

UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

TTITULACIÓN DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

“Caracterización físico – química y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Hypericum lancoides* (Hypericaceae) de la provincia de Loja”

Trabajo de fin de titulación.

AUTORA:

Romero Saraguro, Diana Marisol

DIRECTOR:

Morocho Zaragocin, Segundo Vladimir, M.Sc.

Loja - Ecuador
2013

CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Diana Marisol Romero Saraguro declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y de tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Diana Marisol Romero Saraguro

CERTIFICACIÓN

Loja, Enero del 2013

M.Sc.

Segundo Vladimir Morocho Zaragocin.

DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “**CARACTERIZACIÓN FÍSICO – QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Hypericum lancioides* (HYPERICACEAE) DE LA PROVINCIA DE LOJA**” realizado por el profesional en formación: Diana Marisol Romero Saraguro; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en aspectos de forma y contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

M.Sc. Segundo Vladimir Morocho Zaragocin.

DIRECTOR DE TESIS

AUTORÍA

Los conceptos, ideas, metodologías y los resultados obtenidos en la presente investigación, así como las discusiones, conclusiones y recomendaciones, son de responsabilidad absoluta de la autora.

Diana Marisol Romero Saraguro

DEDICATORIA

Con gran Amor y cariño dedico a:

A Dios por la vida que me ha regalado y las oportunidades que me ha ofreció.

A mis padres, Alonso y Julia, por la formación que me han dado, con todo su amor incondicional, por su apoyo de cada día.

A toda mi familia en especial a mis hermanas María y Sonia, las quiero mucho, quienes me han apoyado en todo lo que he querido hacer en la vida, me han impulsado en los momentos más difíciles de mi vida

Diana Marisol Romero Saraguro

AGRADECIMIENTO

Gracias a DIOS por haberme dado la vida, sabiduría, inteligencia la confianza en mí mismo para poder terminar con éxito la carrera.

A toda mi familia, por haber confiado siempre en mí y haberme permitido alcanzar esta meta, por apoyarme todos los días de mi vida, y enseñarme que la única persona que hay que superar, es uno mismo. Por haber instituido en mí la confianza en Dios, y por haberme formado como soy. Gracias por ser los mejores padres.

Al ingeniero Vladimir Morocho Z. director de tesis gracias por todo el apoyo y de su tiempo valioso brindado durante la realización de este proyecto. Gracias hoy y siempre.

A la ingeniera Diana Guaya mi gratitud de manera especial, por haber depositado la confianza en mí y orientarme.

Al Instituto de Química Aplicada, al laboratorio de Análisis Instrumental por la colaboración desinteresada durante el desarrollo de la presente investigación.

A la Universidad Técnica Particular de Loja y a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por permitirme vivir una gran experiencia profesional y humana, brindándome sus enseñanzas para llevar a cabo mis objetivos personales y académicos

A mis mejores amigas M, C, A, M, A, gracias por su apoyo en mis momentos difíciles, sus buenos consejos su compañía y cariño, y por las bellas experiencias en ésta etapa de mi vida, siempre las recordare.

GRACIAS A TODOS!!!!

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|-------------------------|-----|
| CESIÓN DE DERECHOS..... | i |
| CERTIFICACIÓN..... | ii |
| AUTORÍA..... | iii |
| AGRADECIMIENTO..... | iv |
| DEDICATORÍA..... | v |
| ÍNDICE..... | vi |
| RESUMEN..... | xi |
| ARTICULO..... | xii |

I. PRESENTACIÓN DE FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

| | |
|-----------------------------------|---|
| 1.1.Fin del proyecto..... | 2 |
| 1.2.Propósito del proyecto..... | 2 |
| 1.3.Componentes del proyecto..... | 2 |
| 1.4. Diseño estadístico..... | 3 |

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

| | |
|------------------------|----|
| 2.1. Introducción..... | 5 |
| 2.2. Antecedentes..... | 16 |

III. MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 3.1. Recolección del material vegetal..... | 21 |
| 3.1.1 Selección de la materia vegetal..... | 22 |
| 3.2. Obtención del aceite esencial por arrastre de vapor..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 3.2.1. Determinación de la Humedad..... | 24 |
| 3.2.2. Determinación del Rendimiento..... | 25 |
| 3.3. Determinación de propiedades físicas..... | 25 |
| 3.3.1. Densidad Relativa..... | 25 |
| 3.3.2. Índice de Refracción..... | 26 |
| 3.4 Determinación de la composición química del aceite esencial | |
| 3.4.1. Cromatografía de Gases (GC)..... | 26 |
| 3.4.2. Identificación de la composición química del aceite esencial..... | 28 |
| 3.4.3. Preparación de las muestras..... | 29 |
| 3.4.4. Parámetros operacionales del GC-MS en la columna capilar DB-5MS..... | 31 |
| 3.4.5. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna capilar HP-INNOWAX..... | 32 |
| 3.4.6. Identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos del aceite esencial en base a los índices de Kovats y los espectros de masas..... | 33 |
| 3.4.7. Obtención de los cromatogramas..... | 33 |
| 3.4.8. Determinación de los Índices de Kovats..... | 34 |
| 3.4.9. Cromatografía de gases acoplado al detector de ionización de llama (GC-FID)..... | 34 |
| 3.4.10. Comparación de los cromatogramas obtenidos en CG-MS con los obtenidos en GC-FID..... | 37 |
| 3.5. Evaluación de la actividad biológica..... | 38 |
| 3.5.1. Determinación antimicrobiana de los aceites esenciales..... | 38 |
| 3.5.1.2 Método de Microdilución en Caldo..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.5.1.3. Microorganismos de prueba..... | 38 |
| 3.5.1.4. Preparación de medios de cultivo y condiciones de incubación.. | 39 |
| 3.5. 1.5Preparación del cultivo overnight..... | 40 |
| 3.5.1.6 Preparación del caldo de Cultivo Muller Hinton..... | 40 |
| 3.5.1.7 Preparación de la suspensión de los inóculos..... | 40 |
| 3.5.1.8. Procedimiento CMI antibacterianos..... | 40 |
| 3.5.2. Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales..... | 41 |
| 3.5.2.1Hongos Dermatofitos..... | 41 |
| IV. RESULTADOS Y ANALISIS | |
| 4.1. Porcentaje de humedad..... | 44 |
| 4.2. Rendimiento del aceite esencial..... | 45 |
| 4.4. Propiedades Físicas del Aceite Esencial..... | 45 |
| 4.4.1. Densidad..... | 45 |
| 4.4.2. Índice de refracción..... | 45 |
| 4.5. Composición química del aceite esencial de <i>Hipericum lancoides</i> ... | 46 |
| 4.6. Proporción relativa de los componentes del aceite esencialDB5; HPINOWAX (MS) y DB5; HP-INOWAX (FID)..... | 51 |
| 4.6.1. Espectros de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de <i>Hypericum lancoides</i> | 56 |
| 4.7. Actividad biológica del aceite esencial | 59 |
| 4.7.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Hongos..... | 59 |
| 4.7.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de bacterias..... | 60 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| V. CONCLUSIONES..... | 63 |
| VI. RECOMENDACIONES..... | 65 |
| VII. ANEXOS..... | 67 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Clasificación científica de <i>Hypericum lancioides</i> | 18 |
| Tabla 2: Características de las columnas capilares..... | 28 |
| Tabla 3: Medios de cultivos y condiciones de incubación..... | 39 |
| Tabla 4: <i>Promedio</i> de humedad de las tres recolecciones..... | 44 |
| Tabla 5: Rendimiento de las tres recolecciones de <i>Hypericum lancioides</i> | 45 |
| Tabla 6: Determinación de índice de refracción..... | 46 |
| Tabla 7: Compuestos Identificados en DB5-MS y HP-INOWAX..... | 47 |
| Tabla 8: compuestos del aceite esencialDB5; HPINOWAX (MS) y DB5; HP-INOWAX (FID)..... | 52 |
| Tabla 9: actividad anti fúngica del aceite esencial..... | 59 |
| Tabla10: Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Hypericum lancioides</i> | 60 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|-----------|
| Esquema 1..... | 20 |
| Esquema 2: esquema simplificado de las corridas cromatográficas..... | 30 |
| Esquema 3: condiciones de operación del GC-MS en la columna DB- | |

| | |
|---|----|
| 5MS..... | 31 |
| Esquema 4: condiciones de operación de GC-MS en la columna HP-INNOWAX..... | 32 |
| Esquema 5: Parámetros operacionales en la columna DB-5MS (GC-FID)..... | 35 |
| Esquema 6: Parámetros operacionales en la columna HP-INNOWAX (CG-FID)..... | 36 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: <i>Trichophyton rubrum</i> | 9 |
| Figura 2,: <i>Tricophyton mentagrophytes</i> | 10 |
| Figura 3: <i>Staphylococcu saureus</i> | 12 |
| Figura 4: <i>Enterococcus faecalis</i> | 12 |
| Figura 5: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 13 |
| Figura 6: <i>Proteus vulgaris</i> | 14 |
| Figura 7: <i>Klebsiella peumoniae</i> | 14 |
| Figura 8: <i>Escherichia coli</i> | 15 |
| Figura 9: <i>Salmonella tyhimurium</i> | 15 |
| Figura 10: Área de estudio de la especie de <i>Hypericum lancioides</i> | 21 |
| Figura 11: Proceso de destilación..... | 23 |
| Figura 12: Cromatografía de gases..... | 27 |
| Figura 13: Ilustración de la microplaca..... | 41 |
| Figura 14: Compuestos mayoritarios..... | 50 |
| Figura 15: Cromatogramas del aceite esencial de <i>Hipericum lancioides</i> | |

| | |
|---|----|
| de las tres recolecciones realizadas en DB5-MS..... | 54 |
|---|----|

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

| | |
|---|----|
| Fotografía 1. <i>H. lancioides</i> | 18 |
| Fotografía 2. Lámpara ULTRA X..... | 24 |
| Fotografía 3. Peso del picnómetro..... | 25 |
| Fotografía 4. a) Refractómetro ABBE, b) lectura de resultados..... | 26 |
| Fotografía 5: Cromatografo de gases..... | 28 |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo I. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD..... | 67 |
| Anexo II. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL..... | 68 |
| Anexo III. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20 0C... | 69 |
| Anexo IV. DETERMINACIÓN DEL INDICE DE REFRACCIÓN..... | 71 |
| Anexo V. BIBLIOGRAFÍA DE LOS ÍNDICES DE KÓVATS REPORTADOS EN LA LITERATURA..... | 73 |

RESUMEN

Se determinó la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *Hypericum lancioides* recolectada en Saraguro-Loja (Ecuador) mediante CG-MS y CG-FID. El aceite esencial se compone principalmente de monoterpenos, squaliterpenos y terpenoides. Se definieron un total de 31 compuestos los cuales representan el 91.19% en la columna DB5-MS y el 89,36% en la columna HP-INNOWAX, 17 compuestos fueron determinados en ambas columnas. Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *H. lancioides* son: limonene (33.86%); nonane (6,77%); caryophyllene oxide (5,04%); alpha pinene (4,99%); undecane (4,02%).

La actividad biológica se determinó mediante el método de microdilución en caldo. El aceite esencial de *H. lancioides* inhibió el crecimiento de *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) y *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) pero este fue inactivo contra las bacterias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), y las bacterias gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



“BIOLOGICAL ACTIVITY AND PHYSICAL CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE ESSENTIAL OIL *Hypericum lancioides* (Hypericaceae) OF THE PROVINCE OF LOJA”, ECUADOR

Diana Romero¹, Eduardo Valarezo², Luis Cartuche², Vladimir Morocho².

¹Escuela de Bioquímica y Farmacia, Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja Ecuador.

²Departamento de Química Aplicada, Universidad Técnica Particular de Loja
San Cayetano Alto s/n, PO Box 11 01 608, Loja Ecuador.

AUTHOR ADDRESS: dmromerox@utpl.edu.ec

ABSTRACT

The chemical composition of the essential oil of aerial parts of *Hypericum lancioides* Cuatrec, (Hypericaceae) in flowering stage at Saraguro-Loja (Ecuador) was analyzed by GC/MS and GC/FID. A total of thirty one compounds were identified. The main compounds are limonene (33.86%); nonane (6.769%); caryophyllene oxide (5.044%); alpha pinene (4.985%); and undecane (4.021%). The biological activity was determined by the broth microdilution method. *H. lancioides*, oil inhibited the growth of *Trichophyton rubrum* (ATCC28188) and *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185) but it was inactive against the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*(ATCC 27853); *Klebsiella pneumonia* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Salmonella typhimurium* (LT2); and Gram-positive bacterium *Enterococcus faecalis*(ATCC 29212); *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923).

Key words: *Hypericum lancioides*; limonene; essential oil; *Trichophyton mentagrophytes*; *Trichophyton rubrum*

INTRODUCTION

Hypericum (hypericaceae) is a large cosmopolitan genus, containing about 400 species mainly herbs and shrubs^{1, 2}, which grow widely in temperate regions and have been used as traditional medicinal plants in various parts of the world^{3, 4}.

In Ecuador 22 species present 17 shrub species found in the Andean region and especially in the moors badlands⁵.

There is a growing interest in constituents of this genus because a number of species have been shown to possess various biological activities.

They are source of naphthodianthrones flavonoids, xanthenes, tannins and essential oil^{6, 7}

The fact that naphthodianthrones (hypericin and pseudohypericin), which are found in *hypericum* species possess high antiretroviral activity *in vitro* and *in vivo*, suggested that these compounds may be of interest in the search of new tools against the acquired immune deficiency syndrome (AIDS)⁸. It has also been reported that these compounds have antidepressant activity⁹.

Hypericum Lancioides is a native shrub that is between 2500 to 4500 m.o.s.l. in the provinces of Loja, Napo Pichincha, Carchi, Cotopaxi and Imbabura.

It is commonly known as bura bura, used for dyeing cloth, used in conjunction with other plant species¹⁰.



MATERIALS AND METHODS

Plant material

The aerial parts of *H. lancioides* in flowering stage were collected in "Loma la Torre" of Saraguro of the province of Loja; with coordinates 696176E; 9574249N, 2600 m.o.s.l. The vegetable material was distilled in three different occasions with a 30 days interval. The specie was identified by one of the authors (V.M). A Voucher sample is conserved at UTPL (Universidad Técnica Particular de Loja), with the identification number PP-hy-001.

Isolation of essential oil

The essential oil was obtained of 2500 g. from the fresh aerial by hydro-distillation for 2.5 hours using Clevenger-type apparatus.

Gas chromatography (G C)

The analysis of the chemical composition of the essential oils was done using a gas chromatograph (Agilent 6890 Series) coupled to mass spectrometer (Agilent 5973 inert series) equipped with a polar HP-INNOWAX column (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm) a nonpolar column DB5-MS (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm), and a automatic split/splitless injector (7683 series), provided with a computerized system MSD-Chemstation D.01.00 SP1 and a Flame Ionization detector. The dilution of oil was made using 10 µL of the essential oil concentrated, diluted in 990 µL dichloromethane and injected under the following parameters: carrier gas Helium 0.9 ml/min; split ratio 50:1; temperature of the injector 210°C; temperature of the detector 250°C; temperature of the oven 50°C-210°C with a ramp of 2.5 ml/min

Identification and Quantification

Identification of components was based on their Kovats indices (KI) on both columns DB5-MS and HP-INNOWAX.

KI were determined with reference to a homologous series of aliphatic hydrocarbons (C10-C25). Mass spectra were compared with the spectra of the data base Wiley 7n.1. The quantification of the components was made on the basis of their GC peak areas on the two columns.

Physical properties

The essential oil density was determined according to the standard ANFOR NF T 75-111, and the refraction index was determined using a refractometer (model ABBE), according to the standard ANFOR NF T 75-112.

Antimicrobial activity

The essential oil was tested with Gram-negative bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumonia* (ATCC 9997); *Proteus vulgaris* (ATCC 8427); *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (LT2), two Gram-positive bacterium, *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). The antifungal activity was tested against two organisms *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) and *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185). The minimal inhibitory concentration (MIC) of *hypericum lancioides* essential oil was determined using a broth microdilution method in 96-well microtitre. All tests were performed in Muller Hinton broth, with the exception of the fungus which employed Sabouraud dextrose broth. The oils were diluted using 20 µL of the essential oil concentrated, diluted in 980 µL Dimethyl sulfoxide (DMSO). To evaluate the biological activity for the bacterium the microorganism were grown overnight at 36°C incubated for 24 hours, of this cultivation were taken 150-300 µl in 7 mL of NaCl solution, adjusting the inoculum to an equivalent concentration to 0.5 in the scale of



McFarland, of this suspension we took 140 μ L and we inoculated in 6.86 mL broth Muller Hinton adjusting to a bacterial population of 2×10^6 CFU/mL; 100 μ L of this suspension are used to complete to 200 μ L the final volume of the cultivation dish, in this way it adjusts the bacterial population to 5×10^5 CFU/mL. Finally the plates were incubated at 37°C for 18 to 24 h. Antibiotics solutions (1 mg/mL) of ampicillin, gentamicin, and the DMSO as negative control. MIC values were determined using a final concentration of 5×10^4 esporos/mL of *Trichophyton Mentagrophytes* (ATCC 28185) and *Trichophyton rubrum*. (ATCC 28188)

The MIC was defined as the lowest concentration of substance that prevented growth, which was determined by the appearance of mycelial growth after 96 hours of incubation. Itraconazole was used as positive control (1 mg/mL), and the DMSO as negative control.

RESULTS AND DISCUSSION

The essential oil of *H. lancioides* at room temperature and under refrigeration has a yellowish color. The humidity values yield and physical properties of the essential oil in the three collections, are shown in the table 1.

Table 1. Plant humidity, yield and physical properties.

| Code* | Hm (%) | R (%) | d ²⁰ | n ²⁰ |
|-------|--------|--------|-----------------|-----------------|
| HL 1 | 43,94 | 0,1076 | 0,775 | 1,476 |
| HL 2 | 52,28 | 0,0849 | 0,765 | 1,485 |
| HL 3 | 51,96 | 0,0773 | 0,772 | 1,488 |

*HL=Code for *hypericum lancioides*, and the numbers 1, 2 and 3 for each collection.

Hm =Relative humidity

d²⁰ =Relative density

n²⁰ =Index of refraction.

The qualitative and quantitative analyses of the oil are shown in Table 2 in order of elution from the DB5-MS and

HP-INNOWAX column. A total of 31 compounds were determined, corresponding to the two columns DB5-MS and HP-INNOWAX respectively. The main compounds are limonene (33.86%); nonane (6,77%); caryophyllene oxide (5,04%); alpha pinene (4,99%); and undecane (4,02%). The essential oil was mainly composed by monoterpenes, terpenoides and sesquiterpenes.

Previous investigations have shown that genus *hypericum* from different origins had varying composition¹¹. In many samples it has been report that α pinene and β pinene (57, 3% and 9, 0%, respectively) were the major components¹². In comparison with the obtained results in present investigation in which, the majority compound is the limonene (33.86%).

Difference in chemical composition may be due to the fact that the composition of essential oils depends on the plant species, the chemotypes and climatic condition¹³⁻¹⁴.

The results of the antifungal CMI of the *H. lancioides* are shown on the table 3

Tabla 3. Minimal inhibitor concentration (MIC)

| Oils | Minimal inhibitory concentration (ug/ml) | | |
|--------|--|-----|------|
| | Tm | Tr | C |
| HL 111 | 250 | 125 | 7,81 |
| HL 112 | 250 | 125 | 7,81 |
| HL 113 | 250 | 125 | 7,81 |
| HL 121 | 125 | 125 | 7,81 |
| HL 122 | 125 | 125 | 7,81 |
| HL 123 | 250 | 125 | 7,81 |
| HL 131 | 250 | 125 | 7,81 |
| HL 132 | 250 | 125 | 7,81 |
| HL 133 | 250 | 63 | 7,81 |

Tm=*Trichophyton mentagrophytes* ATCC[®] 28185

Tr=*Trichophyton rubrum* ATCC[®] 28188.

Control: (Itraconazol 1mg/mL)



UTPL
UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------------------------|-------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| 21 | beta-selinene | 1484 | 1490 ^f | 0,832 | 1,338 | | 1,085 | 0,076 | 0,132 | | | | | | | | | | |
| 22 | beta-bisabolone | 1501 | 1504 ^f | 0,484 | 0,399 | 0,536 | 0,473 | 0,069 | 0,147 | | | | | | | | | | |
| 23 | trans-nerolidol | 1558 | 1539 ^j | | 0,492 | 0,569 | 0,534 | 0,055 | 0,104 | 2045 | 2054 ^j | 0,475 | 0,527 | 0,576 | 0,526 | 0,05 | 0,096 | | |
| 24 | caryophyllene oxide | 1568 | 1583 ^f | 5,724 | 3,312 | 6,094 | 5,044 | 1,511 | 0,299 | 1963 | 1999 ^j | 5,602 | 5,167 | 6,024 | 5,598 | 1,542 | 0,312 | | |
| 25 | | NI | | 5,743 | | 5,679 | 5,711 | 0,044 | 0,007 | NI | | 4,088 | | 4,243 | 4,166 | 0,109 | 0,026 | | |
| 26 | | NI | | 3,59 | 2,57 | 3,954 | 3,371 | 0,717 | 0,212 | NI | | 1,949 | 1,674 | 2,099 | 2,024 | 0,215 | 0,106 | | |
| 27 | nonane-3-methyl ^e | | | | | | | | | 979 | 972 ^l | | 1,942 | 2,867 | 2,405 | 0,654 | 0,272 | | |
| 28 | tricyclene ^e | | | | | | | | | 1006 | 1014 ^m | 0,526 | 0,381 | | 0,453 | 0,907 | 0,002 | | |
| 29 | z-beta-farnesene ^e | | | | | | | | | 1665 | 1662 ^m | 1,442 | 1,646 | 1,137 | 1,409 | 0,256 | 0,181 | | |
| 30 | alpha-cedrene ^e | | | | | | | | | 1610 | 1562 ⁿ | | 4,346 | 4,184 | 4,262 | 1,297 | 0,31 | | |
| 31 | gamma-selinene ^e | | | | | | | | | 1707 | 1682 ^o | 0,753 | 0,503 | | 0,628 | 0,175 | 0,233 | | |
| | | | | | | | | | | | | | 91,185 | | | | | | 89,36 |

a = Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB5-MS

b = Índice de Kovats determinados experimentalmente.

c = índice de Kovats de acuerdo a la referencia bibliografía.

d = % promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en la columna DB5-MS y HP-INOWAX respectivamente.

e = Compuestos identificados solo en la columna HP-INOWAX

* = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas

X = Promedio

σ = Desviación Estándar

CV = Coeficiente de variación

IKREF, Literature: ^fref 1, ^gref 2, ^href 3, ⁱref 4, ^jref 5, ^kref 6, ^lref 7, ^mref 8, ⁿref 9, ^oref 10 (anexo V)



The essential oil presented a good antifungal activity for oils HL121 and HL122 for the fungi *T. Mentagrophytes* (ATCC 28185) is of 125 µg/ml. The CMI for *T. rubrum* (ATCC 28188) the oil HL 133 inhibit 62, 5 µg/ml. According to Holetz classification the concentration that oil inhibits the growth to is good¹⁴. This activity is suspected to be associated with the high percentage of terpenoids and squiterpenos in previous reports that β-caryophyllene, β-pinene and caryophyllene oxide possessed moderate to Strong activities against a number of microorganisms¹⁵.

