de fracciones que en este caso fueron entre 7 a 8.

De igual manera para las fracciones E_2 y F_2 , el promedio de elución tomando en cuenta los parámetros de unión y el número de fracciones los compuestos con mayor actividad antibacteriana eluyen en un promedio de 41% de la elución total.



Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante la técnica de microdilución en placa del patrón de hiperforina

Tabla 3.16 CMI del patrón de HIPERFORINA.

Patrón ¹	Concentración mínima inhibitoria ²		Caracterización del agente antimicrobiano ³
	IC 50µg/mL	IC 90µg/mL	
HIPERFORINA	2,119	9,217	Bacteriostático

¹Indica el lugar de procedencia ²Concentración mínima de la hiperforina capaz inhibir el 50% y 90% de la población bacteriana de *S. aureus* expresado en mg/mL probadas en 5 diluciones diferentes (64, 16, 4, 1, 0,25 mg/ml) ³Caracterización del agente antimicrobiano debido al crecimiento o inhibición.

Los valores obtenidos de la concentración mínima inhibitoria para la hiperforina se encuentran en 2,119 µg/mL, siendo muy activa. En la siembra del inóculo se obtuvo crecimiento entre las 24-72 horas, dando el carácter de bacteriostático.

Según Graind & Ganjoo la acción antibacteriana del *Hypericum perforatum* es atribuida a la hiperforina dentro de los varios componentes que la forman. (Graind & Granjoo, 1959)

En estudios realizados por Avato & Col. sobre la CMI frente a bacterias gram positivas de la sal de hiperforina, la cual fue disuelta en hexano a una concentración de 1mg/mL y utilizando la técnica difusión en agar, se determinó la CMI frente varias cepas ensayadas del *S. aureus*, presentado una CMI entre 25-50 µg/mL, dando una significativa inhibición del crecimiento bacteriano. (Avato & Col, 2003).



En el presente estudio, aplicamos la técnica de microdilución en placa a la sal de hiperforina disuelta en metanol (1 mg/mL), resultando muy activa frente a el *S. aureus* comprobando, lo antes señalado por Graind & Ganjoo y Avato & Col, que la hiperforina uno de los constituyentes químicos que se encuentra en mayor porcentaje en el género *Hypericum* es uno de los responsables de la actividad frente a *S. aureus*.

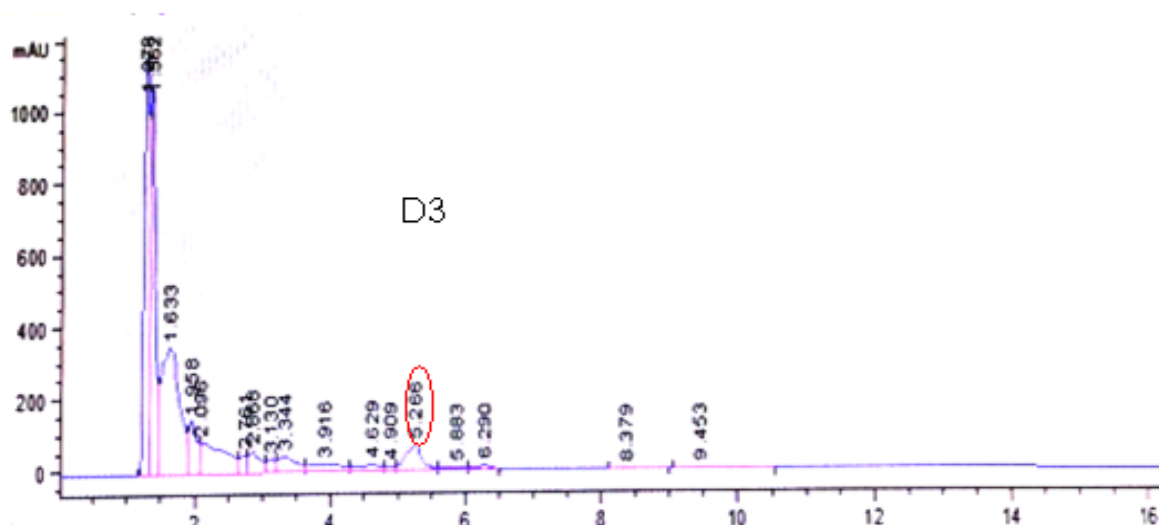
Para determinar si la sustancia responsable de la actividad antibacteriana es la hiperforina se estudiaron las fracciones con actividad antibacteriana, con el patrón de hiperforina por medio de HPLC y TLC

Partiendo de que la hiperforina presenta valores muy bajos en la concentración mínima inhibitoria se procedió a ensayar las fracciones con el valor menor de CMI (A_3 , B_3 , C_4 , D_3 , E_2 y F_2) en HPLC y TLC.

