



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE LA VIOLETILLA (*Hybanthus parviflorus*)”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

DOCTOR EN BIOQUIMICA Y FARMACIA

PRESENTADO POR

LUIS CARLOS BUCAY MOROCHO

RIOBAMBA – ECUADOR

2009

DEDICATORIA

La presente investigación va dedicada a mi Dios quien me acompaña siempre.

A mi esposa María Elena, a mi hija Diana Calorina que a cada instante fueron la fuerza principal para culminar mi carrera.

A mis padres y hermanos quienes forman parte importante en mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios por cuidar y guiar cada uno de mis pasos.

A mis padres y hermanos por haberme brindado el apoyo necesario cuando lo he requerido.

Mis sinceros agradecimientos a la Dra. Susana Abdo Directora de Tesis y Dr. Francisco Portero Miembros de mi Tribunal de tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo.

A mis amigos por sacarme del aburrimiento.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Edmundo Caluña
DECANO FAC. CIENCIAS

.....

.....

Dr. Luís Guevara
**DIRECTOR ESCUELA
BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

.....

.....

Dra. Susana Abdo
DIRECTOR DE TESIS

.....

....._

Dr. Francisco Portero.
MIEMBRO DE TRIBUNAL

.....

.....

Sr. Carlos Rodríguez
**DIRECTOR DEL CENTRO
DE DOMUMENTACIÓN**

.....

.....

NOTA DE TESIS ESCRITA

.....

Yo, Luis Carlos Bucay Morocho, soy responsable de las ideas,
doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el
patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la
ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO

.....
LUIS CARLOS BUCAY MOROCHO

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo. Se la define como el conjunto de todos los conocimientos y prácticas usados en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, y confiado exclusivamente en experiencia práctica, observación y transmitido de generación a generación, en forma oral o escrita (32).

Las plantas medicinales juegan un papel muy importante. En 1977 la Organización Mundial de la Salud (OMS) adoptó una resolución, lanzó una promoción mundial de la medicina tradicional. Dicha resolución insta a los gobiernos miembros, dar importancia a sus sistemas médicos tradicionales. Otra resolución enfatizó los recursos humanos que representan los practicantes (curanderos, parteras, etc.). En 1978 se llevó a cabo la conferencia de Alma Ata, donde se formuló la meta de: Salud para Todos en el año 2000. Fue recomendada en dicha conferencia dar prioridad a la utilización de parteras y curanderos y la incorporación de fitofármacos con usos comprobados, en las políticas nacionales de medicamentos. Desde entonces, muchos fueron los esfuerzos por parte de la OMS de promoverlos (6)(32).

La medicina popular juega un papel muy importante en la vida de la población de la comunidad de San Francisco de Cunuguachay perteneciente a la parroquia de Calpi del cantón Riobamba. En el sistema médico quechua, la personas trata permanentemente de mantener un equilibrio interno con su cuerpo y un equilibrio con su ambiente mediante rituales y ceremonias. La tierra es vista como la tierra que da vida a todo, por ende su nombre es pachamama (la tierra madre). Ella es la fuente de fertilidad, da vida a las plantas, animales y los seres humanos. Es entonces lógico que las plantas sean usadas en la curación de las enfermedades, sin embargo, este sistema cada vez es menos utilizado. Los indígenas en cada casa cultivan las plantas medicinales que son fáciles de conservar en su jardín y las que son silvestres esperan su temporada de floración para ser recolectadas y luego comercializadas convirtiéndose en una fuente de ingresos para sus

hogares. Entre estas plantas medicinales se destaca la Violetilla que es un subarbusto que crece entre 0 y 3 500 m.s.n.m. Es una planta anual, de porte erecto, de no más de 50 cm de altura, que lamentablemente esta desapareciendo por efectos de erosión ambiental de sus suelos. La gente de la comunidad antiguamente la utilizaba en medicina popular por sus propiedades, eméticas, purgativas y antimicrobianas, pero este conocimiento poco a poco se ha ido perdiendo. Sin embargo, no se dispone de estudios realizados sobre esta planta que validen o respalden su uso (4).

Por lo expuesto urge desarrollar investigaciones en la Violetilla para resaltar, validar y rescatar los valores ancestrales sobre su uso, permitiendo en un futuro inmediato su cultivo sustentable y su comercialización como fitomedicamento, brindando de esta forma una alternativa segura para la atención primaria de salud. Permitirá además sustituir, en el plano local los medicamentos importados. También podrían ser utilizadas juntamente con los productos farmacéuticos, potenciando su acción o disminuyendo sus efectos colaterales.

Los objetivos trazados en esta investigación son: describir los usos etnobotánicos de la Violetilla, caracterizar la droga, realizar el tamizaje fitoquímico en extractos acuoso, hidroalcohólico y etéreo; y evaluar su actividad antimicrobiana.

Se planteó la hipótesis: La violetilla contiene principios activos que le dan actividad antimicrobiana.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A	Activo
ATCC	American Type Culture Collection
AHP	American Herbal Pharmacopoeia
APS	Atención primaria de la salud
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CYTED	Programa iberoamericano de ciencia y tecnología
L	Litro
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEUU	Estados Unidos de América
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
FAO	Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas
g	Gramo
HAACH	Hospital Andino Alternativo de Chimborazo
h	Hora
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
I	Inactivo
MH	Mueller Hinton
MT	Medicina tradicional
min	Minutos
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
mm	Milímetro
mg	Miligramo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
mL	Mililitro
NaCl	Sodio cloruro
nm	Nanómetro
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAF	Factor de activación plaquetaria
P	Parcialmente activo
ppm	Partes por millón
sp	especies
TSB	Caldo Soya Triptica
TSA	Agar Soya Triptica
UFC	Unidad formadora de colonia
%	Porcentaje

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS
ÍNDICE DE CUADROS
ÍNDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS
ÍNDICE DE ANEXOS
INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO	15
1.1	Etnobotánica.....	15
1.2	Fitomedicamentos.....	17
1.2.1	Control de calidad de productos elaborados a base de plantas medicinales científicamente validadas.....	20
1.2.1.1	Normas para garantizar una materia prima de calidad.....	21
1.2.2	Control de calidad de materia prima y producto terminado.....	22
1.3	Tamizaje fitoquímico.....	23
1.3.1	Fundamento.....	23
1.3.2	Metodología en el análisis fitoquímico.....	23
1.4	<i>Hybanthus parviflorus</i>	24
1.4.1	Descripción botánica y distribución geográfica.....	24
1.4.2	Usos en la medicina popular.....	25
1.4.3	Estudio farmacognóstico de la violetilla.....	26
1.4.3.1	Quercetina.....	26
1.4.3.2	Luteolina.....	26
1.4.3.3	Apigenina.....	27
1.4.3.4	Ácido ursólico.....	27
1.4.3.5	Beta sitosterol.....	27
1.4.4	Investigación de compuestos antimicrobianos de origen vegetal.....	28
1.4.4.1	Actividad antibiograma.....	28
1.4.4.2	Medios de cultivo.....	29
1.4.4.3	Ensayos antimicrobianos.....	29
2.	PARTE EXPERIMENTAL	30
2.1	Lugar de la investigación.....	30
2.2	Materiales, Equipos y Reactivos.....	30
2.2.1	Material Biológico.....	30
2.2.2	Materiales de laboratorio y otros.....	31

2.2.3	Equipos.....	31
2.2.4	Reactivos y medios de cultivo	32
2.3	Metodología.....	32
2.3.1	Investigación etnobotánica.....	32
2.3.2	Recolección.....	33
2.3.3	Comprobación taxonómica e identificación botánica.....	33
2.3.4	Limpieza y desinfección del material vegetal.....	33
2.3.5	Estudio farmacognóstico.....	33
2.3.5.1	Descripción macro morfológica.....	33
2.3.5.2	Descripción micro morfológica.....	34
2.3.6	Obtención de los extractos.....	34
2.3.7	Análisis físico químicos cualitativos.....	36
2.3.7.1	Reacciones de caracterización.....	36
2.3.8	Control de calidad de la droga cruda.....	43
2.3.8.1	Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido.....	43
2.3.8.2	Determinación de contenido de humedad.....	45
2.3.9	Ensayo de actividad antimicrobiana por el método de Mitscher en el extracto fluido de violetilla.....	46
2.3.9.1	Preparación de muestras para el ensayo.....	46
2.3.9.2	Preparación de los medios.....	47
2.3.9.3	Reactivación de los microorganismos.....	48
2.3.9.4	Preparación de las suspensiones microbianas.....	49
2.3.9.5	Rayado de los microorganismos.....	49
2.3.9.6	Lectura de los resultados.....	50
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.	CONCLUSIONES.....	61
5.	RECOMENDACIONES.....	63
6.	RESUMEN.....	64
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	66
8.	ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Numero de muestras para el ensayo microbiológico.....	47
CUADRO No. 2	Resultados de la encuesta realizado en la comunidad de San Francisco de Cunuguachay.....	52
CUADRO No. 3	Grupos fitoquímicos encontrados en los diferentes extractos de <i>Hybanthus parviflorus</i>	56
CUADRO No. 4	Determinación de cenizas de <i>Hybanthus parviflorus</i>	57
CUADRO No. 5	Determinación de humedad y humedad residual de <i>Hybanthus parviflorus</i>	58
CUADRO No. 6	Actividad antimicrobiana en siembra radial en placa de petri de los extractos de <i>Hybanthus parviflorus</i>	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructura de la luteolina.....	26
FIGURA No. 2	Esquema de la obtención de extracto etéreo, hidroalcohólico y acuoso.....	35
FIGURA No. 3	Esquema del análisis físico químico cualitativo en el extracto etéreo.....	36
FIGURA No. 4	Esquema del análisis físico químico cualitativo en el extracto hidroalcohólico.....	36
FIGURA No. 5	Esquema del análisis físico químico cualitativo en el extracto acuoso.....	37
FIGURA No. 6	Plantilla utilizada en el test de Mischer para el estriado de microorganismos.....	49

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	Violetilla, <i>Hybanthus parviflorus</i>	24
FOTOGRAFÍA No. 2	Obtención de extractos.....	34
FOTOGRAFÍA No. 3	Violetilla, <i>Hybanthus parviflorus</i> recolectada de la comunidad de San Francisco.....	54
FOTOGRAFÍA No. 4	Corte transversal de la raíz de <i>Hybanthus parviflorus</i>	55

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Hoja de la encuesta realizada a los pobladores de la comunidad de San Francisco de Cunuguachay.....	71
ANEXO No. 2	Siembra superficial en placas de petri para el extracto etéreo.....	72
ANEXO No. 3	Siembra superficial en placas de petri para el extracto hidroalcohólico.....	73
ANEXO No. 4	Concentración de los diferentes extractos.....	74

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ETNOBOTÁNICA

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global, la OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de estos tratamientos implica el uso de extractos o sus principios activos. La OMS define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (10).

Tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, 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 puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (30).

Aunque menos del 10% de las especies de angiospermas existentes en el mundo han sido evaluadas para determinar su composición química y sus propiedades farmacológicas, el valor potencial de los medicamentos derivados de plantas tropicales es considerable. En algunos países se han desarrollado programas de prospección para investigar la actividad farmacológica de los componentes de plantas tropicales, tales como el Convenio Merck-INBIO en Costa Rica, el programa de búsqueda de compuestos activos contra el Cáncer

y el SIDA del Instituto Nacional del Cáncer en EEUU y el proyecto de prospección bioquímica del bosque tropical de Yutajé en Venezuela (30).

Los métodos de prospección al azar siguen teniendo preferencia en la búsqueda de compuestos activos por parte de la industria farmacéutica, pero en los últimos años se ha prestado especial atención a la utilización de la información etnobotánica para la selección de plantas en la búsqueda de compuestos con actividad biológica. En tal sentido, algunas investigaciones han evidenciado la efectividad de este enfoque para tal fin. Sin embargo, en muchos países en desarrollo ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales. Aunado a ello, la disponibilidad de estas se ha visto reducida por la degradación de los bosques y su conversión a bosques secundarios y campos agrícolas. En consecuencia, la cadena de transmisión de dicho conocimiento se encuentra en riesgo. Es necesario, entonces, hacer esfuerzos para evitar la pérdida definitiva de este conocimiento, no solo para preservar esta herencia cultural, sino también para registrar la información sobre ciertas especies útiles, que podrían ser relevantes para el desarrollo de nuevas fuentes de medicamentos y de otros beneficios para la humanidad, contribuyendo al mismo tiempo, a proteger la biodiversidad (10).

La investigación sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la etnobotánica, que ha sido definida como el estudio de las interrelaciones entre los grupos humanos y las plantas. Por su naturaleza interdisciplinaria abarca muchas áreas, incluyendo: botánica, química, medicina, farmacología, toxicología, nutrición, agronomía, ecología, sociología, antropología, lingüística, historia y arqueología; lo cual permite un amplio rango de enfoques y aplicaciones. No obstante, aunque existen excepciones notables, muchos investigadores incursionan en este campo de estudio desde el ámbito de sus propias disciplinas. A pesar del interés común, ha existido poco intercambio de teorías y métodos entre disciplinas. Tal situación ha favorecido una alta proporción de estudios etnobotánicos descriptivos. Esto ha contribuido a una percepción negativa de la etnobotánica, la cual ha sido vista como una pseudociencia que carece de un contexto teórico unificado y de técnicas de análisis rigurosas. En las dos últimas décadas se ha hecho un esfuerzo importante para cambiar esta percepción. En ese sentido, la utilización

de técnicas cuantitativas ha permitido valorar con mayor precisión la importancia relativa de las plantas en contextos culturales concretos y los patrones de variación del conocimiento tradicional dentro de las comunidades locales. Los estudios en diferentes grupos étnicos latinoamericanos han documentado experiencias de manejo que podrían constituir la base para diseñar estrategias de conservación y manejo sostenible de ecosistemas tropicales. Igualmente, algunas técnicas ecológicas han resultado útiles para evaluar el impacto ecológico de la extracción de plantas útiles en comunidades naturales (19).

La filosofía de la etnobotánica no ha cambiado mucho, pues en la mayoría de las investigaciones se sigue enfatizando la documentación científica de las plantas y sus usos para beneficio casi exclusivo de grandes transnacionales, con poco interés en la dinámica de los sistemas de conocimiento local y en la compensación a las comunidades nativas. Se requiere entonces de más trabajo interdisciplinario, de una mayor preocupación por los aspectos éticos de la comercialización de medicamentos desarrollados a partir del conocimiento tradicional de ciertos grupos humanos y por el retorno de los resultados obtenidos, en ensayos biológicos y grupos humanos que han colaborado en la colección de las plantas evaluadas (7).

1.2 FITOMEDICAMENTOS

Son los medicamentos cuyo principio activo es un extracto vegetal, elaborado de acuerdo a formas farmacéuticas tradicionales y que presenta una actividad biológica demostrada, es decir, es un extracto vegetal estandarizado, normalizado y estabilizado y que presenta una acción farmacológica definida, conocida y cuantificada (22).

A pesar de que los medicamentos herbarios se han usado durante muchos siglos, y que cerca de 250 mil plantas presentan una gran diversidad en compuestos bioactivos que podrían enriquecer la biblioteca de compuestos útiles para la terapéutica, solo una cantidad relativamente pequeña se han estudiado para las posibles aplicaciones médicas. En la actualidad se dispone de datos sobre la seguridad y la eficacia de un número bajo tanto de plantas como de sus extractos, principios activos y de sus preparaciones (14).

La Convención de las Naciones Unidas sobre la diversidad biológica declara que la conservación y el uso sostenible de los recursos naturales revisten importancia crucial para satisfacer principalmente las necesidades de alimentos y de salud de la creciente población mundial, para lo cual es esencial acceder a los recursos y a la tecnología que permita aprovecharlos, así como su intercambio entre las naciones. Los países desarrollados gastan millones de dólares en productos fitoterapéuticos. Se calcula que en 1999 el mercado global de plantas medicinales excedió los 15 mil millones de dólares, de los cuales 7 mil millones corresponden a Europa, 2.4 mil millones se gastaron en Japón y 3 mil millones de dólares en Estados Unidos (11)(18).

Para que un extracto alcance la categoría de fitomedicamento debe cumplir con una serie de exigencias de uniformidad que incluyen los siguientes factores:

a) Autenticación de la especie botánica empleada

Tarea realizada por un especialista en botánica y que consiste en clasificar la planta por género y especie. La gran mayoría presentan variaciones entre especies e intraespecies.

b) Partes de la planta que son utilizadas

Pueden diferir en composición de sustancias químicas y por supuesto en sus propiedades farmacológicas. De este modo, se hace importantísimo definir si se utiliza la raíz, la corteza, las hojas o las flores.

c) Factores ambientales

La calidad de un recurso herbario puede ser modificada por el clima, altura, fertilidad del suelo, uso de pesticidas y otras variables.

d) Condiciones de la cosecha

El ciclo de crecimiento afecta a la composición química, por esta razón, es importante establecer su momento adecuado de cosecha. También juegan un rol fundamental las condiciones en que se almacenan y su procesamiento en la calidad del material base para la preparación del extracto.

e) Contaminación de ingredientes herbarios

Las especies que servirán como base para el tamizaje fitoquímico deben ser de excelente calidad y estar libres de insectos, hongos, excretas de animales, bacterias, endotoxinas, micotoxinas, pesticidas y metales tóxicos tales como el manganeso, plomo, cadmio, mercurio y otros.

f) Buenas prácticas de manufactura

Debe existir una buena manufactura que asegure la calidad y que sea sujeta a un buen procedimiento de control de calidad que abarque no solo a los constituyentes, su proporción y la especificación del producto final, sino que también a su estabilidad y periodo de duración en los estantes de venta al público (23).

g) Estandarización de los extractos

Siempre es necesario conocer los constituyentes activos de la hierba medicinal que constituyen la base del fitomedicamento y el extracto debe estar estandarizado mediante la cuantificación de estos constituyentes. La calidad y seguridad se garantiza mediante la estandarización. En los casos en que no se conoce la naturaleza exacta de los componentes químicos responsables de la acción, se habla de principios activos y que pueden ser aquellos componentes que se hallan en proporción mayoritaria en la planta o parte de ésta y que también pueden ser útiles para la estandarización y lograr una manufactura con alta calidad farmacéutica.

h) Especificaciones del producto final

El ensayo de control debe ser tal que refleje la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición de los ingredientes activos y las especificaciones son dadas utilizando marcadores si se desconocen los constituyentes activos, de lo contrario, deben especificarse y determinarse cuantitativamente.

Si el producto final contiene más de una materia vegetal o preparaciones diversas y no es posible la determinación cuantitativa de cada ingrediente, se efectúa la evaluación de la mezcla total.

i) Ensayos de estabilidad

Teniendo en cuenta que el material vegetal o la preparación de la planta es considerada en su totalidad como el ingrediente activo, una determinación de la estabilidad de los constituyentes con actividad terapéutica conocida no es suficiente, debe demostrarse por ejemplo a través de perfiles cromatográficos que otros componentes presentes en la droga o sus preparaciones son estables y que su contenido permanece constante (12)(13).

1.2.1 CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS ELABORADOS A BASE DE PLANTAS MEDICINALES CIENTIFICAMENTE VALIDADAS

El control cotidiano de calidad, dentro de una empresa no solo implica el análisis del producto terminado, materia prima, material auxiliar y de empaque, sino también la vigilancia del cumplimiento de normas en todo proceso, desde la recepción de insumos incluyendo elaboración, envasado o empaque, almacenamiento hasta la distribución del producto; de manera que el producto a través de todo el proceso no pierda calidad o se deteriore.

Es el responsable de determinar si el producto es aceptado o rechazado, dependiendo de si cumple o no con todos los requerimientos, dando reproducibilidad de la seguridad y la eficacia.

La calidad es el conjunto de características del producto que potencialmente pueden satisfacer las necesidades o deseos del cliente, la posibilidad de que nuestro producto satisfaga al consumidor, esta directamente relacionada (2)(16).

1.2.1.1 Normas para garantizar una materia prima de calidad

Cultivo: óptima selección del área donde se va a cultivar las plantas.

Necesidad de establecer semilleros o si la especie puede ser sembrada plantada directamente en el campo.

Densidad, época de siembra o plantación, usar suelos sanos sin contaminantes de residuos, usar agua de riego libre de contaminantes (2)(24)(27).

Cosecha: Efectuar la cosecha en el momento que exista mayor contenido de principios activos, preferentemente en condiciones ambientales secas, eliminar la parte que se encuentre dañada o enferma, utilizar los implementos adecuados para evitar daño o maltrato (2).