CONCLUSIONS

A total of 31 compounds were determined, corresponding to the two columns DB5-MS and HP-INNOWAX respectively. The majority component is limonene (38.71%); the oil did not show activity with the bacterium evaluated, but it showed activity with the fungi *T. Mentagrophytes* (ATCC 28185) and *T. rubrum* (ATCC 28188)

ACKNOWLEDGMENT

To the Department de Química Aplicada of the Universidad Técnica Particular de Loja for funding this research, all staffworking in this Institute.

REFERENCES

1. Kitanov GM, Nedialkov PT. Mangiferin and isomangiferinin some *Hypericum* species. *Biochem. Sys. Ecol.* 1998; 26: 647–653
2. Zargari A. *Medicinal Plants*, 5th edn, vol. 1. Tehran University: Tehran, Iran, 1990; 318–325.
3. Yazaki K, Okada T. *Biotechnol. Agric. Forestry*, 1994;26: 167-178.
4. Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. *Pharm. Pharmacol.* 2001;53: 583-600.
5. Robson, N. 1990. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Section 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. *Bull. Brit. Mus. Bot.* 20: 1–151.
6. Bombardelli E, Morazzoni P. *Fitoterapia*, 1995; LXVI: 43–68.
7. Couladis M, Baziou P, Petrakis PV, Harvala C. *Flavour Fragr. J.* 2001; 16: 204–206.
8. Meruelo D, Lavie G, Proc. Natl. Acad. Sei. USA. 1988: 85: 5230-5234.
9. Butterweck V, Bockers T, Korte B, Wittkowski W, Winterhoff H. *Brain Res.* 2002: 930: 21-29.
10. Jørgensen, S. Leon-Yáñez, (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press, pp. 519-522.
11. Gudzic B, Djokovic D, Vajs V, Palic R, Stojanovic G. (2002). *Flavour Fragr. J.*17:392-394.
12. Cakier A, Kordali S, Zengin H, Izumi S, and Hirata T. 2003. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*.
13. Shu.CK, Lawrence BM. Reason for the variation in composition of some commercial essential oils. In *Flavor Chemistry and antioxidant Properties* Risch SJ (eds) *spices* 1997:138-159.
14. Magiatis P, Skaltsounis AI, Chinou I, Haroutounian. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek *Achillea* species. 2002, 287-290.
15. Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *MemInst*



UTPL
UNIVERSIDAD TÉCNICA
PARTICULAR DE LOJA

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

Oswaldo Cruz. Vol: 97:1027-1031.

16. Magiatis P, Skaltsounis AI, Chinou I, Haroutounian. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of the essential oils of three Greek Achillea species. 2002, 287-290.
17. Adams, RP. (2007). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream.

CAPÍTULO I
PRESENTACIÓN DEL FIN, PROPÓSITO Y
COMPONENTES DEL PROYECTO



1.1. Fin del proyecto

- Aportar a la identificación de componentes activos que sean de interés y utilidad desde el punto de vista farmacológico.
- Contribuir al enriquecimiento de la información disponible sobre la flora aromática del sur del Ecuador.

1.2. Propósito del proyecto

Determinar la composición físico - química y evaluar la actividad biológica del aceite esencial de *Hypericum lancoides* (Hypericaceae) de la provincia de Loja.

Este estudio determinará la composición de los componentes químicos del aceite esencial, por medio de la cromatografía de gases, ya que hoy en día los aceites esenciales de muchas plantas aromáticas forman parte de formulaciones farmacéuticas.

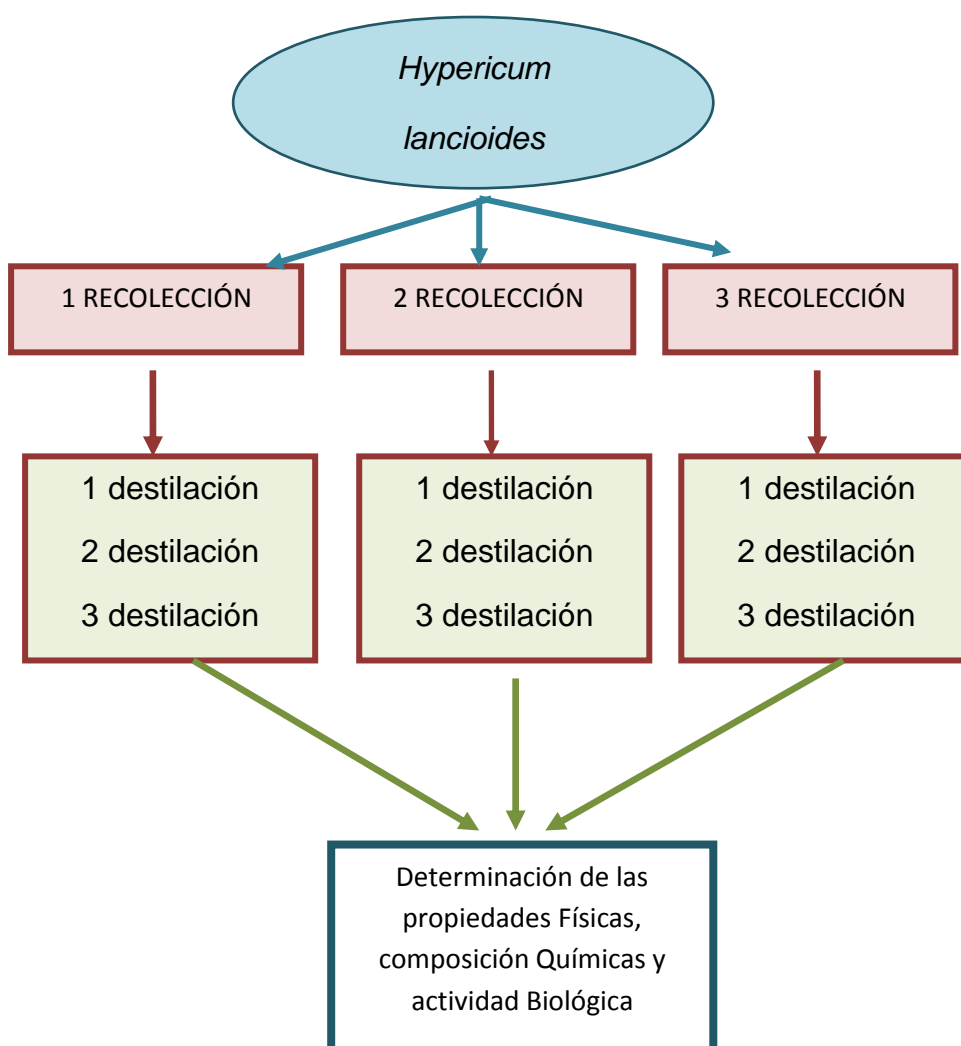
1.3. Componentes del proyecto

- Extracción del aceite esencial de *Hypericum lancoides* y determinar el rendimiento.
- Caracterización física.
- Caracterización química, cromatografía de gases para definir compuesto mayoritario.
- Concentración Mínima Inhibitoria para hongos y bacterias, en concentraciones bajas las cuales permitirán que dicha especie sea usada en la elaboración de nuevos fitofármacos.



1.4 Diseño Experimental

Los análisis obtenidos se realizaron por triplicado a cada uno de los aceites de la especie, se aplicó un diseño estadístico para los datos de humedad, rendimiento y cromatografía de los cuales se calculó la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación, con el objetivo de establecer datos más confiables.



CAPÍTULO II

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES



2.1. Introducción

El uso de plantas medicinales con fines terapéuticos es una práctica antigua, basada en el conocimiento del sentido común en un contexto histórico, representando así parte de la cultura de un pueblo y un conocimiento que es difundido de generación en generación, convirtiéndose de esta forma en una práctica muy utilizada en la salud humana¹. En las plantas, los seres humanos encuentran una amplia gama de beneficios tales como alimentos y su uso medicinal^{2,3}. Las plantas medicinales se utilizan para tratar diversos padecimientos tales como: afecciones de la piel, caída del pelo, caspa, analgésicos en general, para dolor de dientes, cabeza, padecimientos del sistema circulatorio como anemia, sistema digestivo como cólicos, también son utilizadas para tratar el cáncer⁴.

Entre otras aplicaciones tiene gran importancia en la medicina moderna, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos pueden servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos⁵.

La OMS define planta medicinal como todo y cualquier vegetal que posee sustancias que pueden ser utilizadas con finalidades terapéuticas o cuyos principios activos puede servir de precursores para síntesis de nuevos fármacos⁶.

¹Nidia C, Rojas M, Hernández, Mariela Matos Aguilera, Beatriz Romeu Álvarez. (2006). "Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav.", Universidad de La Habana, Rev Cubana Plant Med

² Cronquist A. (1969). Introducción a la Botánica. Ed. Continental, México D.F. 96 p.

³ Shultes R. Von E R. (1997). Ethnobotany. Evolution of a discipline. Dioscorides press. Portland 414p.

⁴ Argueta A. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana vol 3, p 1786.

⁵ Bucay L. (2009). estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana de la violetilla (*Hybanthus parviflorus*). Tesis

⁶ Farnsworth N. (1966). biological and phytochemical screening of plants pharmaceutical: 225, 275.



La mayoría de la población mundial, especialmente en los países en desarrollo, dependen de la medicina tradicional basada en plantas medicinales y aromáticas⁷.

Con el paso de los años se han registrado varios procedimientos clínicos que utilizan las plantas medicinales tradicionales⁸.

Existen innumerables sustancias químicas vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en uno o más países, de las cuales el 74 % fue descubierto a partir de su empleo en medicina tradicional⁹.

En el Ecuador se reportan 3118 especies que pertenecen a 206 familias usadas con fines medicinales y se sabe que el 75% de ellas son plantas nativas dentro de las categorías medicinales¹⁰. Las infestaciones e infecciones están representadas por el 26% de las plantas utilizadas con propósitos medicinales y tratan afecciones causadas por bacterias, virus hongos, platelmintos, protozoos, nematodos, anélidos y artrópodos¹¹.

En la mayoría de las especies vegetales, aromáticas se encuentran los aceites esenciales¹².

Los aceites esenciales son una mezcla de componentes volátiles producto del metabolismo secundario de las plantas, compuesto generalmente por terpenos y compuestos oxigenados, que asociados o no a otros componentes, generan en conjunto el olor vegetal.

⁷ Estandar internacional para la recolección silvestre sostenible de plantas medicinales y aromáticas. (ISSCC-MAP), versión 1.0. Traducida de la versión original: Medicinal Plant Specialist Group. (2007). International Standard for sustainable Wild Collection of Medicinal and Aromatic Plants (ISSCC-MAP). Version 1.0. Bundesamt für Naturschutz (BfN), MPSG/IUCN, WWF Germany and TRAFFIC, Bonn, Gland, Frankfurt, and Cambridge (BfN-Skripten 195). Pp: 5.

⁸ Veiga.JVF,Pinto. AC,Maciel MAM (2005). Plantas Medicinai: cura segura. Revista Química Nova: 519-528.

⁹ Nidia C, Rojas M, Hernández, Mariela Matos Aguilera y Beatriz Romeu Álvarez, "Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav.", Universidad de La Habana, Rev Cubana Plant Med 2006

¹⁰ De la Torre L, Navarrete N, P. Muriel M., M. J. Macía & H. Balsle (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA & Herbario AAU. Quito & Aarhus. 105–114 pp

¹¹ Manuel Fco. Sanchez O. (2006). Manual práctico de aceites esenciales de aromas y perfumes.

¹² Astiasarán I, Martínez JA. (2005) *Alimentos Composición y Propiedades*. Editorial Interamericana de España, S.A.U. pp. 9



Las aplicaciones de los aceites esenciales son en la industria licorera, como saborizantes, y aromatizantes en la industria tabacalera; en la industria alimenticia, como saborizantes, colorantes, aromatizantes en bebidas, sopas, adobos, etc.; en química farmacéutica, como principios activos, saborizantes, colorantes; en veterinaria, como repelentes de insectos, antisépticos, etc.; uso en medicina terapéutica y aromaterapia, en inhalaciones, nebulizaciones, baños de inmersión, entre otros¹³.

Las aplicaciones industriales y terapéuticas de los AE dependen principalmente de su composición química, calidad, propiedades fisicoquímicas, actividad biológica y propiedades organolépticas, así como del grado de refinamiento de la esencia. Por tal motivo, resulta de vital importancia realizar controles de calidad a los AE y estudiar su composición en función de condiciones geobotánicas de su cultivo¹⁴.

Por otra parte, los aceites y extractos de distintas plantas han sido utilizados para una diversidad de propósitos por miles de años, esto se debe a sus actividades antimicrobianas¹⁵.

En las últimas cuatro décadas se han realizado innumerables estudios sobre sustancias con actividad antimicrobiana, provenientes de plantas superiores con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos¹⁶.

Las enfermedades infecciosas constituyen uno de los principales problemas de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo. Algunos antibióticos disponibles actualmente tienen efectos secundarios indeseables, son ineficaces

¹³ Bandoni, Arnaldo (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. 1ª Ed. La Plata, Argentina: Red de Editoriales Universitarias, p.p. 29-39, 131-140, 380-382.

¹⁴ Grupo latino (2005). Manual de Cultivos Orgánicos y Alelopatía. 470-475p.

¹⁵ Albado E, Saez G, Grabiell S.(2001) Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered.* 2001;12: 17-19

¹⁶ Acosta, M., Gonzalez, M., Araque, M., Velazco, E., Khouri, N., Rojas, L., Usubillaga A. (2003), *Composicion química de los aceites esenciales de Ocimum basilicum L. var basilicum, O. basilicum L. var purpurensceus, O. gratissimum L., y O.tenuiflorum L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial* vol 45 (1).



contra patógenos nuevos o re-emergentes y (o) conducen al rápido desarrollo de resistencia¹⁷. Debido a las serias limitaciones de los medicamentos actuales es necesario disponer de nuevos agentes antimicrobianos, preferiblemente con nuevos mecanismos de acción y menores efectos tóxicos, entre los microorganismos que producen problemas se encuentran hongos y bacterias¹⁸.

Hongos

Los hongos están constituidos por células con estructura de célula eucariota y material genético distribuido en un núcleo, con una membrana celular rígida. Se dividen en dos grupos los mohos (hongos filamentosos) y las levaduras. Los mohos están constituidos por filamentos multinucleados denominados hifas que se reproducen continuamente por sus extremos y con frecuencia se ramifican. Las levaduras se reproducen por gemación y ocasionalmente pueden formar filamentos o pseudohifas¹⁹. Dentro de los hongos se encuentran los dermatofitos.

Hongos Dermatofitos

La etimología del término dermatofito proviene de los términos griegos *derm* (piel) y *phyte* (planta)²⁰. Los dermatofitos son hongos patogénicos humanos y animales que causan infecciones cutáneas. Estos hongos crecen exclusivamente en el estrato corneo, uñas o pelo y producen enzimas hidrolíticas que degradan tejidos compactos queratinizados. Como muchos hongos los dermatofitos secretan sustancias con actividad proteolítica conteniendo proteína como única fuente de carbono y nitrógeno¹⁸. Las infecciones producidas por estos hongos se denominan dermatofitosis, aunque

¹⁷ Mesa G, Rodríguez I, Teja J. (2004). Las enfermedades emergentes y reemergentes: un problema de salud en las Américas. *Rev Panam Salud Pública*; 15(4):285-7.

¹⁸ LAHLOU M. (2004). Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. Review Article. *Phytother. Res.*, 18, p.p. 435-448

¹⁹ Fisher, F., Cook, N.B. (2001). *Micología: Fundamentos y diagnóstico*, Rio de Janeiro: revinter.

²⁰ Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 435-447.

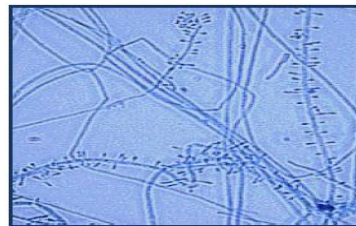


comúnmente también son denominadas tiñas²¹. Los hongos utilizados en la presente investigación son:

Trichophyton rubrum (Ver figura 1). Es actualmente el patógeno más común en el mundo entero causante de dermatofitosis tales como tiña capites, tiña pedís, y onicomicosis. Es de gran importancia porque las onicomicosis causadas por este organismo son extremadamente difíciles de curar²².

Este género produce macroconidios en menor cantidad y microconidios en mayor proporción los macroconidios son lisos, de pared delgada y pueden tener hasta once septos; son de paredes delgadas, dispuestos solitariamente o en racimos y de forma cilíndrica o de lápiz. Los microconidios son piriformes o claviformes²³. (Ver figura 1)

Figura 1: Microconidios piriformes de pared delgada y unicelular de *Trichophyton rubrum*



Fuente: Hernández A

***Trichophyton mentagrophytes*:** (Ver figura 2). Es otro de los agentes causales de dermatofitosis más frecuente. Se caracteriza por presentar un crecimiento relativamente rápido. Presentan dos tipos de colonias: algodonosas o granulares. Las variantes algodonosas son inicialmente blancas, pero pueden tornarse de color crema o acre con la madurez. Las variantes granulares producen colonias planas que se diseminan con una superficie granular gruesa.

²¹ Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G. (1997). Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Star Publishing Co, Belmont.

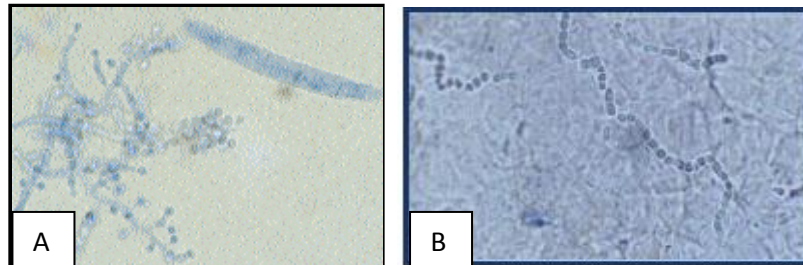
²² Hernández A, Carbajal P, Fernández R, Arenas R (2007). Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México, Rev. Iberoamericana de Micología, Vol: 24: 122-123

²³ Koneman EW, Allen SD, Dawell VR, Janda WM, Sommers HM, Win WC. (1992). Diagnostico microbiologico 3ra. Ed Buenos Aires: ed medica panamericana. P: 692-695.



Al comienzo las colonias son blancas o amarillo intensas, pero después se tornan de color acre o castaño²⁴.

Figura 2: a) y b) hifas fragmentadas y artriconidios de *Tricophyton mentagrophy*



Fuente: winn²³

Bacterias

Las bacterias son los más simples organismos encontrados en la mayoría de los ambientes naturales. Son células esféricas o en forma de bastones cortos con tamaños variados, alcanzando entre 0,2-10 μm de diámetro. La célula bacteriana presenta varias estructuras, algunas de las cuales están presentes sólo en determinadas especies, mientras otras son esenciales, y por lo tanto encontradas en todas las bacterias²⁵.

Una de las estructuras esenciales de la célula bacteriana es conocida como membrana citoplasmática de 8 nm de espesor y responsable de la separación del medio interno (citoplasma) y externo de la célula. El mantenimiento de la forma bacteriana (bacilo, coco, espirilos), se debe a la presencia de la pared celular bacteriana que desempeña una función importante en la división celular dando origen a la formación de un septo o tabique transversal que separa las dos nuevas células resultantes de la división celular.

²⁴ Winn, Allen. Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods, Diagnóstico Microbiológico, Sexta edición, Editorial Médica Panamericana, 2008, pp.: 1140-141.

²⁵ Mims, C., et al. (1999). Microbiología Médica, 2ed. Manole: Saõ Paulo



En la mayoría de las bacterias, la pared celular debe su rigidez a una capa compuesta por una sustancia que sólo se encuentra en procariotas y recibe diferentes denominaciones como mureína, peptidoglicano, mucopéptido²⁶.