Determinación por medio de HPLC de la Hiperforina en las fracciones (A_3 , B_3 , C_4 , D_3 , E_2 y F_2)

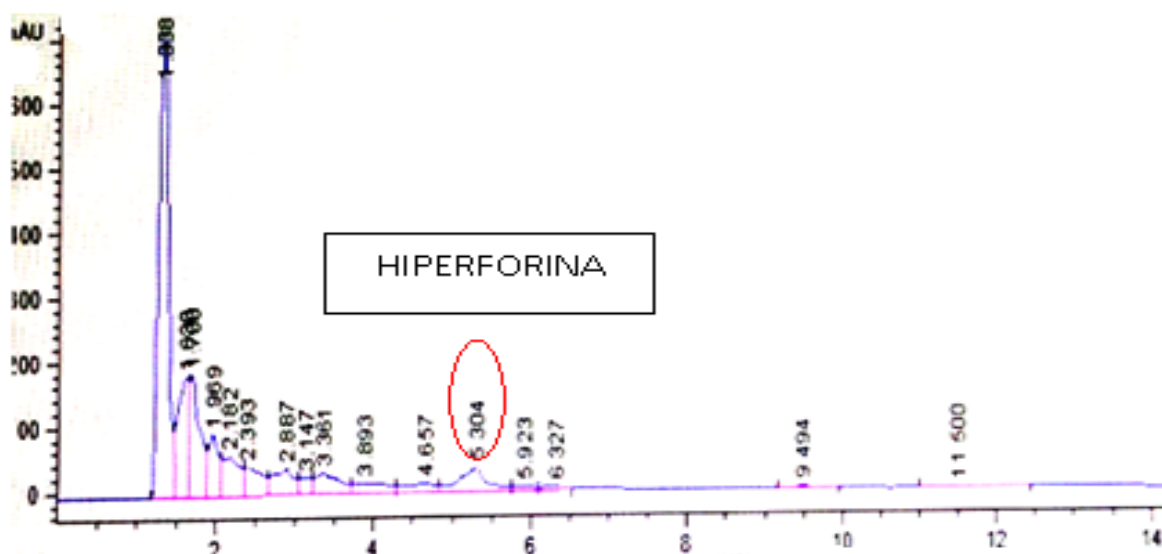
A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC de las fracciones ligeramente activas y del patrón de hiperforina.

Figura 3.7 Cromatograma de la fracción D3



En el eje vertical se representa el tiempo (minutos), en el eje horizontal la respuesta del detector (proporcional a la concentración) a 280nm, los valores que se encuentra arriba de cada una de los picos corresponden al tiempo de retención. El cromatograma corresponde a la muestra de la fracción D₃ que resulto ligeramente activa (valores de CMI más bajos comparados con las demás fracciones), en su actividad antibacteriana frente al *S. aureus*.

Figura 3.8 Cromatograma del patrón de hiperforina.



En el eje vertical se representa el tiempo, en el eje horizontal la respuesta del detector (proporcional a la concentración) a 280nm, el cromatograma corresponde a la patrón de Hiperforina.

El tiempo de retención obtenido en cada una de las fracciones (A₃, B₃, C₄, D₃, E₂ y F₂) se encuentra entre 5,2-5,3 minutos y de la hiperforina en 5,304 minutos. De lo que se puede deducir que las fracciones ligeramente activas con menores valores en su CMI, obtenidas de los extractos puros de tres lugares diferentes, deben su actividad antibacteriana a la hiperforina.

Determinación por medio de TLC de la Hiperforina en las fracciones (A₃, B₃, C₄, D₃, E₂ y F₂)

Figura 3.9 Visualización de la hiperforina en cromatografía de capa fina (UV 365nm).



Indica la referencia (extracto puro D), cada una de las fracciones ensayadas y se utilizó como patrón la sal de hiperforina.