Lavado: utilizar solución de hipoclorito de sodio a 10 ppm /o 2 gotas de cualquier hipoclorito por cada litro de agua, no maltratar la planta durante este proceso (2).

Secado: debe realizarse a la mayor brevedad posible una vez cosechada la planta.

El área debe mantenerse limpia y aireada, colocar la muestra en las bandejas en una sola capa, el material cosechado puede desecarse en forma natural en locales bien ventilados, controlar constantemente la temperatura cuando se utilizan secadores (2).

Trituración: no triturar otra muestra si el equipo no ha sido limpiado correctamente, graduar el equipo al grado de trituración deseado (2)(24)(27).

1.2.2 CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA Y PRODUCTO TERMINADO

IDENTIDAD

Organoléptico: Comprende la forma, tamaño, color, olor, sabor, marcas externas, etc.

PUREZA

Materia extraña: consiste en realizar al ojo y estereoscópicamente las características de la muestra en análisis ya sean contaminación animal, vegetal, mineral, etc.

Perdida por secado: Contenido de humedad que contienen la planta determinada por desecación de la muestra expresado en % (27).

CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

Los análisis microbiológicos se realizan con el objetivo de controlar la calidad sanitaria tanto de la materia prima como del producto terminado, a través de los siguientes parámetros:

- Conteo total de flora aeróbica mesófila
- Conteo total de hongos y levaduras
- *Escherichia coli*
- *Salmonella*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus* (2).

1.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

1.3.1 FUNDAMENTO

Se basa en pruebas preliminares sencillas y rápidas que permiten detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos. Se ayudan de la micro química para evidenciar estos grupos de constituyentes mediante formación de precipitados, coloraciones, etc.

Estas reacciones se caracterizan son selectivas para las clases o grupos de compuestos que se investigan, son simples y rápidas, detectan la mínima cantidad posible y utilizan un mínimo de equipo de laboratorio (11)(12).

1.3.2 METODOLOGÍA EN EL ANÁLISIS FITOQUÍMICO

En términos generales un análisis fitoquímico debe comprender cuatro etapas bien definidas:

- Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio
- Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos
- Determinación estructural, y
- Ensayos farmacológicos (20).

1.4 VIOLETILLA, *Hybanthus parviflorus*



FOTOGRAFÍA No. 1. VIOLETILLA, *Hybanthus parviflorus*

1.4.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Es un subarbusto que crece entre 0 y 3 500 m.s.n.m, es una planta anual, de porte erecto, de no más de 50 cm. de altura, muy difundida en América tropical y subtropical, desde Colombia hasta la provincia de río negro en Argentina (4).

Orden: Tubifloras

Familia: Labiadas

Género: *Hybanthus*

Especie: *parviflorus*

Nombre científico: *Hybanthus parviflorus*

Sinonimia: Cuy chunzhulli, Violetilla

Sistema de reproducción: Básicamente por semillas.

Ciclo de vida: Anual (4).

ANATOMÍA

Raíz: Es de color blanco, fibrosa, muy largas, conformando un sistema radicular con una raíz primaria y varias secundarias, de consistencia dura (4).

Tallo: Herbáceo, de color verde amarillento, bastante delgado, anguloso, posee gran cantidad de vellosidades, alcanza un tamaño comprendido entre los 20 cm y 30 cm, en el que se dispone las hojas y flores (4).

Hojas: De color verde oscuro, tienen un pecíolo grande que se inserta en el tallo. Por la disposición en el tallo son alternas opuestas; de forma ovalada, las nervaduras bien pronunciadas en el haz, pinnatinervias de borde ondeado, en cada ángulo formado por la hoja con el tallo se forman de dos a tres flores (4).

Flores: De color blanco, con un halo lila en la corola, labiadas, formadas de un labio y tres pétalos (uno opuesto y dos laterales), poseen un ovario ínfero, de cada axila de la hoja se desarrollan de dos a tres flores formando un conjunto de flores verticiladas (4).

Fruto: Es tetraquenio.

Semilla: En cada flor se desarrollan cuatro semillas de color negro muy pequeñas, las cuales después de haber llegado a su madurez fisiológica se desprenden fácilmente. Son de lustre brillante (4).

1.4.2 USOS EN LA MEDICINA POPULAR

La violetilla crece silvestremente en la comunidad de San Francisco perteneciente a la parroquia de Calpi del cantón Riobamba y es conocido por nuestros campesinos como cuy chunzhulli (intestino de cuy). Esta planta no ha sido registrado en el herbario de la ESPOCH pero existe registrado en el herbario nacional como *Hybanthus parviflorus* típica de la zona de la provincia de Imbabura (8).

En nuestro país, se emplea en medicina popular por sus propiedades eméticas, purgativas, para enfermedades como paludismo, artritis, fiebre según lo indica el Yachag del HAACH Vicente Paca.

1.4.3 ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE LA VIOLETILLA

En la investigación de Brousalis A. titulada “Estudio farmacognóstico de una planta medicinal Argentina *Hybanthus parviflorus*” establece la composición química previa su extracción, separación e identificación, obteniendo los siguientes compuestos:

1.4.3.1 Quercetina

Es un flavonoide que presenta propiedades como: analgésico, antiagregante plaquetario, vasodilatador, antiartrítico, antibacterial, antiinflamatorio, antigripal, antiespasmódico, hepatoprotector, antidiabético, antiasmático, antioxidante y anticanceroso (4)(21).

1.4.3.2 Luteolina

Es un flavonoide con propiedades específicas: inhibe la inflamación producida por el Factor de Activación Plaquetaria (PAF) bajo la influencia de los alérgenos, inhibe la Tiroxinkinasa y posee una potente actividad antiproliferativa sobre 27 células cancerosas, bloquea la toxicidad de la quimioterapia especialmente de la Adriamicina sobre el corazón y sobre la médula espinal, inhibe la enzima aromatasa y previene la formación excesiva de estrógenos (4)(21).

Es el pigmento amarillo principal en las flores y ha sido utilizado históricamente como tinte, su estructura química es la siguiente.

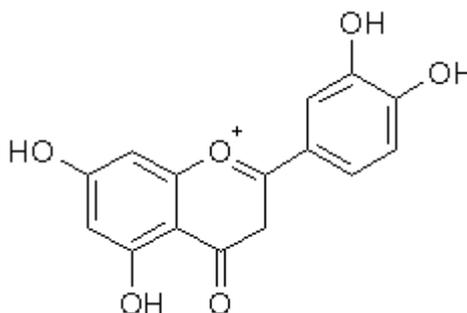


FIGURA No 1. ESTRUCTURA DE LA LUTEOLINA

1.4.3.3 Apigenina

Es un flavonoide que se encuentra en el perejil, la alcachofa, el basílico y el apio. En un estudio que compara la incidencia del consumo de 21 flavonoides sobre el crecimiento de células cancerosas del pecho, obtuvo la mayor acción antiproliferativa. Este principio activo se ata sobre los receptores de estrógenos de las membranas y previene la proliferación celular bajo influencia estrogénica. Sin embargo, otro estudio mostró una fuerte capacidad inhibidora sobre las células cancerosas de la tiroides que carecen de receptores estrogénicos. Los investigadores dedujeron por lo tanto que se activaban varios mecanismos inhibidores. Por otra parte, inhibe asimismo la proliferación cancerosa de las células prostáticas bloqueando la actividad de la enzima tirosinkinasa (4)(21).

1.4.3.4 Acido ursólico

Es un compuesto triterpénico penta cíclico que está presente en numerosas especies vegetales.

Se ha comprobado que combinado con el ácido oleanólico inhiben el crecimiento del tumor inducido por TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) sobre piel de ratón. Por este motivo, ambos compuestos se recomiendan en Japón para la prevención y para el tratamiento del cáncer de piel. Inhibe las vías de la ciclooxigenasas, la 5-lipoxigenasa y la elastasa de los leucocitos humanos. Por este motivo, el ácido ursólico se incluye en la formulación de cosméticos, calmantes, etc (1)(4)(15)(25)(28)(29).

1.4.3.5 Beta sitosterol

Es uno de los muchos esteroides de origen vegetal que se encuentra en casi todas las plantas. Se encuentra en niveles altos en el salvado de arroz, el germen de trigo, el aceite de maíz, soya, el cacahuete y sus derivados, son buenas fuentes de esteroides de origen vegetal (3)(4).

1.4.4 INVESTIGACION DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Desde el descubrimiento de la penicilina en 1946 los antibióticos naturales y semisintéticos han tenido un extenso aprovechamiento en la terapéutica humana, pero actualmente es indispensable la búsqueda de nuevos agentes antiinfecciosos debido a que algunos de los principales antibióticos muestran considerable desventaja en términos de espectro antimicrobiano limitado o efectos secundarios indeseables, por otro lado el uso general de antibióticos ligado a la versatilidad genética de los microorganismos a conducido a incrementar la resistencia clínica de microorganismos previamente sensibles y la aparición de infecciones raras (17).

Sería entonces oportuno el descubrimiento de nuevas moléculas que exhiban actividad prominente contra microorganismos infecciosos que no muestren resistencia cruzada con los antibióticos ya existentes. Los mismos argumentos respaldan el desarrollo de nuevas drogas antivirales, especialmente debido a que los arsenales antivirales son muy pequeños y se limitan al tratamiento de uno o pocos virus específicos (17).

También se debe tomar en cuenta que algunos compuestos activos contra virus podrían resultar perjudiciales a las células que los alojan y que son indispensables para su multiplicación y sobrevivencia (9)(17)(31).

1.4.4.1 Actividad antimicrobiana

La selección de los microorganismos a utilizarse en el ensayo depende en gran parte del propósito de la investigación. Si esta es de carácter general los organismos seleccionados deberán ser tan diferentes como sea posible y de preferencia representantes de un grupo importante de bacterias patógenas según su composición física y química y patrón de resistencia. Se pueden incluir gérmenes representativos de levaduras puesto que se aplican los mismos métodos de ensayo para el screening de estos microorganismos (9).

El ensayo de elección cuando se trata de probar la actividad antimicrobiana en extractos de plantas es la Técnica de Mitscher. Para este ensayo se utilizan las siguientes cepas:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 13709
2. *Escherichia coli* ATCC 9637
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
5. *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607
6. *Candida albicans* ATCC 10231
7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (26).

1.4.4.2 Medios de cultivo

Para la prueba de actividad antimicrobiana la mayoría de bacterias y levaduras, se cultivan en agar Muller Hinton (17).