De acuerdo con la constitución de la pared, las bacterias pueden ser divididas en dos grandes grupos: Gram negativas y Gram positivas. Las diferencias entre esos dos grupos residen principalmente en sus propiedades de permeabilidad y en los componentes de superficie. Las principales diferencias reveladas por la coloración de Gram están relacionadas por la presencia de una membrana externa en las bacterias Gram negativas y de una espesa capa de peptidoglicano en las bacterias Gram-positivas²⁷.

Bacterias Gram Positivas

Las bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* son los agentes patógenos de los humanos y otros mamíferos, dentro del grupo de las bacterias gran positivas se encuentran las siguientes bacterias:

Staphylococcus aureus: (Ver figura 3). Es un microorganismo del reino de los protistas, ampliamente distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales. El hombre es portador asintomático entre un 20% y 40% de adultos sanos y forma parte de la flora normal de muchos sitios del organismo como piel, nasofaringe y gastrointestinal, causando diversas manifestaciones clínicas, es un coco gran positivo aerobio extracelular de aproximadamente 1µm de diámetro. No presenta movilidad y tampoco forma esporas²⁸.

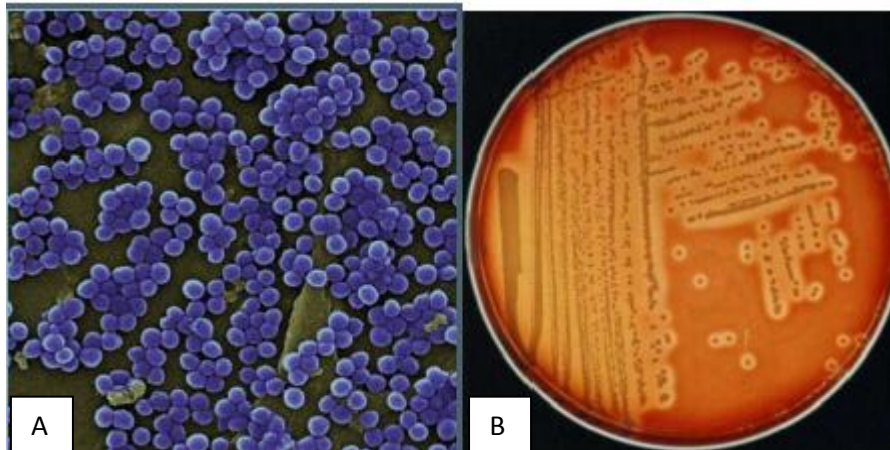
²⁶ Tavares, W. (1999). Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antitumorales, 2ed. Atheneu: San paulo., 792p

²⁷ Ryan, K. J. (1994). Sherris Medical Microbiology: Infectious Diseases. Appleton and Lange: Stamford.

²⁸ Sanchez. L. (1997) *Staphylococcus* Un patógeno de gran virulencia. Rev. Medica, edición N^o 16/17 Peru



Figura 3: a) *Staphylococcus aureus*, coco gram positivo b) *Staphylococcus aureus* presencia de hemolisis β en agar sangre



Fuente: Jorgensen et al, 2000²⁹.

***Enterococcus faecalis*:** (figura 4). Estas bacterias son patógenas que habitan en el tracto gastrointestinal de humanos y animales, desde donde puede pasar vía alimento al humano, estos patógenos suelen tener una multiresistencia a los antibióticos, y que posiblemente, el uso de antibióticos como promotores de crecimiento haya contribuido a esto³⁰.

Figura 4: *Enterococcus faecalis*



Fuente: Jorgensen et al, 2000²⁸

²⁹ Jorgensen K, Hilberg, C and, Vintov J. (2000). food microbiology.

³⁰ Debnam A, Jackson C., Avellaneda G., Barrett J., y Hofacre C., (2005). Effect of growth promotant usage on enterococci species on a poultry farm. Av Dis. 49(3): 36165.



Bacterias Gram Negativas

Dentro de las bacterias Gram negativas se encuentran las *Pseudomonas aeruginosa*,

Pseudomonas aeruginosa: (ver figura 5). Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo gram negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras *Pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoníaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono³¹

Figura 5: *Pseudomonas aeruginosa* bacilo gram negativo



Fuente: Jorgensen et al, 2000²⁸

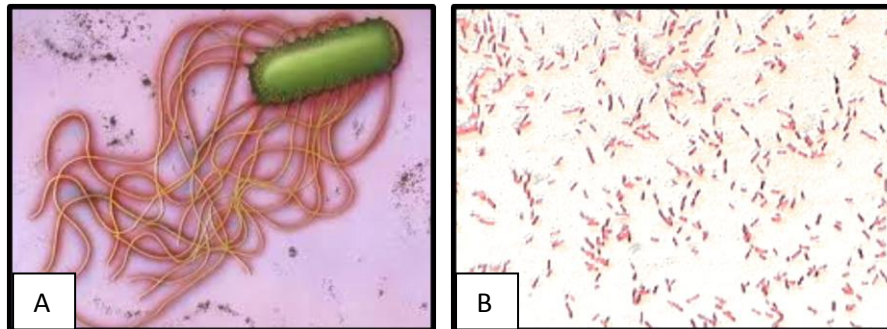
Proteus vulgaris: (Ver figura 6). Es encontrado regularmente en el intestino del hombre. Las infecciones causadas por esas bacterias ocurren principalmente en el trato urinario³²

³¹ Murray P, Baron E, Jorgensen J, Landry M, and, Pfaller M. (2007). Manual of Clinical Microbiology 9th ed, vol II.

³² Trabujsi, L.R., et al. (1999). Microbiología, 3ed. Atheneu: Saõ Paulo.



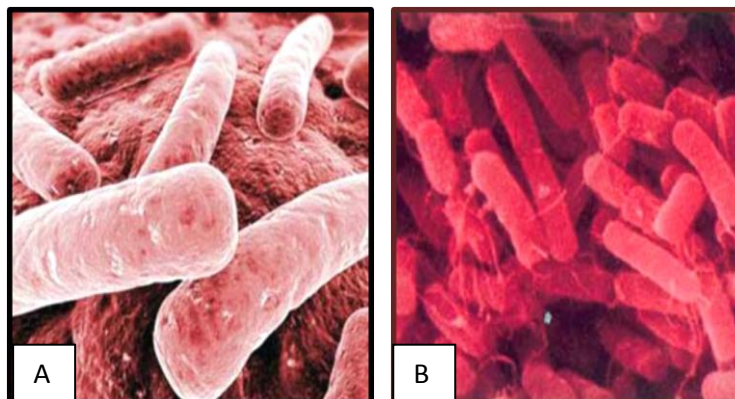
Figura 6: a), b) *Proteus vulgaris*



Fuente: Jorgensen et al, 2000²⁹

Klebsiella pneumoniae: (Ver figura 7). Es el microorganismo causal de infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos, e infecciones de herida quirúrgica. El tratamiento de elección consiste en la asociación de antibióticos de amplio espectro³³.

Figura 7: a), b) *Klebsiella pneumoniae*



Fuente: Jorgensen et al, 2000²⁹

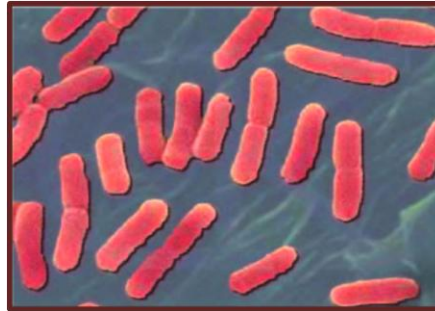
Escherichia coli: (figura 8). Es un bacilo de 1-3 μm , que se presenta solo, en pares, en cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil (por flagelos

³³ Lacaz, C.S. et al. (2002). Tratado de Microbiología Medica, Sarvier: San Paulo



perimétricos), aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forman esporas y por lo general es un capsulado y Gram negativo³⁴.

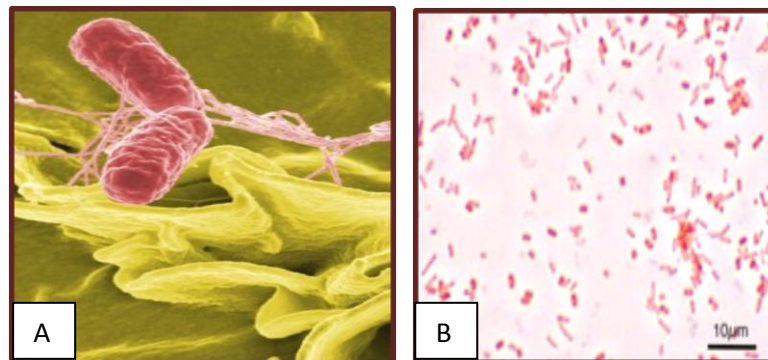
Figura 8: *Escherichia coli*



Fuente: Jorgensen et al, 2000²⁹

Salmonella tyhimurium: (Ver figura 9). Es el agente causal de Salmonelosis es una gastroenteritis comúnmente encontrada en el hombre, que comienza en la mucosa intestinal. La patogenicidad de las Salmonellas varía de acuerdo con el tipo serológico de la bacteria, edad y condiciones de salud del hospedero³⁵

Figura 9: a), b) *Salmonella tyhimurium*



Fuente: Jorgensen et al, 2000²⁹

³⁴ Alam MJ, Zurek L. (2006). Seasonal prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in beef cattle feces. J Food Prot. 69(12):3018-20.

³⁵ Kaye K, Engemann J, Fraimow H, Abrutyn E. (2004) Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. Infect Dis Clin North Am. 18 (3):467-511.



2.2. Antecedentes

El uso de las plantas medicinales es una de las actividades más antiguas del hombre y gran cantidad de especies han probado su eficacia empíricamente³⁶. Entre las cuales se encuentran las plantas de la familia Hypericaceae.

La familia Hypericaceae se distribuye principalmente en zonas tropicales y templadas del mundo y agrupa a ocho géneros con cerca de 560 especies. Esta familia fue segregada de Clusiaceae la cual anteriormente era conocida como Guttiferae. Los caracteres que la diferencian de Clusiaceae son principalmente la presencia de androceo fasciculado, anteras pequeñas y estilos libres³⁷.

El género *Hypericum* consta de 400 especies, tiene una distribución cosmopolita, pero es más diverso en las regiones templadas y en las montañas tropicales. En el Ecuador están representadas 22 especies; se encuentran en la zona andina especialmente en los subpáramos y páramos¹¹. Comprende principalmente hierbas y otros arbustos que producen flores grandes y vistosas, razón por la que se utilizan como plantas ornamentales de jardín³⁸.

Del género *Hypericum* se han realizado estudios a partir de tinturas sus efectos antidepresivos, vasoprotectores e hipotensor, antioxidante, antimicrobiano y antiviral entre otros. Precisamente su actividad antiviral ha sido probada contra el citomegalovirus, coronavirus, adenovirus, rabdovirus (A, B, C) y retrovirus como el VIH³⁹.

³⁶ Martin R del campo. (1976). Consideraciones acerca de las plantas medicinales mexicanas y su posible proyección mundial en estado actual del conocimiento en plantas medicinales mexicanas. IMEPLAN 102p.

³⁷ N,K,B. Robson. (1997). Studies in the genus *Hypericum* I (Guttiferae) infrageneric classification. 291-355.

³⁸ Robson NKB (2003) *Hypericum* botany. In: Ernst E (ed) *Hypericum*. The Genus *Hypericum*. Taylor and Francis, New York

³⁹ Robson, N. 1987. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 7. Section 29. Brathys (part 1). Bull. Brit. Mus., Bot. 16: 1-106.



Se plantea que inhibe la replicación viral y que la administración de bajas dosis previene las infecciones por estos⁴⁰.

Estudio químicos sobre el género *Hypericum*

Hasta el momento se han realizado estudios del género *Hypericum* en varias especies, siendo más relevantes los hallazgos encontrados en las siguientes: *Hypericum fasciculatum*, *H. styphelioide*, *H. hyssopifolium*, *H. heterophyllum*, *H. richerivill*. En estas investigaciones se han encontrado compuestos de tipo alcaloides, terpenos y flavonoides⁴¹.

Estudios de actividades biológicas en especies del género *Hypericum*

En las especies de *Hypericum hyssopifolium* y *Hypericum heterophyllum*, se han realizado estudios sobre la actividad fúngica a partir de los aceites esenciales reportando una acción positiva sobre hongos. En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana, reportando una actividad moderada contra bacterias como bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus*⁴².

Hypericum lancioides

Es un arbusto nativo que se encuentra a una altitud entre 2500 y 4500 m.s.n.m. En las provincias Loja, Napo Pichincha, Carchi, Cotopaxi e Imbabura¹⁰. Pertenece a la familia de *hypericaceae*, es conocida comúnmente como bura bura, usada para el teñido de tela, se usa junto con otras especies

⁴⁰ Robson, N. 1990. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Section 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. Bull. Brit. Mus. Bot. 20: 1–151.

⁴¹ Aleksandra Dordevic, Bojan Zlatkovic, Jelena L, and Radosav Palic. (2011). A detailed chemical composition and antimicrobial activity of *Hypericum richeri* Vill. subsp. *grisebachii* (Boiss.) Nyman essential oil from Siberia.

⁴² Pavlovic M, Tzakou O, Petrakis V and Couladis M. (2004). The essential oil of *Hypericum perforatum* L, *Hypericum tetrapterum* fries and *Hypericum olympicum* L. growing in Crecaia.



vegetales⁴³. En la tabla 1 se presenta una breve descripción de la taxonomía de la planta

Tabla1: descripción taxonómica de la planta



| | |
|-------------------------|---|
| Reino: | Plantae |
| Clase: | Hypericaceae |
| Subclase: | <i>hypericum</i> |
| Familia: | Hypericaceae |
| Género: | <i>hypericum</i> |
| Nombre común: | Bura Bura |
| Ubicación: | Loja, Napo Pichincha, Carchi, Cotopaxi e Imbabura |
| Usos: | Sus flores son usadas para teñir telas |
| Características: | Flores amarillas |

FOTOGRAFIA 1: *hypericum lancioides*

Fuente: Herbario "PPN-UTPL"

Elaboración: La Autora

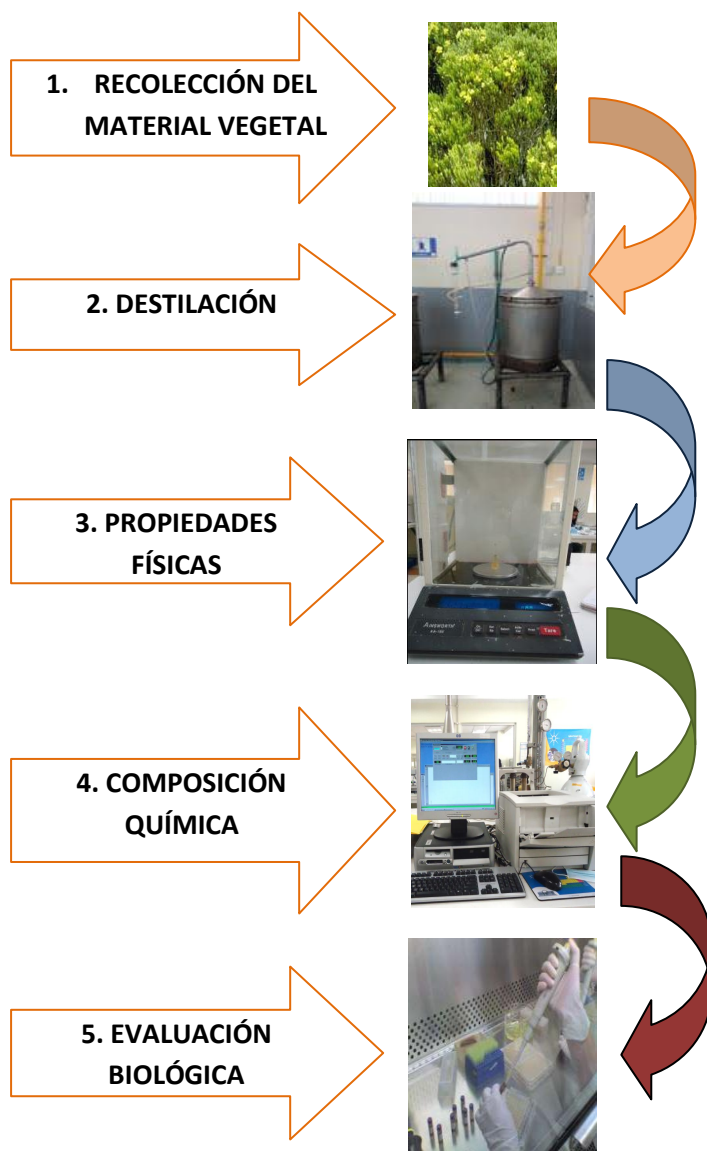
Fuente: Herbario "PPN-UTPL"

⁴³ Jørgensen, S. Leon-Yáñez, (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Missouri Botanical Garden Press, pp. 519-522

CAPÍTULO III
MATERIALES Y MÉTODOS



La metodología utilizada en la presente investigación se detalla en el esquema 1.



Esquema 1: metodología utilizada

Elaboración: la Autora



3.1. Recolección y selección del material vegetal

3.1.1. Recolección de la materia vegetal

Las partes aéreas de la especie vegetal fue recolectada en estado de foliación en el sector Loma la Torre, cantón Saraguro con las coordenadas geográficas 696176E; 9574249N, 2600 m.s.n.m., después de ser recolectada fue transportada al laboratorio de Procesos químicos para su tratamiento post cosecha, cabe señalar que la recolección se realizó en tres salidas de campo con un intervalo de tiempo de 30 días para cada recolección.

En la figura 10 se puede observar el área donde se realizó la recolección de *H. lancioides*.

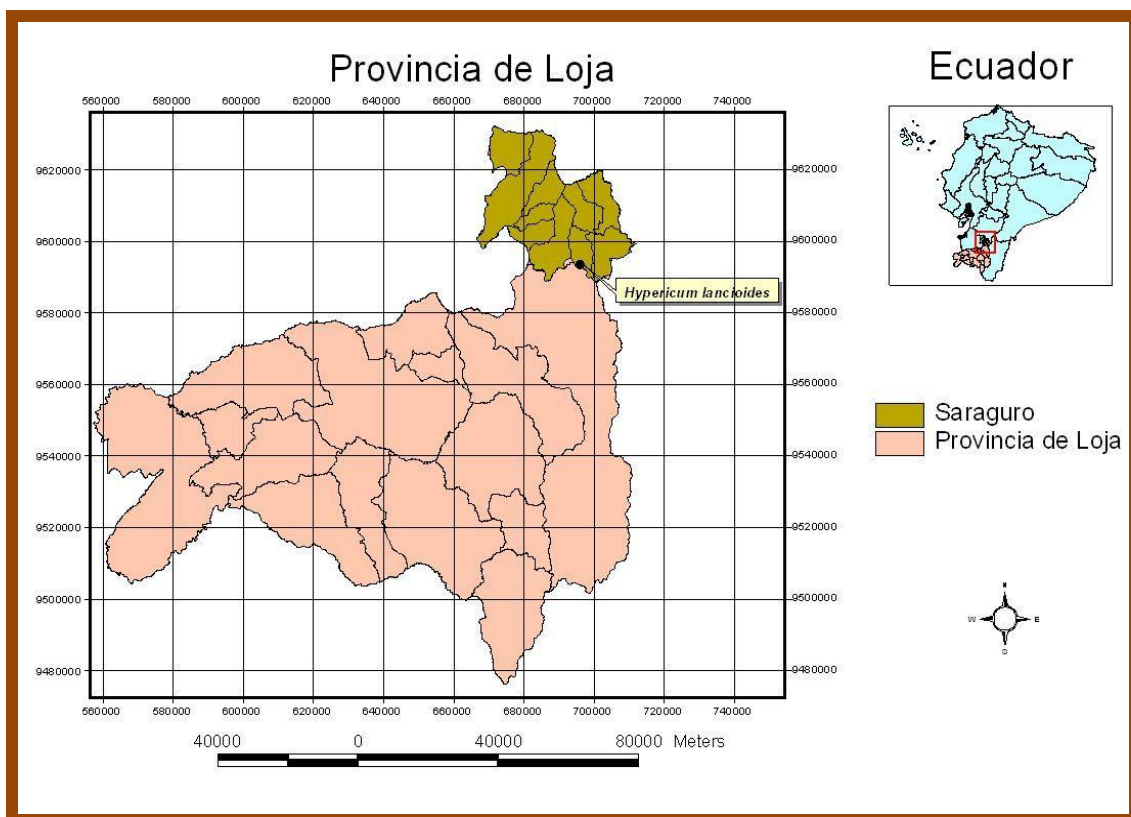


Figura 10: Área de estudio de *H. lancioides*, en la provincia de Loja cantón Saraguro.

Elaboración: La Autora



3.1.2. Selección de la materia vegetal

Luego de la recolección se aplicó un tratamiento de post – cosecha eliminando impurezas, de tal manera que no exista otra especie vegetal que pueda interferir en los resultados.

3.2. Obtención del aceite esencial por el método de arrastre de vapor

Los métodos de extracción de aceites esenciales más comunes son: destilación por arrastre de vapor, expresión, hidrodestilación, extracción destilación simultánea y extracción con fluido supercrítico; existen otros no tan comunes, como la micro extracción en fase sólida y variantes de las técnicas anteriormente descritas, donde el equipo de calentamiento normal es sustituido por un equipo microondas o un ultrasonido⁴³.

La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables, la destilación por arrastre con vapor se emplea con frecuencia para separar aceites esenciales de tejidos vegetales, es el método más usado a nivel industrial, permite obtener AE con buenos rendimientos y además, se pueden procesar grandes cantidades de material vegetal⁴⁴. Este método es una destilación de la mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos

⁴³ Cerpa. M. G., (2007). Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Universidad de Valladolid, departamento de ingeniería química y tecnología del medio ambiente.