Se puede observar en la figura 3.9 que se utiliza como referencia al extracto puro D, se ensayan cada uno de las fracciones en las cuales se obtuvo valores de CMI bajos en comparación a las demás fracciones, y se utilizó el patrón de hiperforina para comprobar si las fracciones positivas presentaban como sustancia activa a la



hiperforina por comparación del Rf. No se pudo determinar por medio de esta técnica el Rf de las fracciones, pero si el de la Hiperforina cuyo valor es de Rf 0,375. Se debe a que la cantidad de principio activo de las fracciones es menor que la sal de hiperforina.



CONCLUSIONES.

Al término de este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- Los resultados validan la metodología empleada para el análisis y aislamiento de extractos y fracciones de *Hypericum sp.* además las técnicas empleadas y su estandarización pueden servir de herramienta para otras investigaciones que sigan estos lineamientos.
- La metodología analítica aplicada a los extractos metanólicos de *H. laricifolium* nos permitió el aislamiento de sustancias con una ligera actividad antibacteriana frente *S. aureus*, basándonos en los valores obtenidos en la concentración mínima inhibitoria, que se encontraron dentro del rango 5-30 µg/mL, presentando valores más bajos en CMI, los extractos obtenidos de Tarqui. Mediante el HPLC pudimos determinar que las fracciones con ligera actividad obtenidas de cada uno de los extractos recolectados en lugares diferentes, presentaban el pico correspondiente a la hiperforina por lo que se podría señalar a esta como sustancia activa causante en parte de la actividad antibacteriana.



- De acuerdo al análisis estadístico ANOVA para los extractos puros del *Hypericum laricifolium* recolectados en 3 lugares distintos podemos concluir existen diferencias en su concentración mínima inhibitoria frente a *S. aureus*, pero la mayoría de los extractos analizados (B, C, D, E, F), presenta actividad frente a esta cepa, siendo el extracto mas activo el D, que fue recolectado en Tarqui. El análisis estadístico de las fracciones obtenidas de cada uno de los extractos, reflejo que eran diferentes entre si, debido a que posiblemente se trate de compuestos diferentes.
- Por medio del análisis por HPLC y la comparación con el patrón de hiperforina se llego a la conclusión que las fracciones A₃, B₃, C₄, D₃, E₂ y F₂, presentaban como sustancia activa responsable de la acción antibacteriana a la hiperforina.



RECOMENDACIONES.

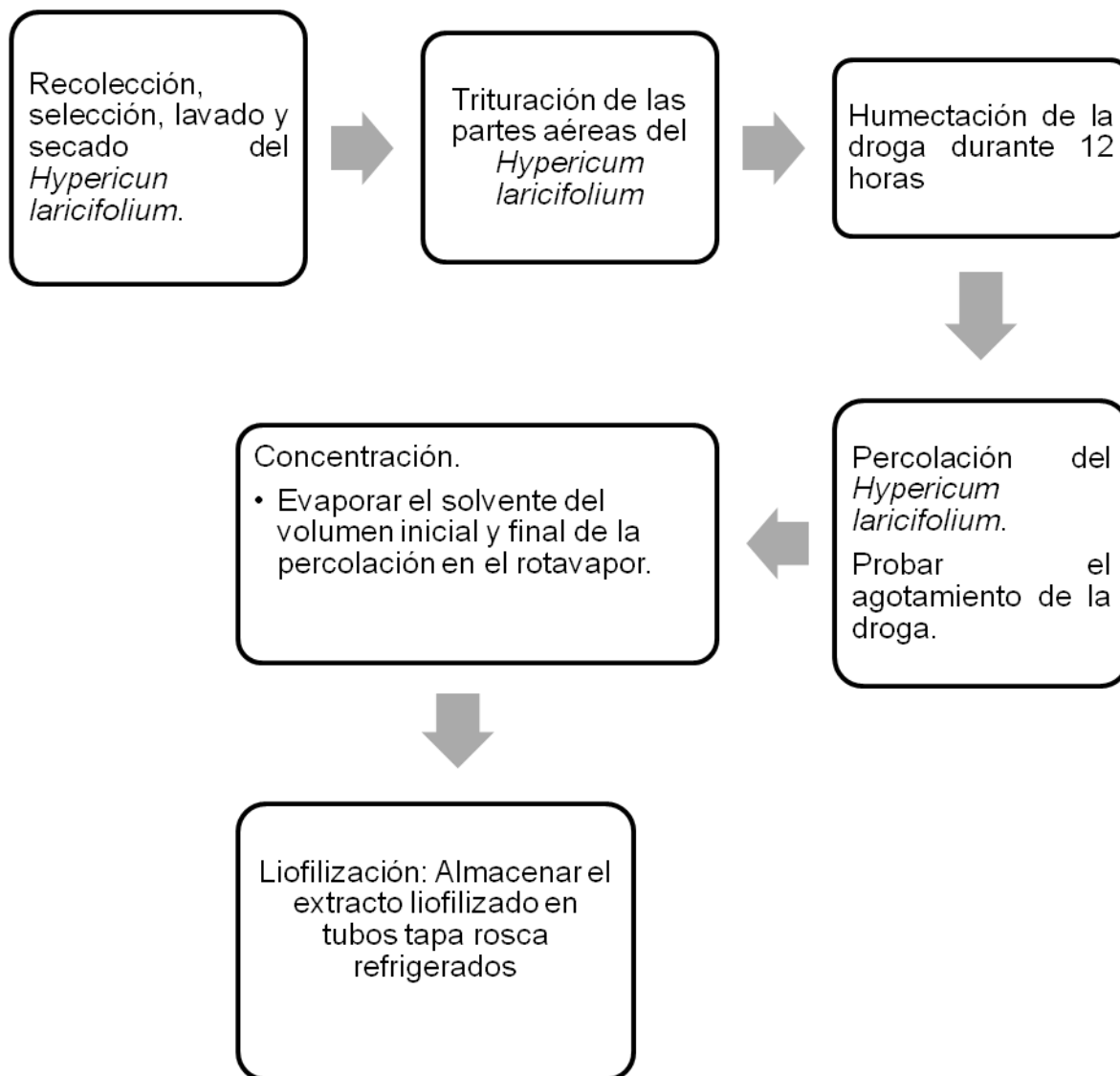
Tomando en consideración lo expuesto en este trabajo, recomendamos lo siguiente:

- Evaluar la posible actividad antibacteriana en diferentes especies nativas o endémicas pertenecientes al género *Hypericum*, con el fin de determinar la posible similitud en su efecto farmacológico
- Realizar estudios sobre la variabilidad de la actividad antibacteriana del *Hypericum laricifolium* frente a diferentes variables que puedan afectar su composición fitoquímica como período de recolección, altitud, estado de desarrollo de la planta, entre otras.

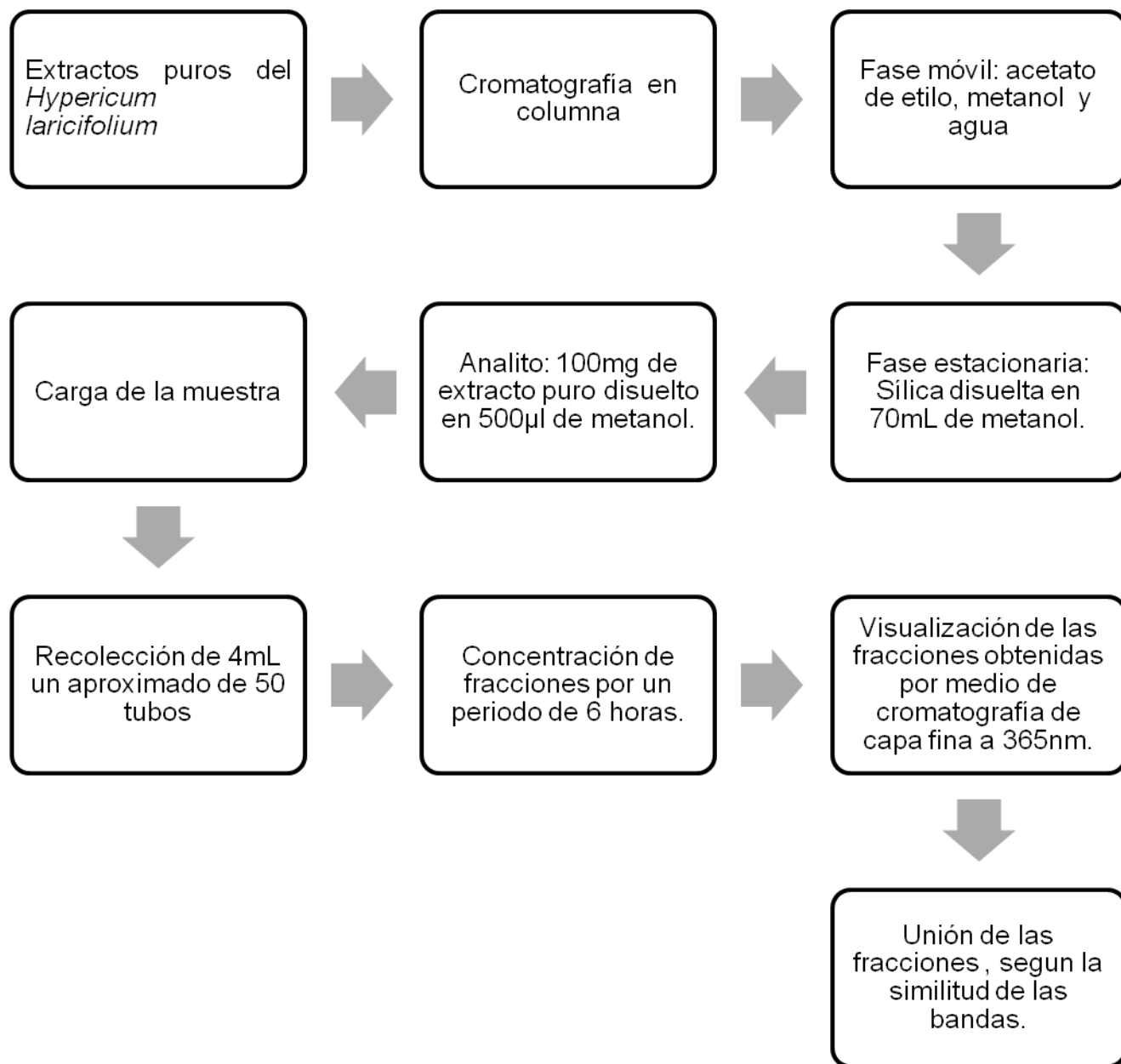


ANEXOS

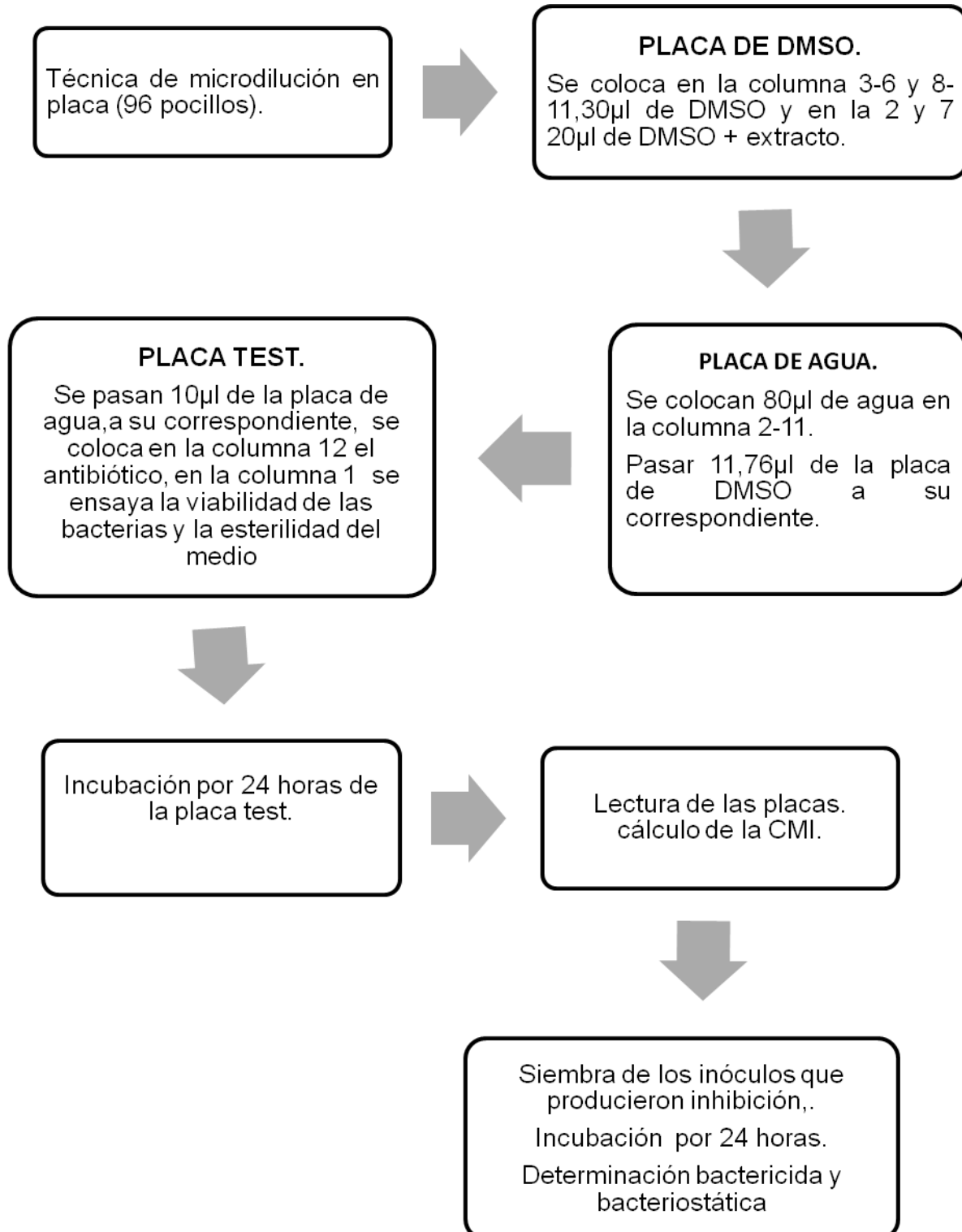
ANEXO 1 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.