1.4.4.3 Ensayos antimicrobianos

Para detectar la actividad antimicrobiana en extractos de plantas se deben reunir 3 condiciones:

- 1) El extracto vegetal debe ser puesto en contacto con la pared celular de los microorganismos seleccionados para la prueba.
- 2) Se deben ajustar las condiciones de cultivo para que los microorganismos sean capaces de crecer cuando no estén presentes agentes antimicrobianos.
- 3) Debe haber algunas maneras para juzgar la cantidad de crecimiento de cualquier microorganismo durante el periodo del tiempo escogido para la prueba. Los métodos disponibles corrientemente: dilución, difusión y bioautobiográfico cumplen estas tres condiciones (5)(9).

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación etnobotánica se llevó a cabo en la comunidad de San Francisco de Cunuguachay perteneciente a la parroquia de Calpi del cantón Riobamba. Los análisis de laboratorio se llevaron a cabo en el laboratorio de productos naturales, de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Hybanthus parviflorus recolectada de la comunidad San Francisco ubicada a una altura de 3200 m.s.n.m. perteneciente a la parroquia Calpi del cantón Riobamba.

La actividad antimicrobiana de los diferentes extractos fue estudiada en cepas provenientes del INIAP (Estación experimental Santa Catalina).

Staphylococcus aureus ATCC 13709

Escherichia coli ATCC 9637

Salmonella gallinarum ATCC 9184

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

Candida albicans ATCC 10231

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

2.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO Y OTROS

- Cajas petri descartables
- Placas porta objetos
- Placas cubre objetos
- Aplicadores estériles
- Mechero
- Asas de platino
- Erlenmeyer
- Tubos de ensayo 100 x 15 mm
- Gradilla
- Corchos para tubos de ensayo
- Papel aluminio
- Cinta indicadora de esterilización
- Probeta
- Mascarillas
- Guantes
- Pipeta microbiológica (Brinkmann Transferpette™ -8/20-200µL-12)
- Puntas amarillas estériles
- Puntas azules estériles

2.2.3 EQUIPOS

- Autoclave (Tuttnauer 2340MK)
- Balanza (Ohaus Triple Beam Balance serie 400)
- Baño María (Fanem 100)
- Estufa bacteriológica (Mettler INB 400)
- Estufa de secado (Mettler INB 500)
- Microscopio (Labovet)
- Refrigeradora (Indurama)
- Reverbero eléctrico (Haceb)

2.2.4 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

- Caldo Soya Tríplica (MERCK)
- Agar Mueller Hinton (DIFCO)
- Tego
- Sodio cloruro al 0.85%
- Agua destilada
- Dimetil sulfóxido
- Éter
- Etanol al 95%
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Sudan
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Bomtrager
- Reactivo de Liberman
- Reactivo de Balged
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo de Fehling
- Cloruro férrico
- Safranina

2.3 MÉTODOLÓGÍA

2.3.1 INVESTIGACIÓN ETNOBOTÁNICA

Se realizó mediante la recuperación de información a los habitantes mayores de 40 años de la comunidad de San Francisco de Cunuguachay mediante la aplicación de una encuesta escrita (ver anexo No. 1).

2.3.2 RECOLECCIÓN

La violetilla fue recolectada la comunidad San Francisco ubicado a una altura de 3 200 m.s.n.m., perteneciente a la parroquia Calpi del cantón Riobamba.

2.3.3 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACION BOTÁNICA

Se tomaron diez plantas completas de la especie en estudio y se llevaron al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quién certificó el ejemplar.

2.3.4 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

- 1) Se limpian todas las partes de la planta y se eliminan los cuerpos extraños.
- 2) Se lavan con cepillo y abundante agua.
- 3) Se sumergen en un tanque de agua con hipoclorito de sodio a 10ppm, durante 10 minutos.
- 4) Se dejan escurrir expuestas al sol por aproximadamente una hora.
- 5) Se cortan en pedazos pequeños de 1 - 3 cm.
- 6) Se somete a un proceso de secado en una estufa con circulación de aire a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 2 días.
- 7) Se tritura las plantas secas hasta obtener una granulometría de 2 mm.
- 8) Se almacena las drogas secas en polvo en fundas de papel estériles, que se introducen luego en recipientes herméticos para protegerlos de la luz y la humedad (24).

2.3.5 ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

2.3.5.1 Identificación macro morfológica

- 1) Se determinó las dimensiones de la planta de la especie en estudio.
- 2) Se comparó los datos obtenidos con los datos reportados para la Violetilla.

2.3.5.2 Identificación micro morfológica

Se realizo finos cortes transversales de las raíces y se procedió a colorearlos con safranina (16).

2.3.6 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

La planta fresca o seca o el residuo de una extracción; fué sometida a tres extracciones sucesivas. Cada extracto etéreo, alcohólico y acuoso se le mide el volumen obtenido y se calcula su concentración, esto es, gramos de sustancia extraída por mL de extracto. Para ello se toma una alícuota de 5 mL y se pasa a una capsula previamente tarada, se evapora a sequedad en baño de agua y se pesa nuevamente (24).



FOTOGRAFÍA No. 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

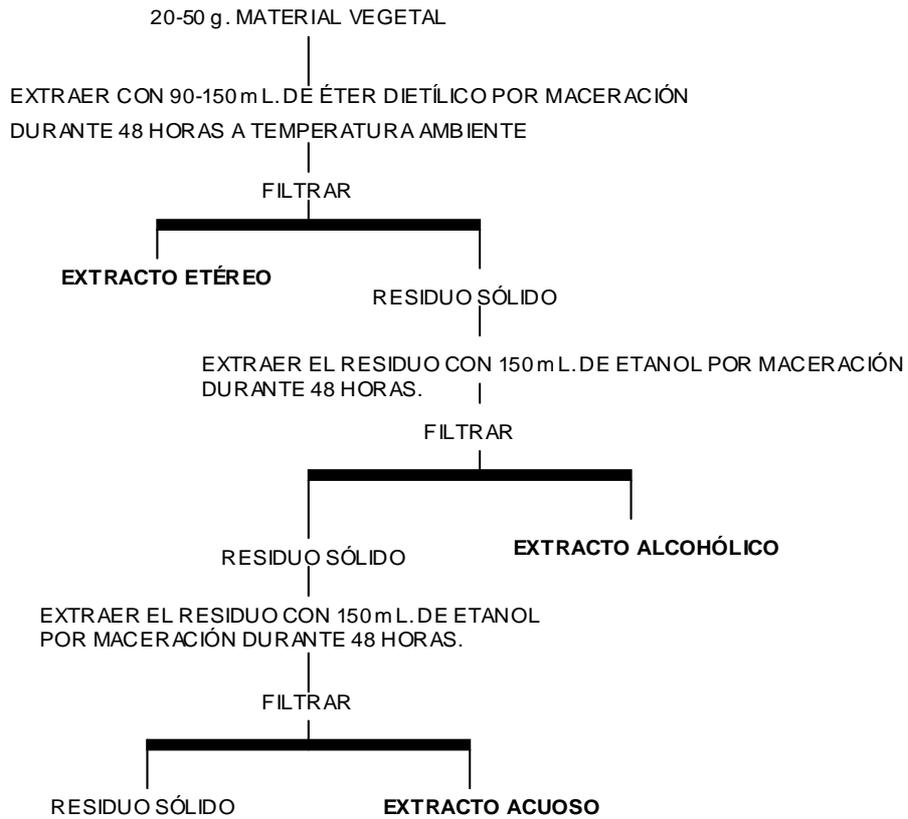


FIGURA NO. 2. ESQUEMA DE LA OBTENCIÓN DE EXTRACTO ETÉREO, HIDROALCOHÓLICO Y ACUOSO

2.3.7 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS CUALITATIVOS

2.3.7.1 Reacciones de caracterización

Se procedió de acuerdo al siguiente esquema:

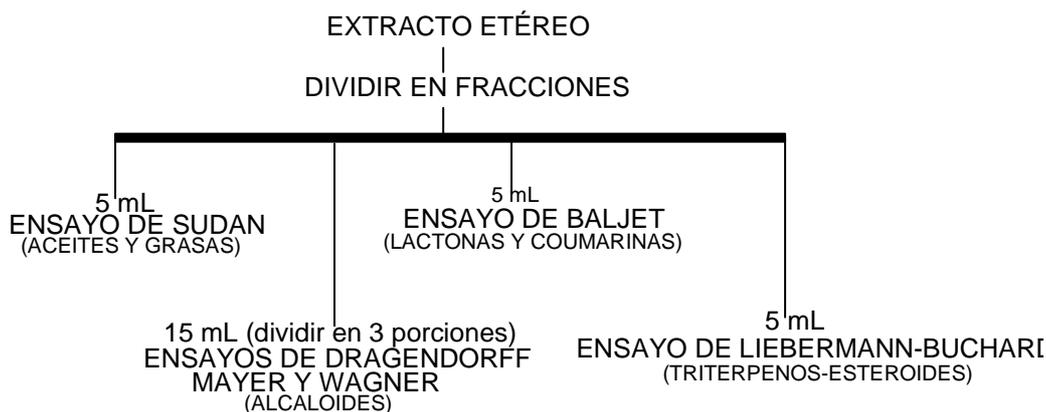


FIGURA NO. 3. ESQUEMA DEL ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO ETÉREO