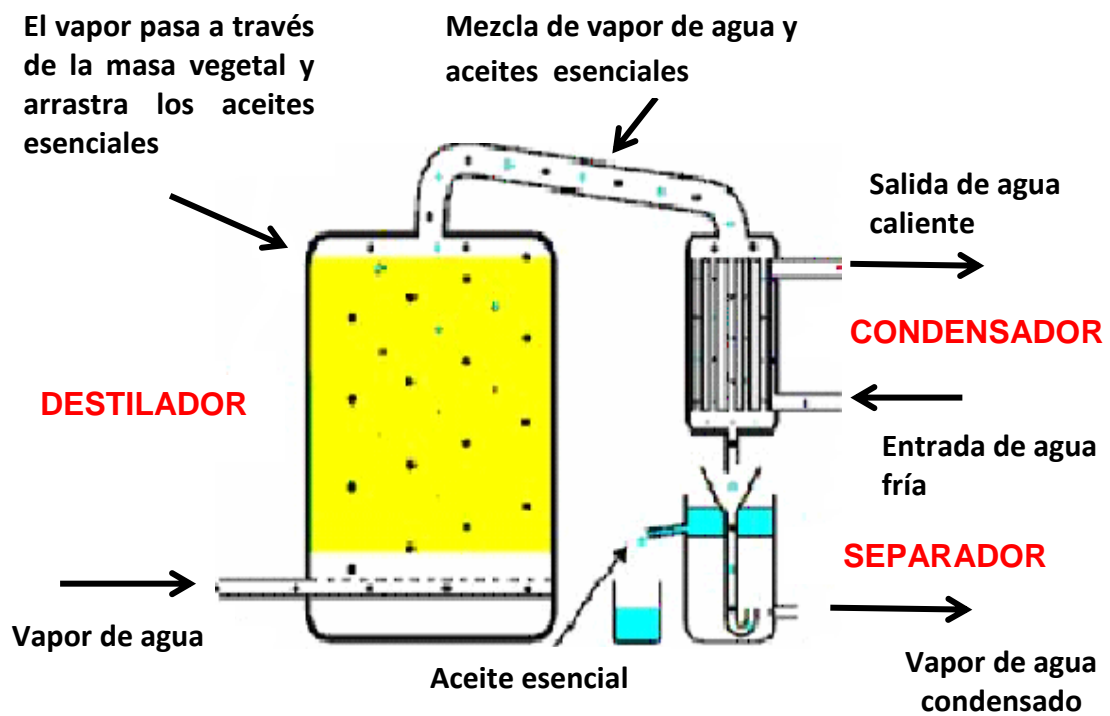
⁴⁴ Denny, E. (1989). Hidro-distillation of oils from aromatic herbs. *Perfumer & Flavorist*, 14, pp. 57.



inmiscibles, agua y AE, finalmente se separan en un vaso Florentino (figura 11)⁴⁵.

El aceite esencial fue obtenido a partir de 2500g de las partes aéreas de *H. lancioides* por el método de arrastre de vapor de agua, utilizando un equipo tipo cleveger.

Figura 11: Proceso de destilación



Fuente: Lachica, M⁴⁶.

⁴⁵ Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales en Latinoamérica., Editorial de la Universidad Nacional de la Plata. Argentina. 410 p

⁴⁶ Lachica, M., Aguilar, A. y Yáñez, J. (1973). Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental Zaidín. Anales de Edafología y Agrobiología 32, 1033-1047.



3.2.1. Determinación de la humedad

Se entiende por humedad el agua libre que contiene el material vegetal. Para una buena conservación, el contenido de agua debe ser inferior al 10%⁴⁷. La humedad se la realizó siguiendo el Anexo 1. En la fotografía 2 se puede observar la lámpara ULTRA X que se utilizó para determinar la humedad.

Se determino la humedad de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Hm = (m1 - m2 / m1 - cv) * 100$$

Dónde:

Hm = % de humedad

c.v. = peso de la capsula vacía (gr).

m1 = peso de la capsula + muestra a analizar (gr).

m2 = peso de la capsula + muestra seca (gr).

Fotografía 2: lámpara ULTRA X



Elaboración: La Autora

⁴⁷ Allen, S. (1989). Chemical Analysis of Ecological Materials. Blackwell Scientific Publications. London.



3.2.2. Determinación del rendimiento

Para determinar el rendimiento se tomo en cuenta el peso total de la materia vegetal a destilar y la cantidad obtenida del aceite (Ver anexo 2).

El porcentaje de rendimiento se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$R = (\text{vol} / \text{P. M}) \times$$

Dónde:

R = rendimiento

vol = volumen obtenido en la destilación en ml

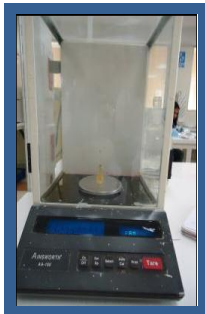
PM= peso total de la muestra destilada en g

3.3. Determinación de las propiedades físicas del aceite

3.3.1. Densidad relativa

La densidad relativa se determinó según la norma ANFOR NFT75-111, (Ver anexo 3) en las cuál se realizaron tres repeticiones, obteniendo una densidad promedio de cada una de las muestras. (Fotografía 3)

Fotografía 3: Peso del picnómetro



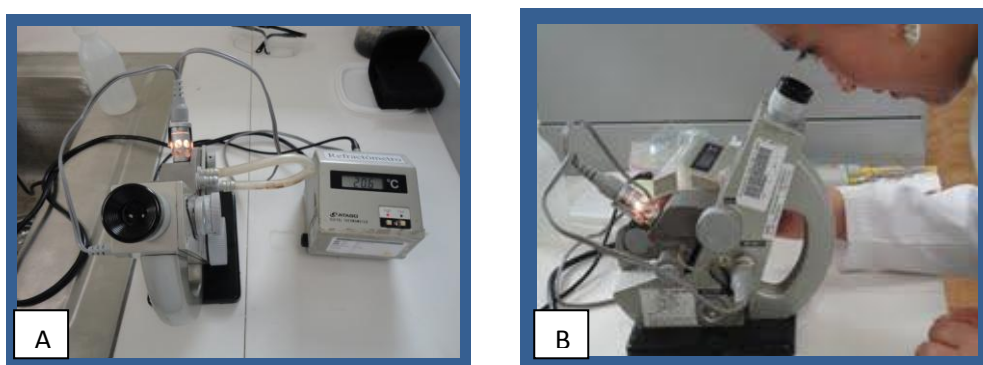
Elaboración: La Autora



3.3.2. Índice de refracción

El índice de refracción del aceite esencial se determinó según la norma ANFOR NF 75 -112 25, (ver anexo 4); la determinación de esta propiedad se la realizó en el refractómetro ABBE (fotografía 4)

Fotografía 4: a) refractómetro ABBE, b) lectura de resultados



Elaboración: La Autora

3.4. Determinación de la composición química del aceite esencial

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de *H. lancoides* se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas GC-MS y acoplada un detector de ionización de llama GC-FID.

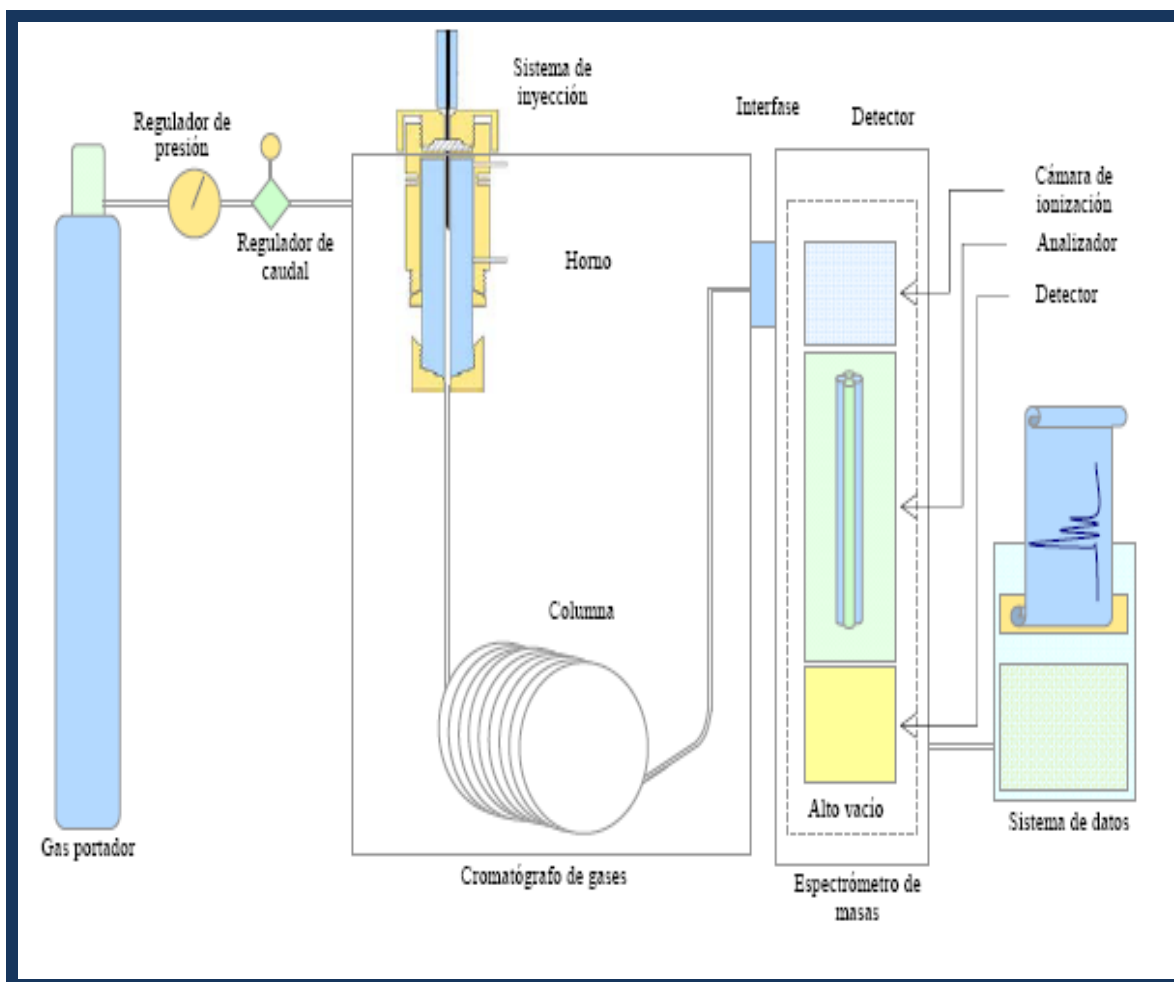
3.4.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una técnica de separación basada principalmente en fenómenos de repartición entre una fase móvil gaseosa (helio, argón, hidrógeno, o nitrógeno) y una fase estacionaria, constituida por un sólido o líquido, soportada en las paredes de la columna. La cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Figura 12) contiene un



sistema de inyección, mediante el cual se introduce la muestra en la columna, un detector, que detecta las diferentes sustancias a medida que van saliendo de la columna, una vez separadas; para la identificación de los componentes de la mezcla se usa un detector de masas (espectrómetro de masas)⁴⁸.

Figura 12: Diseño de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de gases



Fuente: HÄRDLE, W⁴⁹

Elaboración: la Autora

⁴⁸ Grob, R. L. (1985). Modern practice of gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, p.p. 895-897.

⁴⁹ Härdle, W.; Simar, L. (2003). Applied Multivariate Statistical Analysis. MD*TECH Method and data technologies, p.p. 233-274.



3.4.2. Identificación de la composición química del aceite esencial

Para la identificación de los compuestos del aceite esencial se utilizó Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N acoplada a un Espectrómetro de masas Agilent serie 5973 inert, dotado con un sistema de datos MSD-Chemstation D.01.00 SP1 con un inyector automático split/splitless serie 7683.(Fotografía 5).

Fotografía 5: Cromatografo de gases



Elaboración: la autora

Las características de las columnas capilares del cromatografo de gases para la identificación de los compuestos fueron las siguientes: (ver tabla 2)

Tabla 2. Características de las columnas capilares

| Columna | longitud (m) | Diámetro interno (mm) | Película (um) | Temperatura limite(°C) |
|------------|--------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| DB-5MS | 30 | 0.25 | 0.25 | 325 |
| HP-INNOWAX | 30 | 0.25 | 0.25 | 250 |

Elaboración: la autora



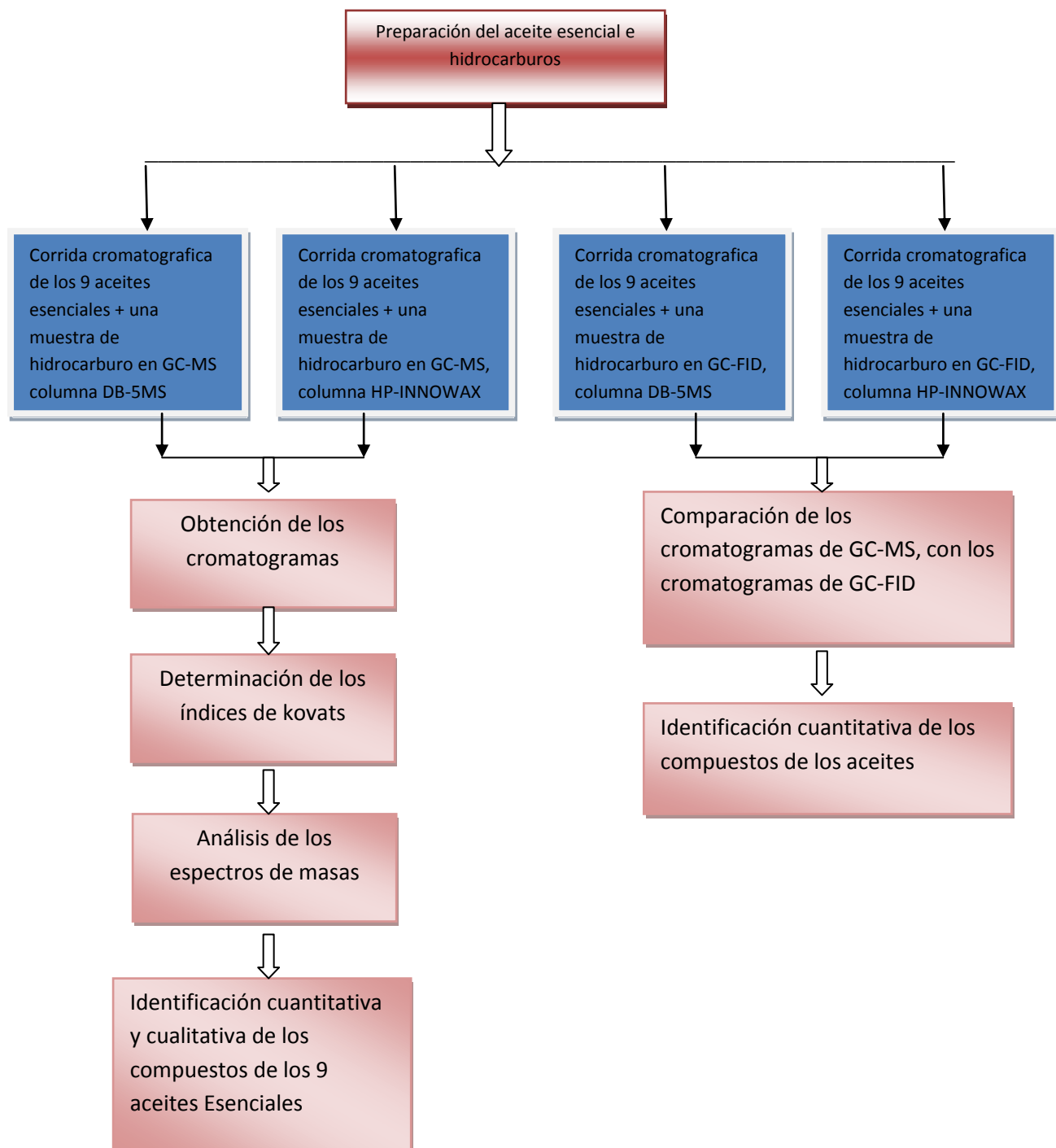
3.4.3. Preparación de las muestras

Para las inyecciones de las corridas cromatográficas se preparó una disolución de 990 ml de diclorometano grado HPLC y 10 ml de aceite esencial, teniendo un total de una concentración del 1ml.

De igual forma se prepararon los hidrocarburos de C10 a C25 (TPH-6RPM de CHEM SERVICE) que fueron inyectados en las columnas DB-5MS y HP-INNOWAX en GC-MS, ya que los tiempos de retención de los hidrocarburos nos sirven de base en la determinación de índices de kovats de cada compuesto. A continuación se presenta un esquema simplificado de la secuencia de las corridas cromatograficas para la obtención de cromatogramas e identificación química de los componentes presentes en el aceite esencial. (Ver esquema 2).



Esquema 2: esquema simplificado de las corridas cromatograficas



Fuente: Directa

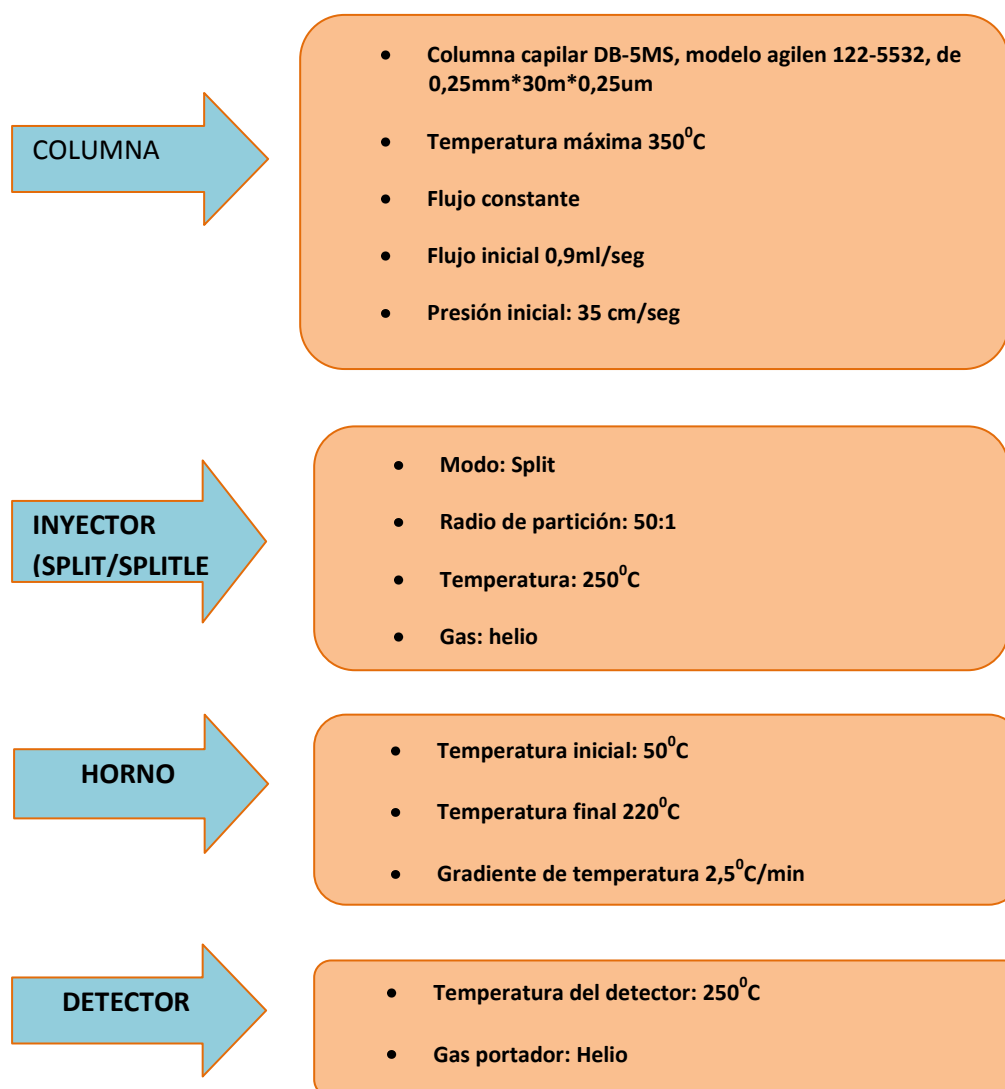
Elaboración: la Autora



3.4.4. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna capilar DB-5MS

Una vez preparadas las muestras de aceite y los hidrocarburos en los viales se procedió a la inyección de las mismas en el cromatografo de gases acoplado a espectrometría de masas en la columna DB-5MS, con los siguientes parámetros operacionales:

Esquema 3: condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5MS.