ANEXO 2 PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE FRACCIONES.



ANEXO 3 PROCEDIMIENTO DE LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN EN PLACA.





BIBLIOGRAFÍA.

1. **Accame, M. E.** (2000). Compuestos fenolicos: sikimatos. Panorama actual del medicamento , 432-435.
2. **Alonso Paz, E. B.** (1992). Yuyos, Uso racional de las plantas medicinales. Montevideo
3. **Acosta de la Luz, L.** (2 de 2006). *La producción agrícola de plantas medicinales en cuba.* (herboctenia), de www.herboctenia.com
4. **Araujo Díaz, J., & Salas Asencios, R.** (2005). *Científica.* (Universidad científica del sur) 1, Actividad antimicrobina de las plantas: www.cientifica.com
5. **Avato, P., Raffo, F., Guglielmin, G., Vitali, C., & Rosato, A.** (27 de 2 de 2003). *Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity.* www.interscience.wiley.com
6. **Bustos, A., Rodriguez, C., & Cantor, F.** (2008). *Andeva para Diseño Completamente el Azar.* Nueva Granda.
7. **Castillo, M. C., & Bobadilla, L. E.** (2008). Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcoholico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. *Revista Medica Vallejana*, V (1), 10.
8. **Cowan, M. M.** (Octubre de 1999). *Plant Products as Antimicrobial Agents.* (American Society for Microbiology)
9. **Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Berna, A. P., Albring, D., & Nör, C.** (2005). *Bioassay-guided Isolation of Antimicrobial Benzopyrans and Phloroglucinol Derivatives from Hypericum species,* de PHYTOTHERAPY RESEARCH: www.interscience.wiley.com
10. **Domingo, D., & Lopez-Brea, M.** (Dicembre de 2003). *Revisión española de quimioterapia.* (Prous Science. SA.Sociedad), de plantas con acción antimicrobiana.
11. **Dominguez, X. A.** (1973). *Métodos de investigación Fitoquímica* (Segunda ed.). Mexico: Limusa.
12. **Ebrey, R. J., & Bernd L Fiebich, M. H.** (28 de Agosto de 1999). *Antibacterial activity of hyperforin from St John's.*
13. **Escobar Bobadilla, L. E.** (2008). Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina)



- Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. *Rev. Med. Vallejana.*, 5 (1), 28 - 37.
14. **Evans, W. C.** (1991). *Fragmacognosia Trease- Evans* (Décima Tercera ed.). (J. Cabo Torres, Trad.) Mexico: Interamericana.
 15. **Ghasemi, P., G.H, R., Malekpoor, B., & Roohi, B.** (08 de 2011). *Variation in antibacterial activity and phenol content of Hypericum scabrum L. population.*, de www.academicjournals.org/JMPR
 16. **Graind, K., & Granjoo, T.** (1959). *Antibacterial principle of Hypericum perforatum*. Pharmacopsychary.
 17. **Humani Achata, M. E., & Ruiz Qui, J. R.** (2005). *Determinación de la actividad antifúngica contra Candida albicans y Aspergillus niger de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú*. Obtenido de http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani_am/html/sdx/huamani_a_m.html
 18. **Hasegawa, D. M.** (1991). *Fitoquímica orgánica* (primera ed.). Venezuela: consejo de desarrollo científico y humanístico.
 19. **Hernández, R., & Gally Jordá, M.** (1981). *Plantas medicinales*. México: pax méxico.
 20. **Hoogesteger, C.** (1994). *Uso de plantas medicinales*. México: pax méxico.
 21. **Jover Botella, A., & García Bermejo, M. J.** (2003). *Manual de auxiliar de farmacia* (primera ed.). España: editorial mad, s.l.
 22. **Kuklinski, C.** (2000). *Farmacognosia*. Barcelona: Omega.
 23. **Lock, s. O.** (s.f.). *Flora andina y amazónica: un aporte a su conocimiento*.
 24. **López Briz, E., & Salvador Martínez, A.** (2007). *Manuel de fitoterapia*. (e. Castillo garcía, & i. Martínez solís, edits.) España: Elsevier.
 25. **Marcano, D., & Hsegawa, M.** (2002). *Fitoquímica organica*. Caracas, venezuela: torino.
 26. **Muñoz, F.** (1987). *Plantas medicinalesy aromaticas: estudio, cultivo y procesado*. Madrid, españa: mundi prensa libros.
 27. **Orlando Muñoz, M. M.** (2001). *Plantas medicinales de uso en chile: química yfarmacología*. Editorial universitaria.
 28. **Osorio Durango, E. J.** (2009). *Aspectos basicos de farmacognosia*.antioquia.



29. **Patočka, J.** (26 de 02 de 2003). *The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active.*, de Journal of Applied Biomedicine: http://www.jcu.czPatočka_journal of applied biomedicine.com
30. **Plantas Medicinales.**(s.f.), de www.asistencia-hogar.com/.../plantas-medicinales.php
31. **Pulok, M., G.S., S., & B, S. (2002).** *Antimicrobial potential of two different Hypericum species available India*, de Phytotherapy research: www.interscience.wiley.com
32. **Remington. (2000).** *Remington the science an practice of pharmacy* (20 ed.). Usa: medica panamericana s.a.
33. **Robison, K., & Robison, J. (2001).** *Analisis Instrumental*. España: Pearson.
34. **Sáez Castillo, A. J.** (21 de julio de 2010). *Métodos Estadísticos con R y R Commander*.
35. **Salama, A., Hinestrosa, a. P., & Chaves, M. D.** (s.f.). *Fito y Bbioanálisis de algunas plantas utilizadas en la medicina pular con posible actividad farmacológica.*, de revista colobiana de ciencias químico-farmacéuticas.
36. **Sanz Piero, P., Gálvez Galve, J. J., & Ortiz Lucas, M.** (2010). *Monográfico de Hypericum*, de MEDICINA NATURISTA: www.dialnet.unirioja.es
37. **Sharapin, N. (2000).** *Fundamentos de tecnologia de productos fitoterapeúticos*. (vol. 78). Convenio andres bello.
38. **Ugaz, D. O.** *Analisis fitoquímico de metabolitos secundarios*. Peru.
39. **Ulloa, U. C., & Moller Jorgensen, P.** (2005). *Arboles y arbustos de los andes del ecuador.*, de andes trees: www.eFloras.org
40. **United States Pharmacopeial Convention.** (2005). *Farmacopea de los Estados Unidos de América XXLL*.
41. **Vivas,, & ubiergo, P.** (2010). *Asteraceae del Valle Morrenico de Mucubají.* Obtenido de Asteraceae of Morrenic Valley in Mucubají,.
42. **Wayne W, D.** (1996). *Bioestadística*. (Quinta ed.). México: Limusa.
43. **World Health Organization.** (2003). *Who guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*.
44. **Yaniv, z. P., & bachrach, U. P.** (2005). *Handbook of medicinal plants*. Canada: the haworth press.



45. **Zanoli, P. (2004).** *Role of Hyperforin in the Pharmacological.* (C. D. Reviews, Editor), de
file:///C:/Users/Telnet%20Expres/Desktop/traducir/pdf.htm