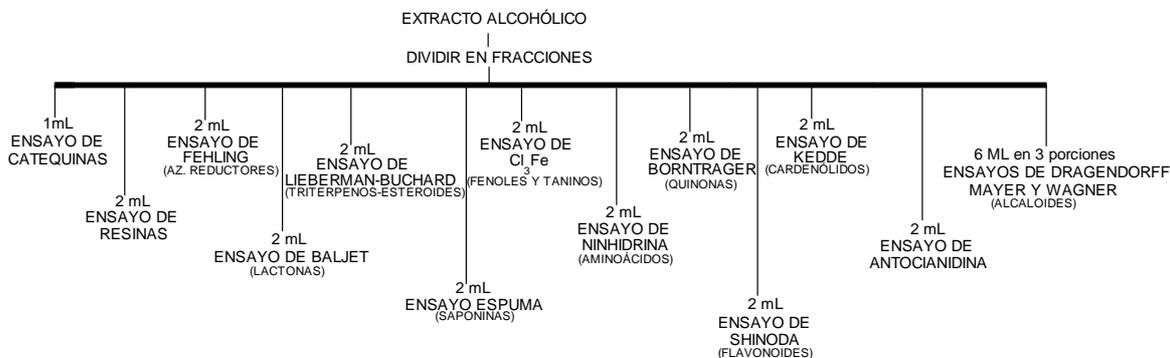


FIGURA NO. 4. ESQUEMA DEL ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

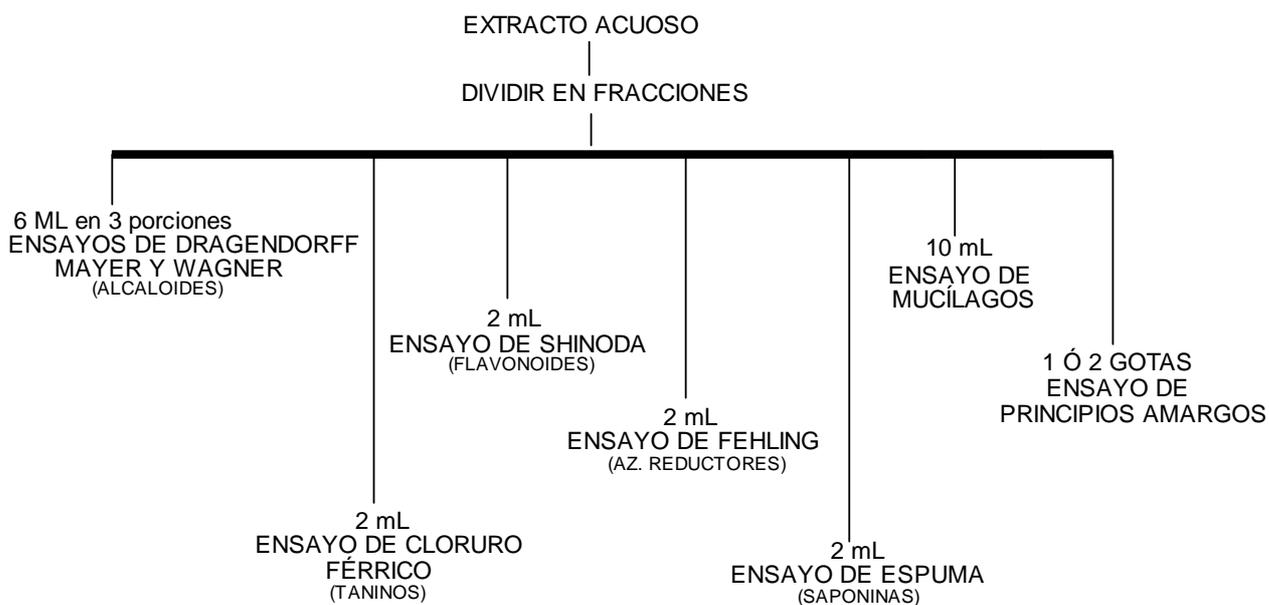


FIGURA No. 5. ESQUEMA DEL ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO CUALITATIVO EN EL EXTRACTO ACUOSO

1) Ensayo de Dragendorff

Utilizado para detectar la presencia de alcaloides. Se debe tomar en cuenta que si el extracto está disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redissolver en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 %. Si se trata de un extracto acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado (20)(24).

Para el ensayo, a la solución acuosa ácida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa:

- Opalescencia (+)
- Turbidez definida (++)
- Precipitado (+++)

2) Ensayo de Mayer

A la solución ácida se le adiciona una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agita y se filtra. Al filtrado adicionar 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer. Tras observación se reporta de la siguiente manera:

- Opalescencia (+)
- Turbidez definida (++)
- Precipitado abundante (+++)

En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias (20)(24).

3) Ensayo de Wagner

Se parte de la solución ácida, de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución, se le adiciona 2 ó 3 gotas del reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior (20)(24).

4) Ensayo de Baljet

Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo.

Si la alícuota de la muestra a probar no está en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en 1 mL de alcohol. Seguidamente, se añade 1mL del reactivo. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo (++) y (+++) respectivamente (20)(24).

5) Ensayo de Borntrager

Es útil para detectar la presencia de quinonas.

Si la alícuota no está en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 %. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) o rojo, para lo cual se reporta (+++) (20)(24).

6) Ensayo de Lieberman-Buchard

Permite reconocer la presencia de triterpenos y/o esteroides, en ambos tipos debe poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Para ello, si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración (20)(24).

- Rosado-azul muy rápido
- Verde intenso-visible aunque rápido
- Verde oscuro-negro-final de la reacción

El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues ésta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

Esta reacción es también utilizada para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes (20)(24).

7) Ensayo de resinas

Para detectar este tipo de compuesto, se adiciono a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado indica un ensayo positivo (20)(24).

8) Ensayo de Fehling

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: Se pesa 35g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Solución B: Se pesa 150 g de tartrato de sodio y potasio y 40 g de hidróxido de sodio y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000 mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar (20)(24).

9) Ensayo de espuma

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos (20)(24).

10) Ensayo del cloruro férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos (20)(24).

11) Ensayo de Shinoda

Permite reconocer la presencia de flavonoides. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos (20)(24).

12) Ensayo de Kedde

Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 h. El reactivo de Kedde se prepara de la siguiente forma:

- Solución 1: Ácido 3.5 dinitrobenzónico al 2 % en metanol.
- Solución 2: Hidróxido de potasio al 5.7 % en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar (20)(24).

13) Ensayo de mucílagos

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5°C, si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo (20)(24).

14) Ensayo de principios amargos y astringentes

El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios bien diferenciados al paladar (16).

2.3.8 CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA CRUDA

2.3.8.1 Determinación de cenizas totales, solubles en agua e insolubles en ácido

A. CENIZAS TOTALES

Se determina la masa de 2 g de la muestra de ensayo con una variación permisible de 0.5 mg en un crisol de porcelana previamente tarado. Calentar suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y luego incinerar en un horno mufla a temperaturas de 700 a 750°C durante 2 h.

Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que las dos pesadas sucesivas no difieran en más de 0.5 mg por g (masa constante).

Para obtener masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 min. Si el residuo presenta trazas de carbón, se le añaden unas gotas de solución de H₂O₂ concentrado, ácido nítrico o solución de nitrato de amonio al 10% m/v y se calienta hasta evaporar los solventes. Al enfriar el crisol el residuo es de color blanco (24).

Expresión de los resultados:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

C = porcentaje de cenizas totales en base hidratada

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g).

100= factor matemático para los cálculos

B. CENIZAS SOLUBLES EN AGUA

A las cenizas totales obtenidas en A, se le añaden de 15 a 20 mL de agua. El crisol se tapa y se hierve suavemente a la llama del mechero durante 5 min. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700-750°C, durante 2 h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante (24).

Expresión de los resultados:

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g).

M₁ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g).

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

C. CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO

A las cenizas totales obtenidas según la técnica se le añaden de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapa con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10 min. Se lava el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente y se une al contenido del crisol. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido

nítrico al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L no muestren presencia de cloruros.

El filtrado con el residuo se deseca de 100 a 105°C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750°C durante 2h. Posteriormente se coloca en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener peso constante (24).

Expresión de los resultados:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada

M = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂= masa del crisol con la ceniza (g)

100= factor matemático

2.3.8.2 Determinación del contenido de humedad

De la muestra pulverizada se pesan 2 g con desviación permisible de 0.5 mg y se transfieren a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105°C hasta masa constante; seguidamente se deseca a 105°C durante 3 h. La cápsula se coloca en la desecadora donde se deja enfriar a temperatura ambiente y se pesa, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 h, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante (24).

Expresión de los resultados:

$$Hg = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Hg = pérdida en peso por desecación (%)

M_2 = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M_1 = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía

100= factor matemático

2.3.9 ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE MITSCHER EN EL EXTRACTO FLUIDO DE VIOLETILLA

2.3.9.1 Preparación de muestras para el ensayo

Se pesa con precisión 400 mg de extracto crudo y (se anota la cantidad exacta en el libro de trabajo) y se disuelve en 4 mL de DMSO. Puede utilizarse ultrasonido para lograr una mejor disolución. La concentración final de este extracto es de 100 000 $\mu\text{g/mL}$. Igual procedimiento se realiza con el sulfato de estreptomicina.

Se realizó una dilución a la mitad, utilizando tubos de ensayo 100 x 13 mm limpios, secos y estériles, a los que se ha añadido 2 mL de DMSO y 2 mL de extracto de la concentración 100 000 $\mu\text{g/mL}$. La concentración final de esta dilución fue 50 000 $\mu\text{g/mL}$.

Se realiza el mismo procedimiento con diluciones a la mitad hasta llegar a 97.65 $\mu\text{g/mL}$. Para el caso de las diluciones del sulfato de estreptomicina se realiza con agua destilada.

Se codificó 70 cajas petri estériles con el nombre del extracto y la concentración final (22 para las 11 concentraciones, 2 para el blanco, 2 para el DMSO y 22 para el sulfato de estreptomicina por cada extracto).

Se pipeteó separadamente 1 mL de las diluciones del extracto a las cajas petri codificadas y se añadió 9 mL de TSA a 45°C. Se mezclaron con el fin de distribuir todo el extracto por toda la placa.

Las cajas petri una vez solidificado el medio de cultivo que contienen los extractos se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente por 18 a 24 horas (26).

Al final se obtiene: (ver cuadro No. 1)

CUADRO No. 1. NUMERO DE CAJAS PETRI PARA EL ENSAYO MICROBIOLÓGICO

Concentración (ppm)	No Cajas Petri				
	Blanco	DMSO	Sulfato de estreptomicina	Extracto etéreo	Extracto hidroalcohólico
10000,0	-	-	2	2	2
5000,0	-	-	2	2	2
2500,0	-	-	2	2	2
1250,0	-	-	2	2	2
625,0	-	-	2	2	2
312,5	-	-	2	2	2
156,3	-	-	2	2	2
78,1	-	-	2	2	2
39,1	-	-	2	2	2
19,5	-	-	2	2	2
9,8	-	-	2	2	2
0	2	2	-	-	-
TOTAL	2	2	22	22	22

2.3.9.2 Preparación de los medios

"TRYPTICASE SOY AGAR" (TSA)

Se disuelven 38 g de TSA en un litro de agua destilada. Esta cantidad es suficiente, aproximadamente para 100 cajas.