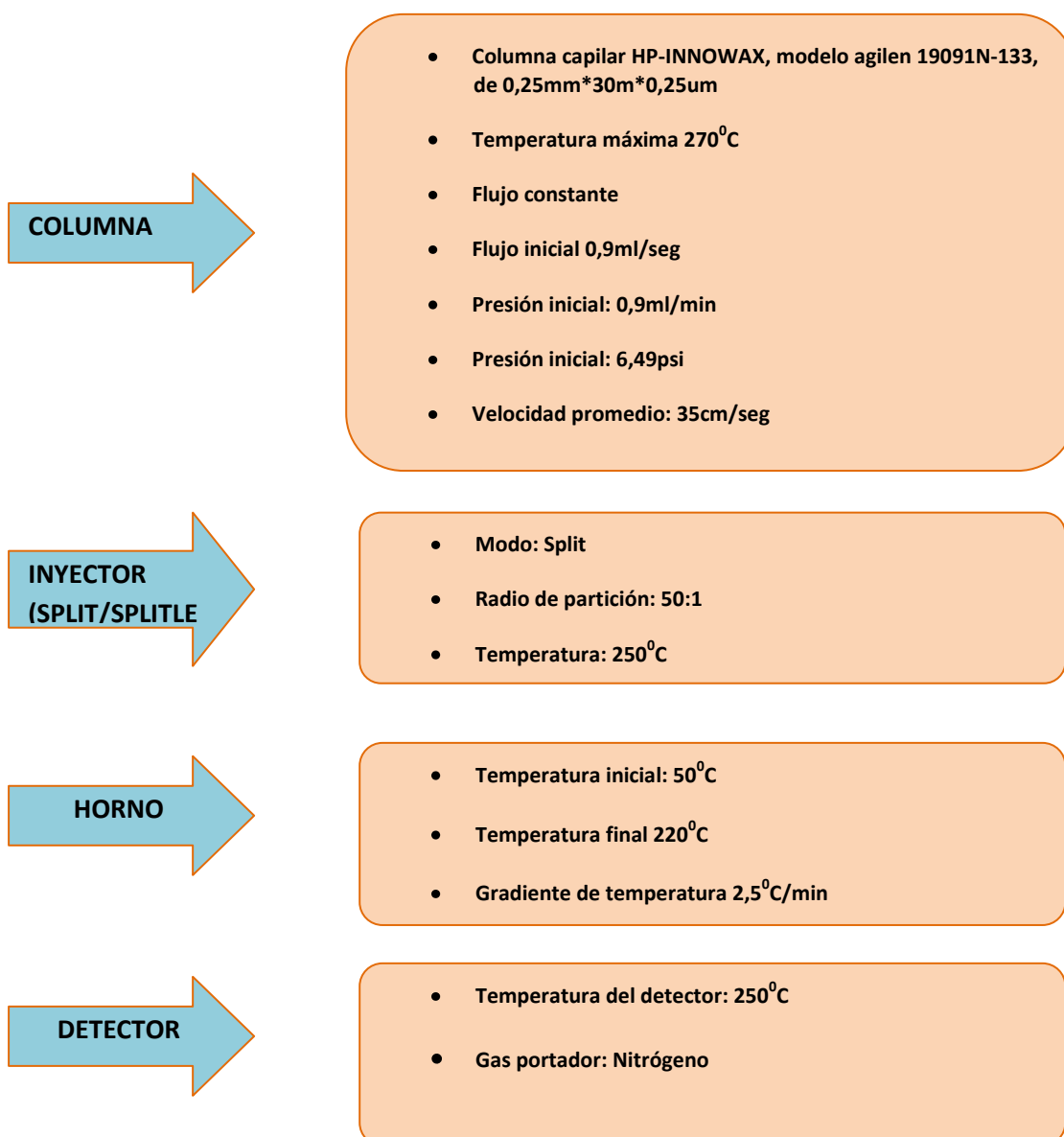
Fuente: Directa
Elaboración: la Autora



3.4.5. Parámetros operacionales del CG-MS en la columna capilar HP-INNOWAX

Para realizar las respectivas corridas de las muestras, con este tipo de columna capilar, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros operacionales:

Esquema 4: condiciones de operación de CG-MS en la columna HP-INNOWAX



Fuente: Directa

Elaboración: la Autora



3.4.6. Identificación cualitativa y cuantitativa de los componentes químicos del aceite esencial en base a los índices de Kovats y los espectros de masas.

La identificación de los compuestos químicos del aceite esencial de *H. lancioides* se realizó con la ayuda de la librería WILEY 7n.1 la misma que nos proporciona el número de CAS que es específico para cada componente y posteriormente se determinó el índice de Kovats de cada uno de los compuestos del aceite esencial detectados en las dos columnas (DB-5 MS y HP-INOWAX).

Adicionalmente la identificación se la realiza mediante el análisis de los espectros de masas dados para cada uno de los compuestos identificados mediante la librería WILEY 7n.1

3.4.7. Obtención de los cromatogramas

Si se coloca un detector al final de la columna que responde a la concentración del soluto y se registra su señal en función del tiempo, se obtiene una serie de picos que representan un gráfico denominado cromatograma. Este gráfico es muy útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente⁵⁰.

Para la obtención de los cromatogramas se realizó el análisis del aceite esencial de *H. lancioides* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

⁵⁰ D. Skoog, y J. Leary, (1994). Análisis instrumental, Madrid, McGraw-Hill,.



3.4.8. Determinación de los Índices de Kóvats

Los índices I_k , se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homóloga de patrones de hidrocarburos desde C10 hasta C25, corridos en el GC-MS bajo las mismas condiciones que los aceites esenciales, en las fases estacionarias.

Los valores fueron calculados aplicando la siguiente ecuación:

$$I_k = 100n + 100 * \frac{(t_{Rx} - t_{Rn})}{(t_{RN} - t_{Rn})}$$

Dónde:

IK= Índice de retención de Kóvats

n= Número de átomos de carbono en el n-alcano

t_{Rx}= Tiempo de retención del compuesto analizado

t_{Rn}= Tiempo de retención n-alcano que eluye antes del compuesto analizado.

t_{RN}= Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto analizado.

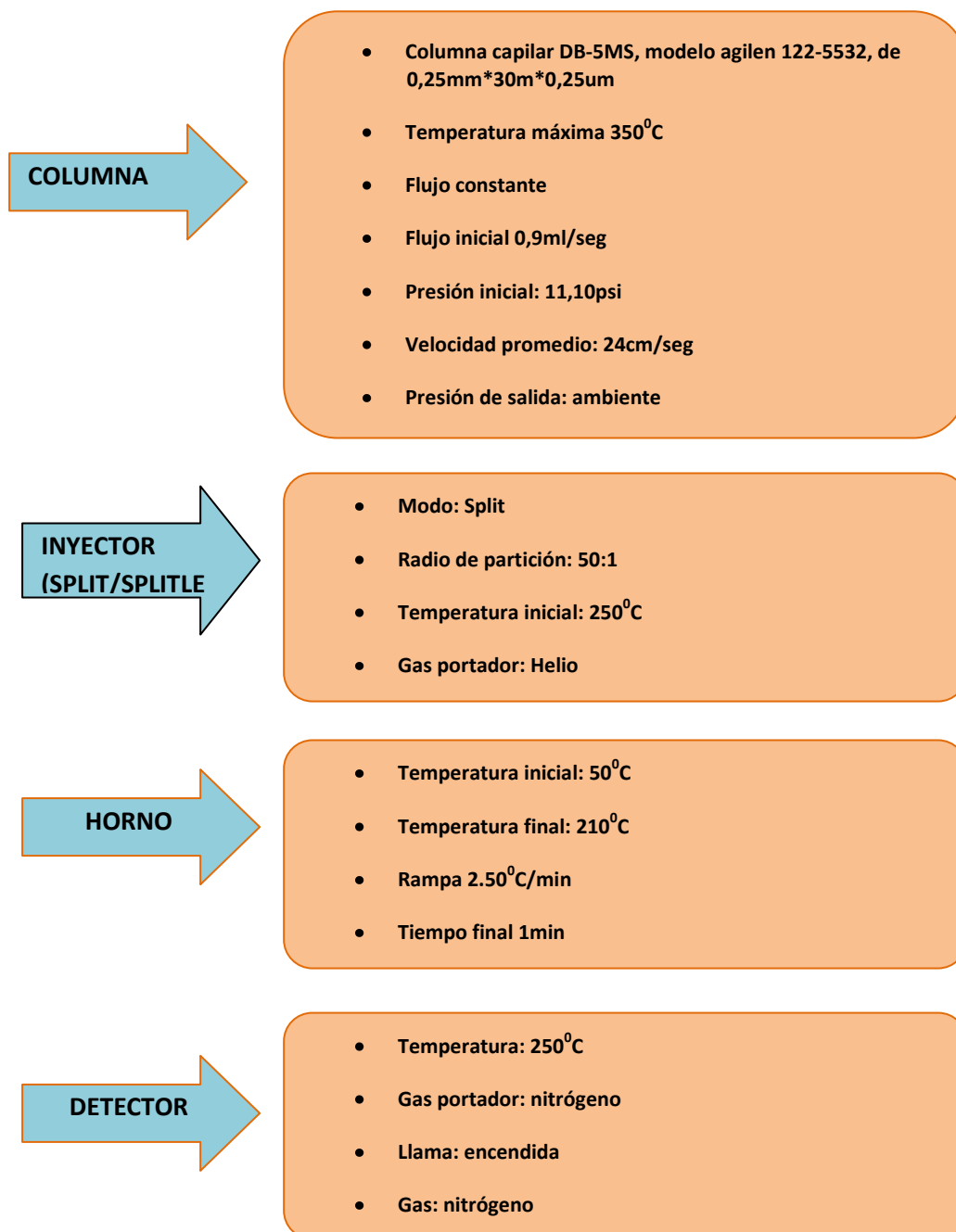
3.4.9. Cromatografía de Gases acoplada al Detector de Ionización de Llama (CG-FID)

Un detector muy utilizado es el detector de ionización de llama (FID), en el cual se mide, registra y amplifica el flujo iónico resultante de la ionización de las moléculas en una llama de hidrogeno (gas de combustión necesarios: hidrogeno y aire comprimido). El FID es un detector de los denominados universales o inespecíficos adecuados para medidas cuánticas. Es un detector dependiente del flujo de masa, es decir la señal es tanto mayor, cuanto más sustancia se ioniza en la llama y unidad de tiempo⁵⁰.



Los parámetros operacionales aplicados a la cromatografía de gases acoplado al detector de llama CG-FID en la columna DB-5MS se muestran a continuación en el esquema 5.

Esquema 5: Parámetros operacionales en la columna DB-5MS (CG-FID).



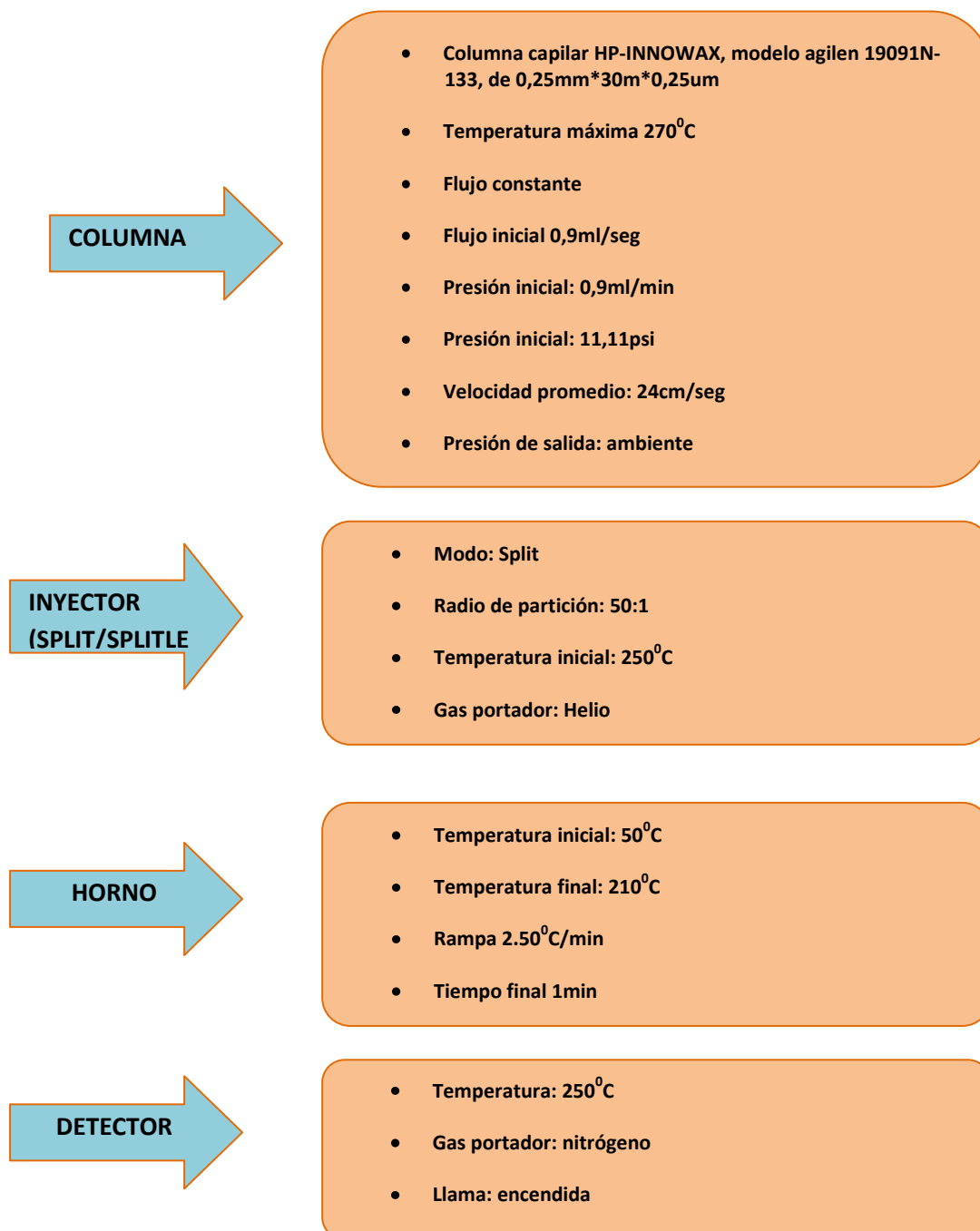
Fuente: Directa

Elaboración: la Autora



En el esquema 6 se puede observar las Parámetros operacionales en la columna capilar HP-INNOWAX (CG-FID)

Esquema 6: Parámetros operacionales en la columna capilar HP-INNOWAX (GC-FID)



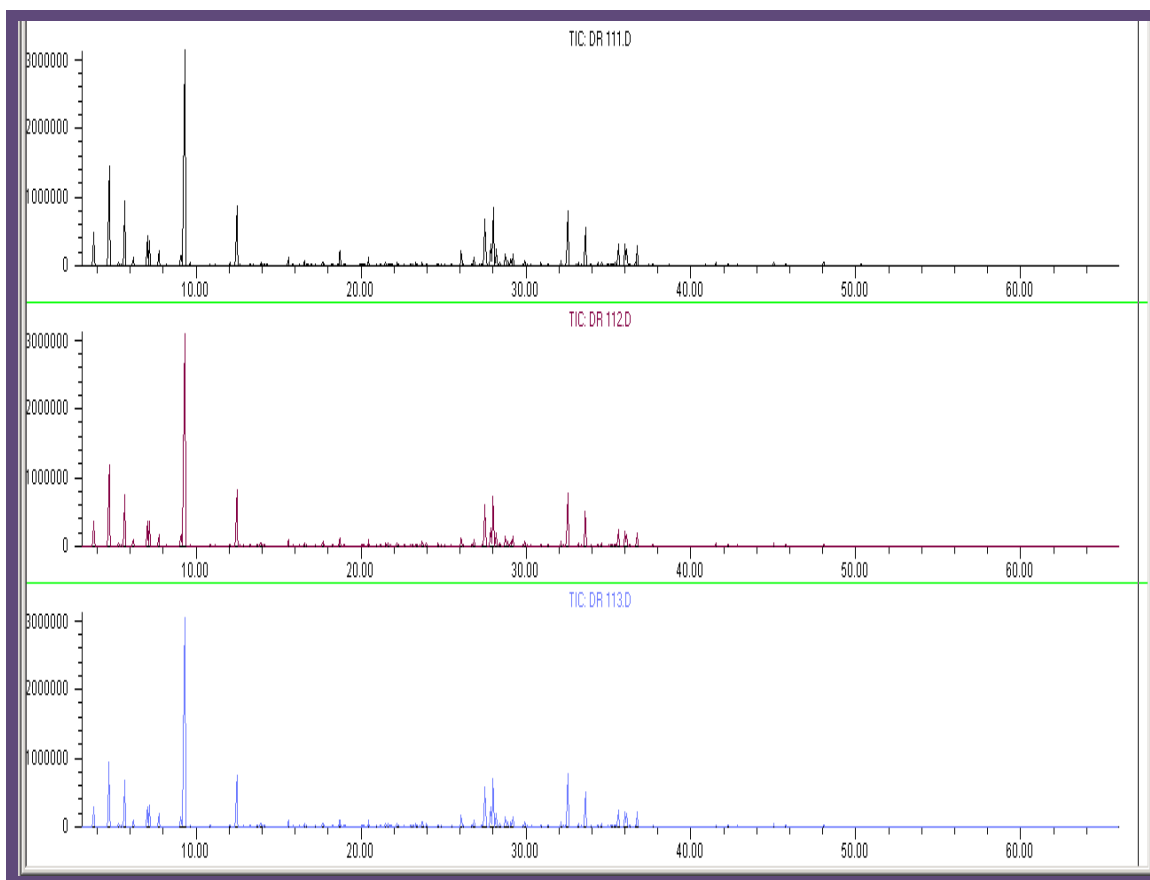
Fuente: Directa

Elaboración: la Autora



3.4.10. Comparación de los cromatogramas obtenidos en CG-MS con los obtenidos en CG-FID

Una vez obtenido los cromatogramas en CG-MS y en CG-FID se realizó una comparación con el fin de determinar si el porcentaje relativo de cada compuesto identificado en ambos detectores existiera alguna variabilidad.



Fuente: Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N

Elaboración: la Autora



3.5. Evaluación de la actividad biológica

Los métodos empleados para evaluar la actividad antimicrobiana permiten medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos frente a sustancias con posible potencial antimicrobiano⁵¹

3.5.1. Determinación antimicrobiana de los aceites esenciales

Para determinar la actividad antibacteriana y antifúngica de los aceites esenciales se realizó las pruebas de susceptibilidad microbiana conocidas como Microdilución en Caldo. Para ello se preparó una disolución de 20mg/ml en 980ul de Dimetil sulfóxido (DMSO).

3.5.1.2. Método de Microdilución en Caldo

Es un método de cultivo líquido al cual se le agrega un estándar bacteriano o fúngico y es inoculado dentro de los pocillos de una microplaca (llamada TC96, porque contiene 96 pocillos) que contienen diferentes diluciones del aceite esencial a ensayar para tener concentraciones decrecientes inhibitorias en caldo. Este método define la menor concentración del aceite necesaria para inhibir la producción y multiplicación de un crecimiento visible de una cepa microbiana dada en el sistema de prueba⁵²

3.5.1.3. Microorganismos de prueba

Para estas pruebas utilizamos 7 bacterias: de las cuales 5 son gram negativas: *Pseudomona aeruginosa* ATCC[®] 27853; *Klebsiella pneumoniae* ATCC[®] 9997; *Proteus vulgaris* ATCC[®] 8427; *Escherichia coli* ATCC[®] 25922, *Salmonella*

⁵¹ Russo, T.; Meszaros, M. *Orgánica en viales*, Flinn Scientific, INC.: Batavia, 1988, 26:27.

⁵² Pellecuer, S; et al. 1976. Huiles Essentielles Bactericidas et Fungicides. *Revue de L Institute Pasteur de Lyon*. 9;135-159



tyhimurium LT2 y 2 cepas gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC[®]29212; *Staphylococcus aureus* ATCC[®]25923. Y dos cepas fúngicas *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC[®]281885) y *Trichophyton rubrum* (ATCC[®]28188).

3.5.1.4. Preparación de medios de cultivo y condiciones de incubación

Para la preparación de los inóculos bacterianos se realizaron cultivos en caldos nutritivos específicos para cada cepa las cuales se encuentran en reserva a -80°C, siguiendo las pautas indicadas en la Tabla 3

Tabla 3: Medios de cultivo y condiciones de incubación

| Bacterias Gram Negativas | Caldos | Incubación |
|---------------------------------|---|----------------------|
| <i>Pseudomona aeruginosa</i> | Caldo Triptisoya | 37°C por 14-16 horas |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Caldo Triptisoya | 37°C por 14-16 horas |
| <i>Escherichia Coli</i> | Caldo Triptisoya | 37°C por 14-16 horas |
| <i>Proteus vulgaris</i> | Caldo Muller | 37°C por 14-16 horas |
| <i>Salmonella Tiphymurium</i> | Hinton (Difco) | 37°C por 14-16 horas |
| Bacterias Gram Positivas | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Caldo Triptisoya | 37°C por 14-16 horas |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Caldo Infusión Cerebro Corazón (Bacto™) | 37°C por 14-16 horas |

Fuente: American Type Culture Collection (ATCC)

Elaboración: la Autora



3.5.1.5. Preparación del cultivo overnight

Para la preparación de los inóculos bacterianos se realizaron cultivos en caldos nutritivos específicos para cada cepa las cuales se encuentran en reserva a -80°C , siguiendo las pautas indicadas en la Tabla 3.

3.5.1.6 Preparación del caldo de Cultivo Muller Hinton

El caldo Muller Hinton es el principal medio utilizado para las pruebas bacterianas y fue preparado de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

3.5.1.7. Preparación de la suspensión de los inóculos

Se preparó un cultivo overnight mencionado anteriormente. De este cultivo se tomó $150\text{-}300\mu\text{L}$ en 7mL de suero fisiológico estéril, ajustando el inóculo a una concentración equivalente a 0,5 en la escala de McFarland, de esta suspensión tomamos $140\mu\text{L}$ e inoculamos en 7mL de Caldo Muller Hinton ajustando a una población bacteriana de 2×10^6 UFC/mL. De esta suspensión se tomó $100\mu\text{L}$ para completar a $200\mu\text{L}$ el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población bacteriana a 5×10^5 UFC/mL.

3.5.1.8. Procedimiento CMI antibacterianos

El ensayo se realizó sobre microplacas que constan de 96 pocillos (Ver figura 13), utilizando el procedimiento de dilución doble seriada del siguiente manera: colocamos $180\mu\text{L}$ de caldo Muller Hinton al primer pocillo y $100\mu\text{L}$ a todos los demás pocillos restantes, luego se adiciona $20\mu\text{L}$ de la disolución del aceite esencial a probar en el primer pocillo y mezclamos, se realizaron diluciones seriadas tomando $100\mu\text{L}$ del primer pocillo y diluyendo con $100\mu\text{L}$ del pocillo siguiente y se continúa este procedimiento hasta obtener 8 diluciones



consecutivas. Se sigue el mismo procedimiento para el control de esterilidad (180µL caldo + 20 µL extracto) control negativo (180µL caldo + 20µL DMSO) como para el control positivo (180µL caldo + 20µL antibiótico según corresponda. Luego de preparada la placa se inocularon todas las columnas con 100 µL de la suspensión del inóculo a excepción de los controles de esterilidad, completando a un volumen final de 200 µL en la placa de cultivo, de esta manera se ajusta tanto la población bacteriana a 5×10^5 ufc/mL, así como la concentración final del extracto de 1000 a 8 ug/mL. Se sella con parafilm las placas e incubamos a 37°C por un período de 18-24 horas.

Figura 13: Ilustración de la microplaca TC96 hecha con 12 columnas y 8 filas (A –H), con las concentraciones del aceite esencial en µg/ml.

| | AE 1 | | | AE 2 | | | AE 3 | | | | Controles DMSO Antibiótico | |
|---|--------|---|---|------|---|---|------|---|---|----|----------------------------------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | 1000 | | | | | | | | | | | |
| B | 500 | | | | | | | | | | | |
| C | 250 | | | | | | | | | | | |
| D | 125 | | | | | | | | | | | |
| E | 62,5 | | | | | | | | | | | |
| F | 31,25 | | | | | | | | | | | |
| G | 15,626 | | | | | | | | | | | |
| H | 7,8125 | | | | | | | | | | | |

Fuente: Directa

Elaboración: la Autora

3.5.2. Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales

3.5.2.1. Hongos Dermatofitos

Se prepara la suspensión a partir de las cepas en reserva criogénica mantenidas a - 80°C a una concentración definida en 7ml de Caldo Sabouroud. De esta suspensión se usan 100 µL para completar a 200µL el volumen final de la placa de cultivo, de esta manera se ajusta la población fúngica a 5×10^4 esporas/mL.

**Tabla4:** medios de cultivos y condiciones para hongos

| Hongos esporulados | Medio de cultivo | Condiciones de incubación |
|--------------------------|------------------|---------------------------|
| <i>T. mentagrophytes</i> | Caldo sabouraud | 28 °C por 24-72h |
| <i>T.rubrum</i> | Caldo sabouraud | 28 °C por 24-72h |

Fuente: American Type Culture Collection (ATCC)**Elaboración:** la Autora

3.5.2.2. Procedimiento

Se realizo el mismo procedimiento empleado en CMI antibacterianos, la diferencia que en este caso se utilizo el Caldo Saboraud (Ver tabla 4) de la misma manera se emplearon controles de esterilidad (180µL caldo + 20 µL extracto) control negativo (180µL caldo + 20µL DMSO) como para el control positivo (180µL caldo + 20µL Gentamicina o Itraconazol). Se sella las placas e incubamos a 37°C por un período de 18-24 horas (bacterias) y a 28°C durante 72 horas (dermatofitos). Cabe recalcar que las pruebas se realizaron por triplicado.

CAPÍTULO IV
ANÁLISIS DE RESULTADOS



4.1. Porcentaje de humedad

En la tabla 5 se presenta el promedio de humedad, desviación estándar y coeficiente de variación de las tres destilaciones de cada recolección.

Tabla 5: Promedio de humedad de las tres recolecciones

| Código | Hm (%) | \bar{x} | σ | CV |
|--------|--------|-------------|----------|-----|
| HYL 1 | 43,94 | | | |
| HYL 2 | 52,28 | | | |
| HYL 3 | 51,96 | 49,4 | 4,7 | 0,1 |

HYL: *Hypericum lanciodes* 1 Primera Recolección; 2 Segunda Recolección; 3 Tercera Recolección;
 \bar{x} = promedio
 σ = Desviación estándar
CV = Coeficiente de Variación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora

El promedio de las humedades que se destilaron fue mayor para la segunda destilación con el 52,28% y menor para la primera destilación con el 43,94%, la variabilidad de los resultados podría darse a los diferentes factores por los cuales puede ser afectada la humedad como las condiciones climáticas

53

⁵³ Burbott A, Loomis D (1967). Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. Plant Physiol., Vol.:42: 20-28.



4.2. Rendimiento del aceite esencial

En la tabla 6 se indica el rendimiento, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las destilaciones de cada recolección.

Tabla 6: Rendimiento de las tres recolecciones de *Hypericum lancioides*

| Recolección | Destilaciones | | | \bar{x} | σ | CV |
|--------------|---------------|------|------|-----------|----------|------|
| | 1 | 2 | 3 | | | |
| HYL 1 | 0,19 | 0,12 | 0,14 | 0,15 | 0,03 | 0,17 |
| HYL 2 | 0,17 | 0,18 | 0,16 | 0,17 | 0,01 | 0,05 |
| HYL 3 | 0,08 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,00 | 0,06 |

\bar{x} =promedio
 σ =Desviación estándar
CV= Coeficiente de Variación

Fuente: Investigación directa

Elaboración: la Autora

El promedio mayor de rendimiento se obtuvo en la segunda destilación con un porcentaje de 0,16%, y el menor en la tercera destilación, la variabilidad de resultados como se observar en la tabla 5

4.4. Propiedades Físicas del Aceite Esencial

El aceite esencial de *H. lancioides* es un líquido viscoso a temperatura ambiente y en refrigeración, presenta una coloración amarillo claro.

4.4.1. Densidad

La densidad promedio de la mezcla de los tres aceites esencial de *H. lancioides* fue de 0,840gr/cm³.

4.4.2. Índice de refracción



En la tabla 7 se presenta los valores promedios de los índices de refracción de los aceites esenciales obtenidos de cada recolección, dando un promedio total de 1,483. (Ver tabla 7).

Tabla 7: Promedio del índice de refracción de los aceites esenciales

| Recoleciones | Índice de refracción | \bar{x} |
|--------------|----------------------|-----------|
| HYL 1 | 1,472 | |
| HYL 2 | 1,476 | 1,483 |
| HYL 3 | 1,476 | |

HYL: *Hypericum lanciodes* 1 Primera Recolección; 2 Segunda Recolección; 3 Tercera Recolección; X: Promedio por cada recolección.

Fuente: Investigación directa

Elaboración: la Autora

4.5. Composición química del aceite esencial de *Hipericum lanciodes*

La determinación de la composición química del aceite esencial de *H. lanciodes* por CG-MS en las columna DB-5MS y HP-INNOWAX se basó en la comparación de los espectros de masas con los espectros de la base de datos Wiley 7n.1 del equipo.

El aceite esencial se encuentra compuesto principalmente por monoterpenos, terpenoides y sesquiterpenos. Se definieron un total de 31 compuestos de los cuales el 91,19% corresponde a la columna DB5-MS y el 89,36% a la columna HP-INNOWAX, 17 compuestos fueron determinados en ambas columnas.

Los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *H. lanciodes* son: limonene (33,86%); nonane (6,77%); caryophyllene oxide (5,04%); alpha pinene (4,98%); undecane (4,02%).

En la tabla 8 se indica la composición química del aceite esencial de *H. lanciodes*; se indican los índices de Kóvats tanto calculados, como los reportados en la literatura, también se muestra el porcentaje promedio relativo para cada compuesto en las dos columnas DB-5MS y HP-INNOWAX para las tres recolecciones, y se muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los porcentajes relativos obtenidos.



Tabla 8: Compuestos Identificados en DB5-MS y HP-INOWAX

| No | COMPUESTOS | | | DB5 ^a | | | | | | | | HP INOWAX ^e | | | | | |
|----|-------------------------|-------------------|-------------------|------------------|--------|--------|-----------|----------|-------|-------------------|-------------------|------------------------|-------|--------|-----------|----------|-------|
| | | IK-C ^b | IK-R ^c | HL111 | HL112 | HL113 | \bar{x} | σ | CV | IK-C ^b | IK-R ^c | HL111 | HL112 | HL113 | \bar{x} | σ | CV |
| 1 | octane, 2-methyl | 870 | 861 ^f | 2,879 | 2,399 | 2,062 | 2,436 | 0,428 | 0,175 | | | | | | | | |
| 2 | Nonane | 901 | 900 ^f | 8,737 | 6,558 | 5,01 | 6,769 | 1,872 | 0,276 | | | | | | | | |
| 3 | alpha pinene | 930 | 939 ^f | 5,201 | 5,732 | 4,022 | 4,985 | 0,875 | 0,175 | 1018 | 1027 ^k | 5,806 | 6,379 | 4,014 | 5,399 | 1,234 | 0,228 |
| 4 | Camphene | 940 | 922 ^f | 0,652 | 0,668 | | 0,66 | 0,011 | 0,017 | 1059 | 1077 ^j | 0,749 | 0,805 | 0,486 | 0,684 | 0,173 | 0,25 |
| 5 | methylnonane(dl) | 955 | 962 ^g | 2,305 | 1,469 | 1,822 | 1,865 | 0,419 | 0,225 | | | | | | | | |
| 6 | beta-pinene | 958 | 979 ^f | 1,997 | 2,349 | 1,352 | 1,899 | 0,505 | 0,266 | 1104 | 1113 ^k | 2,315 | 2,718 | 1,413 | 2,147 | 0,667 | 0,31 |
| 7 | betha myrcene | 968 | 990 ^f | 1,063 | 1,061 | | 1,062 | 0,191 | 0,061 | 1162 | 1168 ^j | 1,178 | 2,605 | 1,729 | 1,504 | 0,978 | 0,651 |
| 8 | p-cymene | 992 | 1024 ^f | 1,247 | 1,584 | 1,628 | 1,486 | 0,208 | 0,142 | 1265 | 1277 ^k | 1,378 | 1,734 | 1,689 | 1,604 | 0,194 | 0,121 |
| 9 | Limonene | 1020 | 1029 ^f | 33,919 | 36,438 | 31,213 | 33,856 | 3,681 | 0,114 | 1196 | 1212 ^k | 37,373 | 44,34 | 37,418 | 39,71 | 5,528 | 0,144 |
| 10 | Undecane | 1066 | 1100 ^f | 5,454 | 2,947 | 3,662 | 4,021 | 1,291 | 0,321 | 1101 | 1100 ^k | 7,918 | 3,984 | 6,466 | 6,123 | 1,984 | 0,324 |
| 11 | Decanal | 1135 | 1161 ^f | 0,585 | 0,615 | 0,848 | 0,683 | 0,144 | 0,211 | | | | | | | | |
| 12 | trans carveol | 1179 | 1189 ^h | 0,358 | | 0,549 | 0,453 | 0,136 | 0,299 | 1835 | 1846 ^j | 1,034 | 0,449 | 0,976 | 0,819 | 0,322 | 0,392 |
| 13 | Carvone | 1202 | 1210 ⁱ | 1,005 | | 1,101 | 1,053 | 0,068 | 0,065 | 1724 | 1715 ^l | 1,135 | 0,445 | 1,196 | 0,925 | 0,417 | 0,45 |
| 14 | betha caryophyllene | 1407 | 1418 ^f | 1,019 | 1,683 | 0,797 | 1,166 | 0,46 | 0,395 | 1580 | 1608 ^j | 0,885 | 1,457 | | 1,177 | 0,404 | 0,345 |
| 15 | alpha gurjenene | 1411 | 1409 ^f | 5,135 | 1,058 | 3,099 | 3,097 | 0,389 | 0,128 | | | | | | | | |
| 16 | alpha-trans-bergamotene | 1426 | 1436 ^f | 0,608 | 0,487 | 0,593 | 0,562 | 0,065 | 0,116 | 1576 | 1579 ^j | 0,677 | 0,469 | 0,6206 | 0,589 | 0,107 | 0,182 |
| 17 | santalene-epi-beta | 1451 | 1447 ^f | 2,206 | | 1,975 | 2,093 | 0,163 | 0,078 | 1653 | 1638 ^l | 1,408 | 0,955 | 1,489 | 1,284 | 0,288 | 0,224 |
| 18 | alpha guaiene | 1454 | 1439 ^f | | 2,765 | 3,315 | 3,042 | 0,389 | 0,128 | 1622 | 1651 ^l | 5,693 | | 6,169 | 5,929 | 0,339 | 0,057 |
| 19 | alloaromadendrene | 1472 | 1461 ^f | | 2,077 | 4,397 | 3,237 | 1,64 | 0,424 | | | | | | | | |
| 20 | Valencene | 1481 | 1496 ^f | 0,536 | | 0,548 | 0,542 | 0,168 | 0,071 | | | | | | | | |



ANALISIS DE RESULTADOS

Universidad Técnica Particular de Loja

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------------------------------|-------|-------------------|-------|-------|-------|---------------|-------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-------|--------------|-------|-------|
| 21 | beta-selinene | 1484 | 1490 ^f | 0,832 | 1,338 | | 1,085 | 0,076 | 0,132 | | | | | | | | |
| 22 | beta-bisabolone | 1501 | 1504 ^f | 0,484 | 0,399 | 0,536 | 0,473 | 0,069 | 0,147 | | | | | | | | |
| 23 | trans-nerolidol | 1558 | 1539 ^j | | 0,492 | 0,569 | 0,534 | 0,055 | 0,104 | 2045 | 2054 ^j | 0,475 | 0,527 | 0,576 | 0,526 | 0,05 | 0,096 |
| 24 | caryophyllene oxide | 1568 | 1583 ^f | 5,724 | 3,312 | 6,094 | 5,044 | 1,511 | 0,299 | 1963 | 1999 ^j | 5,602 | 5,167 | 6,024 | 5,598 | 1,542 | 0,312 |
| 25 | | NI | | 5,743 | | 5,679 | 5,711 | 0,044 | 0,007 | NI | | 4,088 | | 4,243 | 4,166 | 0,109 | 0,026 |
| 26 | | NI | | 3,59 | 2,57 | 3,954 | 3,371 | 0,717 | 0,212 | NI | | 1,949 | 1,674 | 2,099 | 2,024 | 0,215 | 0,106 |
| 27 | nonane-3-methyl ^e | | | | | | | | | 979 | 972 ^l | | 1,942 | 2,867 | 2,405 | 0,654 | 0,272 |
| 28 | tricyclene ^e | | | | | | | | | 1006 | 1014 ^m | 0,526 | 0,381 | | 0,453 | 0,907 | 0,002 |
| 29 | z-beta-farnesene ^e | | | | | | | | | 1665 | 1662 ^m | 1,442 | 1,646 | 1,137 | 1,409 | 0,256 | 0,181 |
| 30 | alpha-cedrene ^e | | | | | | | | | 1610 | 1562 ⁿ | | 4,346 | 4,184 | 4,262 | 1,297 | 0,31 |
| 31 | gamma-selinene ^e | | | | | | | | | 1707 | 1682 ^o | 0,753 | 0,503 | | 0,628 | 0,175 | 0,233 |
| | | | | | | | 91,185 | | | | | | | | 89,36 | | |

a = Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB5-MS

b = Índice de Kovats determinados experimentalmente.

c = índice de Kovats de acuerdo a la referencia bibliografía.

d = % promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en la columna DB5-MS y HP-INOWAX respectivamente.

e = Compuestos identificados solo en la columna HP-INOWAX

* = Sumatoria del porcentaje relativo de los compuestos identificados en ambas columnas

X = Promedio

σ = Desviación Estándar

CV = Coeficiente de variación

IK_{REF}, Literatura: ^fref 1, ^gref 2, ^href 3, ⁱref 4, ^jref 5, ^kref 6, ^lref 7, ^mref 8, ⁿref 9, ^oref 10 (anexo V)

Fuente: Investigación directa

Elaboración: La autora



Comparando con otras investigaciones del genero *Hypericum*, como es en *Hypericum heterophyllum* y *hyssopifolium*, presenta compuestos mayoritarios a α -pinene y β -pinene (57,3% y 9,0%), respectivamente⁵⁴. En *H. richeri* subsp. *grisebachii* a Germacrene D (13.1%), β -pinene (5.8%)⁵⁵ a diferencia de *H. lancioides* que el compuesto mayoritario es Limonene con 33.46%, y Alpha pinene en menor porcentaje con el (4,99%).

De estas variaciones se podría decir que la composición del aceite esencial depende de cada especie de la planta, y condiciones climáticas⁵⁶.

⁵⁴ Cakier A, Kordali S, Zengin H, Izumi S, and Hirata T. 2003. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*.

⁵⁵ Aleksandra Dordevic, Bojan Zlatkovic, Jelena L, and Radosav Palic. (2011). A detailed chemical composition and antimicrobial activity of *Hypericum richeri* Vill. subsp. *grisebachii* (Boiss.) Nyman essential oil from Siberia

⁵⁶ CK. Shu, Bm. Lawrence. (1997). Reason for the variation in composition of some commercial essential oils. In *Flavour Chemistry and Antioxidant properties*. Risch SJ (eds). Spices ACS Symposium Series 660. Amer. Chemical Soc. Washington: 138-159.



En la figura 14 se puede observar los compuestos que se encuentran con mayor porcentaje en las tres destilaciones del aceite esencial de *H. lancioides*

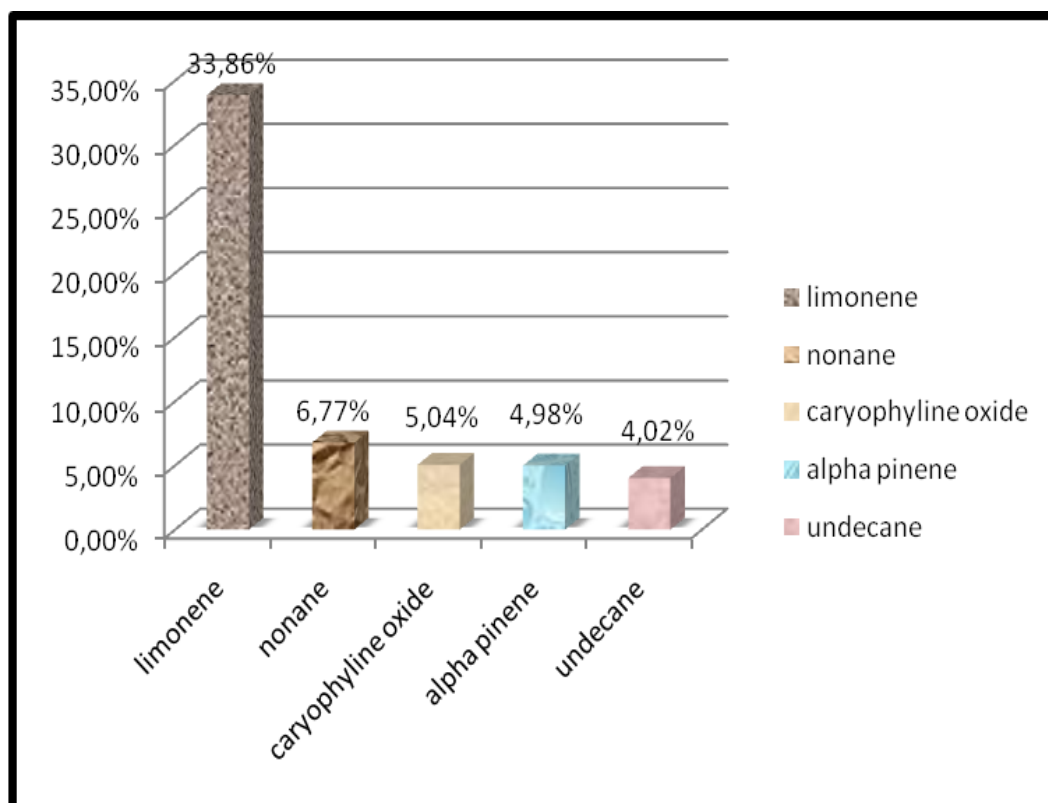


Figura 14. Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *H.lancioides*

Elaboración: la Autora

En la figura 14 se puede observar la comparación de los porcentajes de la cantidad relativa de los compuestos mayoritarios de las tres destilaciones de cada recolección, en la que se demuestra una variación cuantitativa entre los compuestos mayoritarios que existen en el aceite esencial. Estas variaciones se pueden dar debido a factores extrínsecos tales como: tiempo de recolección, ubicación de la planta a si como también las condiciones de destilación⁵⁷.

⁵⁷ A Burbott, Loomis D (1967). Effects of light and temperature on the monoterpenes of peppermint. Plant Physiol., Vol:42, 20-28



4.6 Proporción relativa de los componentes del aceite esencial DB5; HPINOWAX (MS) y DB5; HP-INOWAX (FID)

El detector de ionización en llama (FID) se emplea ampliamente como sistema de detección en GC para el análisis de los aceites esenciales. Entre los criterios de identificación tentativa en GC-FID, están la comparación de los tiempos de retención (t_r) de las sustancias de referencia con los tiempos de retención de los analitos en la muestra y la determinación de sus índices de Kovàts (IK), calculados bajo las mismas condiciones operacionales, que usados para los patrones.⁵⁸

De acuerdo a la correlación realizada entre MS y FID se determinó la presencia de los compuestos en ambos detectores con una pequeña variación en cuanto al porcentaje de los compuestos.

En la tabla 9 se indican los porcentajes de los compuestos presentes en ambos detectores MS y FID.

⁵⁸ Prats, S.M.; Jiménez, A. (2004). Essential oils analysis by gas chromatography. Tomado de Cazes, J. Encyclopedia of Chromatography. Marcel Dekker, Inc., New York.