Se calienta la solución hasta que se logre disolución clara. Luego se transfiere 10 mL del agar a tubos de ensayo de 150 x 15 con tapa, y posteriormente se esterilizan en autoclave por 15 min a 121°C. Los tubos de ensayo se sacaron del autoclave y se mantuvieron en baño maría a 45°C hasta el momento de usar (26).

"TRYPTIC SOY BROTH" (TSB)

Se disuelven 30 g de TSB en un litro de agua destilada. Se calienta hasta obtener una disolución clara. Se transfieren 25 mL de TSB a los erlenmeyers individuales de 125 mL de capacidad. Estos se esterilizan en autoclave a 121°C por 15 minutos. Los erlenmeyers con TSB pueden mantenerse refrigerados hasta el momento de usar (26).

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN SALINA

Se prepara 100 mL de solución salina al 0.85 % y se repartieron 10 mL en tubos de ensayo tapa rosca 150 x 15. Se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos. Los tubos de ensayo con solución salina se pueden mantener en refrigeración hasta el momento de usar (26).

2.3.9.3 Reactivación de los microorganismos

Se llevó a temperatura ambiente 6 erlenmeyer que contenían 25 mL de TSB estéril y se codificaron con el nombre de los microorganismos ATCC y la fecha.

Utilizando un asa estéril se tomó una asada de los microorganismos ATCC de los tubos inclinados que los contienen y se transfirieron independientemente a los erlenmeyers codificados.

Los microorganismos que se transfirieron fueron los siguientes:

Staphylococcus aureus ATCC 13709

Escherichia coli ATCC 9637

Salmonella gallinarum ATCC 9184

Klebsiella pneumoniae ATCC 10031

Candida albicans ATCC 10231

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Estas suspensiones se colocaron en la estufa a 37°C por 24 h (26).

2.3.9.4 Preparación de las suspensiones microbianas

Todos los erlenmeyer que contienen los microorganismos para el ensayo deben estar visiblemente turbios. Con el fin de conseguir aproximadamente la misma velocidad de crecimiento de cada uno de los microorganismos, algunas de estas suspensiones deben ser diluidas con un volumen de 10 mL de disolución salina estéril, como se detalla a continuación.

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 100 μ L susp/10 mL solución salina.
2. *Escherichia coli* ATCC 9637 100 μ L susp/10 mL solución salina.
3. *Salmonella gallinarum* ATCC 9184 100 μ L susp/10 mL solución salina.
4. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 100 μ L susp/10 mL solución salina.
5. *Candida albicans* ATCC 10231 1 mL susp/10 mL solución salina.
7. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 100 μ L susp/10 mL solución salina.

2.3.9.5 Rayado de los microorganismos

Las cajas petri que se han preparado, no deben tener contaminación visible, si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado en otra ocasión.

Todas las cajas petri se dividieron con marcador en 6 partes iguales y se marcaron del 1 al 6.

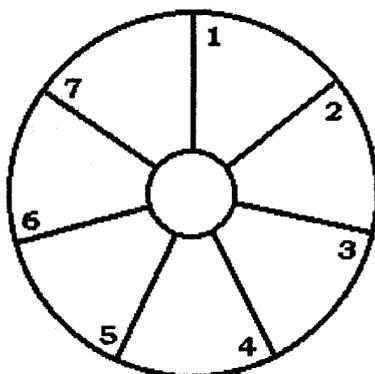


FIGURA No. 6. PLANTILLA UTILIZADA EN EL TEST DE MITSCHER PARA EL ESTRIADO DE MICROORGANISMOS

Con un asa de Henle estéril entre una aplicación y otra se toma una asada de cada microorganismo en su turno. El asa con el microorganismo es entonces rayado en un patrón radial de cada caja petri.

Las suspensiones de los microorganismos deben ser agitadas de tiempo en tiempo, para evitar la sedimentación.

El rayado es más seguro si se lleva a cabo desde la región cercana al límite de la caja hacia el punto cerca de la zona clara del centro de la caja. El rayado no debe llegar exactamente al centro de la caja pues hay peligro de contaminación cruzada por pasar sobre una línea de microorganismo previamente rayada.

Cuando todas las cajas se hayan rayado con todos los microorganismos se incuban a 37°C por 48 h.

Se prepara y marca una caja petri con TSA puro y estéril, luego, se realiza el ensayo con el resto de las cajas. Esta caja se prepara con el fin de determinar si el rayado de los microorganismos ha sido realizado correctamente; este es el control negativo.

Cada ensayo debe contener un control positivo (series de sulfato de estreptomicina).

Las cajas de control deben tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en la caja de control negativo y la potencia apropiada en las cajas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así el experimento ha fallado y debe ser repetido (26).

2.3.9.6 Lectura de resultados

Las cajas se sacan de la incubadora y se examinaron al día 4. Si todos los cultivos crecieron el examen es válido. Si alguno no creció se debe incubar y leer el día 5.

Hay actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo.

A = Activo.

P = Parcialmente activo.

I = Inactivo.

Si el microorganismo es morfológicamente alterado, por ejemplo, si *Ps. aeruginosa* no muestra su pigmento verde característico, o si no crece bien, la caja puede ser registrada como P. (actividad parcial). Las cajas petri de control deben tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en las cajas de control negativo y la potencia apropiada en las cajas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así, el experimento ha fallado y debe ser repetido.

La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja, lejos de las líneas rayadas es señal de contaminación y se pueden generalmente ignorar (26).

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

3.1.1 USOS ETNOBOTÁNICOS

Se realizó una investigación sobre los usos de esta planta a algunos yachac de la provincia de Chimborazo especialmente a don Vicente Paca y Valeria Anaguarqui del HAACH que dan fe del poder curativo de esta planta.

CUADRO No. 2. RESULTADOS DE LA ENCUESTA REALIZADA EN LA COMUNIDAD DE SAN FRANCISCO DE CUNUGUACHAY. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO-NOVIEMBRE DEL 2008.

PREGUNTA	RESPUESTA	
	SI	NO
1. Conoce usted el Cuy chunlluly	15	5
2. Con que otro nombre se conoce	Pamba jihua	
3. Ha utilizado esta planta:	Con frecuencia	5
	Poco	3
	Una sola vez	7
4. Para que la utiliza	Fiebre	
	Dolor de huesos	
	Vómitos	
	Malaire	
5. Como la utiliza (modo de preparación)	Infusión	
6. Cuantas veces toma	Dos veces al día	
7. Usted ha comprobado que es eficaz para los tratamientos para los cuales la utiliza	Si	
8. Como la recolecta	Manualmente	
9. Junto a que otras plantas crece o esta sola	Junto con malezas	
10. Lugares donde generalmente crece esta planta	SF	
11. Usted cultiva la planta o solo la recolecta	Recolección	

En la encuesta realizada en la comunidad de San Francisco de Cunuguachay a 20 personas de edad avanzada 15 de ellos manifestaron que conocían a la Violetilla como planta medicinal, mencionaban que la conocían también como Pamba jihua, la utilizaban para la fiebre, dolor de los huesos, vómitos y malaire. Ellos la utilizan en infusión y su tratamiento es de dos veces al día obteniendo buenos resultados. La planta solo la recolectan de los alrededores de la comunidad y se la encuentra generalmente junto con otras plantas o maleza. Además mencionan que al pasar el tiempo esta ha ido desapareciendo poco a poco y solamente existe en las tierras abandonadas y no cultivadas (ver cuadro No.2).

3.1.2 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA

La comprobación taxonómica fue realizada por un especialista del herbario de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo el Ing. Jorge Caranqui mismo que comprobó que la planta en estudio pertenece al género *Hybanthus* especie *parviflorus*, nombre científico *Hybanthus parviflorus* y conocida también como Violetilla o Cuy chunzhulli.

3.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y MACROMORFOLÓGICA

Hybanthus parviflorus, subarbusto que crece entre 0 y 3500 m.s.n.m, es una planta anual, de porte erecto, de no más de 50 cm de altura.

Olor: fétido en toda la planta

Raíz: color blanco, fibrosa, muy largas, conformando un sistema radicular con una raíz primaria y varias secundarias. De consistencia dura.

Tallo: herbáceo, de color verde amarillento, bastante delgado, es anguloso, posee gran cantidad de vellosidades: alcanza un tamaño comprendido entre los 20 cm y 30 cm, en el que se dispone las hojas y flores.

Hojas: color verde oscuro, tienen un pecíolo grande que se inserta en el tallo. Por la disposición en el tallo son alternas opuestas; de forma ovalada, las nervaduras bien pronunciadas en el haz. Pertenecen al grupo de hojas pinnatinervias, de borde ondeado. En cada ángulo formado por la hoja con el tallo se forman de dos a tres flores (ver fotografía No.3).

Flores: color blanco, con un halo lila en la corola, pertenecen a las flores labiadas, formadas de un labio y tres pétalos (uno opuesto y dos laterales). Poseen un ovario ínfero, de cada axila de la hoja se desarrollan de dos a tres flores formando un conjunto de flores verticiladas.

Fruto: es tetraquenio.

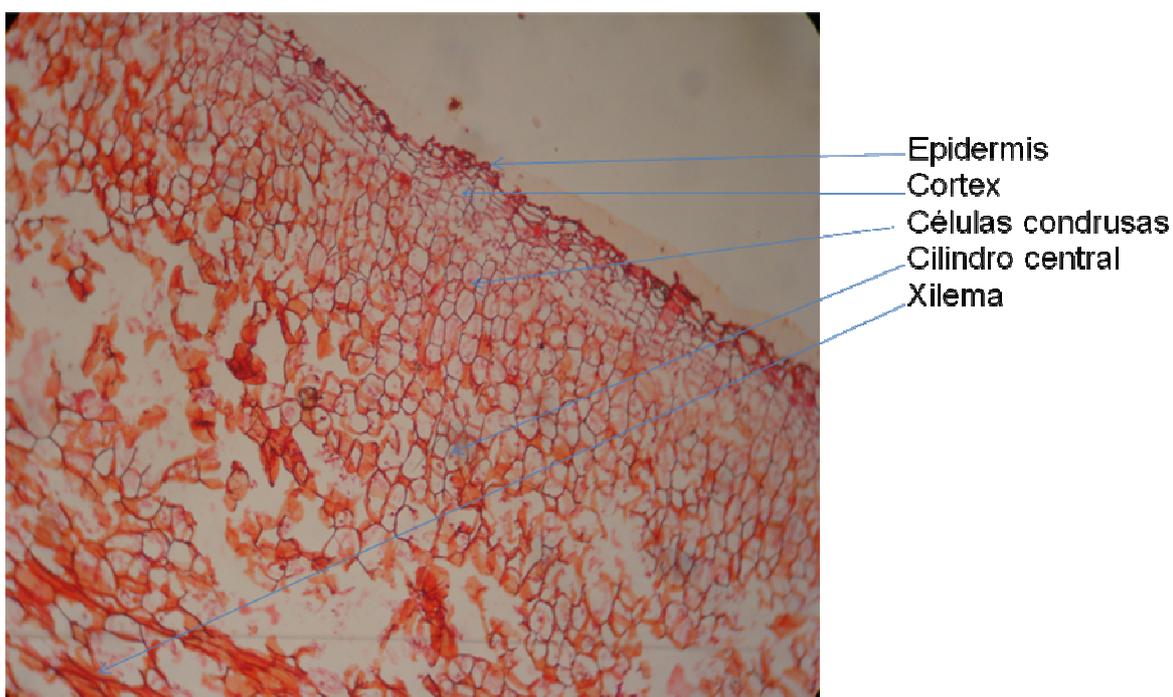
Semilla: En cada flor se desarrollan cuatro semillas de color negro muy pequeñas, las cuales después de haber llegado a su madurez fisiológica se desprenden fácilmente. Son de lustre brillante.