Tabla 9: Compuestos del aceite esencial DB5; HPINOWAX (MS) y DB5; HP-INOWAX (FID)

| No | COMPUESTOS | DB5 ^a | | | | | | HPINOWAX ^b | | | | | | | | | |
|----|--|------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|
| | | HL 111 | | HL 112 | | HL 113 | | PROMEDIO | | HL111 | | HL112 | | HL113 | | PROMEDIO | |
| | | MS ^e | FIB ^f | MS ^e | FIB ^f | MS ^e | FIB ^f | MS ^e | FIB ^f | MS ^e | FIB ^f | MS ^e | FIB ^f | MS ^e | FIB ^f | MS ^e | FIB ^f |
| 1 | octane, 2-methyl ^a | 2,879 | 2,645 | 2,399 | 2,393 | 2,062 | 3,34 | 2,436 | 2,793 | | | | | | | | |
| 2 | nonane ^a | 8,737 | 10,048 | 6,558 | 7,574 | 5,01 | 8,675 | 6,769 | 8,765 | | | | | | | | |
| 3 | alpha pinene ^{a,b} | 5,201 | 3,687 | 5,732 | 3,933 | 4,022 | 3,797 | 4,985 | 3,797 | 5,806 | 5,393 | 6,379 | 5,896 | 4,014 | 4,218 | 5,399 | 5,836 |
| 4 | camphene ^{a,b} | 0,652 | 0,507 | 0,668 | 0,492 | | | 0,66 | 0,499 | 0,749 | 0,359 | 0,805 | 0,525 | 0,486 | 0,314 | 0,684 | 0,399 |
| 5 | methylnonane(dl) ^a | 2,305 | 2,336 | 1,469 | 1,508 | 1,822 | 2,377 | 1,865 | 2,072 | | | | | | | | |
| 6 | beta-pinene ^{a,b} | 1,997 | 1,745 | 2,349 | 1,967 | 1,352 | 1,293 | 1,899 | 1,668 | 2,315 | 1,568 | 2,718 | 2,888 | 1,513 | 1,915 | 2,147 | 1,457 |
| 7 | beta myrcene ^{a,b} | 1,063 | 1,672 | 1,061 | 1,124 | | | 1,062 | 1,398 | 1,178 | 0,872 | 2,605 | 2,017 | 1,729 | 0,486 | 1,504 | 1,125 |
| 8 | p-cymene ^{a,b} | 1,247 | 0,873 | 1,584 | 1,803 | 1,628 | 0,647 | 1,486 | 1,107 | 1,378 | 0,842 | 1,734 | 1,083 | 1,689 | 1,175 | 1,604 | 1,034 |
| 9 | limonene ^{a,b} | 33,919 | 33,076 | 36,438 | 38,249 | 31,213 | 32,364 | 33,856 | 34,563 | 37,373 | 37,535 | 44,337 | 39,959 | 37,418 | 38,771 | 39,709 | 38,755 |
| 10 | undecane ^{a,b} | 5,454 | 6,924 | 2,162 | 3,314 | 3,662 | 5,711 | 4,021 | 5,315 | 7,918 | 7,575 | 3,984 | 3,473 | 6,466 | 6,235 | 6,123 | 5,761 |
| 11 | decanal ^a | 0,585 | 0,147 | 0,615 | 0,459 | 0,848 | 1,347 | 0,683 | 0,649 | | | | | | | | |
| 12 | trans carveol ^{a,b} | 0,358 | 0,591 | | | 0,549 | 0,269 | 0,453 | 0,432 | 1,034 | 0,991 | 0,449 | 0,9 | 0,976 | 0,709 | 0,819 | 0,897 |
| 13 | carvone ^{a,b} | 1,005 | 0,253 | | | 1,101 | 0,377 | 1,053 | 0,315 | 1,135 | 1,173 | 0,445 | 0,575 | 1,196 | 1,298 | 0,925 | 1,015 |
| 14 | betha caryophyllene ^{a,b} | 1,019 | 0,453 | 1,683 | 1,049 | 0,797 | 1,132 | 1,166 | 1,315 | 0,885 | 0,708 | 1,457 | 1,315 | | | 1,177 | 1,011 |
| 15 | alpha gurjenene ^a | 5,135 | 4,194 | 1,058 | 1,016 | 3,099 | 4,203 | 3,097 | 3,137 | | | | | | | | |
| 16 | alpha-trans-bergamotene ^{a,b} | 0,608 | 0,113 | 0,487 | 0,164 | 0,593 | 0,449 | 0,562 | 0,344 | 0,677 | 0,609 | 0,469 | 0,469 | 0,6206 | 0,644 | 0,589 | 0,576 |
| 17 | santalene-epi-beta ^{a,b} | 2,206 | 2,109 | | | 1,975 | 1,232 | 2,093 | 1,675 | 1,408 | | 0,955 | | 1,489 | | 1,284 | 1,256 |
| 18 | alpha guaiene ^{a,b} | | | 2,765 | 1,909 | 3,315 | 1,067 | 3,042 | 1,488 | 5,693 | 5,702 | | | 6,169 | 5,967 | 5,929 | 5,835 |



ANALISIS DE RESULTADOS

Universidad Técnica Particular de Loja

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|--------------|
| 19 | alloaromadendrene ^a | | | 2,077 | 2,359 | 4,397 | 3,933 | 3,237 | 3,147 | | | | | | | | |
| 20 | valencene ^a | 0,536 | 0,844 | | | 0,548 | 0,754 | 0,542 | 0,799 | | | | | | | | |
| 21 | beta-selinene ^a | 0,832 | 0,985 | 1,338 | 0,989 | | | 1,085 | 1,058 | | | | | | | | |
| 22 | beta-bisabolone ^a | 0,484 | 0,253 | 0,399 | 0,558 | 0,536 | 0,377 | 0,473 | 0,473 | | | | | | | | |
| 23 | trans-nerolidol ^{a,b} | | | 0,492 | 0,262 | 0,569 | 0,374 | 0,534 | 0,529 | 0,475 | 0,488 | 0,527 | 0,504 | 0,576 | 0,639 | 0,526 | 0,544 |
| 24 | caryophyllene oxide ^{a,b} | 5,724 | 5,009 | 3,312 | 3,539 | 6,094 | 5,018 | 5,044 | 4,994 | 5,602 | 6,177 | 5,167 | 5,479 | 6,024 | 5,904 | 5,598 | 5,853 |
| 25 | | 5,743 | | | | 5,679 | | 5,711 | | 4,088 | 4,674 | | | 4,243 | 4,418 | 4,166 | 4,546 |
| 26 | | 3,59 | 3,349 | 2,57 | | 3,954 | 3,374 | 3,371 | 3,482 | 1,949 | 1,949 | 1,674 | 1,626 | 2,099 | 2,089 | 2,024 | 1,878 |
| 27 | nonane-3-methyl ^b | | | | | | | | | | | 1,942 | 1,329 | 2,867 | 1,749 | 2,405 | 1,539 |
| 28 | tricyclene ^b | | | | | | | | | 0,526 | 0,381 | 0,381 | 0,223 | | | 0,453 | 0,218 |
| 29 | z-beta-farnesene ^b | | | | | | | | | 1,442 | 1,162 | 1,646 | 1,527 | 1,137 | 0,825 | 1,409 | 1,171 |
| 30 | alpha-cedrene ^b | | | | | | | | | | | 4,346 | 4,321 | 4,184 | 4,399 | 4,262 | 4,36 |
| 31 | gamma-selinene ^b | | | | | | | | | | 0,750 | 0,274 | 0,503 | | | 0,628 | 0,429 |
| | | | | | | | | 91,185 | 85,84 | | | | | | | 89,364 | 85,49 |

a = Compuestos ordenados de acuerdo al orden de elución en la columna DB5-MS
 b= Compuestos identificados solo en la columna HP-INOWAX
 c = Índice de Kovats determinados experimentalmente.
 d = índice de Kovats de acuerdo a la referencia bibliográfica.
 e = % promedio calculados en base al % del área de los picos reportados en DB5 y HP-INOWAX (MS)
 f = %promedio calculado en base al %del área de picos reportados en DB5 y HP-INOWAX (FID)
 = Promedio
 IK_{REF}, Literatura: ^fref 1, ^gref 2, ^href 3, ⁱref 4, ^jref 5, ^kref 6, ^lref 7, ^mref 8, ⁿref 9, ^oref 10 (anexo V)

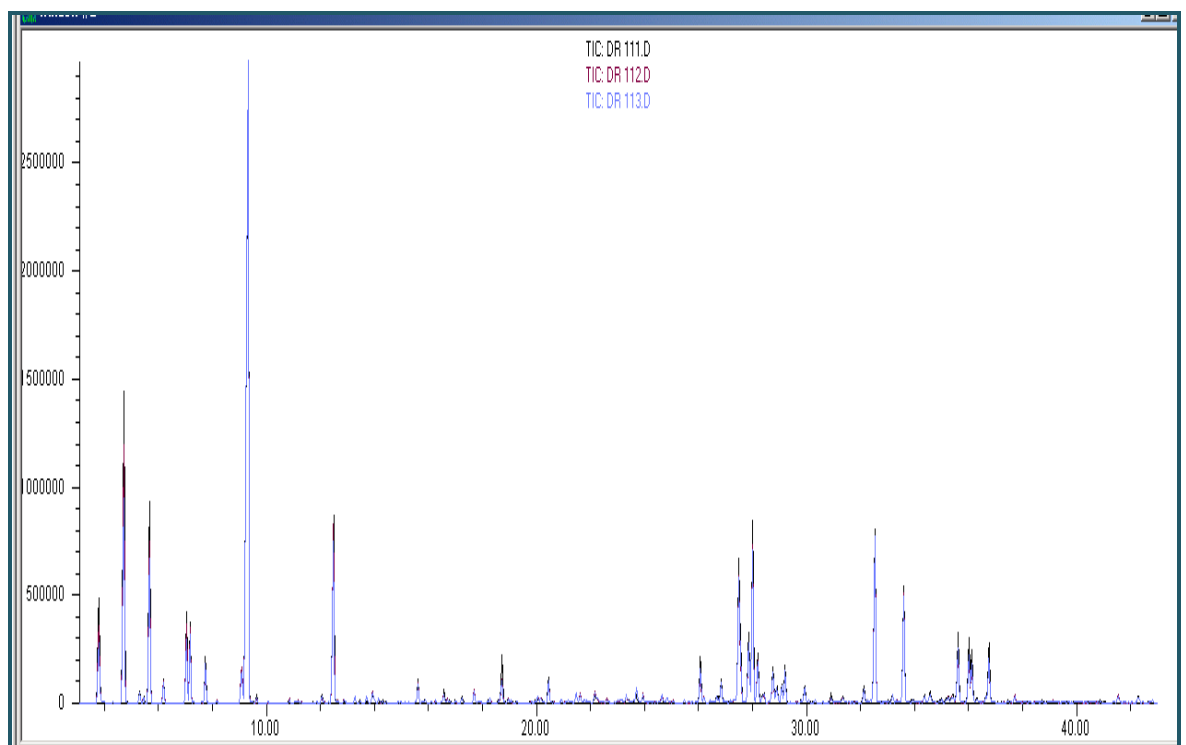
Fuente: Investigación directa
 Elaboración: La autora



En la siguientes figuras se muestran algunos cromatogramas obtenidos del aceite esencial de *H. lancioides* en la columna DB5-MS de cada recolección; a) Primera recolección, b) Segunda recolección, c) Tercera recolección.

Figura 15. Cromatogramas del aceite esencial de *Hipericum lancioides* de las tres recolecciones realizadas en DB5-MS

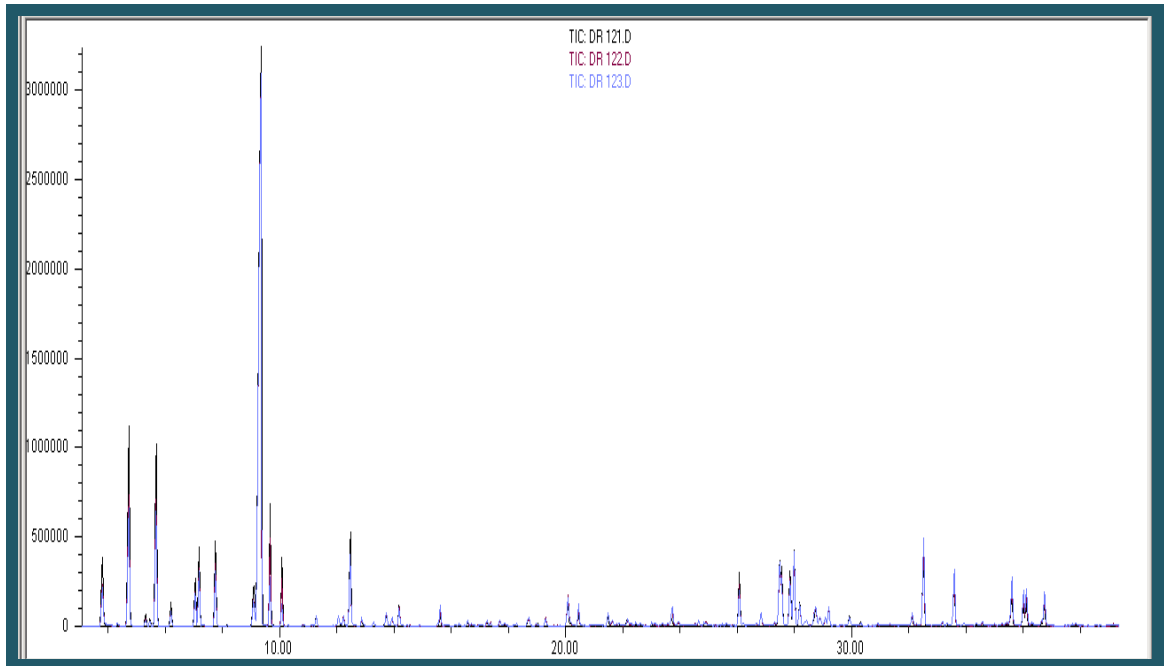
a) 111,112,113.



Fuente: Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N
Elaboración: la Autora

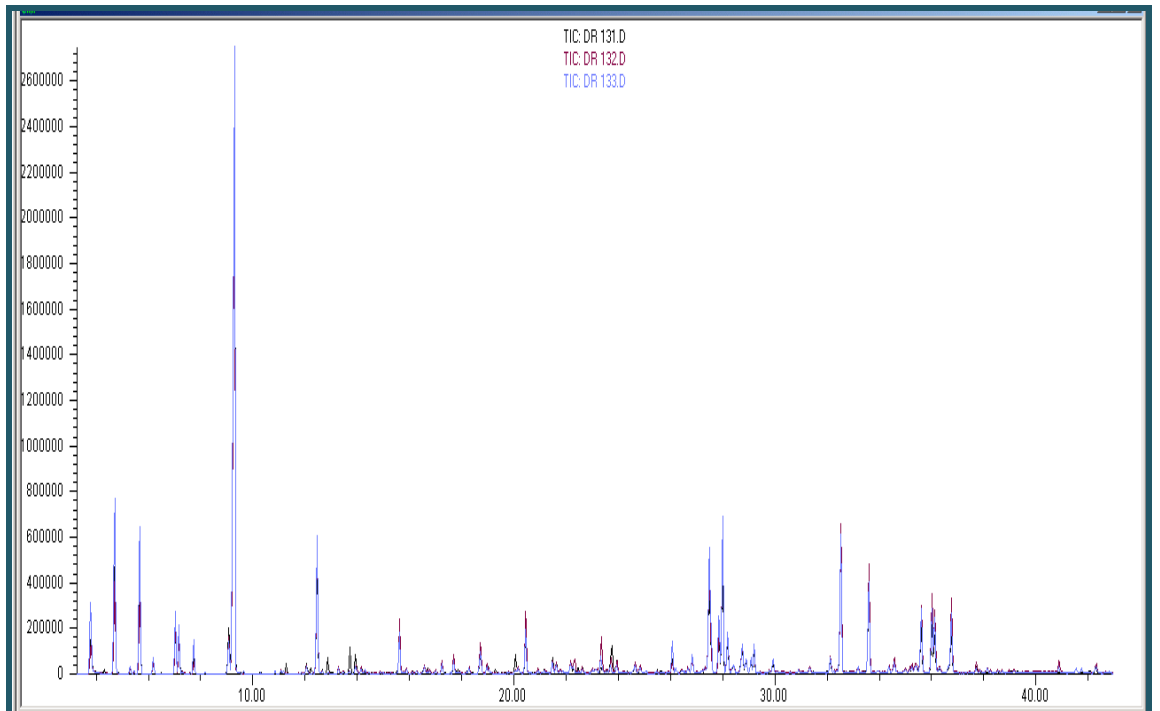


b) 121,122,123.



Fuente: Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N
Elaboración: la Autora

c) 131,132,133.



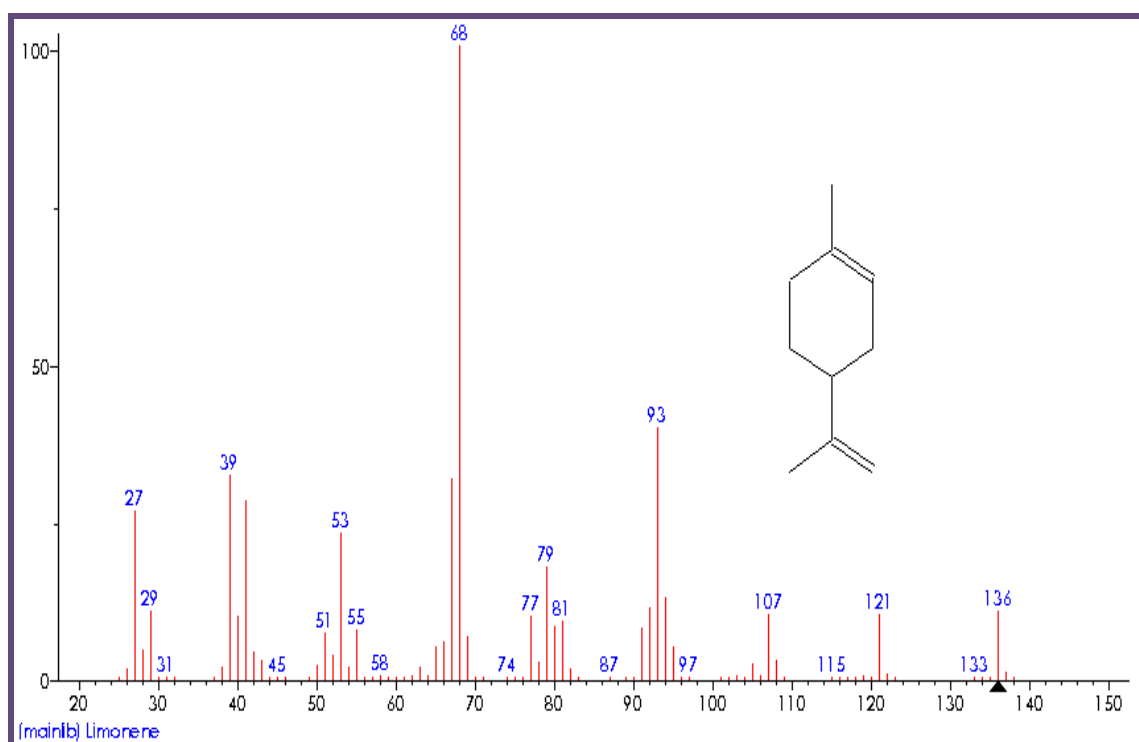
Fuente: Cromatógrafo de Gases Agilent serie 6890N
Elaboración: la Autora



4.6.1. Espectros de los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de *Hypericum lancoides*

Los espectros que se muestran a continuación en la figura 15 corresponden a los compuestos más representativos presentes en el aceite esencial de *Hypericum lancoides*.

LIMONENE

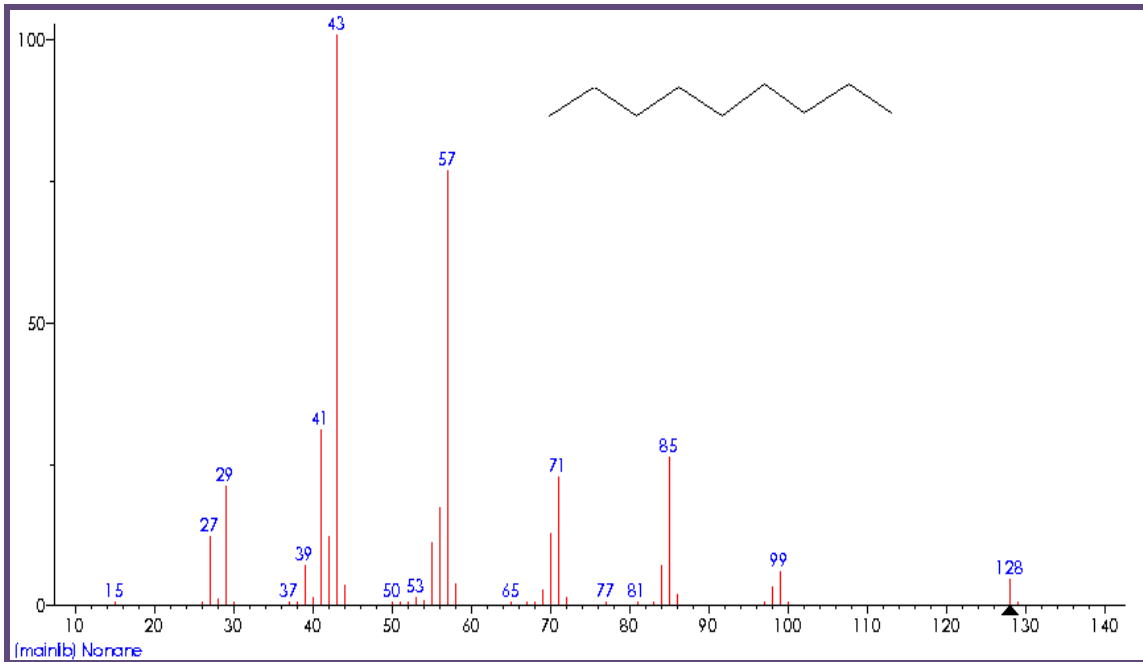


Fuente: librería WILEY 7n.1

Elaboración: la Autora



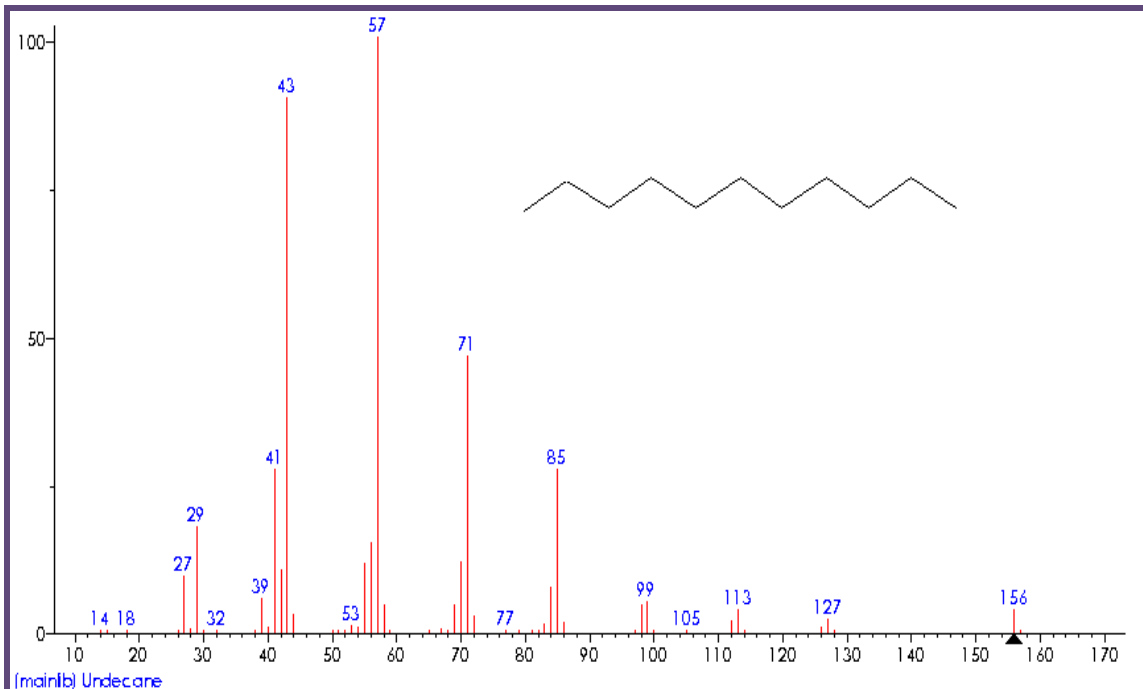
NONANE



Fuente: librería WILEY 7n.1

Elaboración: la Autora

UNDECANE

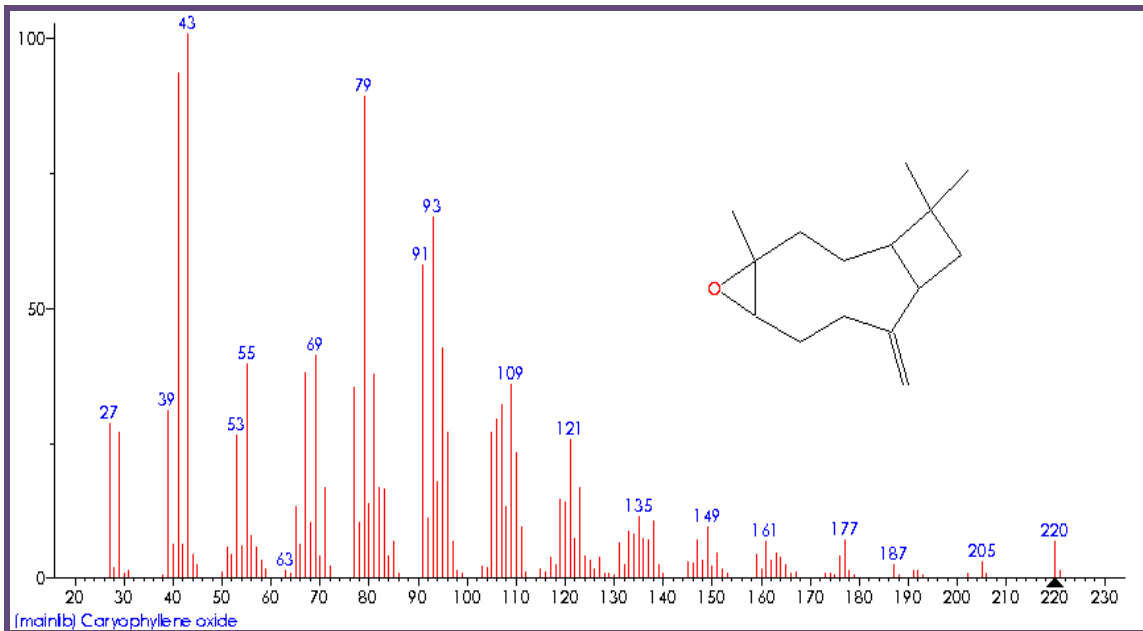


Fuente: librería WILEY 7n.1

Elaboración: la Autora



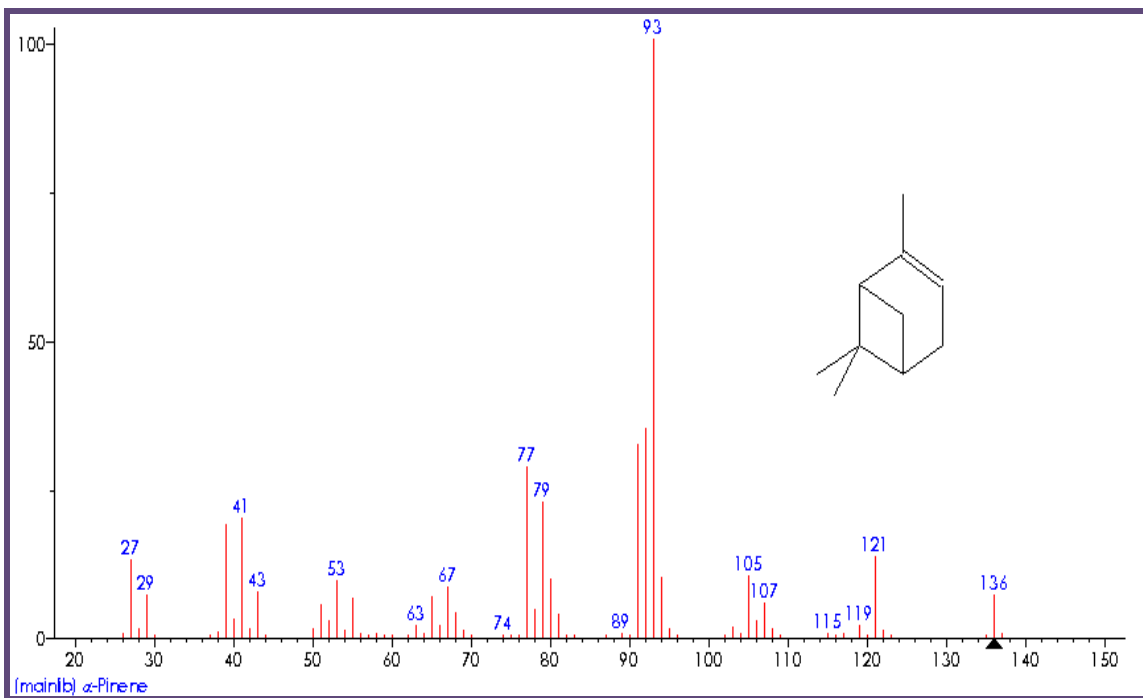
CARYOPHYLLENE OXIDE



Fuente: librería WILEY 7n.1

Elaboración: la Autora

ALPHA PINENE



Fuente: librería WILEY 7n.1

Elaboración: la Autora



4.7 Actividad Biológica del Aceite Esencial

4.7.1 Concentración mínima Inhibitoria (CMI) para hongos

En la tabla 10 se muestran que los aceites esenciales obtenidos de *Hypericum lancioides* poseen actividad contra hongos: *Trichophyton mentagrophytes*[®] y *Trichophyton rubrum*[®] a una concentración de 10ul/mg, como se puede observar los aceites inhiben el crecimiento del hongo *T. Mentagrophytes* ATCC[®] 28185 a una concentración de 250 µg/ml, 125 ug/mL y el CMI para *T. rubrum* ATCC[®] 28188 la inhibición de los aceites esenciales es de 125 µg/ml y 62.5 ug/mL. Los resultados obtenidos en la presente investigación. Según la clasificación de Holetz et al (2002), los aceites mostraron una actividad buena

Tabla 10: Actividad antifúngica del aceite esencial de *Hypericum Lancioides* contra dermatofitos

| Concentración Mínima Inhibitoria(µg/mL) | | | |
|---|-----|------|------|
| Aceite esencial | Tm | Tr | C |
| HL 111 | 250 | 125 | 7.81 |
| HL 112 | 250 | 125 | 7.81 |
| HL 113 | 250 | 125 | 7.81 |
| HL 121 | 125 | 125 | 7.81 |
| HL 122 | 125 | 125 | 7.81 |
| HL 123 | 250 | 125 | 7.81 |
| HL 131 | 250 | 125 | 7.81 |
| HL 132 | 250 | 125 | 7.81 |
| HL 133 | 250 | 62.5 | 7.81 |

Tm=*Trichophyton mentagrophytes* ATCC ® 28185
Tr=*Trichophytonrubrum* ATCC ® 28188.Control:
(Itraconazol 1mg/mL)

Elaboración: la Autora

⁵⁹ Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Filho B (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. MemInst Oswaldo Cruz.Vol: 97, p.p.1027–31.



Estudios desarrollados de actividad antimicrobial en especies del género *Hypericum*, *H. richeri* subsp. *Grisebachii* demostraron obtener actividad contra hongos y bacterias con una inhibición para las bacterias gram positivas *S. aureus* (CMI = 1.625 µg/mL), y para hongos *C. albicans* (CMI = 1.625 µg/mL)⁴⁰. En comparación con nuestro estudio que demostró actividad solo para hongos. Las diferencias entre los resultados obtenidos de esta variación se podrían explicar que se debe a la diferente composición química de cada especie

60

4.7.2 Concentración mínima Inhibitoria (CMI) para bacterias

En el ensayo de bioactividad realizado para evaluar la susceptibilidad de las bacterias se determinó que el aceite esencial de la especie *Hypericum lancioides* mostraron un CMI de 1000 µg/mL, valor por el cual según la clasificación de Holetz et al (2002) una CMI > 1000 µg/ml nos indica como una actividad débil o nula⁵⁸. (Tabla 11)

Tabla 11: Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hypericum lancioides*

| Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml) | | | |
|--|-------------------------------|-----------|------|
| ESPECIE VEGETAL | BACTERIAS | ACTIVIDAD | C |
| <i>Hypericum lancioides</i> | <i>Escherichia coli</i> | NA | 7,81 |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | NA | 7,81 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | NA | 7,81 |
| | <i>Proteus vulgaris</i> | NA | 7,81 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | NA | 7,81 |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> | NA | 7,81 |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> | NA | 7,81 |
| NA= No Activo C= Control | | | |

Elaboración: la Autora

⁶⁰ V. Saroglou, PD Marin, A Rancic, M Veljic, H Skaltsa. (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *hypericum* species from Serbia Biochem Syst. E col, 35: 146-152.



Según Magiatis et al., 2002; Bougatsos et al 2004 las actividades biológicas de los aceites esenciales dependen de sus componentes, sus estructuras y las concentraciones en que se hallen presentes. Por ejemplo, se ha observado que los aceites esenciales que contienen aldehídos alifáticos α,β -insaturados, presentan inhibición del desarrollo microbiano, aún en bajas concentraciones. Por otra parte, los sesquiterpenos, $C_{15}H_{24}$, aunque no son tan efectivos en la inhibición del desarrollo de microorganismos, suelen presentar actividad citotóxica y mutagénica. Respecto a la actividad antibacteriana, diferentes autores, han mostrado como los aceites esenciales con un elevado contenido de fenoles, son potentes microbicidas o inhibidores, la cual depende de sus composiciones químicas^{62 63}.

⁶² Magiatis P, Skaltsounis AI, Chinou Sa Haroutounian(2002).chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of three Greek Achillea species: 287-290.

⁶³ Bougatsos C, Runyoro O, Chinoua IB. (2004). Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the two Helichysum species from Tanzania: 368-372.

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES



- ❖ Los promedios totales de humedad fueron 49,4% y para el rendimiento un promedio total de 0,15%.
- ❖ El promedio total de las propiedades físicas de los aceites esenciales de *H. lancoides* obtenidos de las tres destilaciones fueron: para el índice de refracción 1,483, y de la densidad 0,840gr/cm³.
- ❖ El aceite esencial de *H. lancoides* está compuesto principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos y terpenoides. Un total de 31 compuestos fueron identificados en las dos columnas de los cuales el 91.19% corresponde a la columna DB5-MS y el 89,36% a la columna HP-INNOWAX, Los compuestos mayoritarios fueron: limonene (33.86%); nonane (6,769%); caryophyllene oxide (5,04%); alpha pinene (4,99%); undecane (4,02%).
- ❖ El aceite esencial de *Hypericum lancoides* no presento ningún tipo de actividad frente a las bacterias.
- ❖ El aceite esencial de *Hypericum lancoides* presento actividad buena frente a *Trichophyton rubrum*, con una concentración mínima inhibitoria de 62.5 ug/mL.

CAPÍTULO VI
RECOMENDACIONES



- ❖ Realizar recolecciones de diferentes lugares que se encuentre la especie de *H. lancioides*, para poder hacer una comparación, es decir tratar de establecer en qué estado fenológico hay un mayor rendimiento del aceite esencial, y también sobre su composición química ya que varios autores señalan sobre la variación de la composición química que se encuentra la especie vegetal.

- ❖ Se recomienda realizar pruebas para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *H. lancioides*, como también poder determinar sus dosis terapéuticas para su uso en la población humana.

- ❖ Realizar pruebas farmacológicas ya que la especie en estudio presento buena actividad biológica contra hongos.

CAPÍTULO VII

ANEXOS



ANEXO I

DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Principio:

La pérdida de peso de la muestra, debido a que es sometida a altas temperaturas en una estufa durante un tiempo determinado.

Materiales

- Pinza
- Balanza
- Crisol
- Desecador

Procedimiento

- Pesar en una capsula o luna de reloj de 0,5 a 1 gramo de la muestra; seguidamente colocarla durante 15min en la lámpara ULTRA X.
- Enfriar la capsula en el desecador por 15 min, aproximadamente, hasta que la temperatura de la capsula se iguale a la temperatura ambiente. Luego pesar y anotar el peso.
- Colocar la capsula nuevamente en la estufa durante 15 min, enfriar en el desecador y pesar.
- Repetir el procedimiento hasta que el peso de la capsula sea constante.

Cálculo

$$Hm = (m1 - m2 / m1 - cv) * 100$$

Dónde:

Hm = % de humedad

c.v. = peso de la capsula vacía (gr).

m1 = peso de la capsula + muestra a analizar (gr).

m2 = peso de la capsula + muestra seca (gr).

**ANEXO II****CÁLCULO DEL RENDIMIENTO**

Para la determinación del rendimiento del aceite esencial se hizo en relación al volumen obtenido del aceite y la cantidad de materia vegetal en gramos utilizada para cada destilación. El rendimiento se expresó en porcentaje, y se calculó un rendimiento exclusivo para cada destilación.

Los resultados se expresaron bajo la siguiente fórmula:

Fórmula:

$$R = (\text{vol} / \text{P.M}) \times 100$$

R= rendimiento

vol= volumen obtenido en la destilación

P.M= peso total de la muestra destilada



ANEXO III

DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA A 20°C

Principio:

La densidad relativa a 20°C de un aceite esencial se define como la masa de un determinado volumen de aceite esencial a 20°C sobre la masa de un volumen igual de agua destilada a 20°C.

Nota:

- Si es necesario operar a una temperatura diferente debido a la naturaleza del aceite para indicar la norma referente al aceite esencial. La corrección para 20°C es de 0.0007 a 0.0008 por grado centígrado.
- La masa volumétrica a 20°C de un aceite esencial se reporta como la masa de un cierto volumen del aceite esencial a 20°C.

Aparatos:

- Picnómetro de vidrio.
- Baño termostático, mantenido a una temperatura de 20°C +/- 0.2°C.
- Termómetro de precisión graduado de 10 a 30°C, con una variación de 0.2°C a 0.1°C.
- Balanza analítica.

Procedimiento:

- ❖ **Picnómetro:** Limpiar rigurosamente y luego enjuagar el picnómetro, lavar con etanol y luego con acetona, pasarlo por una corriente de aire seco. Si es necesario secar el exterior del picnómetro con un trapo seco o con papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura en el cuarto de la balanza, pesar el picnómetro, con el tapón en su sitio con 1mg de precisión.
- ❖ **Peso del agua destilada:** Llenar el picnómetro con agua recién destilada, que esté a una temperatura de 20°C. Ajustar el nivel del agua hasta la marca, poner el tapón del picnómetro en su sitio, secar el exterior del



picnómetro con un trapo seco o papel filtro. Cuando se equilibre la temperatura con el cuarto de balanzas pesar el picnómetro lleno con el tapón en su sitio con un mg de precisión lleno igual que en el caso anterior.

- ❖ **Peso del aceite esencial:** Vaciar el picnómetro, enjuagar y secar como en el inicio. Efectuar las mismas operaciones solo que esta vez será con aceite esencial en lugar de agua.

Cálculo:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Dónde:

Dónde:

d = densidad relativa a 20⁰C, referido al agua a 20⁰C

m0 = masa en gramos del picnómetro vacío.

m1 = masa en gramos del picnómetro con agua.

m2 = masa en gramos del picnómetro con aceite esencial.

Se expresará los resultados con tres decimales.



ANEXO IV

DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

Principios

El Índice de Refracción de un aceite esencial es el producto entre el seno del ángulo de incidencia y el seno del ángulo de refracción de un rayo luminoso de longitud de onda determinada, que pasa desde el aire a través del Aceite Esencial, manteniendo la temperatura constante.

La longitud de onda específica es (589.3 ± 0.3) nm, correspondiente a la radiación D1 y D2 del espectro de sodio.

La temperatura de referencia es de 20°C, salvo para los aceites esenciales que no son líquidos a esa temperatura. En este caso se deben adoptar las temperaturas de 25 y 30 °C según el punto de fusión del aceite considerado.

Aparatos:

Refractómetro: Utilicé un refractómetro clásico que permita la lectura de los índices de refracción entre: 1.300 y 1.700 o con una precisión de ± 0.0002 .

Ajusté el aparato de manera que a una temperatura de 20 °C, se tengan los siguientes índices de refracción según:

1.3330 para agua destilada.

1.4906 para el p-cimeno.

1.5685 para el benzoato de bencilo.

1.6585 para el 1-bromo naftaleno.

Los productos patrón deben ser puros, de calidad para refractometría, deben también ajustarse con una lámina de índice de refracción conocida, según las indicaciones de fabricación del equipo.

**Modo de operación:**

Determinación Pasar una corriente de agua en el refractómetro, a fin de mantener el aparato a la temperatura de referencia de 20°C salvo para los aceites esenciales que nos son líquidos a esa temperatura. En este caso deben adoptarse las temperaturas de 20°C y 30°C, según el punto de fusión del aceite esencial considerado. Esta temperatura no debe diferir de la temperatura de referencia más de $\pm 0.2^\circ\text{C}$ y debe mantenerse a $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

Antes de poner la muestra en el instrumento, llevarla a una temperatura igual a la que se realizará la medida.

Para efectuar la lectura esperar que la temperatura sea estable.

Nota:

- ❖ Expresar los resultados con cuatro cifras decimales.
- ❖ La precisión de la determinación es de ± 0.0002 .



ANEXO V
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS
INDICE DE Kovats

1. Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL. 1995.
2. Zaikin, V.G., and Borisov, R.S. 2002. Chromatographic-mass spectrometric analysis of Fischer-Tropsch synthesis products. J. Anal. Chem. 57:544-551.
3. Gaspar, H.; Palma, F.M.S.B.; de la Torre, M.C.; Rodríguez, B.; Barroso, J.G.; Figueiredo, A.C. Composition of the essential oil of *Teucrium haenseleri* Boiss. Flavour Fragr. J., 12, 1997, 355-357.
4. Acree, T.; Arn, H. Cornell University Flavornet 1997.
5. Choi, H.-S. 2003. Character impact odorants of citrus hallabong [(*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco] cold-pressed peel oil. J. Agric. Food Chem. 51:2687-2692
6. Hognadottir, A., and Rouseff, R.L. 2003. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography - mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 998:201-211.
7. Davies, N.W. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. J. Chromatogr. A. 503:1-24.
8. Pino, J.A., Mesa, J., Munoz, Y., Marti, M.P., and Marbot, R. 2005. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. J. Agric. Food Chem. 53:2213-2223.



9. Cavalli, J.-F., Tomi, F., Bernardini, A.-F., and Casanova, J. 2003. Composition and chemical variability of the bark oil of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon from Madagascar. *Flavour Fragr. J.* 18:532-538.

10. Everaerts, C., Roisin, Y., Le Quere, J.-L., and Bonnard, O., and Pasteels, J.M. 1993. Sesquiterpenes in the frontal gland secretions of nasute soldier termites from New Guinea. *J. Chem. Ecol.* 19:2865-2879