FOTOGRAFÍA No. 3. VIOLETILLA, *Hybanthus parviflorus* RECOLECTADA DE LACOMUNIDAD DE SAN FRANCISCO.

3.1.3 DESCRIPCIÓN MICROMORFOLÓGICA

Esta descripción sirve para observar las diferentes características micro morfológicas propias de la especie de *Hybanthus parviflorus* en estudio mediante la utilización de finos cortes de la raíz, tinción con safranina y observación en el microscopio con lente de aumento de 10X (ver fotografía No.4).



FOTOGRAFÍA No. 4. CORTE TRANSVERSAL DE LA RAIZ DE *Hybanthus parviflorus*

El corte transversal de la raíz muestra: una epidermis con capa piliférica, una capa de células poligonales con paredes suberificadas, una amplia zona cortical parenquimatosa con gránulos de almidón y una endodermis que contiene glóbulos de aceite esencial, una amplia medula que contiene grupos de células esclerinquematosas y xilema.

3.2 ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS CUALITATIVOS

3.2.1 REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN

Los resultados obtenidos en el extracto de la especie en estudio se aprecian en el siguiente cuadro. Las reacciones de coloración o aparición de precipitados, aplicadas

según las técnicas de tamizaje fitoquímico, son específicas para el grupo químico que se esta investigando.

CUADRO No 3. GRUPOS FITOQUÍMICOS ENCONTRADOS EN LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE *Hybanthus parviflorus*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO-NOVIEMBRE DEL 2008.

DETERMINACIÓN Grupo fitoquímico	TIPO DE EXTRACTO		
	Extracto etéreo	Extracto hidroalcohólico	Extracto acuoso
DRAGENDORFF			
Alcaloides	(+++)	(+++)	(+++)
SUDAN III			
Lípidos y aceites esenciales	(-)		
BALJET			
Lactonas y Coumarinas	(+++)	(+++)	
LIEBERMAN			
BUCHARD			
Triterpenos y esteroides	(+++)	(+++)	
BORNRAGER			
Quinonas		(-)	
CLORURO FÉRRICO			
Fenoles y Taninos		(++)	(++)
SHINODA			
Flavonoides		(-)	
FEHLING			
Azúcares reductores		(+++)	(+++)
ESPUMA			
Saponinas		(++)	(++)
Mucilagos			(-)

Interpretación: (-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

El cuadro No. 3, muestra la composición química de los diferentes extractos de Violetilla, se evidencia alcaloides en alta concentración los cuales están presentes en los tres extractos etéreo, hidroalcohólico y acuoso. No hay evidencia de la presencia de Lípidos y aceites esenciales. Lactonas, coumarinas, triterpenos y esteroides también en alta concentración en el extracto etéreo e hidroalcohólico. No hay presencia de quinonas. En el extracto hidroalcohólico y acuoso se halla evidencia de fenoles y taninos. Nuestro estudio no reportó evidencia de Flavonoides; sin embargo, la investigación de Brousalis A. sobre *Hybanthus parviflorus* en Argentina menciona la presencia de Flavonoides en el extracto hidroalcohólico. Esto se puede deber a que las condiciones de hábitat de esta planta son muy diferentes a las de nuestra localidad y también que nuestra planta posea cantidades de Flavonoides a niveles de trazas que por nuestro método no las podemos

determinar. Azúcares reductores en alta evidencia y evidencia de saponinas en los extractos hidroalcohólico y acuoso. No se determinó la presencia de mucílagos (ver cuadro No.3).

3.3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS CUANTITATIVOS

3.3.1 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN ÁCIDO

La determinación de cenizas es un indicativo de la calidad de la droga si el valor es mayor a 12% la droga deberá ser rechazada ya que es probable, que tenga demasiada contaminación con tierra, sílice o en su defecto metales pesados, por esta razón se aplicó los tres métodos cenizas totales, solubles en agua y ácido insolubles.

CUADRO No 4 DETERMINACIÓN DE CENIZAS DE *Hybanthus parviflorus*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO- NOVIEMBRE DEL 2008.

PARAMETRO	UNIDAD	PORCENTAJE
CENIZAS TOTALES	%	3,57
CENIZAS SOLUBLES EN AGUA	%	0,85
CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO	%	1,89

Los índices de cenizas, están dentro de los límites normales establecidos para las plantas medicinales. Las cenizas totales permitieron determinar la cantidad de material remanente después de la ignición: cenizas fisiológicas o derivados de los tejidos vegetales y cenizas no vegetales. Las cenizas solubles en agua corresponden al 0.85% de material de tipo orgánica, mientras que el 1.89% de cenizas ácido insolubles están relacionadas a las sustancia minerales propias presentes en la planta. Como se aprecia el resultado de cenizas insolubles en ácido es muy alto lo que demuestra que la planta tenía alto contenido de arena y tierra silicea (ver cuadro No.4).

3.3.2 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y HUMEDAD RESIDUAL

Se realizó la determinación de humedad de la planta fresca con el método de desecación o pérdida por calentamiento en estufa con circulación de aire, y la humedad residual de la planta después del proceso de secado, por el método azeotrópico con Tolueno, para determinar si estaban dentro de los límites establecidos por la OMS para el almacenamiento de drogas en polvo, con un máximo de 12% de humedad residual en el caso de plantas en polvo.

CUADRO No 5. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD Y HUMEDAD RESIDUAL DE *Hybanthus parviflorus*. LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH. JULIO- NOVIEMBRE DEL 2008.

PARAMETRO	UNIDAD	PORCENTAJE
HUMEDAD	%	79,49
HUMEDAD RESIDUAL	%	4,71

Se observa que la planta fresca de violetilla tiene un 79.46% de agua, razón por la cual el proceso de secado fue muy cuidadoso para que no se degraden los principios activos mientras perdía el agua a una temperatura de $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por cuatro días en estufa con circulación de aire, se logró de esta manera obtener una humedad residual de 4.71% que esta dentro de los límites establecidos para almacenamiento de drogas en polvo (ver cuadro No.5).

3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SIEMBRA SUPERFICIAL EN PLACA DE PETRI

Este ensayo tuvo por objetivo poder dilucidar cual extracto de la planta en estudio presentaba actividad antimicrobiana, para continuar su posterior análisis. Es por ello que en placas de petri con agar y extracto se le sembraron los diferentes microorganismos dando resultados negativos para los tres extractos frente a 8 cepas ensayadas en las placas de petri, los cuales se indican en el cuadro No. 6.

CONCENTRACION (ppm) EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

MICROORGANISMO	CONTROL	SOLVENTE DMSO 10000	5000	2500	1250	625	312,5	156,25	78,12	39,06	19,53	9,765
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13709.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Salmonella gallinarum</i> ATCC 9184.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Mycobacterium smegmatis</i> ATCC 607.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I

Como resultado de esta prueba se pudo observar que ninguno de los extractos presentó actividad, frente a los 6 microorganismos con las que contó el estudio. Con este resultado se puede determinar que en el extracto etéreo e hidroalcohólico de Violetilla no existen compuestos que serían los responsables de la actividad antimicrobiana o en el mejor de los casos que estos compuestos se degradaron o inactivaron durante el proceso de extracción pues aunque no se ha probado la actividad “*in vivo*” en esta tesis, los habitantes que utilizan esta planta la utilizan con este propósito (ver cuadro No.6).

En la literatura se ha descrito el efecto de diversos flavonoides sobre *Escherichia coli*, donde la mayor inhibición la presentan las flavanonas, las cuales no presentan doble enlace entre el C2 y el C3 del anillo C, siendo también mayor el efecto en aquellas moléculas con mayor números de sustituciones de grupos hidroxilos, y sumado a lo anterior la presencia de algún grupo metóxilo el que aumenta la lipofilia del compuesto. La presencia del doble enlace entre C2-C3, produce una disminución en la capacidad de inhibición, posiblemente asociada al aumento de la conjugación en la molécula y la mayor rigidez que a ella le confiere. Los extractos obtenidos no presentan estos compuestos.(4)

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. La encuesta etnobotánica realizada en la comunidad de San Francisco de Cunuguachay de la parroquia de Calpi del cantón Riobamba, determina que *Hybanthus parviflorus* es usada por personas mayores de 40 años para enfermedades como artritis, fiebre, vómito, malaire y algunos también lo usan como purgante.
2. La humedad residual después del proceso de secado es de 4.71% lo cual demuestra que el procesamiento de la droga en cuanto se refiere a secado y almacenamiento fue el adecuado. El parámetro está dentro de los límites establecidos por la OMS para el almacenamiento de drogas en polvo (12%).
3. Los parámetros físico químicos de *Hybanthus parviflorus* son: cenizas totales 3.53%, cenizas insolubles en ácido 1.82%, cenizas solubles en agua 0.85%, encontrándose dentro de los parámetros según las exigencias de la OMS.
4. El tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, hidroalcohólico y acuoso de *Hybanthus parviflorus* presenta: alcaloides, triterpenos, esteroides, lactonas, coumarinas, fenoles, taninos, azúcares reductores y saponinas, dentro de los grupos más importantes.
5. Los extractos etéreo e hidroalcohólico de *Hybanthus parviflorus* no presenta actividad antimicrobiana por el método de Mitscher frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 13709, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9181, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

6. Se rechaza la hipótesis planteada, pues se ha visto que ninguno de los extractos presentan actividad antimicrobiana frente a los microorganismos en prueba.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Seguir con el estudio de esta planta pues por los compuestos que esta presenta se puede determinar que posea otras propiedades biológicas para lo cual se deberá realizar un monitoreo para detectar la mayor cantidad de compuestos con posibilidad de actividad farmacológica.
2. La baja densidad que existe sobre esta planta silvestre es un indicativo para que esta tiende a su desaparición en la zona, para lo cual se recomienda que se investigue sobre el cultivo de la misma para tratar de alguna forma de rescatarla
3. Valorar el conocimiento ancestral de las plantas medicinales, ya que facilita mucho su estudio y su posterior utilización como fitomedicamento.

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

Hybanthus parviflorus conocida también como “Viletilla o Cuy chunzhulli”, es utilizada por la población de la comunidad de San Francisco de Cunuguachay perteneciente a la parroquia de Calpi del cantón Riobamba para fiebre, artritis, purgante y como antimicrobiano. La investigación del material vegetal se realizó en el laboratorio de productos naturales de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH. El estudio empezó con la recolección, el lavado de la planta con hipoclorito de sodio a 10ppm, para continuar con el secado por una semana a temperatura ambiente y su molienda. El material vegetal se sometió a diferentes extracciones usando disolventes de polaridad creciente, comenzando con éter, etanol y finalmente con agua, para posteriormente realizar el tamizaje fitoquímico y su evaluación microbiológica en el extracto etéreo e hidroalcohólico. La determinación cuantitativa demostró un contenido de humedad residual de 4.71%, cenizas totales 3.53%, cenizas insolubles en ácido 1.82%, cenizas solubles en agua 0.85. Los grupos fitoquímicos más abundantes encontrados fueron: alcaloides, triterpenos, esteroides, lactonas, coumarinas, fenoles, taninos, azúcares reductores y saponinas. La actividad del extracto etéreo e hidroalcohólico es nula, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 13709, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9184, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

SUMMARY

Hybanthus parviflorus also known as " Viletilla or Cuy chunshulli" is used by the population of the community San Francisco de Cunuguachay belonging to the Calpi Parish, Riobamba cantón, for fever arthritis , purgative and as an anti-microbial treatment. The vegetal material investigation was carried out in the lab of natural products of the ESPOCH Science Faculty. The study started with plant collection, plant washing with sodium hypochlorite at 10 ppm to continue with drying for a week at room temperature and grinding. The vegetal material was subjected to different extractions using growing polarity solvents , beginning with ether, ethanol and finally water , to, later, carry out the phyto-chemical sieving and microbiological evaluation in the ethereous and hydro-alcoholic extract. The quantitative determination showed a residual humidity content of 4.71%, 3.53% total ashes, 1.82% insoluble ashes in acid and 0.85 soluble ashes in water. The most abundant phyto-chemical groups were alkaloids, triterpenes , steroids, lactons, coumarines , phenols, tannins , sugars reducers and saponins. The ethereous and hydro-alcoholic extract activity is null against *Staphylococcus aureus* ATCC 13709, *Escherichia coli* ATCC 9637, *Salmonella gallinarum* ATCC 9181, *Klebsilla pneumoniae* ATCC 10031, *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

1) ACIDO URSOLICO

http://www.doymafarma.com/doyma/ctl_servlet?_p=doyma.farmacia&_c=Revista&_m=PresentaArticulo&_s=farmacia/FichaArticulo.jsp&id=1306961920070623

2) AMERICAN HERBAL. 1999. Pharmacopoeia and analytical quality control, therapeutic monograph. USA. American Herbal. 24 p.

3) BETA SITOSTEROL

http://www.fredmeyer.com/Es-Supp/Beta_Sitosterol.htm
20070623

4) BROUSSALIS, A. 2004. Estudio farmacognóstico de una planta medicinal Argentina *Hybanthus parviflorus*. Tesis Dr. Bioquímico Farmacéutico. Argentina. Universidad de Buenos Aires. Facultad de ciencias químicas. 150 p.

http://www.saic.org.ar/revista/2004_2/2004_2_tesis.doc
20070615

5) BUCHANON, R. 1984. Manual de determinaciones bacteriológicas. México. Interamericana. pp. 217-221

6) CONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE ATENCION PRIMARIA DE LA SALUD DE ALMA-ATA

[http://conferencia internacional de la salud de Alma At%c3%At
20070623](http://conferencia.internacional.de.la.salud.de.alma.ata)

7) EL MUNDO DE LAS PLANTAS

[http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id_trabajo=209
20070618](http://www.conganat.org/7congreso/trabajo.asp?id_trabajo=209)

8) ENCUESTA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMATICAS

[http://www.saic.org.ar/encuesta nacional de plantas medicinales y
aromáticas/2004_2/2004_2
20040615](http://www.saic.org.ar/encuesta_nacional_de_plantas_medicinales_y_aromaticas/2004_2/2004_2)

9) ERAZO, S. y otros. 2002. Actividad antimicrobiana de *Lophopappus tarapacanus*, especie autóctona Chilena. Argentina. 250 p.

10) ETNOGRAFIA: Etnobotánica

[http://www.aranzadi-zientziak.org/. php?id=432
20070623](http://www.aranzadi-zientziak.org/.php?id=432)

11) FARNSWORTH, N. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. Pharmaceutical. USA (55):225-275. Agosto 1966

12) GATUSO, M. 1999. Manual de procedimientos para el análisis de drogas en polvo. Rosario. Argentina: Universidad Nacional de Rosario. 150 p.

13) HERBOTECNIA, Tecnología en producción de plantas medicinales, aromáticas y tintorias.

[http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-010.html
20070623](http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-010.html)

14) HERBOLARIA

http://dialnet.unirioja.es/servlet/revista?tipo_busqueda=CODIGO&clave_revista=60
20070623

15) ISHIDA, M. y otros. 2002. Topical preparations containing ursolic acid and/or oleanolic acid for prevention of skin cancer. World J Gastroenterol. USA. (8): 493-495. Agosto 2002

16) JATIVA, C. 2004. Texto básico de Farmacognosia. Ecuador. CDR-Xerox. 54 p.

17) JAWETH, E. 1981. Manual de microbiología médica. 5ª ed. México. Manual Moderna. pp. 148-150

18) JAYASURIYA, D. 2000. The regulation of medicinal plants a preliminary review of selected aspects of national legislation. USA. Unpublished report. 125 p.

19) LAS PLANTAS MEDICINALES. Fitoterapia y medicina alternativa

<http://www.todoplantas.net/>
20070615

20) LOCK, O. 1988. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. Perú. Pontificia universidad católica del Perú. 211 p.

21) LOS FLAVONOIDES

<http://www.bellezaydietas.com/theproducts.cfm?cat=1&master=7414&owner=69>
20070623

22) MEDICAMENTOS NATURALES

http://www.farmacianuevaisla.cl/Art%C3%ADculos/Art_XV.htm
20070619

- 23) MELENDEZ, R. Buenas prácticas de manufactura
www.infomed.sid.cu/revistas/pla/vol6201/pla01201.htm
20070615
- 24) MIRANDA, M. 1986. Métodos de análisis de drogas y extractos. Cuba. 400 p.
- 25) NAJID, A. et.al. 1992. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages. *Farmacéutica. USA.* (3): 213-220.
Octubre 1992
- 26) PROGRAMA IBEROAMERICANO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO (CYTED). Manual de técnicas de investigación. Guatemala: CYTED. pp. 63-70
- 27) ROHDE, P. 1973. Manual of products and laboratory procedures. USA. Dickinson and Company. 145 p.
- 28) SAFAYHI, H. et.al. 1997. Inhibition of boswellic acids of human leucocyte elastase. *Pharmacology and Experimental Therapeutics. USA.* (10): 460-463. Enero 1997.
- 29) TOKUDA, H. et.al. 1986. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Letters. Japan.* (33): 279-285. Octubre 1986
- 30) UNIVERSIDAD DE CHILE. Laboratorio: Farmacodinamia y fitofarmacología.
<http://www.farmafitolab.med.uchile.cl/fitofarmacologia.fitoterapia.html>
20070615
- 31) VELEZ, H. y ROJAS, W. 1999. Fundamento de medicina: corporación para investigaciones biológicas. Medellín. 150 p.

32) WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1978. Primary health care: report of the international conference on primary health care. Health for all. Ginebra. (1): 12-25. Septiembre 1978

CAPÍTULO VIII

ANEXOS

ANEXO No. 1. HOJA DE LA ENCUESTA REALIZADA A LOS POBLADORES DE LA COMUNIDAD DE SAN FRANCISCO DE CUNUGUACHAY

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA



ENCUESTA SOBRE: “Conocimientos ancestrales sobre plantas medicinales Violetilla o Cuy chunlluly”

Objetivo: La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo. Con medicina tradicional se quiere decir: El conjunto de todos los conocimientos y prácticas usados en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, y confiado exclusivamente en experiencia práctica y observación y transmitido de generación a generación, en forma oral o escrita. Los datos obtenidos servirán para la realización de la tesis “**ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA VIOLETILLA (*Hybanthus parviflorus*)**” previa la obtención del título Dr. En Bioquímica y Farmacia.

Nota: los datos serán lo más cercanos a la realidad.

Datos informativos:

Nombre..... Edad..... Localidad.....

Preguntas:

1. Conoce usted el Cuy chunlluly.....
2. Con que otro nombre se conoce.....
3. Ha utilizado esta planta:
Con frecuencia..... Poco..... Una sola vez.....
4. Para que la utiliza.....
5. Como la utiliza (modo de preparación).....
6. Cuantas veces toma.....
7. Usted ha comprobado que es eficaz para los tratamientos para los cuales la utiliza.....
8. Como la recolecta.....
9. Junto a que otras plantas crece o esta sola.....
10. Lugares donde generalmente crece esta planta.....
11. Usted cultiva la planta o solo la recolecta.....

Gracias.

ANEXO No. 2. SIEMBRA SUPERFICIAL EN PLACAS DE PETRI PARA EL EXTRACTO ETereo



**ANEXO No. 3. SIEMBRA SUPERFICIAL EN PLACAS DE PETRI PARA EL EXTRACTO
HICROALCOHOLICO**



ANEXO No. 4. CONCENTRACIÓN DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS

