

Evaluación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de potenciales productos bioactivos de origen vegetal

CHRISTIAN ZORZETTO



TESIS DOCTORAL

Directoras

Dra. CANDELARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ MATEO
Dra. ÁNGELES ARIAS RODRÍGUEZ
Dra. ROSA MARÍA RABANAL GALLEGO

2015

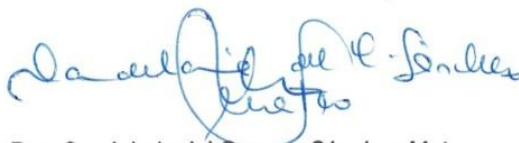
Dña. **CANDELARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ MATEO**, Profesora Titular de Farmacología del Dpto. de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna, Dña. **ÁNGELES ARIAS RODRÍGUEZ**, Catedrática de Medicina Preventiva y Salud Pública del Dpto. de Obstetricia, Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y Salud Pública, Toxicología, Medicina Legal y Forense, Dña. **ROSA MARÍA RABANAL GALLEGO**, Profesora Titular de Farmacología del Dpto. Medicina Física y Farmacología

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada:

"Evaluación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante de potenciales productos bioactivos de origen vegetal", adscrita al Programa de Doctorado "Investigación Biomédica Básica", presentada por el licenciado **CHRISTIAN ZORZETTO**, ha sido realizada bajo sus direcciones en el Departamento de Medicina Física y Farmacología y en el Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Medicina Preventiva y Salud Pública, Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología, ambos de la Universidad de La Laguna y además, considerando que reúne las condiciones de calidad y rigor científico, se autoriza para que pueda ser presentada y defendida antes el tribunal nombrado al efecto, para optar al grado de Doctor en Farmacia.

La Laguna, a de 23 noviembre de 2015.



Fdo.: Dra. Candelaria del Carmen Sánchez Mateo



Fdo.: Dra. Ángeles Arias Rodríguez



Fdo.: Dra. Rosa María Rabanal Gallego

TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la capacidad antimicrobiana y antioxidante
de potenciales productos bioactivos de origen vegetal**

CHRISTIAN ZORZETTO

Directora

Dra. CANDELARIA DEL CARMEN SÁNCHEZ MATEO

Profesora Titular de Farmacología, Dpto. Medicina Física y Farmacología

Codirectoras

Dra. ÁNGELES ARIAS RODRÍGUEZ

*Catedrática de Medicina Preventiva y Salud Pública, Dpto. de Obstetricia y Ginecología, Pediatría,
Medicina Preventiva y Salud Pública, Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología*

Dra. ROSA MARÍA RABANAL GALLEGO

Profesora Titular de Farmacología, Dpto. Medicina Física y Farmacología

Título original: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE
POTENCIALES PRODUCTOS BIOACTIVOS DE ORIGEN VEGETAL
Realizada por: *Christian Zorzetto*
Dirigida por: *Dra. Candelaria del Carmen Sánchez Mateo*
Dra. Ángeles Arias Rodríguez
Dra. Rosa María Rabanal Gallego

Programa de Doctorado "Investigación Biomédica Básica"
Departamento de Medicina Física y Farmacología
Facultad de Ciencias de la Salud
Sección de Farmacia
La Laguna, 2015

Cubierta: Detalle de ramillete de *Hypericum reflexum*. Foto tomada en La Esperanza (Tenerife)
en junio de 2013
**Edición fotográfica de
la cubierta:** *M^a Candelaria González Pérez (Cande)*
Diseño de la cubierta: *Christian Zorzetto*
Fotografías: Archivo del Autor

Parte de los resultados obtenidos en esta investigación, hasta el momento se han publicado de la siguiente manera:

Artículo en revista indexada y con índice de impacto:

Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, Bramucci M, Quassinti L, Caprioli G, Papa F, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Maggi F. **2015**. Phytochemical analysis and in vitro biological activity of three *Hypericum* species from the Canary Islands (*H. reflexum*, *H. canariense* and *H. grandifolium*). *Fitoterapia*. 100:95-109.

Comunicación en congreso internacional:

Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, Bramucci M, Quassinti L, Caprioli G, Papa F, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Maggi F. **2014**. “Composizione e attività biológica di oli essenziali ed estratti di 3 specie del genere *Hypericum* (*H. canariense*, *H. reflexum*, *H. grandifolium*) endemiche delle Isole Canarie”. En Actas del II Congreso nacional per la ricerca sugli oli essenziali, Terni (Italia) 14-16 Noviembre 2014: ISTISAN Congressi 14/C8.

Póster en congreso internacional:

Zorzetto C, Abreu R, Arias A, Rabanal RM, Sánchez-Mateo CC. **2013**. “Antibacterial Effects of two species of *Hypericum* from the Canary Islands against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” Poster en Actas del 17th International Congress, Viena (Austria) 8-10 Julio 2013.

Póster en congreso nacional:

Zorzetto C, Lupidi G, Maggi F, Rabanal RM, Sánchez-Mateo CC. **2015**. “Capacidad antioxidante de diversos extractos de *Hypericum reflexum* L. fil, especie endémica de las Islas Canarias”. Poster en Actas del 8º Congreso de Fitoterapia SEFIT; Zaragoza 23-24 Octubre 2015.

Zorzetto C, Abreu R, Arias A, Rabanal RM, Sánchez-Mateo CC. **2013**. “Actividad antibacteriana de dos especies de *Hypericum* de las Islas Canarias frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina”. Poster en Actas del 7º Congreso de Fitoterapia SEFIT; Alicante 18-20 Octubre 2013.

A mi **esposa**,
*por su amorosa e infinita paciencia
en tantos años de espera.*

A **Jessy** y a **Fran**,
por el mucho tiempo robado.

Alla mia **mamma** e al mio **papá**,
*che mi hanno trasmesso fin da piccolo
la passione per i libri e lo studio.*

Antes que nada, dar gracias a Dios, por hacer que pudiera vivir esta experiencia.

A Dioreth, que con su infinito amor no dejó de esperarme ni un segundo en todos estos años y que siempre me empujó a no desistir.

A mis Directoras de Tesis, la Dra. Sánchez Mateo, la Dra. Arias Rodríguez y la Dra. Rabanal Gallego, por la confianza y la enorme ayuda que siempre me han brindado para llevar a cabo un proyecto que ha resultado ser tremendamente enriquecedor. Siempre tendrán mi más sincera gratitud, por dejarme cumplir un sueño.

Al Prof. Dr. Vittori Sauro, en su momento Director de la *Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute* en la *Facoltà di Farmacia* de la *Università degli Studi di Camerino* (UNICAM), a quien debo el haber realizado una estancia tan valiosa en tan prestigiosa Universidad.

Al Prof. Dr. Maggi Filippo, de la *Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute* (UNICAM), por haberme explicado muchos misterios de los aceites esenciales y por ser ahora un muy buen amigo.

A todos los otros integrantes del equipo investigador de la *Università degli Studi di Camerino*, el Dr. Sagratini, Dr. Ricciutelli, Dra. Cortese y el Dr. Caprioli, el Prof. Dr. Lupidi, el Prof. Dr. Bramucci y la Dra. Quassinti, la Dra. Petrelli, el Dr. Vitali, y finalmente el Dr. Papa y el Dr. Mustafa, porque sin ellos no habría sido posible gran parte de lo que aquí se presenta.

A la Dra. Hernández Padrón, profesora en el Área de Botánica de la Facultad de Ciencias de la Salud, por las identificaciones del material vegetal utilizado en esta investigación y al Dr. Pérez de Paz, Catedrático de Botánica de la Universidad de La Laguna, por la pronta ayuda que siempre ha dado poniendo a disposición su vasto saber.

Al Dr. Víctor López, profesor de la Facultad de Ciencias de la Salud en la Universidad San Jorge, por haberme motivado a terminar lo que parecía interminable, por su inestimable apoyo y su gran amistad.

A todo el personal del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna y, en particular, a Begoña que tantos certificados me ha facilitado, cumplimentado y tramitado y a Gregorio por ayudarme en el día a día del laboratorio, por darme muy buenos consejos y animarme a excavar un hoyo más profundo.

A Lucio Pérez Aranaz y a María Jesús González Álvarez, por haber consentido tantos cambios de horario y tantas ausencias en el trabajo, sin las cuales no hubiese sido posible terminar a tiempo este proyecto.

A mi familia, infinitamente, por no dejar nunca de creer en mí.

[...]
Laudato si', mi' Signore, per sora nostra matre terra,
la quale ne sustenta et governa,
et produce diversi fructi con coloriti flori et herba.
[...]

Francesco d'Assisi,
"Il Cantico delle Creature"

[...] a la gente del país canario, para que conozcan mejor su tierra, la amen y la conserven; de esa forma la vida en ella tendrá una calidad adecuada, y será posible el desarrollo y convivencia entre las personas. Al mismo tiempo, un mejor conocimiento de nuestra tierra, permitirá una mayor comprensión y solidaridad hacia los hombres y las tierras del resto del mundo.

Arnoldo Santos,
"Arboles de Canarias. Flora de Canarias –I"

<i>Visto Bueno</i>	iv
<i>0.I. Publicaciones</i>	viii
<i>Dedicatoria</i>	x
<i>0.II. Agradecimientos</i>	xii
<i>Frases de personas célebres</i>	xiv
<i>0.IV. Abreviaturas, acrónimos, símbolos y fórmulas químicas</i>	xx
1. Resumen, introducción, justificación y objetivos	2
1.I.a. Resumen	4
1.I.a.1. Estructura de la Memoria	5
<u>1.I.b. Riassunto</u>	8
<u>1.I.b.1. Struttura del Saggio</u>	9
1.II. Introducción	12
1.II.1. Las plantas medicinales como punto de partida	12
1.II.2. El Archipiélago Canario y su flora medicinal	14
1.II.3. El enfoque de la investigación	17
1.II.4. Proyección internacional de los resultados	19
1.III. Justificación y objetivos	20
2. Revisión bibliográfica	24
2.I. Género <i>Hypericum</i>	26
2.I.1. Clasificación taxonómica, descripción botánica y usos populares	26
2.I.2. Composición química	27
2.I.3. Actividades farmacológicas	32
2.II. El género <i>Hypericum</i> en las Islas Canarias	34
2.II.1. Clasificación taxonómica, descripción botánica y usos populares	34
2.II.2. Composición química	36
2.II.3. Actividades farmacológicas	39
2.III. Actividad biológica	43
2.III.1. Capacidad antioxidante	43
2.III.1.1. Introducción	43
2.III.1.2. Compuestos fenólicos como antioxidantes	45
2.III.1.2.1. Ácido clorogénico	45
2.III.1.2.2. Flavonoides	46
2.III.1.3. Aceites esenciales como antioxidantes	47
2.III.1.4. El hipérico como antioxidante	48
2.III.2. Actividad antimicrobiana	49
2.III.2.1. Introducción	49
2.III.2.2. Compuestos fenólicos como antimicrobianos	50
2.III.2.2.1. Ácido clorogénico	51
2.III.2.2.2. Flavonoides	52

2.III.2.3. Aceites esenciales como antimicrobianos	53
2.III.2.4. El hipérico como antimicrobiano	54
2.III.3. Actividad citotóxica	56
2.III.3.1. Introducción	56
2.III.3.2. Compuestos fenólicos como citotóxicos	57
2.III.3.2.1. Ácido clorogénico	57
2.III.3.2.2. Flavonoides	58
2.III.3.3. Aceites esenciales como citotóxicos	59
2.III.3.4. El hipérico como citotóxico	61
3. Material y métodos	64
3.I. Recolección, identificación, desecación y trituración	66
3.II. Preparación de extractos, fracciones y aceites esenciales	68
3.II.1. Productos químicos utilizados	68
3.II.2. Extracción discontinua con disolvente: maceración	68
3.II.3. Extracción continua con disolvente: Soxhlet	69
3.II.4. Hidrodestilación	69
3.III. Estudio fitoquímico	71
3.III.1. Productos químicos utilizados	71
3.III.2. HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia	71
3.III.2.1. Fundamento teórico	72
3.III.2.2. HPLC-DAD. Protocolo experimental	73
3.III.2.3. HPLC/ESI-MS. Protocolo experimental	75
3.III.3. GC: Cromatografía de gases	76
3.III.3.1. Fundamento teórico	76
3.III.3.2. GC-MS. Protocolo experimental	77
3.III.3.3. GC-FID. Protocolo experimental	78
3.III.3.4. PCA: Análisis de Componentes Principales	78
3.IV. Actividad biológica	80
3.IV.1. Productos químicos utilizados	80
3.IV.2. Capacidad antioxidante	81
3.IV.2.1. Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)	82
3.IV.2.1.1. Fundamento teórico	82
3.IV.2.1.2. Protocolo experimental	83
3.IV.2.2. Reacción con el radical ABTS ^{•+}	85
3.IV.2.2.1. Fundamento teórico	85
3.IV.2.2.2. Protocolo experimental	86
3.IV.2.3. Medida de la capacidad reductora del hierro: método FRAP	87
3.IV.2.3.1. Fundamento teórico	87
3.IV.2.3.2. Protocolo experimental	87
3.IV.2.4. Determinación del contenido fenólico total	89
3.IV.2.4.1. Fundamento teórico	89
3.IV.2.4.2. Protocolo experimental	90
3.IV.3. Actividad antimicrobiana	91
3.IV.3.1. Método de difusión en agar	91
3.IV.3.1.1. Fundamento teórico	91
3.IV.3.1.2. Protocolo experimental	91
3.IV.3.2. Determinación de la CIM	92
3.IV.3.2.1. Fundamento teórico	92
3.IV.3.2.2. Protocolo experimental	93

3.IV.4. Actividad citotóxica: ensayo con líneas celulares tumorales	94
3.IV.4.1. Fundamento teórico	94
3.IV.4.2. Protocolo experimental	95
4. Resultados	98
4.I. Preparación de extractos, fracciones y aceites esenciales	100
4.II. Estudio fitoquímico	102
4.II.1. HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia	102
4.II.1.1. HPLC-DAD	102
4.II.1.2. HPLC/ESI-MS	103
4.II.2. GC: Cromatografía de gases: Determinación de componentes volátiles	103
4.II.2.1. GC-MS y GC-FID	103
4.II.2.2. PCA	109
4.III. Actividad biológica	112
4.III.1. Capacidad antioxidante	112
4.III.1.1. Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)	112
4.III.1.2. Reacción con el radical ABTS•+	113
4.III.1.3. Medida de la capacidad reductora del hierro: método FRAP	113
4.III.1.4. Determinación del contenido fenólico total: Método de F-C	114
4.III.2. Actividad antimicrobiana	115
4.III.2.1. Método de difusión en agar	115
4.III.2.2. Determinación de la CIM	117
4.III.3. Actividad citotóxica	118
5. Discusión	120
5.I. Estudio fitoquímico	123
5.II. Actividad biológica	128
5.II.1. Capacidad antioxidante	128
5.II.2. Actividad antimicrobiana	131
5.II.3. Actividad citotóxica	133
6.a. Conclusiones	136
<u>6.b. Conclusioni</u>	140
7. Referencias bibliográficas	144

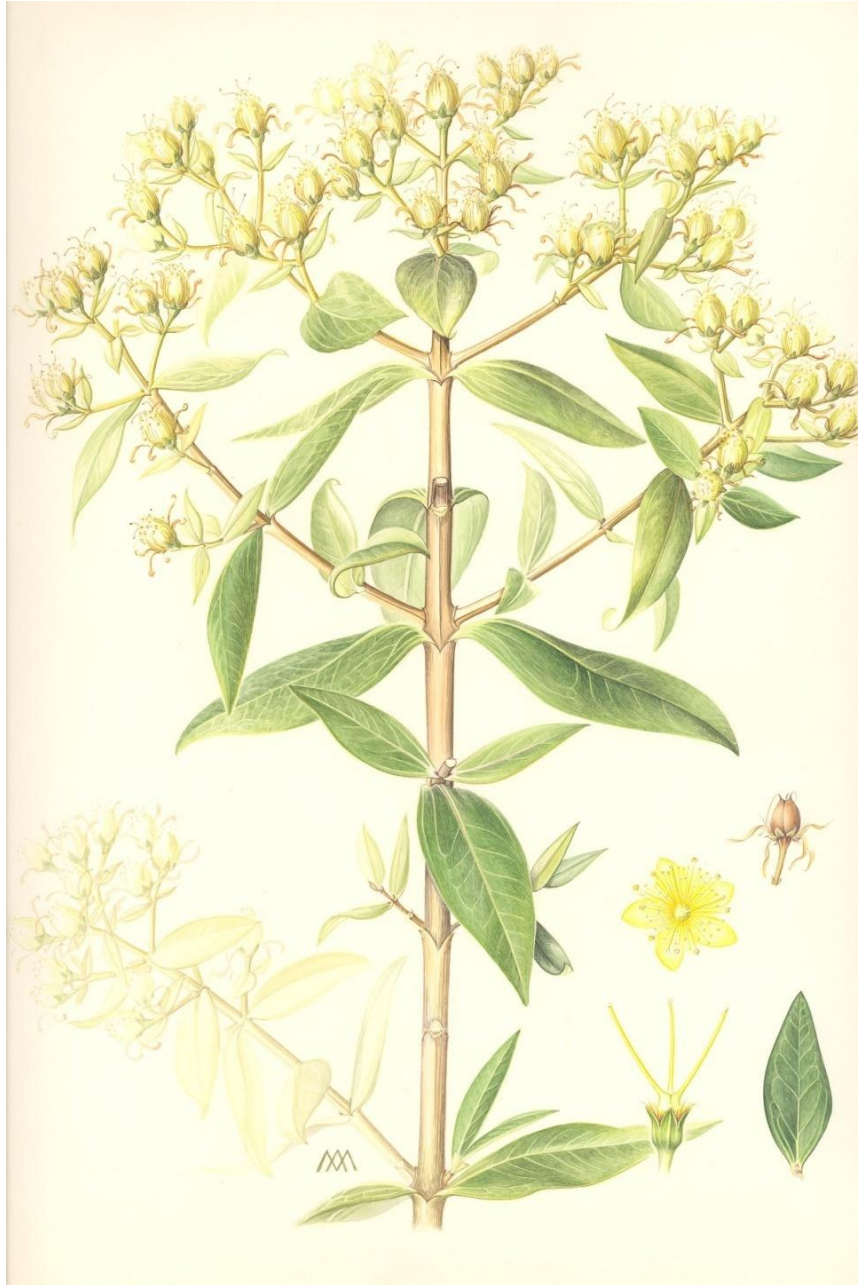
0.IV.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SÍMBOLOS y FÓRMULAS QUÍMICAS

A●	antioxidante, forma oxidada
A	absorbancia
Å	ångström
a. C.	antes de Cristo
A375	línea celular de melanoma humano
ABTS	ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfúrico)
ABTS ^{•+}	radical catiónico del ABTS
AH	antioxidante, forma reducida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLEE	Betalactamasas de Espectro Extendido
BuOH	butanol
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CHCl ₃	cloroformo
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CO ₂	dióxido de carbono
COOH	grupo carboxilo
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector con Diodos en Línea)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo radical
Dr.	Doctor
Dra.	Doctora
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
ESBL	<i>Extended-Spectrum Beta-Lactamase</i> (<i>Beta-Lactamasi a Spettro Estes</i>)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por Electronebulización)
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> , y otros
EUA	Estados Unidos de América
Fe ²⁺	hierro ferroso
Fe ³⁺	hierro férrico
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de Ionización de Llama)
Fig.	figura
FP	Fracción Polar
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (Medida de la Capacidad Reductora del Hierro)
g	gramo

GA Eq	<i>Gallic Acid Equivalents</i> (Equivalentes de Ácido Gálico)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de Gases)
GPS	<i>Global Positioning System</i> (Sistema de Posicionamiento Global)
h	horas
H.	<i>Hypericum</i>
HCl	ácido clorhídrico
HCT116	línea celular de carcinoma humano de colon
HI-FBS	<i>Heat-Inactivated Fetal Bovine Serum</i> (Suero Bovino Fetal Inactivado por Calor)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
i.e.	<i>id est</i>
IC ₅₀	<i>half-Inhibition Concentration</i> (Concentración de Inhibición del 50%)
L.	Linnaeus
L. f.	Linnaeus Filius
LOD	<i>Limit Of Detection</i> (Límite de Detección)
LOQ	<i>Limit Of Quantification</i> (Límite de Cuantificación)
m	metro
M	masa molar
m/z	masa/carga
MDA-MB 231	línea celular de carcinoma mamario humano
MeOH	metanol
mg	miligramo
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (<i>Concentrazione Minima Inibitoria</i>)
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mmol	milimoles
Mo	molibdeno
mol	mol
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (<i>Staphylococcus aureus Resistente a la Meticilina</i>)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de Masas)
MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
N	Norte
N. del A.	Nota del Autor
nm	nanómetro
nº	número
OMS	Organización Mundial de la Salud
p.	página
p. ej.	por ejemplo
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampón Fosfato Salino)
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Análisis de Componentes Principales)
pH	potencial de hidrógeno
ppm	partes por millón
psi	<i>Pounds-force per Square Inch</i> (libra-fuerza por pulgada cuadrada)
R ²	coeficiente de determinación
RI	<i>Retention Index</i> (Índice de Retención)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies Reactivas del Oxígeno)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (medio Roswell Park Memorial Institute)

S	Sur
s	segundo
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a la Meticilina
SCCmec	<i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> (Casete Cromosómico Estafilocócico)
SDH	succinato deshidrogenasa
SNC	Sistema Nervioso Central
spp.	especies
TE	<i>Trolox Equivalent</i>
TEAC	<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i> (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox)
TFC	sigla asignada al Herbario del Departamento de Biología Vegetal (Botánica) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de La Laguna
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina (tripiridiltriazina)
t _R	tiempo de retención
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UI	Unidad Internacional
ULL	Universidad de La Laguna
UNICAM	<i>Università degli Studi di Camerino</i> (Universidad de Camerino)
UV	Ultravioleta
V	voltio
v/v	concentración porcentual en volumen
μm	micrómetro o micra
μM	micromolar
μl	microlitro
μg	microgramo
σ	(letra griega <i>sigma</i> que describe a la) desviación estándar
λ	(letra griega <i>lambda</i> que describe a la) longitud de onda
°C	grado Celsius
\leq	menor o igual
\geq	mayor o igual
\pm	más menos
$>$	mayor que
$<$	menor que



1. RESUMEN, INTRODUCCIÓN, JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

Página anterior: *Hypericum canariense* L. var. *canariense*.

[Imagen disponible en <http://www.jardincanario.org/inicio>, web del Jardín Botánico Viera y Clavijo de Gran Canarias].

El incremento de las infecciones humanas y de las enfermedades crónicas degenerativas, junto con los progresos en los conocimientos en fitoquímica para la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica, han motivado la realización de este trabajo. En el mismo se explora, por primera vez, la eficacia como antioxidante, citotóxico y antimicrobiano frente a cepas de bacterias multirresistentes de diferentes extractos obtenidos de varios hipéricos de las Islas Canarias usadas en la medicina tradicional canaria por sus propiedades vulnerarias, cicatrizantes y antibacterianas, entre otras. Las especies objeto de esta investigación fueron: el granadillo (*Hypericum canariense* L.), la malfurada (*Hypericum grandifolium* Choisy) y la cruzadilla (*Hypericum reflexum* L. f.), siendo este último recolectado en dos puntos diferentes de Tenerife.

De las tres especies de hipérico se obtuvieron el aceite esencial, el extracto Soxhlet y el metanólico, así como a partir de este último la fracción clorofórmica y la polar.

Tras el análisis fitoquímico mediante técnicas cromatográficas de alta eficacia (HPLC-DAD y HPLC/ESI-MS), se evidenció una elevada presencia de compuestos polifenólicos en las especies en estudio, siendo especialmente abundante el ácido clorogénico y la rutina en el *Hypericum reflexum*. Asimismo, sólo se encontró una pequeña cantidad de hipericina en el *Hypericum reflexum* de Ifonche.

El análisis de los aceites esenciales mediante GC-MS y GC-FID mostró que los componentes mayoritarios en todos los aceites esenciales estudiados están relacionados con la fracción de hidrocarburos, destacando *n*-nonano, *n*-undecano, (*E*)-cariofileno, α -pineno y β -pineno. Asimismo, se pudo constatar una variabilidad en la composición de las sustancias volátiles entre las dos especies de *Hypericum reflexum* recogidas en diferentes zonas de la isla.

Cuando se llevó a cabo el estudio de la capacidad antioxidante mediante tres métodos diferentes (DPPH, ABTS y FRAP), comprobamos que todos los extractos y fracciones de las especies en estudio, con excepción de los aceites esenciales, presentaron actividad antioxidante en las tres pruebas, sobresaliendo entre ellos las fracciones polares que presentaron una actividad comparable a la obtenida con el Trolox (antioxidante de referencia). Los aceites

esenciales sólo mostraron actividad antioxidante por el método ABTS, aunque inferior a la observada con el resto de los extractos ensayados.

El estudio de la actividad antimicrobiana se realizó frente a varias bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como frente a diferentes cepas de SARM y BLEE, mediante el método de difusión en agar y el de microdilución. Encontramos que todos los extractos ensayados presentaron una moderada actividad frente a las bacterias Gram positivas, pero ninguna actividad frente a las Gram negativas, destacando los valores de CMI encontrados para el extracto Soxhlet de *Hypericum grandifolium*. Por otro lado, si bien todos los extractos de hipéricos analizados mostraron una moderada actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar frente a las cepas SARM ensayadas, todos presentaron valores de CMI altos por el método de microdilución.

Finalmente, se evaluó la citotoxicidad *in vitro* mediante el método MTT sobre diferentes líneas de células tumorales: melanoma humano (A375), carcinoma mamario humano (MDA-MB 231) y carcinoma humano de colon (HCT116). Tras la realización de esta prueba, comprobamos que todos los extractos presentaron actividad citotóxica frente a todas las líneas tumorales ensayadas, siendo los aceites esenciales los más potente. Sobresale entre todos ellos el aceite esencial del *Hypericum reflexum* que mostró una actividad citotóxica comparable a la del cisplatino (fármaco de referencia).

En resumen, los hipéricos estudiados en nuestra investigación mostraron una eficaz capacidad antioxidante, una leve acción antimicrobiana frente a bacterias multirresistentes y una potente actividad citotóxica frente a células tumorales.

I.a.1. Estructura de la Memoria

Esta Tesis Doctoral está compuesta por siete capítulos, además de una parte inicial que incluye el informe favorable de lectura de la Directora y las Codirectoras, los apartados de publicaciones obtenidas con los resultados de la investigación, la dedicatoria, los agradecimientos, las citas ilustres, el índice y las abreviaturas. Consta de 25 figuras y 17 tablas, las cuales ofrecen una visión resumida e inmediata de los resultados de la misma.

En el capítulo 1, se realiza, tras la presentación de un resumen de esta Memoria, una breve reseña sobre el interés del estudio de las plantas medicinales en general, y de las Islas Canarias en particular, y se describe el enfoque de la investigación realizada y la proyección internacional alcanzada por la misma, su justificación y los objetivos prefijados.

En el capítulo 2, Revisión bibliográfica, se resume la situación actual con respecto a las últimas investigaciones fitoquímicas y farmacológicas realizadas con especies del género *Hypericum*, centrándonos especialmente en los componentes químicos identificados en esta investigación (compuestos fenólicos y aceites esenciales) y en las actividades ensayadas en esta Tesis Doctoral. También se hace una revisión bibliográfica de los estudios realizados con las especies del género *Hypericum* de las Islas Canarias.

En el capítulo 3, Material y Métodos, se describen los equipos, materiales, metodologías, técnicas de caracterización y análisis estadísticos empleados en la investigación con el propósito de darle cumplimiento a los objetivos del trabajo.

En los capítulos 4, 5 y 6 (Resultados, Discusión y Conclusiones, respectivamente), se aportan y se describen los resultados de la investigación, para los cuales luego se propone una discusión y finalmente se formulan las conclusiones alcanzadas en la investigación.

Finalmente, el capítulo 7 (Referencias bibliográficas) describe los libros y publicaciones usadas para la realización de este trabajo y consta de 389 referencias en total, de las cuales el 31% corresponde a los últimos 5 años.

Además, para optar a la Mención Internacional en el título de doctor, según queda recogido en el artículo 28 del Reglamento de Enseñanzas Oficiales de Doctorado de la Universidad de La Laguna (de 25 de enero de 2013), que traspone las disposiciones al respecto contenidas en el Real Decreto 99/2011 (de 28 de enero), el doctorando deberá redactar parte de la Tesis Doctoral (al menos el resumen y las conclusiones), en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en su campo de conocimiento, distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España. Por este motivo, el resumen y las conclusiones de la presente Memoria se redactan y presentan también en italiano.

*L'aumento delle infezioni ospedaliere e delle malattie cronico-degenerative, assieme al costante sviluppo delle conoscenze nell'ambito della fitochimica indirizzate a ricercare nuove molecole con attività biologiche, hanno spinto alla realizzazione dell'investigazione i cui risultati qui di seguito si presentano. Per la prima volta si indaga la efficacia come antiossidante, antimicrobiano (su batteri multiresistenti) e antiproliferativa (su linee tumorali umane) di diversi estratti ottenuti da varie specie del genere *Hypericum* delle Isole Canarie che sono ampiamente utilizzate nella medicina tradizionale canaria, tra le altre cose, come cicatrizzanti e antibiotici. Le specie su cui si è posta l'attenzione sono state il "granadillo" (*Hypericum canariense* L.), la "malfurada" (*Hypericum grandifolium* Choisy) e la "cruzadilla" (*Hypericum reflexum* L. f.), quest'ultimo raccolto in due punti diversi dell'isola di Tenerife.*

Dalle tre specie in questione si sono ottenuti gli oli essenziali, l'estratto metanolico e quello realizzato mediante apparato Soxhlet oltre alle frazioni cloroformiche e quelle più polari.

*Dalle analisi fitochimiche realizzate mediante HPLC-DAD e HPLC/ESI-MS è scaturita una grande ricchezza in composti polifenolici presenti in tutte le specie, essendo i più abbondanti l'acido clorogenico e la rutina presenti nell'*Hypericum reflexum*. Inoltre, i risultati ricavati hanno descritto la presenza di una piccola quantità di ipericina in *Hypericum reflexum* della zona di Ifonche.*

*Per quanto riguarda la composizione degli oli essenziali realizzata mediante GC-MS e GC-FID, questi sono risultati composti specialmente da idrocarburi come n-nonano, n-undecano, (E)-cariofillene, α - e β -pinene. Inoltre, dalle analisi effettuate si sono stabilite delle importanti differenze nella composizione delle sostanze volatili degli *Hypericum reflexum* raccolti in due località diverse dell'isola.*

Per quanto invece riguarda le diverse attività biologiche, dai saggi antiossidanti realizzati per mezzo di tre diversi metodi (DPPH, ABTS, FRAP) è emerso che tutti gli estratti e le frazioni, facendo eccezione gli oli essenziali, presentano una buona attività che risultò essere ancora più accentuata nel caso delle frazioni più polari di tutti e tre gli iberici esaminati, con dei valori prossimi a quelli del Trolox (standard antiossidante utilizzato nei saggi). Gli oli essenziali invece

hanno mostrato una parziale attività antiossidante nel saggio con ABTS, con valori comunque inferiori a quelli rinvenuti nel caso degli altri estratti.

L'esame dell'attività antimicrobica è stato realizzato su batteri Gram positivi, Gram negativi e alcuni ceppi di batteri multiresistenti MRSA ed ESBL, utilizzando per lo scopo il metodo per diffusione (test di Kirby–Bauer) e quello per diluizione. I risultati hanno evidenziato dei modesti valori di inibizione per tutti gli estratti sui batteri Gram positivi, nulli sui Gram negativi, ma comunque degni di nota per l'estratto Soxhlet di *Hypericum grandifolium*. È da aggiungere poi che tutti gli estratti sono stati in grado di inibire i ceppi batterici MRSA (mediante il metodo per diffusione), anche se poi ottennero dei valori MIC alti.

Per quanto riguarda l'attività antiproliferativa in vitro realizzata mediante il saggio MTT su tre linee tumorali (A375, melanoma umano; MDA-MB 231, carcinoma mammario umano; HCT116, carcinoma del colon umano), si è potuto appurare l'azione inibente realizzata su tutte le linee, essendo in questo caso gli oli essenziali i più potenti di tutti. Soprattutto l'olio essenziale di *Hypericum reflexum* ha mostrato dei valori di IC_{50} vicini a quelli del controllo positivo cisplatino (farmaco chemioterapico di riferimento).

In conclusione, gli iberici esaminati in questo studio hanno messo in evidenza che oltre ad una efficace attività antiossidante e moderata azione antimicrobiana sono dei potenti agenti antiproliferativi di certe linee tumorali. Per tale motivo sono meritevoli di ulteriori studi al fine di evidenziarne il meccanismo d'azione.

I.b.1. Struttura del Saggio

Questa Tesi di Dottorato si compone di sette capitoli, oltre a una parte iniziale che racchiude l'informe positivo redatto dalla Direttrice e dalle Vicedirettrici dell'investigazione, il capitolo delle pubblicazioni ottenute fino ad adesso con parte dei risultati, la dedica, i ringraziamenti, le citazioni illustri, l'indice e le abbreviature. Si compone di 25 figure e 17 tabelle che offrono una visione d'insieme dei risultati ottenuti.

Nel capitolo 1, dopo l'esposizione di un riassunto, è riportata una breve recensione sulla necessità dello studio delle piante medicinali in generale e in special modo di quelle delle Isole Canarie, soffermando l'attenzione sull'approccio dell'investigazione realizzata per poi chiudere il capitolo descrivendo la rilevanza internazionale raggiunta dallo stesso, lo scopo e gli obiettivi fissati.

Nel capitolo 2, Review, si riassume la situazione attuale riguardante gli ultimi studi pubblicati sulla fitochimica e farmacologia del genere Hypericum, focalizzando l'attenzione sui composti chimici identificati in questo nostro studio (composti fenolici e oli essenziali) e sulle attività testate anche in questa Tesi Dottorale. Inoltre si aggiunge una review di tutte le pubblicazioni realizzate fino al momento aventi per oggetto gli iperici delle Isole Canarie.

Nel capitolo 3, Materiali e Metodi, si descrivono gli apparati, i materiali, i metodi e le tecniche di analisi statistiche usate per la realizzazione dello studio con il fine di raggiungere gli obiettivi prefissati.

Nei capitoli 4, 5 e 6 (Risultati, Discussione e Conclusioni) si descrivono i risultati dei saggi realizzati, per i quali poi si propone una discussione e poi alla fine si formulano le conclusioni raggiunte.

Concludendo, nel capitolo 7 (Bibliografia) si riportano in ordine alfabetico libri e pubblicazioni scientifiche consultate per la scrittura della Tesi, la quale è formata da 389 riferimenti di cui il 31 % sul totale è composto da lavori pubblicati negli ultimi 5 anni.

Per poter optare per la "Menzione Internazionale" al titolo di Dottore, in base all'articolo 28 del Regolamento degli Studi Ufficiali di Dottorato di Ricerca dell'Università della Laguna (del 25 di gennaio del 2013) che trascrive gli articoli al rispetto contenuti nel Decreto Regale 99/2011 (del 28 di gennaio), il dottorando dovrà redigere parte del Saggio (almeno il Riassunto e le Conclusioni) in una delle lingue che abitualmente si usano per la comunicazione scientifica nel suo campo di conoscenza, diversa da tutte quelle che sono ufficiali nel territorio spagnolo. Per questo motivo, il Riassunto e le Conclusioni del presente Saggio si stendono anche in Italiano.

II.

INTRODUCCIÓN

II.1. Las plantas medicinales como punto de partida

A pesar del enorme progreso habido en los últimos años en el desarrollo de nuevos fármacos, la mayoría de ellos presentan efectos secundarios que, en circunstancias extremas, pueden amenazar la vida del paciente. Por ello, la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos más eficaces y seguros sigue siendo una parte importante de la investigación farmacéutica. En este sentido, el reino vegetal tiene una gran importancia, como lo avala el hecho de que muchas plantas se usen en medicina popular por sus propiedades medicinales y además ofrezcan una gran diversidad de metabolitos secundarios, lo que hace de las mismas una fuente prácticamente inagotable de moléculas con las más diversas aplicaciones (Bruneton 2001; Wagner 2006).

El uso de plantas medicinales como fuente de metabolitos secundarios aprovechables para curar enfermedades se remonta a tiempos muy antiguos, cuando ya en el 2500 a. C. con el Código de Hamurabi o en el 2700 a. C. con el Pentsao chino se daba constancia de un elevado número de plantas y drogas usadas con fines curativos (Pérez de Paz y Hernández Padrón 1999). Durante mucho tiempo las plantas medicinales fueron el principal recurso medicinal del que disponían nuestros antepasados. Desde entonces ha acontecido un constante descubrimiento de vegetales que el hombre ha sabido utilizar de forma provechosa para sus propósitos terapéuticos. Especialmente en las últimas décadas se ha producido un renovado interés de la investigación en el campo de los productos naturales, debido no sólo al desarrollo y disponibilidad de una serie de nuevos bioensayos, sino a los avances en la química y la instrumentación que han producido métodos más eficaces de aislamiento, separación, purificación y elucidación estructural. Algunos de estos compuestos son importantes no sólo por su uso directo como agentes terapéuticos, sino también como prototipo en el desarrollo de nuevos medicamentos. En muchos casos, los principios activos obtenidos de las plantas son susceptibles de ser modificados químicamente para mejorar su comportamiento. Así, algunas veces se introduce un radical que, al cambiar sus propiedades físico-químicas, modifica favorablemente su cinética o su actividad (De Smet 1997; Villaescusa y Zaragoza 2003; Wagner,

2006). De hecho se calcula que aproximadamente del 25 al 50% de los fármacos actuales derivan de plantas aislándose hoy todavía algunos medicamentos directamente de las plantas por ser más económico dada su complejidad estructural (Cowan 1999, Cragg *et al.* 2009). Un ejemplo de ello sería el caso de la digoxina. Este heterósido cardiotónico, que se encuentra en las hojas de la *Digitalis purpurea* y que se administra hoy en día como compuesto puro en comprimidos o vía parenteral en caso de insuficiencia cardiaca, se usaba ya en el 1785 cuando William Withering, medico inglés, utilizaba las hojas de esta planta por poseer, según él “un poder sobre los movimientos del corazón que no ha sido observado con ninguna otra medicina” (Goodman y Gilman 2003).

Aun así, a pesar de los grandes esfuerzos y avances realizados en investigación de base en farmacología (incluyendo a la farmacognosia) y al constante acudir a la etnobotánica, que en muchas ocasiones ha servido de punto de partida para diseñar el camino a seguir, muchas moléculas quedan por descubrirse y muchas funciones farmacológicas por asignarse.

Si analizamos las fuentes naturales que han dado lugar a nuevos principios activos utilizados para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, podemos observar que los productos naturales juegan un papel importante en los procesos de descubrimiento y desarrollo de estos nuevos medicamentos. De los 1010 productos aprobados entre 1981-2006, el 44 % fueron productos de origen natural o derivados a partir de ellos y, concretando, entre el 62-67% de los medicamentos antibacterianos o anticancerígenos se obtuvieron igualmente a partir de sustancias de origen natural (Newman y Cragg 2007).

En este sentido, tenemos que comentar que la búsqueda de compuestos naturales bioactivos con propiedades antimicrobianas se encuentra plenamente justificada, debido a la creciente aparición y diseminación de resistencias a los antimicrobianos clásicos y los graves efectos secundarios que ocasionan, así como a la aparición de micosis y otras infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos (Cowan 1999; Cantón y Sánchez Moreno 2003; Díaz Granados *et al.* 2008; Lagamayo 2008; Bockstael y van Aerschot 2009). De hecho, existen diferentes compuestos procedentes de organismos vegetales que han demostrado en numerosos trabajos poseer dicha actividad, entre los que podemos destacar los fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, flavonas, aceites esenciales y los alcaloides (Cowan 1999; Domingo y López-Brea 2003; Rios y Recio 2005).

Por otro lado, se ha puesto de manifiesto durante los últimos años la existencia de una estrecha relación entre el estrés oxidativo y una serie de procesos fisiopatológicos que limitan la calidad y la expectativa de vida de muchas personas. Entre estos procesos podemos destacar: mutagénesis, cáncer, arteriosclerosis, infarto de miocardio, diabetes, cataratas, enfermedades

inflamatorias, envejecimiento celular, trastornos del sistema nervioso central y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple), entre otros (Blaylock 1998; Behl 1999; Gilgun-Sherki *et al.* 2001; Junqueira *et al.* 2004; Qureshi *et al.* 2004).

Por esta causa, en los últimos años ha aumentado el interés científico por las propiedades antioxidantes de los compuestos procedentes del reino vegetal, ya que estas sustancias constituyen una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos que adquirimos a través de la dieta, jugando un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox y en disminuir la incidencia del daño producido por los radicales libres, por lo que actualmente se consideran altamente beneficiosos para la salud (Blaylock 1998; Youdim y Joseph 2001; Issa *et al.* 2006; Russo 2007; Holst y Williamson 2008). De entre estos compuestos activos destacan los derivados polifenólicos, y, en especial, los flavonoides, que constituyen uno de los grupos de antioxidantes naturales más abundantes, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y que en muchas ocasiones han demostrado ser los responsables de la actividad antioxidante (Heim *et al.* 2002; Erlund 2004; Williams 2004; Lotito y Frei 2006).

II.2. El Archipiélago Canario y su flora medicinal

Canarias, junto con Azores, Madeira, Salvajes y Cabo Verde constituyen la Región Macaronésica. Estos Archipiélagos poseen una extraordinaria diversidad ecológica, fruto de unas especiales condiciones ambientales que dan lugar a una rica variedad de hábitats naturales.

El origen geológico de las Islas Canarias ha sido siempre un tema de grandes controversias. En un principio, se consideraron como los restos de las cumbres de las altas montañas del continente hundido de la Atlántida. Más recientemente se han formulado dos teorías más, donde la primera supone que las Islas Canarias fueron en algún momento de la historia parte del continente africano del cual se separaron por la deriva de los continentes, y, una segunda, que las considera surgidas del mar por la actividad de volcanes submarinos. Esta última teoría, gracias a estudios geológicos y oceanográficos recientes, parece ser la que describe mejor la formación del Archipiélago (Bramwell y Bramwell 2001).

La edad de las islas es delatada por la flora endémica de las mismas. En muchos sitios de la región mediterránea se han hallado fósiles de hojas y frutos de plantas idénticas a especies que se encuentran actualmente solamente en Canarias y en el resto del Archipiélago macaronésico. Fósiles de plantas como el Drago (*Dracaena draco*), el Laurel (*Laurus azorica*) o

muchos helechos canarios datan de los períodos Mioceno y Plioceno de la Época Terciaria y tienen hasta 20 millones de años (Bramwell y Bramwell 2001).

El clima de las Islas Canarias es básicamente mediterráneo. Sin embargo, está influenciado por una serie de factores que lo modifican y lo hacen único, como la proximidad de las Islas Orientales a la costa Norte-Africana o la gran altura y la posición oceánica de las Islas Occidentales rozadas por los Vientos Alisios del Noreste (Bramwell y Bramwell 2001). La diversidad climatológica unida a la gran altitud ocasiona un evidente efecto sobre la distribución de los tipos de vegetación en las Islas. Así se delimitan zonas de vegetación bien definidas según la altura: xerofítica (0-700 m), bosque termófilo (200-600 m), bosque húmedo (400-1500 m), bosque de pinos (1200-2000 m) y zona de alta montaña (> 1900 m) (Bramwell y Bramwell 2001).

Desde hace varios siglos, el rico patrimonio vegetal del Archipiélago Canario ha llamado la atención de numerosos naturalistas, botánicos e investigadores. Se tiene constancia de que, ya en el siglo XVIII, Linneo conocía una pequeña cantidad de plantas de las Islas; pero fue solo en los años 1771-80 cuando empezaron las primeras exploraciones botánicas en Canarias llevadas a cabo por el primer recolector de plantas enviado por el Real Jardín Botánico de Kew, Francis Masson. De hecho se considera una de las floras regionales con mayor diversidad genética. La importancia de su biodiversidad se ve aumentada por ser un tercio de su flora silvestre clasificada como endémica: dato equiparable solo al de otros territorios insulares de origen volcánico como las Galápagos o Hawái. Aunque en muchas ocasiones ese gran número de especies únicas ve reducida su presencia, presentándose en ocasiones en poblaciones integradas por menos de una decena de individuos (Pérez de Paz y Hernández Padrón 1999; Bramwell y Bramwell 2001). Aun así, la impresionante excepcionalidad de su flora y fauna hicieron que los investigadores declararan que su vegetación endémica es un magnífico ejemplo de radiación adaptativa, tanto que si Charles Darwin hubiese podido desembarcar en el 1832 en la isla de Tenerife (cosa que no sucedió por una epidemia de cólera en Inglaterra), quizás la hubiese usado para ilustrar su obra maestra "*El origen de las especies*" (Bramwell y Bramwell 2014).

Es más, muchas de las plantas endémicas han sido objeto durante largo tiempo de leyendas y folklores. Por ejemplo, se cuenta que los Guanches (pre-hispánicos de Tenerife) en períodos de sequía quitaban la corteza del cardón (*Euphorbia canariensis*) y con ella su látex venenoso para chupar la pulpa interior del tallo y así calmar la sed. También, se sabe que el legendario Drago de Canarias (*Dracaena draco*) exuda una resina de color rojo, conocida como

“sangre de drago” y que ya desde la Edad Media era muy apreciada por los alquimistas y los médicos por sus dotes místico-medicinales (Bramwell y Bramwell 2001).

Otro aspecto a destacar de los endemismos de las Islas es el uso medicinal que se ha hecho de algunos de ellos. En la época prehistórica, los aborígenes los empleaban bien como alimentos (frutos del mocán, *Visnea mocanera*) o bien para la fabricación de vestimentas (entretejiendo hojas de palmeras, *Phoenix canariensis*) y de herramientas y armas (*Pinus canariensis*, *Juniperus canariensis*, *Olea europea*, *Dracaena drago*). Además, aún hoy en día, plantas como el poleo (*Bystropogon* sp.), la salvia blanca (*Sideritis* sp.) y la cresta de gallo (*Isoplexis* sp.) son considerados valiosos remedios para determinadas afecciones como bronquitis, heridas infectadas y cardiopatías respectivamente (Bramwell y Bramwell 2001). Cabe mencionar también al algaritofe (*Cedronella canariensis*), que de entre los múltiples usos tradicionales que se han descrito, se han podido demostrar sus propiedades antimicrobianas, analgésicas, antiinflamatorias, hipoglucemiantes, diuréticas e hipotensoras (López-García *et al.* 1991, 1992, 1996), así como, en fecha muy reciente, sus propiedades antioxidantes y citotóxicas sobre células tumorales (Zorzetto *et al.* 2015a).

Tenerife, la mayor de las Islas Canarias con una superficie de 2034 km², es una isla con un perfil que se asemeja a un triángulo, de unos 80 km de largo y 60 km de ancho. Es atravesada por el centro por una cadena de montañas que dibujan en su geografía profundos valles y que alcanza su punto más alto en el pico volcánico central del Teide (3707 m). La zona Norte presenta altos acantilados, mientras que el Sur tiene una llanura costera que se presenta muy ancha y plana en la zona de Granadilla de Abona y Adeje. En las regiones más occidentales y orientales (Teno y Anaga, respectivamente), hay dos bloques de montañas de antiguo basalto del Terciario, con profundos valles y afiladas sierras cubiertas de bosque (Bramwell y Bramwell 2001; Bramwell 2014).

Las montañas por encima de Santa Cruz, conocidas como la Sierra de Anaga, con sus alturas que llegan a los 1000 m y declaradas Parque Rural, se extienden desde La Laguna hasta la Punta de Anaga, el punto más Nordeste de la isla. Las cumbres están cubiertas en muchos sitios, como en Las Mercedes, de monte con densas zonas de laurisilva. Los árboles más importantes son *Laurus azorica*, *Prunus lusitanica*, *Rhamnus glandulosa*, *Ilex canariensis*. Pero también están presentes *Pericallis appendiculata*, *Isoplexis canariensis*, *Ixanthus viscosus*, *Tealine canariensis*, solo por nombrar algunas especies. La zona costera de la Sierra de Anaga no es de menor importancia, albergando especies como *Echium simplex*, *Gonospermum revolutum*, *Tealine pallida*, *Ruta pinnata* y suculentas del género *Aeonium* (Bramwell y Bramwell 2001). En este contexto tan rico en flora, en el Parque Rural de Anaga, crece y se ha recolectado

el *Hypericum canariense* y el *Hypericum grandifolium*, objeto de la investigación que en esta Tesis Doctoral se presenta.

En la zona central de la isla, se encuentra el Parque Natural de la Corona Forestal, que extendiéndose desde La Esperanza hacia las cotas más altas de Teno y de Adeje, presenta en algunas zonas restos de bosque húmedo, con laurisilva y fayal-brezal, además de pequeñas zonas de castaños y eucaliptos introducidos (Bramwell 2014). Aquí, en la carretera dorsal, que desde La Laguna va a La Esperanza y sube hacia Las Cañadas del Teide y que atraviesa el bosque de pinos, se ha recolectado uno de los dos *Hypericum reflexum* investigados, el que se llamará "*Hypericum reflexum* (La Esperanza)".

En la vertiente suroccidental de la isla, se localiza el Paisaje Protegido de Ifonche, en la comarca de Chasna, extendiéndose entre los términos municipales de Adeje y Vilaflor. La vegetación en este entorno se corresponde con los terrenos potenciales del pinar que, debido a la activa e intensa transformación antrópica habida en este espacio, hizo que el pinar ocupe hasta la fecha de hoy solo una fracción de la superficie total del Paisaje Protegido (Gobierno de Canarias 2015). En este entorno, hemos recolectado el segundo de los *Hypericum reflexum* estudiados, el que en toda la exposición de esta Memoria se definirá como "*Hypericum reflexum* (Ifonche)".

II.3. El enfoque de la investigación

Desde hace años, los miembros del equipo de investigación del que formo parte han venido realizando estudios fitoquímicos y ensayos biológicos con diferentes especies vegetales de nuestras Islas, sobre todo aquellas que han sido empleadas tradicionalmente en la medicina popular de las Islas Canarias.

Cabe recordar aquí la importancia que las investigaciones en fitoquímica han adquirido en las Islas, hecho reflejado en la prolífica producción de publicaciones que a partir de 1949 (año en el cual se dio a conocer la composición del látex de *Euphorbia canariensis* por los investigadores González y Calero) describen los compuestos químicos propios y derivados de las plantas canarias. Con mirada retrospectiva, se descubre así que la década de 1966-1975 coincide con el apogeo en número de estudios realizados sobre la química de las plantas del Archipiélago. A partir de esa fecha decrece el número de publicaciones puramente químicas, para dejar paso a nuevos campos del conocimiento como la biosíntesis y las actividades biológicas centradas en productos químicos de la flora canaria (Pérez de Paz 1982).

Dentro de las diversas líneas de investigación seguidas en nuestro laboratorio, una de ellas involucra a diferentes especies del género *Hypericum* nativas del Archipiélago Canario, cuyas sumidades floridas, hojas y frutos se usan en la medicina popular canaria en forma de infusión, cataplasma o cocidas para la cicatrización y curación de la piel, así como sedante, diuréticos, vermífugos, antihistéricos y antidepresivos (Darias *et al.* 1986, 1989; Pérez de Paz y Hernández Padrón 1999).

La elección de este género no es casual, sino basada en sus usos tradicionales y en las interesantes acciones farmacológicas encontradas en los últimos años para la especie *Hypericum perforatum* que, como se describirá detalladamente más adelante (ver capítulo 2. *Revisión bibliográfica*), ha demostrado poseer propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antivirales y antidepresivas, así como antioxidantes, citotóxicas, cicatrizantes y antimicrobianas (incluyendo aquí a las bacterias multirresistentes), entre otras (Bombardelli y Morazzoni 1995; Butterweck *et al.* 1997; Axarlis *et al.* 1998; Jakovljević *et al.* 2000; Barnes *et al.* 2001; Flausino *et al.* 2002; Mattace Raso *et al.* 2002; Rodríguez-Landa y Contreras 2003; Linde y Knüppel 2005; Randløv *et al.* 2006; Öztürk *et al.* 2007; Šavikin *et al.* 2007; Sosa *et al.* 2007; Kasper *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Uchida *et al.* 2008).

Así pues, frutos del trabajo llevado a cabo en nuestro laboratorio con diferentes especies de *Hypericum* de las Islas Canarias han sido las publicaciones realizadas en diversas revistas internacionales, encontrado interesantes actividades antibacteriana, analgésica, antiinflamatoria y antidepresivas para estas especies (Herrera *et al.* 1996; Prado *et al.* 2002; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2005; Rabanal *et al.* 2005; Sánchez-Mateo *et al.* 2005, 2006a, 2006b, 2006c, 2007; Bonkanka *et al.* 2008; Sánchez-Mateo *et al.* 2009; Bonkanka *et al.* 2011; Sánchez-Mateo *et al.* 2015 *in press*).

Dado los interesantes resultados encontrados con estas especies de hipéricos canarios, decidimos continuar la línea de investigación realizada hasta ahora centrándonos en el presente trabajo en el estudio de sus actividades antioxidantes, citotóxicas y antimicrobianas frente a bacterias multirresistentes, propiedades que han sido ampliamente demostradas en el *Hypericum perforatum* (ver capítulo 2. *Revisión bibliográfica*) y que no han sido estudiadas hasta la fecha en los hipéricos del Archipiélago Canario.

Para ello, en primer lugar, se obtuvieron diferentes extractos de tres especies de hipérico canarios, *H. canariense*, *H. grandifolium* y *H. reflexum* (este último, recolectado en dos puntos diferentes de la isla de Tenerife). Posteriormente, se analizó el perfil fitoquímico con técnicas analíticas como el HPLC y la cromatografía de gases, y se realizaron los ensayos necesarios para determinar la eficacia de estos extractos como antioxidantes (con pruebas como DPPH,

ABTS y FRAP), citotóxicos (frente a tres líneas celulares de tumores humanos) y antimicrobianos frente a diferentes cepas de bacterias multirresistentes.

II.4. Proyección internacional de los resultados

Cabe subrayar que con parte de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral hemos podido realizar una serie de publicaciones, lo que avala a nivel internacional el trabajo realizado en nuestros laboratorios hasta la fecha (ver apartado 0.I *Publicaciones*).

Debemos hacer una mención especial a la posibilidad que hemos tenido de colaborar con el grupo de *Food Chemistry* de la “Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute” de la “Università degli Studi di Camerino” (Italia), en la cual se realizó una fructífera estancia bajo la dirección del Profesor Sauro Vittori. Además, gracias a esta colaboración internacional, hemos podido realizar investigaciones paralelas con otras plantas endémicas de Canarias, las cuales han dado como fruto la presentación de pósters y comunicaciones en Congresos Internacionales así como la publicación de artículos en revistas de impacto (Venditti *et al.* 2014; Zorzetto *et al.* 2014b; Zorzetto *et al.* 2015a).

III.

JUSTIFICACIÓN y OBJETIVOS

Las investigaciones en productos naturales siguen siendo una de las principales vías para descubrir nuevos compuestos bioactivos con aplicaciones farmacéuticas o agroquímicas. Como es sabido, uno de los factores limitantes de la industria farmacéutica es encontrar nuevas moléculas de diversidad estructural, y, en este contexto, la importancia de los productos naturales es casi ilimitada, teniendo en cuenta que presentan una gran variedad estructural y que queda una parte considerable de productos presentes en la naturaleza que todavía no se han identificado (Gil Ruiz 2002).

El interés experimentado por la investigación en este campo va paralelo también al desarrollo y disponibilidad, por una parte, de una serie de nuevos bioensayos, y, por otra, de métodos más eficaces de aislamiento, separación y purificación. Asimismo, el avance de los métodos espectroscópicos ofrece una amplia gama de herramientas con las que abordar el problema de la elucidación estructural (Gil Ruiz 2002).

Sobre la base de estas premisas, desde hace varios años el grupo de investigación del que formo parte ha venido realizando un amplio estudio encaminado a poner de manifiesto las posibles actividades farmacológicas de diferentes especies de la rica flora silvestre de las Islas Canarias, con el fin de contribuir al estudio de los recursos naturales de interés terapéutico de nuestro Archipiélago y establecer nuevas fuentes de especies botánicas y de productos naturales con actividades farmacológicas de interés que puedan resolver (aunque sea parcialmente) algunos de los problemas con que se enfrenta hoy la terapéutica.

Dado el gran interés suscitado en los últimos años por las especies del género *Hypericum*, y, en particular *Hypericum perforatum* que ha demostrado tener interesantes propiedades farmacológicas (antidepresivas, analgésicas, antibacterianas y citotóxicas, entre otras) (Bombardelli y Morazzoni 1995; Butterweck *et al.* 1997; Axarlis 1998; Schulz *et al.* 1998; Jakovljević *et al.* 2000; Barnes *et al.* 2001; Flausino *et al.* 2002; Mattace Raso *et al.* 2002; Prado *et al.* 2002; Rodríguez-Landa y Contreras 2003; Avato 2005; Crockett *et al.* 2005; Linde y Knüppel 2005; Randløv *et al.* 2006; Öztürk *et al.* 2007; Šavikin *et al.* 2007; Sosa *et al.* 2007; Kasper *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Uchida *et al.* 2008; Saddiqe *et al.* 2010; Crockett y Robson 2011; Negi *et al.* 2013; Wölffe *et al.* 2014), nuestro grupo de investigación ha venido realizando

desde hace varios años el estudio de las potenciales propiedades farmacológicas de diferentes especies de *Hypericum* de las Islas Canarias, que se han utilizado en la medicina popular canaria en forma de infusión, cataplasma o cocidos como sedante, diuréticos, vermífugos, antihistéricos y antidepresivos, así como para cicatrizar y curar heridas de la piel (Darias *et al.* 1986, 1989; Pérez de Paz y Hernández Padrón 1999). Frutos de esta investigación han sido varias publicaciones donde se han puesto de manifiesto las propiedades antibacteriana, analgésica, antiinflamatoria y antidepresivas para cuatro de estas especies, *Hypericum canariense* L., *Hypericum glandulosum* Aiton, *Hypericum grandifolium* Choisy e *Hypericum reflexum* L. f. (Herrera *et al.* 1996; Prado *et al.* 2002; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2005; Rabanal *et al.* 2005; Sánchez-Mateo *et al.* 2005, 2006a, 2006b, 2006c, 2007; Bonkanka *et al.* 2008; Sánchez-Mateo *et al.* 2009; Bonkanka *et al.* 2011; Sánchez-Mateo *et al.* 2015 *in press*), que corroboran algunos de los usos populares de estas plantas.

En este contexto, y teniendo en cuenta los interesantes resultados obtenidos con las especies de hipéricos canarios en trabajos previos, la presente Tesis Doctoral continúa con esta línea de investigación estudiando en más profundidad tanto desde el punto de vista fitoquímico como farmacológico tres especies del género *Hypericum* empleadas en la medicina popular canaria, *Hypericum canariense* L., *Hypericum grandifolium* Choisy e *Hypericum reflexum* L. f. Dado que otras especies del género *Hypericum* han mostrado actividades antioxidantes, citotóxicas y antimicrobianas frente a bacterias multirresistentes, y que estas acciones no han sido estudiadas (que nosotros tengamos conocimiento) en los hipéricos de las Islas Canarias, nos centramos en el presente trabajo en el estudio de dichas actividades.

En esta Tesis Doctoral se ha emprendido un proyecto de investigación interdisciplinar, interdepartamental e internacional cuyo objetivo fundamental es el estudio fitoquímico de diferentes extractos obtenidos de las especies de hipéricos seleccionadas y la evaluación de sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y bacterias multirresistentes, así como citotóxicas frente a diferentes líneas de células tumorales, con el propósito de avalar algunos de sus usos populares e identificar, si es posible, los principios responsables de dicha acción.

El objetivo general propuesto en el párrafo anterior se pretende alcanzar por medio de una serie de actividades que se describen a continuación:

- Preparar los diferentes extractos de las especies de *Hypericum* bajo investigación: aceite esencial, extracto Soxhlet, extracto metabólico, así como fraccionamiento de éste último (fracción clorofórmica y polar).

- Identificar una serie de metabolitos secundarios característicos de los hipéricos en los extractos de las plantas investigadas mediante técnicas cromatográficas de alta eficacia (HPLC-DAD y HPLC/ESI-MS).
- Identificar los compuestos volátiles en los aceites esenciales de las especies investigadas mediante GC-MS y GC-FID.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos y aceites esenciales por medio de tres pruebas específicas: capacidad atrapadora del radical libre DPPH, reacción con el radical ABTS^{•+} y medida de la capacidad reductora del hierro (FRAP), así como determinar el contenido en fenoles totales en los diferentes extractos mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.
- Estudiar las actividades antimicrobianas de los diferentes extractos frente a diferentes bacterias Gram positivas, Gram negativas y multirresistentes (SARM y BLEE) mediante los métodos de difusión en agar y de microdilución para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM).
- Determinar la potencial citotoxicidad de los extractos en estudio frente a tres líneas celulares tumorales, A375 (melanoma humano), MDA-MB 231 (carcinoma mamario humano), HCT116 (carcinoma humano de colon), mediante el método colorimétrico MTT.
- Intentar establecer posibles relaciones entre las actividades encontradas, los compuestos identificados y los usos populares a partir de los resultados obtenidos.



2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Página anterior: *Hypericum canariense* L. var. *floribundum* (Aiton) Bornm.
[Imagen disponible en <http://www.jardincanario.org/inicio>, web del Jardín Botánico Viera y Clavijo de Gran Canarias].

I. GÉNERO *HYPERICUM*

I.1. Clasificación taxonómica, descripción botánica y usos populares

El taxón *Hypericum* (familia Hypericaceae, orden Theales) consta de 469 especies — entre hierbas, arbustos y árboles (en el caso de algunas especies extraeuropeas) — distribuidas en todo el mundo (menos en Antártida), siendo nativas o habiendo sido introducidas con finalidad ornamental. Viven en una gran variedad de hábitats: regiones templadas, altas montañas y trópicos, evitando solo las zonas con condiciones extremas de aridez, temperatura y/o salinidad. Estudios monográficos han llevado a la división del género en 36 secciones taxonómicas, caracterizándose cada una por su propio perfil morfológico, biogeográfico y químico (Crockett y Robson 2011). De todas las especies descritas, 61 se encuentran en Europa y, más específicamente, 26 en España (Nogueira *et al.* 2008; Arechavaleta *et al.* 2010).

Las plantas tienen hojas opuestas y simples y en muchas ocasiones presentan glándulas. Las flores son amarillas, solitarias o en cimas ramificadas; están compuestas por 5 sépalos, 5 pétalos y numerosos estambres que a menudo están unidos en haces por la base. El ovario es súpero, con 3 o 5 estilos. Los frutos son cápsulas que a veces son carnosas. Las semillas, numerosas, son muy pequeñas y de color marrón (Ramos 1984; Bramwell y Bramwell 2001). Florece en la época del solsticio de verano, llegando así a llamarse hierba de San Juan (*St John's Wort*). En el Medioevo, se solía colocar unos ramos de este hipérico suspendidos encima de las imágenes sagradas para ahuyentar a los malos espíritus, lo que explica que el nombre de género proceda etimológicamente del griego (*hyper* [encima] y *eikón* [imagen]) (Bruneton 2004).

Mención especial merecen los dos tipos de glándulas identificadas en los hipéricos, debido a que están directamente implicadas en la producción y almacenamiento de algunos metabolitos secundarios fundamentales para el perfil fitoquímico de esta planta: las glándulas oscuras (o negras) y las glándulas translúcidas. Las primeras están formadas por un grupo de células especializadas y muestran un color que va de rojizo a negro. Estas glándulas se han observado en dos tercios de las especies de hipéricos descritas (de ahí que se consideren útiles para la taxonomía de los hipéricos), estando presentes, en proporciones variables, en todas la

partes aéreas de la planta. Su número y tamaño es directamente proporcional al contenido en naftodiantronas, las cuales se almacenan (y probablemente también se sintetizan) en dichas estructuras anatómicas (Crockett y Robson 2011; Akhtar *et al.* 2014). A tal propósito, se ha demostrado que las naftodiantronas, dependiendo de su concentración, son las responsables del color (de rojizo a negro) de las glándulas que las almacenan (Crockett y Robson 2011). El segundo tipo, constituido por las glándulas translúcidas, con un color que va de transparente (por la presencia de aceites esenciales) a ámbar (por las resinas), están formadas por espacios intercelulares esquizógenos y segregan aceites esenciales y derivados del floroglucinol (como la hiperforina). A simple vista se aprecian como puntos transparentes al mirar una hoja de hipérico a contraluz, dándole el nombre de *Hypericum perforatum* a la especie más investigada del género debido a esta característica (Ramos 1984; Crockett *et al.* 2005; Crockett y Robson 2011).

El *Hypericum perforatum* es una planta medicinal muy conocida que se ha usado en medicina tradicional desde la antigüedad para tratar una gran variedad de afecciones, tales como curación de heridas, infecciones urinarias y para aliviar los desórdenes del sistema nervioso (Bombardelli y Morazzoni 1995; Barnes *et al.* 2001; Avato 2005).

I.2. Composición química

La composición química de la sumidad florida del *Hypericum perforatum* ha sido estudiada en profundidad en los últimos años, habiéndose identificado numerosos componentes relacionados con su actividad biológica (Bruneton 2004; Crockett *et al.* 2005).

Tradicionalmente, se ha considerado que en los extractos hidroalcohólicos de las partes aéreas de hipérico existen cinco grupos fundamentales de compuestos:

1. Naftodiantronas [principalmente hipericina **(1)** y pseudohipericina **(2)** (0.06-0.15 %) que son las principales responsables de la coloración de las glándulas oscuras presentes en hojas y flores del hipérico; además cabe recordar que en la planta fresca se encuentra protohipericina **(3)** y protopseudohipericina **(4)**].
2. Derivados prenilados del floroglucinol: hiperforina **(5)** (2-4.5 %) y adhiperforina **(6)** presentes en flores y frutos maduros.
3. Flavonoides (2-4 %): especialmente luteolina **(7)**, kaenferol **(8)**, quercetina **(9)** y heterósidos de quercetina [quercitrina **(10)**, hiperósido **(11)**, isoquercitrina **(12)**, rutina **(13)**].
4. Compuestos fenólicos, como el ácido cafeico y el clorogénico **(14)**.

5. Biflavonoides, concentradas en las flores: I3,II8-biapigenina (**20**) y I3',II8-biapigenina (**21**) (i.e. amentoflavona, 0.01-0.05 %).

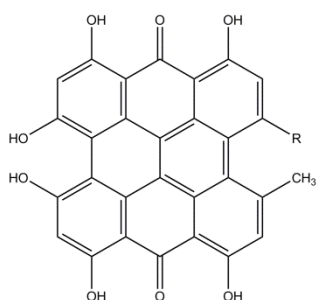
Además, en menor cantidad, se han encontrado en el *Hypericum perforatum* algunas xantonas (en los tallos floridos), taninos, diterpenos, triterpenos, carotenoides, esteroides y aminoácidos (Bombardelli y Morazzoni 1995; Nahrstedt y Butterweck 1997; Schulz *et al.* 1998; Barnes *et al.* 2001; Bruneton 2001; Buendía Sánchez 2000; Vanaclocha y Cañigüeral 2003; Saddiqe *et al.* 2010).

Asimismo, la especie de *Hypericum perforatum* tiene una pequeña cantidad de aceite esencial (0.1 a 0.35 % de la droga seca), que contiene, mayoritariamente, hidrocarburos alifáticos (2-metil-octano, *n*-nonano, *n*-decano, *n*-undecano) y terpénicos [α -pineno (**15**), β -pineno (**16**), (*E*)-cariofileno (**17**), α -cadinol (**18**), δ -cadineno (**19**), β -farneseno, humuleno, germacreno D] (Avato 2005; Hostettmann y Wolfender 2005; Crockett 2010; Saddiqe *et al.* 2010).

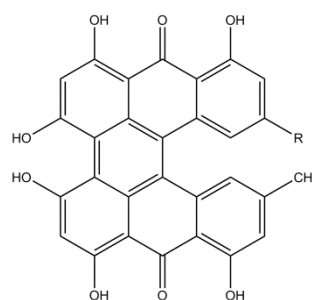
Por otro lado, se ha encontrado en algunos estudios que el contenido de algunos de estos compuestos, como hipericina, fenoles o flavonoides, sufre variaciones según el ciclo biológico de la planta, observándose que el momento en que la planta produce mayores cantidades de estos compuestos es el período de floración (Toker 2009) y que el contenido de polifenoles aumenta (> 12 %) en las yemas (justo antes de la floración) y en las plantas que crecen en zonas geográficas de mayor altitud (Avato 2005; Cimpoi 2006). Además, se sabe que la concentración de los metabolitos secundarios varía en función de factores como el origen geográfico de las plantas o la época del año (se ha descrito una disminución de las naftodiantronas y un aumento de los derivados de floroglucinol desde el momento de la floración hasta la fructificación de la planta). También hay que tener en cuenta el proceso de secado, la conservación del material desecado y si se trata de plantas cultivadas o silvestres (Hostettmann y Wolfender 2005; Bagdonaitė *et al.* 2012; Wölflle *et al.* 2014).

En el caso de las naftodiantronas, uno de los compuestos característicos del género *Hypericum*, encontramos que si bien las más abundantes del grupo son hipericina y pseudohipericina, se han aislado por lo menos cuatro derivados más, ciclopseudohipericina, isohipericina, protohipericina y protopseudohipericina. Estas dos últimas se encuentran en mayor cantidad en plantas sin desecar, aunque debido a su inestabilidad a la luz, son convertidas rápidamente en las más estables hipericina y pseudohipericina (Avato 2005; Hostettmann y Wolfender 2005; Karioti y Bilia 2010; Saddiqe *et al.* 2010).

NAFTODIANTRONAS

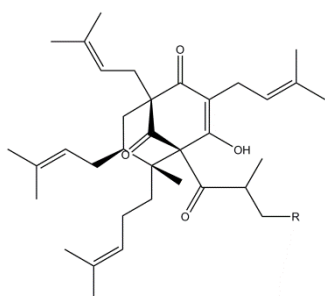


$R = CH_3$, hipericina (1)
 $R = CH_2OH$, pseudohipericina (2)



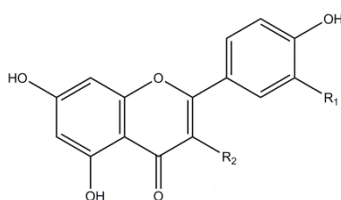
$R = CH_3$, protohipericina (3)
 $R = CH_2OH$, protopseudohipericina (4)

DERIVADOS PRENILADOS DEL FLOROGLUCINOL



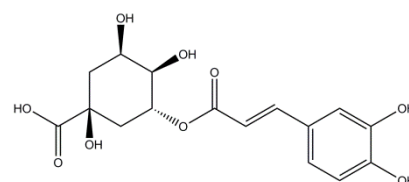
$R = H$, hiperforina (5)
 $R = CH_3$, adhiperforina (6)

FLAVONOIDES



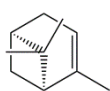
$R_1 = OH, R_2 = H$; luteolina (7)
 $R_1 = H, R_2 = OH$; kaenferol (8)
 $R_1 = OH, R_2 = OH$; quercetina (9)
 $R_1 = OH, R_2 = O-Rha$; quercitrina (10)
 $R_1 = OH, R_2 = O-Gal$; hiperósido (11)
 $R_1 = OH, R_2 = O-Glc$; isoquercitrina (12)
 $R_1 = OH, R_2 = O-Glc(6 \leftarrow 1)Rha$; rutina (13)

COMPUESTOS FENÓLICOS

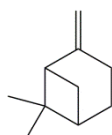


ácido clorogénico (14)

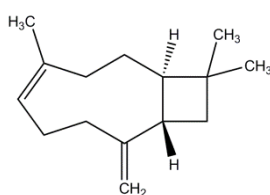
MONOTERPENOS y SESQUITERPENOS



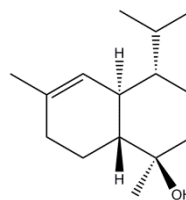
α -pineno (15)



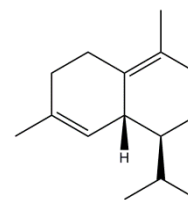
β -pineno (16)



(E)-cariofileno (17)

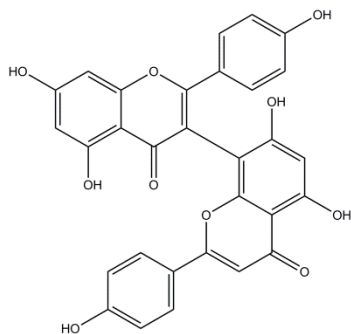


α -cadinol (18)

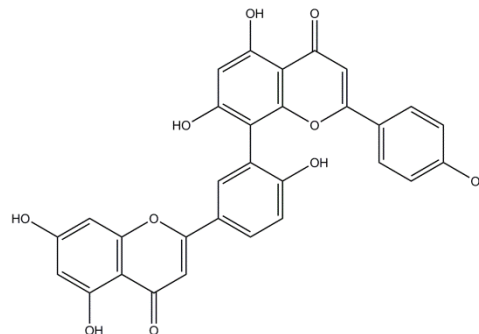


δ -cadineno (19)

BIFLAVONOIDES



13, 118-biapigenina (20)



1'3, 118-biapigenina (amentoflavona) (21)

Figura 2.1. Estructuras de algunos compuestos de las partes aéreas del género hiperico.

Esta última, a su vez y bajo determinadas condiciones, es convertida a ciclo pseudohipericina (Avato 2005; Karioti y Bilia 2010). De hecho, estos seis compuestos mencionados son denominados, en conjunto, por algunos autores como “hipericinas totales” (Barnes *et al.* 2001).

Por otro lado, se ha observado que en las flores y las hojas la concentración de hipericina y pseudohipericina varía en función del estadio evolutivo de la planta (0.03 % a 0.3 % de peso seco), habiéndose descrito en algunas especies una concentración hasta cuatro veces superior de pseudohipericina que de hipericina (Avato 2005; Karioti y Bilia 2010; Saddiqe *et al.* 2010; Crockett y Robson 2011). Si bien se ha considerado que la hipericina siempre se encontraba en hipéricos en floración, esto no parece ser una constante en todas las secciones que componen el género *Hypericum*, existiendo de hecho algunas de ellas que no la producen (Hostettmann y Wolfender 2005; Crockett y Robson 2011).

Conviene señalar que las naftodiantronas se han considerado las responsables del color (de negro a rojizo dependiendo de la concentración) de las glándulas que las almacenan, habiéndose observado una correlación estadísticamente significativa entre el número de glándulas negras y la cantidad de hipericina en ellas contenida (Çirak 2007a, 2007b; Crockett y Robson 2011). No obstante, se ha descubierto que no son los únicos compuestos implicados en la coloración de esas estructuras anatómicas, ya que existen otros metabolitos secundarios (como algunos dímeros de antraquinonas identificado en *Hypericum perforatum*) que podrían actuar como pigmentos (Crockett y Robson 2011).

La composición de los aceites esenciales es muy sensible a factores de variabilidad, como el origen botánico, el desarrollo vegetativo, las condiciones ambientales, las características del cultivo, el momento de recolección y hasta el procedimiento de obtención (Kuklinski 2000; Figueiredo *et al.* 2008; Barra 2009; Miguel 2010a, 2010b; Amorati 2013). De modo que, se ha llegado a decir que para conseguir una composición de aceite esencial constante en el tiempo hay que realizar el extracto bajo las mismas condiciones, a partir del mismo órgano vegetal y que la planta haya crecido en el mismo suelo, en las mismas condiciones climáticas y que se recolecte en la misma época del año (Bakkali *et al.* 2008; Guedes *et al.* 2012).

De hecho, las diferencias químicas en la composición de los aceites esenciales se han utilizado para confirmar las distintas variedades de una misma especie. En el caso de las especies de hipérico, los aceites esenciales han demostrado ser buenos marcadores quimiotaxonómicos del género (Avato 2005). Un ejemplo interesante se encuentra en la investigación realizada con dos variedades de *Hypericum perforatum* recolectado en Serbia, donde en una de ellas se produce α - y β -himachaleno, mientras que en la otra no (Hostettmann y

Wolfender 2005; Crockett 2010). Además, destacan los trabajos realizados para aclarar la taxonomía de las especies y variedades de *Hypericum* del centro de Italia recurriendo al uso de los aceites esenciales como marcadores taxonómicos (Maggi *et al.* 2004; Sagratini *et al.* 2008; Maggi *et al.* 2010a, 2010b, 2010c).

No obstante, también se han detectado diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición de individuos de poblaciones de diferentes localidades, sin que por ellos se clasifiquen en taxones distintos. Se observó, por ejemplo, que plantas de la misma especie recolectadas en la misma región geográfica, aumentan el contenido en monoterpenos y sesquiterpenos en sus aceites esenciales según vaya aumentando la altitud de la zona de recolección, y que, además, producen un aceite esencial más rico en compuestos alifáticos estando en zonas más cercanas al nivel del mar. Así que estas variabilidades se asocian más a adaptaciones al medio ambiente por parte de la planta que a verdaderas diferencias taxonómicas entre ellas (Crockett 2010). Asimismo, en los resultados de algunos estudios se han indicado diferencias a nivel de síntesis en tipos de terpenos según el órgano de la planta analizado (más concretamente en el caso del hipérico: flores y hojas) (Crockett 2010; Saddiqe *et al.* 2010; Guedes *et al.* 2012).

En la actualidad, además de realizar investigaciones centradas en obtener datos sobre un metabolito secundario en concreto, ha crecido el número de investigaciones con el objetivo de obtener un *fingerprint* (“huellas dactilares”) de una especie mediante métodos cromatográficos (como el HPLC o cromatografía de gases), es decir, una serie de compuestos que sirvan de biomarcadores para diferenciar taxonómicamente una especie (incluyendo a los rangos inferiores, como las subespecies, variedades o poblaciones) de las otras (Wagner *et al.* 2001; Crockett *et al.* 2005; Nicoletti 2011; Agatonovic-Kustrin *et al.* 2015).

Con el fin de definir el perfil químico del género *Hypericum*, se ha propuesto un conjunto de diez metabolitos secundarios, como posible “*fingerprint*”: flavonoides (rutina, hiperósido, isoquercitrina, quercitrina y quercetina), biflavonoides (I3,II8-biapigenina y amentoflavona), naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina) y un derivado de acilfloroglucinol (hiperforina) (Crockett *et al.* 2005; Crockett y Robson 2011).

Para llevar a cabo la caracterización de *Hypericum perforatum*, algunas publicaciones oficiales, como la Farmacopea Francesa, recomiendan realizar un análisis por CCF de un extracto metanólico que determine la presencia de hiperósido y, gracias a su fluorescencia, de hipericina, pseudohipericina y de ácido clorogénico (Bruneton 2001). A este mismo análisis, la monografía de la OMS sobre hipéricos incluye también la detección del hiperósido, además de aconsejar la utilización del HPLC para la identificación de hiperforina y rutina que son

consideradas como marcadores quimiotaxonómicos para diferenciar el *Hypericum perforatum* de otros *Hypericum* spp. (WHO 2002).

Cabe mencionar que, aunque la especie *Hypericum perforatum* es la especie más estudiada (tanto desde el punto de vista químico como farmacológico) debido a su amplio uso en terapéutica, en los últimos años han aumentado las investigaciones con otras especies del género. Si bien se ha confirmado en estas especies actividades biológicas y perfiles químicos semejantes a los del *Hypericum perforatum*, cada una de ellas (como era de esperar) presenta sus propias peculiaridades (Decosterd *et al.* 1991; Öztürk *et al.* 1996; Pistelli *et al.* 2000; Cakir *et al.* 2003; Dall'Agnol *et al.* 2003; Do Rego *et al.* 2007; Radulović *et al.* 2007; Šavikin *et al.* 2007; Bonkanka *et al.* 2008; Crockett *et al.* 2008; Perazzo *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Maggi 2010a, 2010b, 2010c; Quassinti *et al.* 2013b; Stojanović *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014). Dado la considerable cantidad de trabajos relacionados con la composición química de las diferentes especies del género *Hypericum* encontrada al realizar esta revisión bibliográfica, hemos decidido no incluirlos en este apartado, y sólo mencionar en la sección *Discusión* aquellos que estén relacionados con los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico realizado en la presente Tesis Doctoral.

Finalmente, es interesante destacar que, aunque se han realizado investigaciones fitoquímicas con al menos una especie perteneciente a cada unas de las 36 secciones que forman el género *Hypericum*, se estima que el 60% de los metabolitos secundarios de estas plantas son aún desconocidos (Crockett y Robson 2011).

I.3. Actividades farmacológicas

La especie *Hypericum perforatum* ha demostrado en los últimos años poseer interesantes propiedades antidepressivas tanto en experimentación animal como clínica, por lo que ha recibido una atención especial. De hecho, existen numerosos estudios clínicos realizados con preparados comerciales de extractos de esta especie que han demostrado ser efectivos para el tratamiento de depresiones de leves a moderadas, presentando un perfil favorable de efectos adversos y siendo, por lo tanto, una valiosa alternativa a los tratamientos con antidepressivos de síntesis (Bombardelli y Morazzoni 1995; Butterweck *et al.* 1997; Schulz *et al.* 1998; Brenner *et al.* 2000; Barnes *et al.* 2001; Bruneton 2001; Greeson *et al.* 2001; Schulz 2001; Prado *et al.* 2002; Schulz 2002; Rodríguez-Landa y Contreras 2003; Linde y Knüppel 2005; Randløv *et al.* 2006; Kasper *et al.* 2008; Gastpar 2013; Rahman 2013; Grobler *et al.* 2014). Tanto

es así, que la sumidad florida desecada de este hipérico se prescribe habitualmente en Alemania en el tratamiento de depresiones moderadas, bajo forma de extracto estandarizado (Bruneton 2001).

Además de sus efectos a nivel cerebral, se han estudiado y confirmado otras acciones biológicas, tales como la antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, antitumoral, antiviral, antimicótica y antiinflamatoria, siendo útiles en el tratamiento de numerosas afecciones, entre las que podemos citar el tratamiento de heridas, eccemas, o los desordenes gastrointestinales y psicológicos (Bombardelli y Morazzoni 1995; Butterweck *et al.* 1997; Axarlis 1998; Schulz *et al.* 1998; Jakovljević *et al.* 2000; Barnes *et al.* 2001; Flausino *et al.* 2002; Mattace Raso *et al.* 2002; Prado *et al.* 2002; Rodríguez-Landa y Contreras 2003; Avato 2005; Crockett *et al.* 2005; Linde y Knüppel 2005; Randløv *et al.* 2006; Öztürk *et al.* 2007; Šavikin *et al.* 2007; Sosa *et al.* 2007; Kasper *et al.* 2008; Silva *et al.* 2008; Uchida *et al.* 2008; Saddiqe *et al.* 2010; Crockett y Robson 2011; Negi *et al.* 2013; Wölflle *et al.* 2014).

Debido al gran interés que ha suscitado la especie de *Hypericum perforatum*, se han investigado otras muchas especies del género, habiéndose encontrado para un gran número de ellas acciones farmacológicas tales como: antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes, hepatoprotectoras, analgésicas, antiinflamatorias y/o antidepresivas (Prado *et al.* 2002; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002; Cakir *et al.* 2003; Dall'Agnol *et al.* 2003; Rabanal *et al.* 2005; Sánchez-Mateo *et al.* 2005, 2006; Do Rego *et al.* 2007; Radulović *et al.* 2007; Sánchez-Mateo *et al.* 2007; Bonkanka *et al.* 2008; Crockett *et al.* 2008; Perazzo *et al.* 2008; Wang *et al.* 2008; Sánchez-Mateo *et al.* 2009).

Con respecto a los posibles metabolitos secundarios responsables de las actividades farmacológicas encontradas en las especies del género *Hypericum*, la atención de los investigadores se centró, en un principio, en las naftodiantronas hipericina y pseudohipericina, que fueron consideradas durante mucho tiempo los principios activos más importantes y casi únicos del hipérico. No obstante, se ha confirmado que otros metabolitos secundarios contribuyen también a las actividades farmacológicas mostradas por estas especies, tales como flavonoides, derivados del floriglucinol (especialmente la hiperforina) y xantonas. Todos ellos, en conjunto, son los principios activos responsables de acciones farmacológicas como la antidepresiva, la antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, antitumoral, antiviral y antiinflamatoria, espasmolítica, cicatrizante, entre otras (Butterweck *et al.* 2000; Barnes *et al.* 2001; Butterweck *et al.* 2003; Avato 2005; Hostettmann y Wolfender 2005; Beerhues 2006; Medina *et al.* 2006; Saddiqe *et al.* 2010; Negi *et al.* 2013; Akhtar *et al.* 2014; Wölflle *et al.* 2014).

II.

EL GÉNERO *HYPERICUM* EN LAS ISLAS CANARIAS

II.1. Clasificación taxonómica, descripción botánica y usos populares

De las 26 especies del género *Hypericum* que se encuentran en España, en las Islas Canarias crecen 8 de ellas: *Hypericum canariense* L., *Hypericum coadunatum* C. Sm. ex Link, *Hypericum glandulosum* Aiton, *Hypericum grandifolium* Choisy (citado en algunas obras como *Hypericum inodorum* Miller [Kunkel 1991]), *Hypericum humifusum* L., *Hypericum perfoliatum* L., *Hypericum perforatum* L., *Hypericum reflexum* L. f. Todas son nativas, siendo dos de ellas además endémicas (*Hypericum coadunatum* e *Hypericum reflexum*) (Arechavaleta *et al.* 2010).

Centrando nuestra atención en las especies objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, se sabe que el *Hypericum canariense* se localiza en todas las islas excepto en las más Orientales (Lanzarote y Fuerteventura), además de haberse naturalizado en otros sitios, como Hawái, California y la parte occidental de Australia. Asimismo, ejemplares de *Hypericum grandifolium* se han descrito en todas las Islas, mientras que el *Hypericum reflexum* solo se encuentra en La Gomera, Tenerife y Gran Canaria (Robson 1996; Dlugosch 2008a, 2008b; Arechavaleta *et al.* 2010; Nürk y Crockett 2011; Frey *et al.* 2015). Cada uno de ellos se cataloga en una sección diferente: *Webbia* de la cual el *Hypericum canariense* es el único representante, *Androsaemum* para el *Hypericum grandifolium* y *Adenosepalum*, subsección *Adenosepalum*, para el *Hypericum reflexum* (Robson 1996; Crockett y Robson 2011; Nürk y Crockett 2011; Pilepić 2011; Nürk *et al.* 2013).

Debemos señalar que algunos autores han descrito la existencia de variedades para dos de las especies en estudio, el *Hypericum canariense* y el *Hypericum reflexum*. Con respecto al primero (*Hypericum canariense*), algunos análisis genéticos recientes, llevados a cabo con plantas recolectadas en varios lugares de las islas donde crece, indican la existencia de dos variedades: *canariense* en La Gomera, El Hierro y Tenerife, y *floribundum* en Gran Canaria y La Palma (Kunkel 1991; Robson 1996; Dlugosch y Parker 2007; Dlugosch 2008a, 2008b; Nürk *et al.* 2013). Por el contrario, otros estudios no han podido establecer diferencias algunas entre los individuos de la especie (Bramwell 2014). De momento, hasta que no se arroje luz sobre el tema

con estudios definitivos, para la realización de la revisión bibliográfica hemos decidido indicar la procedencia geográfica del hipérico citado.

Con respecto al segundo (*Hypericum reflexum*), se han descrito algunas variedades especialmente en las islas centrales del Archipiélago, aunque no confirmadas de manera concluyente hasta la fecha (Kunkel 1991; Bramwell 2014). En el catálogo oficial de especies silvestres de Canarias, se recogen los nombres de tres posibles variedades: *leiocladum*, *lanuginosum* y *reflexum* (Arechavaleta *et al.* 2010). En la investigación monográfica de Robson sobre los hipéricos, en lugar de una variedad *reflexum*, se indica otra, la *myrtillifolium* (citada como *myrtifolium* en la web del Cabildo de Gran Canaria) y se mantienen las otras dos ya nombradas, *leiocladum* y *lanuginosum*. Según la clasificación que se propone en la web del Cabildo de Gran Canaria para el Jardín Botánico “Viera y Clavijo”, la variedad *myrtillifolium* se nombraría *myrtifolium*, se mantendría la denominación de *leiocladum* y se propondría la *lanuginosum* como sinónimo de la variedad *reflexum*. Ejemplares de la variedad *leiocladum* (que difieren de todas las demás por tener las ramas glabras) se habrían descrito en Gran Canaria, mientras que algunos ejemplares de las variedades *lanuginosum* (= *reflexum*) y *myrtillifolium* en Tenerife y Gran Canaria. La diferencia morfológica entre estas últimas dos variedades consiste en que la segunda presenta hojas ovaladas a ovalado elíptico, mientras que la primera tiene hojas elíptico-lanceoladas (Robson 1996; JBVC 2013).

Por lo que respecta a la presencia de las glándulas típicas de los hipéricos, cada una de las especies investigadas tiene su peculiaridad. Así, en las hojas de *Hypericum canariense*, tanto de plantas cultivadas *in vitro* como recolectadas *in situ* (Tenerife y Gran Canaria), se identificaron unas glándulas secretoras de color rojo oscuro contenidas en el parénquima de las mismas (Mederos-Molina 2002). Sin embargo, este dato se puso en duda por otros investigadores que no encontraron glándulas oscuras en las hojas de especies recolectadas en Portugal, pero si describieron la presencia de glándulas translúcidas (identificándose en su interior ácidos grasos, aceites esenciales y alcaloides) (Costa 2010; Nürk y Crockett 2011). En las hojas del *Hypericum grandifolium* recolectadas en Portugal, se describió mediante el uso de técnicas de microscopía la presencia de glándulas translúcidas, declarando ausentes las glándulas negras (Costa 2010). Solo en el *Hypericum reflexum* se ha descrito con seguridad la presencia de glándulas oscuras en los márgenes de las hojas, siendo, además, una característica común de muchas especies de la sección *Adenosepalum* a la que pertenece (Crockett y Robson 2011).

En las Islas Canarias, las sumidades floridas, hojas y frutos de diferentes especies del género *Hypericum* han sido utilizadas en la medicina popular en forma de infusión, cataplasma o cocidas para el tratamiento de heridas externas, así como sedantes, diuréticos, vermífugos,

antihistéricos y antidepresivo (Darias *et al.* 1986, 1989; Pérez de Paz y Hernández Padrón 1999). Con respecto a los hipéricos seleccionados en la presente Tesis Doctoral, a la especie *Hypericum canariense*, que se le conoce con el nombre de “granadillo”, “grenadillo” o “flor de cruz”, se le atribuyen las siguientes propiedades: vulneraria, diurética, vermífuga, antihistérica y forrajera. Asimismo, del *Hypericum grandifolium* (nombrada “malfurada”, “flor de cruz”, “hierba de San Juan” o “corazoncillo”) se dice que es cicatrizante, antihistérica, sedante, hipocolesterolemianta, pectoral y, finalmente, el *Hypericum reflexum*, al que se le asigna el nombre vulgar de “cruzadilla” o “hierba cruz”, se considera vulnerario, antibacteriano, antipirético, ansiolítico y útil para combatir las hemorragias internas. Además, se recoge en las fuentes bibliográficas que el *Hypericum canariense* y el *Hypericum reflexum* han sido usados como especies tintóreas, sirviendo, el primero para la producción del color amarillo y beige, mientras que no hemos encontrado una cita para un color en concreto en el caso del segundo. Los tres hipéricos se han empleado en forma de infusión y zumo, así como en forma de cataplasma (*Hypericum canariense*, *Hypericum grandifolium*) y de liparolito (*Hypericum reflexum*) (Darias *et al.* 1986, 1989, Pérez de Paz y Hernández Padrón 1999; Bramwell y Bramwell 2001).

II.2. Composición química

Con respecto a la composición química de estas especies, estudios preliminares llevados a cabo por nuestro grupo confirmaron la existencia de antraquinonas, flavonoides y taninos en *Hypericum canariense*, *Hypericum glandulosum*, *Hypericum grandifolium* e *Hypericum reflexum*. Asimismo, dieron positivas las reacciones de identificación de saponinas para todos ellos, menos para *Hypericum canariense* (Sánchez-Mateo *et al.* 2006a, 2006b, 2006c).

Es necesario señalar que existen datos contradictorios sobre la presencia de hipericina y otras naftodiantronas en los hipéricos canarios seleccionados. Probablemente, tales diferencias, se deben a que en algunos casos las plantas utilizadas fueron recogidas directamente en el archipiélago Canario en su hábitat natural, mientras que en otros se recurrió a cultivos de las mismas, realizados en laboratorio o en jardines en condiciones geográficas y ambientales diferentes a las del lugar de origen. Esto hace que pueda haber variabilidad en la producción de algunos metabolitos secundarios por parte de la planta (Bruneton 2001).

Así, se ha descrito la presencia de hipericina en un extracto obtenido con diclorometano de ejemplares de *Hypericum canariense* cultivados *in vitro*, procedentes de plantas previamente recolectadas en Tenerife y Gran Canaria (Mederos-Molina 2002). En otro estudio, se detectó en

plantas de *Hypericum canariense* cultivadas *in vitro*, además de hipericina, otras dos naftodiantronas: pseudohipericina y protohipericina (Klejduš 2013). No obstante, estos datos hay que tomarlos con cautela, ya que no se ha podido confirmar la presencia de glándulas oscuras en esta especie, la estructura que en mayor medida almacena, y probablemente sintetiza, las naftodiantronas (Akhtar *et al.* 2014) y, además, parece ser que los hipéricos cultivados no sintetizan hipericina (Crockett y Robson 2011; Nürk y Crockett 2011). Otro factor a tener en cuenta es la posible existencia de dos variedades dentro de la especie *Hypericum canariense* sugerida por algunos autores (Kunkel 1991; Robson 1996; Dlugosch y Parker 2007; Dlugosch 2008a, 2008b; Nürk *et al.* 2013).

Con respecto a la especie *Hypericum reflexum*, los estudios fitoquímicos preliminares realizados por nuestro equipo de investigación no identificaron la hipericina en un extracto metanólico de esta especie recogida en Tenerife (Sánchez-Mateo *et al.* 2006a, 2006b, 2006c). Sin embargo, otros autores si detectaron hipericina y pseudohipericina en las glándulas oscuras de hojas y flores de especies de *Hypericum reflexum* procedentes de cultivos y por medio de una técnica denominada LDI-MSI (*matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometric imaging*) (Hölscher 2009, Fang y Schneider 2014). La presencia de naftodiantronas en *Hypericum reflexum* estaría en concordancia con los datos obtenidos con otras especies de la misma sección (*Adenosepalum*), que tienen como característica intrínseca la producción de naftodiantronas (Kitanov 2001; Crockett y Robson 2011; Nürk y Crockett 2011). Conviene mencionar aquí, que se han propuesto muchos métodos para la extracción y aislamiento de las naftodiantronas y que, en general, se considera que el Soxhlet da mejores resultados que la maceración (Karioti y Bilia 2010), lo cual podría explicar en parte los resultados contradictorios encontrados en los estudios preliminares realizados con el *Hypericum reflexum* canario. Además, hay que tener en cuenta que estos estudios realizados por Hölscher (2009) y Fang y Schneider (2014) se han llevado a cabo con plantas cultivadas, lo cual puede producir variación en la producción de algunos metabolitos secundarios por parte de la planta (Bruneton 2001). También puede causar variaciones el ciclo biológico de la planta (Toker 2009).

Finalmente, en el *Hypericum grandifolium* no se ha detectó ninguna naftodiantrona (hipericina, pseudohipericina, protohipericina y protopseudohipericina) (Crockett *et al.* 2005; Bonkanka *et al.* 2008; Bonkanka *et al.* 2011), coincidiendo estos resultados con otros investigadores que no han hallado hipericina ni pseudohipericina en las especies pertenecientes a la sección *Androsaemum* (Kitanov 2001; Crockett y Robson 2011; Nürk y Crockett 2011).

Con respecto a los derivados prenilados del floroglucinol, en el extracto metanólico de la especie *Hypericum grandifolium* (recolectado en Tenerife) se detectó la presencia de una

pequeña cantidad de hiperforina (< 0.1 mg/g de planta seca), lo cual está en consonancia con los datos obtenidos con otras especies pertenecientes a la sección *Androsaemum*, que han demostrado ser productoras de acilfloroglucinoles (Bonkanka *et al.* 2008; Nürk y Crockett 2011). En el caso de la especie *Hypericum canariense* sólo se ha detectado hiperforina en plantas cultivadas *in vitro*, mientras que para el *Hypericum reflexum* no hay datos disponibles, aunque se sabe que las especies pertenecientes a la sección *Adenosepalum* son productoras de derivados del floroglucinol (Kitanov 2001; Crockett y Robson 2011; Klejdus 2013).

Por otra parte, todas las especies de hipéricos canarios investigados hasta la fecha poseen flavonoides. En el extracto metanólico de *Hypericum grandifolium* recolectado en Tenerife mediante HPLC se encontraron algunos flavonoides (hiperósido, quercetina y quercitrina) mientras que no se detectaron rutina ni I3,II8-biapigenina. La isoquercitrina se ha aislado, de momento, solo en plantas cultivadas de esta especie (Zapesochnaya *et al.* 1967; Crockett *et al.* 2005; Bonkanka *et al.* 2008; Bonkanka *et al.* 2011; Crockett y Robson 2011). Por lo que se refiere a la especie *Hypericum canariense*, además de la presencia de flavonoides en plantas recolectadas en Tenerife (Sánchez-Mateo *et al.* 2006a), se han encontrado asimismo en plantas recolectadas en la Palma, donde se detectaron quercetina, hiperósido y I3,II8-biapigenina (Cardona *et al.* 1989), así como derivados de la quercetina (Díaz 2010). Igualmente, se han identificado diferentes flavonoides en plantas cultivadas de esta especie, como quercetina, hiperósido, quercitrina, I3-II8-biapigenina, astragalina, rutina, luteolina-7-O-glucósido, apigenina-7-O-glucósido, eriodictiol-chalcona y kaenferol (Costa 2010; Díaz 2010; Crockett y Robson 2011; Nürk y Crockett 2011; Klejdus 2013). De la especie *Hypericum reflexum* solamente se ha encontrado un estudio fitoquímico preliminar donde se detectó la presencia flavonoides (Sánchez-Mateo *et al.* 2006a, 2006b, 2006c), aunque es conocido que las especies de la sección *Adenosepalum* (a la cual pertenece) son productora de flavonoides como la quercetina, rutina, hiperósido, quercitrina e isoquercitrina (Kitanov 2001; Crockett y Robson 2011; Nürk y Crockett 2011).

Por otro lado, existen pocos estudios sobre la composición química de los aceites esenciales de las especies de hipérico canarios. Con respecto a *Hypericum canariense*, sólo hemos encontrado información sobre plantas de cultivo en donde los autores realizaban una clasificación de *Hypericum* spp. en dos grandes grupos según el contenido relativo de limoneno: un primer grupo con un elevado contenido en el citado monoterpeno (> 10%) y, en el cual se incluyó al *Hypericum canariense*, y un segundo grupo con un contenido inferior (< 5%) (Mathis y Ourisson 1964; Avato 2005; Bertoli *et al.* 2011). Por otro lado, en las hojas y flores de plantas cultivadas de *Hypericum grandifolium* (citado como *Hypericum inodorum*) se encontró trazas de

aceite esencial (Lotocka y Osinska 2010). Cabe recordar que todas las especies pertenecientes a la sección *Androsaemum* investigadas hasta la fecha han demostrado producir en su fracción volátil elevadas cantidades de hidrocarburos de cadena larga (como el nonano), monoterpenos como α -pineno y β -pineno, limoneno, terpinoleno además de sesquiterpenos como (*E*)-cariofileno, óxido de cariofileno e ishwarane (Nürk y Crockett 2011).

Sobre la composición del aceite esencial de *Hypericum reflexum* no hay datos. Hasta la fecha solo se ha descrito la composición de los aceites esenciales de otras especies pertenecientes a la misma sección (*Adenosepalum*), siendo los compuestos mayoritarios mentona, *n*-octano, óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno, *n*-undecano, isocariofileno, γ -cadineno y 2,4-diisopropenil-1-metil-1-vinil-ciclohexano (Nürk y Crockett 2011).

Además de los compuestos mencionados anteriormente, también se aislaron xantonas de *Hypericum canariense* (Cardona *et al.* 1985; Cardona 1986; Bennett 1989; Díaz 2010), *Hypericum grandifolium* (Cardona *et al.* 1992) e *Hypericum reflexum* (Cardona 1990), y una serie de ácidos y derivados aldehídicos (Klejduš 2013). Asimismo, se aislaron dos diterpenos del grupo de los abietanos (Cardona 1993) y un bifenilo de *Hypericum reflexum* (Cardona 1990), así como compuestos poliprenilados derivados del benzoilfloroglucinol y unos derivados benzofenónicos de *Hypericum grandifolium* (Bonkanka *et al.* 2008).

II.3. Actividades farmacológicas

En anteriores estudios realizados por el grupo de investigación del que formo parte se ha puesto de manifiesto las propiedades antibacterianas, analgésicas, antiinflamatorias y antidepressivas de diferentes extractos y fracciones obtenidos de las sumidades floridas de cuatro hipéricos de las Islas Canarias, *Hypericum canariense*, *Hypericum glandulosum*, *Hypericum grandifolium* e *Hypericum reflexum* (Herrera *et al.* 1996; Prado *et al.* 2002; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2005; Rabanal *et al.* 2005; Sánchez-Mateo *et al.* 2006a, 2006b, 2006c, 2007; Bonkanka *et al.* 2008; Sánchez-Mateo *et al.* 2009; Sánchez-Mateo *et al.* 2015 *in press*).

Con respecto a la actividad antimicrobiana, se investigó el efecto de varios extractos de de las sumidades floridas de cuatro especies de *Hypericum* de la flora canaria frente a diferentes bacterias y hongos mediante el método de difusión en agar y el de microdilución. Se encontró que el extracto metanólico y la fracción clorofórmica de la especie *Hypericum canariense*, así como los extractos metabólicos y las fracciones butanólicas y clorofórmicas de *Hypericum*

glandulosum, *Hypericum grandifolium* e *Hypericum reflexum* presentaron una buena actividad antibacteriana, especialmente frente a las bacterias Gram positivas (como *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*), con valores de CIM comprendidos entre 30 µg/ml y 0.78 mg/ml, siendo la fracción clorofórmica, en general, la más activa (Herrera *et al.* 1996; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2006a). Además, *Hypericum canariense*, *Hypericum glandulosum* e *Hypericum grandifolium* mostraron actividad frente a la bacteria Gram negativa *Bordetella bronchiseptica* (Rabanal *et al.* 2002), mientras que *Hypericum reflexum* fue activo frente a la bacteria Gram negativa *Klesbsiella pneumoniae* (Herrera *et al.* 1996). Por el contrario, ninguno de los extractos ensayados mostró actividad antifúngica (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida cruzei*, *Candida parapsilosis*) (Herrera *et al.* 1996; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2006a). Aunque no se identificaron las moléculas responsables de la actividad antibacteriana, se sugiere que los flavonoides y taninos presentes en los cuatro hipéricos pueden jugar un papel importante dado que han mostrado en trabajos anteriores dicha actividad (Bombardelli y Mozarroni 1995, Rocha *et al.* 1995; Cowan 1999). En resumen los cuatro hipéricos canarios investigados mostraron una buena actividad antimicrobiana, especialmente frente a bacterias Gram positivas, lo que justificaría el uso de estas especies en la medicina tradicional canaria para el tratamiento de enfermedades de la piel como heridas infectadas y accesos.

Continuando con la evaluación farmacológica de estas especies, se sometieron los diferentes extractos de los cuatro hipéricos canarios mencionados anteriormente a una batería de pruebas generales en roedores para evidenciar sus efectos sobre el sistema nervioso central (efecto sobre la actividad motora, temperatura corporal o sueño inducido por barbitúricos, entre otras), así como pruebas más específicas para determinar su actividad antidepresiva (test de la tetrabenacina, test de Porsolt). Se encontró que, en general, todos los extractos ensayados (infusiones, extractos metabólicos, extractos clorofórmicos, extractos butanólicos) ejercieron en mayor o menor medida efectos antidepresivos en el test de Porsolt (prueba conductual clásica: depresión por desesperación comportamental), no debiéndose este efecto a propiedades estimulantes centrales ya que a las dosis activas en esta prueba no modificaron o disminuyeron la actividad motora de los animales de experimentación (Prado *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2005, 2007, 2009). Asimismo, las infusiones y los extractos metanólicos de todos los hipéricos estudiados, así como la fracción clorofórmica de *Hypericum glandulosum*, *Hypericum grandifolium* e *Hypericum reflexum* mostraron efectos significativos en el test de la tetrabenacina, antagonizando la ptosis y/o la depresión motora inducida por este fármaco, lo que suele evidenciar una cierta actividad adrenérgica o serotoninérgica. Además, los extractos metanólicos

de *Hypericum glandulosum* e *Hypericum grandifolium*, así como la fracción butanólica de *Hypericum grandifolium* e *Hypericum reflexum* potenciaron las sacudidas de cabeza inducidas por L-5-hidroxitriptófano, indicando que pueden ser inhibidores de la 5-hidroxitriptamina. Por otro lado, estos extractos mostraron nulos efectos miorelajantes en el test de la tracción y, con excepción de la infusión de *Hypericum canariense*, la fracción clorofórmica de *Hypericum grandifolium*, así como el extracto metanólico y la fracción clorofórmica de *Hypericum reflexum*, no modificaron de forma significativa la temperatura corporal de los animales de experimentación ni el tiempo de sueño inducido por pentobarbital sódico (Prado *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2005, 2007, 2009).

Con respecto a los principios activos responsables de la actividad antidepresiva observada en estas especies, se ha sugerido que los flavonoides presentes en ellas pueden ser los responsables, al menos en parte, de la actividad encontrada, ya que estos compuestos han mostrado dicha actividad en trabajos de investigación llevados a cabo con la especie *Hypericum perforatum* (Butterweck *et al.* 2000; Nöldner and Schötz 2002; Butterweck *et al.* 2003). No obstante, dado que tanto la fracción clorofórmica como la butanólica han presentado actividad en estas pruebas deben existir diversos compuestos de distinta naturaleza responsables de estos efectos que actúan de una manera sinérgica, como se ha observado con otras plantas medicinales como el *Hypericum perforatum* (Chatterjee *et al.* 1988; Butterweck *et al.* 2000, Barnes *et al.* 2001; Nöldner y Schötz 2002; Butterweck *et al.* 2003; Rodríguez-Landa y Contreras 2003). Por tanto, las especies de hipérico canarios estudiados mostraron actividad antidepresiva en ratones, lo que confirma el uso de esta planta en la medicina tradicional canaria frente a diferentes afecciones del sistema nervioso central.

Por otro lado, se evaluó la potencial actividad analgésica de estas especies utilizando diferentes modelos experimentales de nocicepción, basados en estímulos químicos (test del ácido acético y/o de la formalina) y en estímulos térmicos (test del tail-flick). Se encontró que la mayoría de los extractos de *Hypericum glandulosum* así como los extractos metabólicos y las fracciones clorofórmicas de *Hypericum grandifolium* e *Hypericum reflexum* presentaron actividad analgésica tanto a nivel periférico como central, ya que a las dosis ensayadas mostraron una actividad antinociceptiva no sólo en el test del ácido acético, sino también en las dos fases del test de la formalina y/o en el test del tail-flick. Por el contrario, los extractos de *Hypericum canariense* ensayados mostraron actividad analgésica significativa sólo en el test del ácido acético, lo que sugiere que el efecto analgésico está mediado principalmente por un mecanismo periférico (Rabanal *et al.* 2005; Sánchez-Mateo *et al.* 2006; Bonkanka *et al.* 2011).

Finalmente, se llevó a cabo el estudio de la actividad antiinflamatoria por vía tópica de los diferentes extractos de los cuatro hipéricos en estudio mediante la inhibición del edema inducido en ratones por el tetradecanoil-forbol-acetato (TPA), así como la actividad antiinflamatoria vía oral en ratones de los extractos del *Hypericum grandifolium* mediante la inhibición del edema inducido por carragenina. Todos los extractos ensayados presentaron una actividad antiinflamatoria significativa por vía tópica, presentando algunos extractos valores próximos a los mostrados por la dexametasona (antiinflamatorio de referencia) (Rabanal *et al.* 2005; Sánchez-Mateo *et al.* 2006; Bonkanka *et al.* 2008). Este efecto antiinflamatorio fue corroborado por vía oral en el modelo de edema plantar por carragenina en ratón para la especie *Hypericum grandifolium*, si bien la actividad antiinflamatoria encontrada fue menor, lo cual podría explicarse por el diferente mecanismo de acción de producción del edema o por el hecho de que la administración tópica es una vía más efectiva ya que con ella se pueden conseguir concentraciones mayores del producto en el lugar de la inflamación (Bonkanka *et al.* 2008).

Con respecto a los principios activos, tanto en los estudios de la actividad analgésica como antiinflamatoria se sugiere que los flavonoides presentes en estas especies son responsables de una parte de los efectos observados dado que muchos de ellos han mostrado estas acciones en estudios anteriores (Calixto *et al.* 2000; Guardia *et al.* 2001; Calixto *et al.* 2003, Morikawa *et al.* 2003; Rotelli *et al.* 2003; Calixto *et al.* 2004; Gadotti *et al.* 2005; Martínez *et al.* 2009).

III.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

III.1. Capacidad antioxidante

III.1.1. Introducción

La pérdida gradual de las funciones fisiológicas desde el inicio de la edad adulta se ha asociado al proceso continuo de producción mitocondrial de radicales libres y al desarrollo de una condición de estrés oxidativo. La ingesta de fruta y verdura con la alimentación se asocia a un riesgo menor de padecer afecciones relacionadas con el estrés oxidativo, como pueden ser las enfermedades coronarias y neurodegenerativas, algunos tipos de cáncer y el envejecimiento. De hecho, los conocimientos actuales han llevado a relacionar los agentes oxidantes con la aparición de esas enfermedades y con muchas más. Por definición, los antioxidantes son compuestos capaces de reducir o retardar el comienzo de la oxidación de un sustrato incluso cuando son usados en cantidades muy pequeñas (< 1 %, usualmente 1-1000 mg/l) (Vlietinck y Apers 2000; Miguel 2010b; Raut y Karuppayil 2014; Kale *et al.* 2015).

Los radicales libres son átomos altamente reactivos e inestables debido a que presentan un electrón desapareado en su configuración electrónica, razón por la cual atacan a átomos de otras moléculas para alcanzar la estabilidad en su orbital. Los radicales libres son el resultado de diferentes actividades: algunas son intrínsecas en los seres vivos (como la respiración celular), mientras que otras dependen de factores externos que podrían exacerbar el proceso de producción de esos átomos muy reactivos (como la contaminación ambiental, el tabaquismo, una dieta rica en grasas y la exposición excesiva a radiaciones solares). A nivel celular, los ataques más frecuentes de los radicales libres van dirigidos especialmente a los lípidos de membrana, pero también a los ácidos nucleicos del ADN y a las proteínas (Bruneton 2004; Baser 2010).

En los sistemas biológicos, las agresiones de los radicales libres van dirigidas a los componentes de los tejidos animales o vegetales. Esta reacción se inicia por una especie radicalaria que es capaz de interaccionar con un sustrato RH para llevar a la formación de un radical alquilo R• (fase conocida como iniciación); a continuación, el proceso se desarrolla a través de una secuencia de reacciones en las cuales el R• interactúa con el oxígeno presente en el medio para formar el radical peróxido ROO•, el cual a su vez ataca a otra molécula del

sustrato para dar el hidropéroxido ROOH más otro radical R• (fase de propagación); esta última fase se repite de forma cíclica hasta que dos radicales se unen para terminar generando un compuesto no radicalario (terminación de la cadena) (Amorati *et al.* 2013).

Los compuestos capaces de inactivar una reacción radicalaria se catalogan en dos grandes grupos. Por un lado, están los que se conocen como antioxidantes “directos” que se dividen, a su vez, en dos grandes categorías dependiendo de su mecanismo de acción. La primera engloba a los que se conocen como antioxidantes preventivos, los cuales interfieren con la fase de iniciación retardando la formación de las especies radicalarias (a este grupo pertenecen, por ejemplo, la enzima catalasa y los quelantes de metales como el ácido fítico). A la segunda categoría pertenecen los antioxidantes que se encargan de reducir la velocidad o incluso bloquear la fase de propagación reaccionando más rápidamente que el radical ROO• con el sustrato oxidable. Dado que los antioxidantes preventivos son del todo inútiles una vez iniciada la reacción, los del segundo grupo son sin duda los antioxidante más importantes dentro del grupo de los “directos” (Miguel 2010b; Amorati *et al.* 2013). Por otro lado, están los antioxidantes “indirectos”: son compuestos capaces de aumentar las defensas intrínsecas de los sistemas vivientes, por ejemplo, haciendo que aumente la expresión de las enzimas antioxidantes propias de las células (Amorati *et al.* 2013).

Otra manera de clasificar los antioxidantes, mirándolos desde el punto de las células, es la que los divide según sea un sistema defensivo de tipo enzimático (p. ej.: superóxido dismutasa [SOD], catalasa y glutatión peroxidasa) o no enzimático. A este último grupo pertenecen los antioxidantes “scavengers” (Bruneton 2004; Baser 2010), los cuales se componen por los antioxidantes sintéticos, como el derivado hidrosoluble de la vitamina E (Trolox), y por los naturales, como la vitamina C, el β-caroteno, el licopeno y los compuestos fenólicos. En los últimos años varios estudios han puesto en evidencia que los antioxidantes sintéticos podrían estar relacionados con la aparición de diferentes enfermedades, motivo por el cual se está experimentando un aumento en las investigaciones que ven implicados a los antioxidantes de origen natural, no sólo para una mejor comprensión de sus mecanismos de acción sino para la búsqueda de nuevos compuestos a partir de material vegetal (Hässig *et al.* 1999; Cimpoiu 2006; Baser 2010; Amorati *et al.* 2013; Raut y Karuppayil 2014).

Bajo el punto de vista teórico, el mejor ensayo para evaluar la actividad antioxidante de un compuesto o una mezcla, sería el que reprodujera las mismas condiciones que se encuentran en un sistema real, cosa que sería inviable (uno de los motivos es la imposibilidad de describir durante semanas o incluso meses el proceso oxidativo realizado a temperatura ambiente sobre un sustrato biológico). Por consiguiente, se han desarrollado a lo largo de los años muchos

ensayos que simulan las condiciones reales, simplificándolas y a la vez haciéndolas transcurrir a velocidades mayores que las que actuarían en una oxidación espontánea (Amorati *et al.* 2013).

Los ensayos antioxidantes en alimentos y sistemas biológicos se pueden dividir en dos tipologías: los que evalúan la peroxidación lipídica y los que miden la capacidad atrapadora de los radicales libres. Este segundo grupo, a su vez, se compone de las reacciones basadas en la transferencia, o bien de un hidrógeno, o bien de un electrón (Miguel 2010b). Esto se lleva a cabo a través de sustancias oxidantes (radicales o cationes coloreados persistentes en el tiempo) que son reducidas por los antioxidantes. Todos esos *tests*, son considerados como métodos útiles para ensayar de forma preliminar la actividad antioxidante de una sustancia o extracto (Amorati *et al.* 2013).

III.1.2. Compuestos fenólicos como antioxidantes

Los compuestos fenólicos de origen natural juegan un papel fundamental en los mecanismos antioxidantes de los sistemas biológicos, actuando como “*scavengers*”: reaccionan con los radicales, actuando como inhibidores de la propagación de las especies radicalarias e impidiendo así las degradaciones debidas a su intensa reactividad (Olthof *et al.* 2003; Niggeweg *et al.* 2004; Cimpoiu 2006; Miguel 2010b). Actuarían por medio de mecanismos tan dispares como la formación de complejos con iones metálicos (este mecanismo es propio de los fenoles con dos grupos hidroxilos adyacentes) o como la reacción directa con especies radicalarias. En este último caso, la reactividad de los fenoles se explica fundamentalmente por su estructura: el núcleo aromático permite la deslocalización del electrón ganado en la reacción en la cual actuarían como antioxidantes, por medio de la formación de un fenoxi radical (Dudonné *et al.* 2009; Miguel 2010b). Se ha observado que, en líneas generales, la actividad antioxidante crece al aumentar el número de grupos hidroxilos de las moléculas y disminuye con su glicosilación (Fukumoto y Mazza 2000), hasta llegar al punto en que algunos fenoles han demostrado ser mejores antioxidantes que los tocoferoles (Miguel 2010b).

III.1.2.1. Ácido clorogénico

Los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico son fuentes importantes de antioxidantes en las plantas, gracias también a su ubiquidad dentro del reino vegetal. Un ejemplo de ellos es el ácido clorogénico, que en algunos experimentos llevados a cabo *in vitro* e *in vivo* demostró una notable capacidad antioxidante (Chen y Ho 1997; Sato *et al.* 2011; Razzaghi-Asl *et al.* 2013). Así, por ejemplo, inhibió la peroxidación lipídica inducida por hierro en microsomas de hígado de bovino, demostrando por ello su eficacia a la hora de realizar una acción protectora

frente a enfermedades en las cuales estén implicadas las ROS (Especies Reactivas del Oxígeno) (Kono *et al.* 1998).

Finalmente, demostró ser más activo que muchos otros fenoles y parece que la cinética de la reacción, a diferencia de otros antioxidantes, pasa por la rotura de su molécula en fragmentos más pequeños y estables sin que finalmente haya producción de ulteriores radicales libres, dando fin así a la fase de propagación de la reacción misma (Kono *et al.* 1998).

III.1.2.2.Flavonoides

En la actualidad se considera que estos metabolitos secundarios son capaces de captar radicales libres en diversas situaciones patológicas, como en el caso de anoxia e inflamación (que son procesos que implican, entre otras cosas, la formación del radical superóxido $\bullet\text{O}_2^-$), así como en el caso de la autooxidación lipídica (Bruneton 2004). Numerosas evidencias sugieren que los flavonoides ejercerían una acción protectora del ADN (especialmente quercetina, quercitrina y rutina) al inhibir los efectos oxidativos provocados por las ROS sobre el ácido nucleico (Fukumoto y Mazza 2000; Pérez Trueba 2003).

Las investigaciones realizadas hasta el momento han demostrado que los flavonoides ejercen su acción antioxidante mediante la combinación de cuatro mecanismos de acción. El primer mecanismo identifica a los flavonoides como secuestradores de radicales libres, dando así como resultado una especie radicalaria más estable y por ende menos reactiva. Por ejemplo, los flavonoides rutina y quercetina mostraron ser capaces de secuestrar eficazmente el radical superóxido $\bullet\text{O}_2^-$ (Pérez Trueba 2003). El segundo habla de sus propiedades quelatantes de metales de transición, como el hierro. Así se explicarían, por ejemplo, los efectos inhibidores de la peroxidación lipídica iniciada por iones metálico observados con la quercetina (Gioti *et al.* 2009). El tercero demuestra la inhibición que ejercen los flavonoides sobre diversas enzimas, como las oxidasas (lipoxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, NADPH oxidasa y xantina oxidasa), la fosfolipasa A₂ (involucrada en los procesos oxidativos) o la óxido nítrico sintasa (implicada en el proceso patológico de la isquemia). De hecho, existen evidencias de que la quercetina y la rutina inhiben la NADPH oxidasa de los microsomas hepáticos. Por último, un cuarto mecanismo, opuesto al anterior, pone en evidencia que los flavonoides estimulan algunas enzimas con marcadas propiedades antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa. Se corroboró, por ejemplo, en un estudio que los flavonoles (grupo de flavonoides al cual pertenece la quercetina) inducen las funciones de la enzimas hepática uridin-5'-difosfato glucuroniltransferasa (UDP-GT) (Bohm *et al.* 1998; Bravo 1998; Fukumoto y Mazza 2000; Russo *et al.* 2000; Nijveldt *et al.* 2001; Pérez Trueba 2003; Chahar *et al.* 2011).

Se ha demostrado que la capacidad antioxidante de un flavonoide depende de su estructura (Bruneton 2004). La mayoría de los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes hidroxílicos en posición 3' y 4' en el anillo B son antioxidantes más eficaces y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, de un grupo OH libre en la posición 3 y de un grupo carbonilo en la posición 4, como es el caso concreto de la quercetina (Pérez Trueba 2003; Miguel 2010b). Al mismo tiempo, se ha descubierto que los aglicones son más activos que los heterósidos en cuanto a la inhibición de daños peroxidativos generados a los lípidos de membranas celulares (Pérez Trueba 2003; Miguel 2010b).

III.1.3. Aceites esenciales como antioxidantes

Se ha demostrado que los aceites esenciales pueden interferir con las funciones mitocondriales de las células de los mamíferos, por ello pueden jugar un papel importante en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y los daños celulares provocados por los radicales libres, como las enfermedades neurodegenerativas, las cardíacas, el cáncer y hasta en procesos inflamatorios en los cuales se genera el radical superóxido $\cdot\text{O}_2^-$, los cuales serían eficazmente neutralizado por la presencia de los aceites esenciales (Miguel 2010a; Bhalla *et al.* 2013; Raut y Karuppayil 2014).

Los aceites esenciales que han mostrado mayor potencia antioxidante son los que contienen altas concentraciones de compuestos fenólicos, especialmente timol, carvacrol y eugenol, que se ha observado que contrarrestan eficazmente la actividad de radicales como el peróxido $\text{ROO}\cdot$ (Bakkali *et al.* 2008; Adorjan y Buchbauer 2010; Amorati *et al.* 2013; Turek y Stintzing 2013; Jayasena y Jo 2014). Si bien, en líneas generales, se obtuvieron también muy buenos resultados con aceites esenciales ricos en algunos otros monoterpenos (*p*-cimeno, terpinoleno, α -terpineno, γ -terpineno y sabineno) y en (*E*)-cariofileno (Ruberto y Baratta 2000; Edris 2007; Edziri *et al.* 2010; Mechergui *et al.* 2010; Miguel 2010a). En cambio, a los hidrocarburos monoterpénicos (a los cuales pertenecen el α -pineno y β -pineno), a los hidrocarburos sesquiterpénicos y a los compuestos no isoprenoides se les atribuye una actividad antioxidante escasa (Ruberto y Baratta 2000).

Aunque la mayoría de los experimentos realizados intentan relacionar la actividad a una determinada molécula, algunos trabajos han mostrado que, posiblemente, los diferentes compuestos presentes en el aceite esencial actuarían de forma sinérgica, encontrándose en algunos casos que la actividad antioxidante de los compuestos aislados era inferior a la del aceite esencial (Miguel 2010b; Adorjan y Buchbauer 2010; Amorati *et al.* 2013). Algunos

investigadores han utilizados redes de neuronas artificiales (ANN, *artificial neural networks*) para predecir la actividad antioxidante de varios aceites esenciales en ensayos con DPPH y ácido linoleico partiendo de algunos de sus compuestos. Los resultados confirmaron el papel fundamental que tienen los terpenos, como el timol, carvacrol, eugenol y *p*-cimeno, para aumentar dicha actividad (Cabrera y Prieto 2010). Aun así, queda mucho trabajo todavía por desarrollar sobre sinergias y antagonismos en las complejas mezclas de los aceites esenciales (Miguel 2010a).

III.1.4. El hipérico como antioxidante

El hipérico es una planta muy interesante desde el punto de vista de la actividad antioxidante, dado su elevado contenido en compuestos fenólicos y flavonoides (Guedes *et al.* 2012). De hecho, los extractos metanólicos, etanólicos y acuosos de varias especie de hipérico (entre las cuales se encuentra el *Hypericum perforatum*) han demostrado una potente actividad antioxidante y se han relacionado además con un efecto preventivo sobre el Alzheimer (Zou *et al.* 2004; Asgarpanah 2012; Guedes *et al.* 2012).

En los primero ensayos realizados con extractos de *Hypericum perforatum* donde demostraron su elevada actividad antioxidante se consideró que gran parte de esa actividad se debía a la presencia de hipericina y hiperforina (esta última, cuando era ensayada como compuesto puro, demostró poseer una capacidad antioxidante mayor que el Trolox). Sin embargo, posteriormente, se ha relacionado con esta actividad, no solo a las naftodiantronas y a los derivados del floroglucinol, sino también a los compuestos fenólicos presentes en el hipérico, destacando en algunos casos la especial contribución mostrada por el ácido clorogénico (Hunt *et al.* 2001; El-Sherbiny *et al.* 2003; Silva *et al.* 2005; Gioti *et al.* 2009; Orčić *et al.* 2011; Asgarpanah 2012; Kanmani *et al.* 2014; Wölflle *et al.* 2014). En general, el contenido de fenoles en los hipéricos se ha relacionado directamente con la actividad antioxidante observada, especialmente en las pruebas realizadas con DPPH (Gioti *et al.* 2009). También se demostró la eficacia antioxidante de quercetina, hiperósido y rutina, siendo de estos flavonoides el más activo la quercetina y el menos la rutina (Zou *et al.* 2004).

Finalmente, cabe comentarse que algunas investigaciones demuestran que los extractos totales presentan una actividad antioxidante más acentuada que las fracciones obtenidas de ellos, lo cual sugiere que existen efectos sinérgicos entre los diferentes compuestos del extracto total (Gioti *et al.* 2009).

III.2. Actividad antimicrobiana

III.2.1. Introducción

La era de oro de los antibióticos empezó tras el descubrimiento accidental de la penicilina por Alexander Fleming. Desde entonces, la ciencia ha logrado identificar innumerables moléculas que han servido de antibióticos para diversos tipos de infecciones, intentando combatir a las bacterias que en constante modificación se hacen cada vez más resistentes a los nuevos medicamentos. En este contexto, la investigación básica enfocada a identificar nuevas moléculas con actividad antibacteriana procedentes de fuentes naturales parece ser uno de los caminos importantes a seguir debido a la gran variedad estructural presente en los metabolitos secundarios producidos por las plantas (Rahman 2015).

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública mundial. El uso y el abuso de los antimicrobianos en la medicina humana y la ganadería durante los últimos 70 años han producido un aumento incesante del número y de los tipos de microorganismos resistentes a estos medicamentos, con el consiguiente aumento de la mortalidad, de la morbilidad y de las discapacidades. El aumento y la propagación de los microorganismos resistentes tienen dos factores determinantes: uno es el uso excesivo e indebido de los antimicrobianos mientras que el otro es la propagación de los microorganismos resistentes entre las personas, las comunidades y los países. Por consiguiente, la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos requiere intervenciones en dos áreas: 1) Mejora del uso de los antimicrobianos, 2) Bloqueo de la transmisión de los microorganismos resistentes (Fukuda 2015).

Staphylococcus aureus es uno de los principales patógenos que a través de la selección natural ha desarrollado resistencia a los antibióticos β -lactámicos. Se encuentra normalmente en las mucosas y en la piel de aproximadamente la mitad de la población y es extremadamente adaptable a la presión antibiótica. La resistencia a meticilina es independiente de la producción de betalactamasas. Esta resistencia está codificada y regulada por una serie de genes que se encuentran en la región del cromosoma de la bacteria llamada *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec, casete cromosómico estafilocócico). Uno de estos genes (*mecA*) codifica una proteína fijadora de penicilina con una baja afinidad por los β -lactámicos (llamada PBP2a), haciendo sí que no sirva como blanco para las penicilinas. Existen varios tipos de SCCmec: los de tipo I, II y III se asocian con infecciones intrahospitalarias, mientras que los de tipo IV y V se relaciona con cepas de SARM extrahospitalarias. Se calcula que la mitad de todas las infecciones de *S. aureus* en EE.UU. son resistentes a penicilina, meticilina, tetraciclina

y eritromicina. Esto deja, en muchos casos, a la vancomicina como el único medicamento efectivo disponible actualmente. Sin embargo, a finales de la década de los noventa aparecieron las primeras cepas con niveles intermedios de resistencia también a la vancomicina. La epidemiología de la bacteria ha cambiado drásticamente en los últimos años, tanto que a partir del 2005 se ha empezado a registrar cada vez más casos de SARM aislados en ganados llegando a ser detectado inclusive en productos de la cadena alimenticia como pollo, cerdo, leche y pescado, lo cual es fuente de preocupación ya que se ha descrito el paso de cepas identificadas en animales (especialmente cerdos) a seres humanos tras exposición directa o por contaminación del medio ambiente. La difusión del empleo de antibióticos, en ocasiones innecesarios, tanto a nivel humano como animal (especialmente en ganadería), ha llevado al aumento de los casos de infecciones por SARM. La prevalencia de SARM en el cerdo de origen canario (criado en granjas) es elevada (62 %), por lo cual se considera que son un reservorio importante para la transmisión de la bacteria al hombre (especialmente trabajadores). Un elevado número de cepas aisladas en Canarias presenta mutirresistencia a los antibióticos gentamicina, tobramicina, cotrimoxazol y clindamicina (Gil 2000; Patel *et al.* 2010; Abreu *et al.* 2011; Morcillo *et al.* 2015).

Por otro lado, algunas enterobacterias y bacilos Gram negativos presentan un mecanismo de resistencia que se lleva a cabo con la producción de una enzima denominada betalactamasa. Ésta inactiva a los antibióticos β -lactámicos —como pueden ser las penicilinas, las cefalosporinas (también las de tercera y cuarta generación, por lo cual se les nombra "betalactamasas de espectro extendido" [BLEE]), monobactámicos (aztreonam) y carbapenemasas— por rotura del anillo β -lactámico que todos ellos tienen en común. No obstante, un denominador común de estas BLEE es la sensibilidad al ácido clavulánico. Las BLEE se encuentran con mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* y en *Escherichia coli*, aunque se han identificado también en otras especies como *Proteus*, *Serratia* o *Salmonella* spp. (Pujol y Peña 2003; Ma *et al.* 2012).

Los productos naturales, que son una de las fuentes mayores de diversidad química, han provisto a la terapéutica a lo largo de los años de importantes agentes para su arsenal en la lucha contra las enfermedades de origen bacteriano (Cushnie y Lamb 2011).

III.2.2. Compuestos fenólicos como antimicrobianos

Varios compuestos fenólicos y polifenólicos presentes en las plantas han demostrado ser eficaces antibacterianos (Hatano *et al.* 2005). Mientras que los antibióticos de síntesis tienen como diana una reacción específica dentro de las funciones de una célula bacteriana, los

compuestos antimicrobianos procedentes de plantas, como los polifenoles, inhiben diversos procesos a la vez, haciendo que la creación de resistencia por parte de la bacteria sea mucho más improbable (Karunanidhi *et al.* 2013).

Se ha demostrado la intervención de fenoles y polifenoles en un gran número de factores de virulencia bacteriana, como son la inhibición de la formación de *biofilms*, la reducción de ligandos de adhesión celular y la neutralización de toxinas bacterianas (Daglia 2012). Además, las bacterias, como consecuencia de la exposición a los polifenoles, aumentarían la producción de las proteínas relacionadas con los sistemas defensivos, mientras que disminuirían la de aquellas que están implicadas con el metabolismo y la biosíntesis, causando en conjunto una reducción del metabolismo bacteriano (Ferrazzano *et al.* 2011).

A pesar de la buena actividad antimicrobiana presentada por los polifenoles, ésta se ve mermada porque a veces su biodisponibilidad es limitada. Aun así, es interesante subrayar que son capaces de penetrar las membranas celulares y ejercer su acción antibiótica desde el interior de las células bacterianas debido a su lipofiliidad (Daglia 2012). Con respecto a la relación estructura - actividad, se ha observado que la mejor acción frente a SARM se obtiene cuando en el compuesto fenólico están presentes los grupos COOH en el anillo bencénico, dos grupos OH en orto y en para y un grupo OCH₃ en meta (Friedman 2015).

Es interesante destacar que se ha encontrado fenómenos de sinergia entre antibióticos de síntesis y polifenoles (flavonoles) en estudios *in vitro* frente a bacterias multirresistentes. Así, por ejemplo, se llegó a obtener una mejora importante de la actividad de la rifampicina y de la quercetina frente a los SARM cuando se combinaban. Resultados parecidos se obtuvieron combinando ciprofloxacino y quercetina, o la oxacilina con catequinas (Hatano *et al.* 2005; Daglia 2012).

III.2.2.1. Ácido clorogénico

El ácido clorogénico, bien como sustancia aislada o dentro de extractos de plantas con una concentración elevada del mismo, ha demostrado actividad antifúngica, antiviral y antibacteriana muy marcada frente a Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mutans* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativos (*Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, y *Escherichia coli*), incluyendo a cepas resistentes como las SARM. El mecanismo de acción no se ha esclarecido por completo, pero parece ser que inhibe la acción de ciertas enzimas (como FabI y FabG) involucradas en la síntesis de ácidos grasos bacterianos, además de incrementar sensiblemente la permeabilidad de la membrana celular (causando así la salida de material citoplasmático con consiguiente muerte celular) e inhibir la

formación de *biofilm* de los Gram negativos (como *Stenotrophomonas maltophilia*), incluso cuando fue ensayado frente a cepas resistentes (Karunanidhi *et al.* 2013; Friedman 2015). Curiosamente, hemos encontrado un trabajo en donde, por el contrario, el ácido clorogénico no mostró ninguna actividad frente a los Gram positivos (Daglia 2012).

III.2.2.2. Flavonoides

Este grupo de metabolitos secundarios ha recibido especial atención por haber demostrado un amplio espectro de acción, destacando entre todos ellos los flavan-3-oles y los flavonoles, siendo eficaces frente a numerosos Gram positivos (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Actinomyces naeslundii*) y Gram negativos (*Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*) (Daglia 2012).

Existen varios mecanismos que explican su acción antibacteriana. Se ha observado que los flavonoides son capaces de producir un daño directo sobre las membranas citoplasmáticas (posiblemente debido a producción de peróxido de hidrógeno), inhibir la síntesis de ácidos nucleicos (por inhibición de las topoisomerasas y/o de la dihidrofolato reductasa) y, además, inhibir el metabolismo energético (por inhibición de la ATP sintasa). Asimismo, se han encontrado otros mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared celular (por inhibición de D-alanina-D-alanina ligasa), inhibición de la síntesis de la membrana celular (por inhibición de las enzimas FabG, FabI, FabZ, Rv0636 y KAS III) e inhibición del normal funcionamiento de las bombas de eflujo (usadas por las bacterias como uno de los mecanismos de resistencia a los antibióticos). Es interesante resaltar, no obstante, que los estudios recientes sugieren que la acción antibacteriana que ejercen los flavonoides no es debida a un solo mecanismo sino a varios a la vez (Cushnie y Lamb 2011; Abreu *et al.* 2015; Xie *et al.* 2015).

Respecto a la relación estructura-actividad, se ha observado que es importante para aumentar la eficacia del flavonoide en general que contenga un grupo OH en la posición 3 y 5, además de un grupo lipófilo en 6 o 8. Por el contrario, la metoxilación en 4' (en el anillo B) reduce la potencia del flavonoide hasta valores de CIM excesivamente elevados ($\geq 1000 \mu\text{l/ml}$) (Cushnie y Lamb 2011; Xie *et al.* 2015).

Por otro lado, algunos flavonoides y xantonas han demostrado ser efectivos frente a bacterias multirresistentes SARM (Hatano *et al.* 2005), observándose también fenómenos de sinergia cuando se combinan con antibióticos. Algunos ejemplos de esta sinergia frente a SARM son: la combinación de algunos flavonoides con oxacilina (Hatano *et al.* 2005), la administración simultánea de epicatequina-3-galato con antibióticos β -lactámicos (Cushnie y Lamb 2011; Xie *et*

al. 2015), o la combinación de quercetina con ciprofloxacino, tetraciclina y eritromicina (Abreu *et al.* 2015).

III.2.3. Aceites esenciales como antimicrobianos

Numerosos estudios realizados *in vitro* han demostrado una actividad antimicrobiana elevada de los aceites esenciales frente a microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteria*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, con niveles de CIM del orden de 0.2 – 10 μ l/ml (Burt 2004; Edris 2007; Miguel 2010a).

Se sabe que el poder antiséptico de los aceites esenciales es variable y depende de su composición química. Así, los compuestos fenólicos demuestran un elevado poder antiséptico (p. ej. carvacrol, timol, eugenol y ácido cinámico), los que tienen una función alcohol tienen acción intermedia y, finalmente, las cetonas presentan una baja actividad (Kuklinski 2000; Burt 2004; Adeyinka y Richard 2015). Por ejemplo, los aceites esenciales de tomillo y orégano demostraron ser muy efectivos a la hora de inhibir algunos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium* debido a la acción directa de carvacrol y timol (Edris 2007).

En general, se ha observado que los Gram negativos son más resistentes a la acción de los aceites esenciales, aunque sean especialmente ricos en compuestos fenólicos, y se sugiere, por eso, que la envoltura celular de los Gram negativos los protege del paso de sustancias lipófilas como son los compuestos de las esencias (Burt 2004; Vergis *et al.* 2015). No obstante, algunos aceites esenciales, como el de *Achillea clavennae*, han demostrado ser efectivos frente algunos Gram negativos (*Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa*), siendo sorprendentemente ineficaz frente al Gram positivo *Streptococcus pyogenes* (Edris 2007).

Al estar compuestos por un gran número de sustancias diferentes, los aceites esenciales actúan sobre la célula bacteriana a través de diferentes mecanismos, sin que uno prevalezca sobre otro (Burt 2004). Uno de estos mecanismos estaría implicado con la capacidad que tienen de pasar a través de la membrana bacteriana, romper su estructura y volver así la célula permeable a la salida de iones, con la consiguiente reducción de potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y la depleción de las reservas de ATP, entre otros efectos (Burt 2004; Bakkali *et al.* 2008). Otro mecanismo propuesto es la reacción de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos presentes en las esencias con las proteínas de los patógenos, causando así inhibición de sus funciones enzimáticas (Edris 2007; Adeyinka y Richard 2015). Además, se ha observado fenómenos de sinergia entre algunos terpenos, como el del carvacrol y su precursor el *p*-cimeno, o entre el cinamaldehído y el eugenol, así como entre el geraniol y la

oxacilina o entre algunos aceites esenciales y la nitrofurantoina (Hatano *et al.* 2005; Bakkali *et al.* 2008). Finalmente, cabe recordar que los compuestos presentes en concentración minoritaria en la composición de un aceite esencial también son fundamentales para explicar los fenómenos de sinergia (Burt 2004).

Hasta el día de hoy, dado que actúan por varios mecanismos celulares a la vez, los aceites esenciales no han causado especial resistencia bacteriana. Pero, aun así, hay ejemplos de fenómenos que dejan entrever que las bacterias se pueden adaptar a la presencia de los aceites esenciales. Es el caso, por ejemplo, del carvacrol, para el cual se observó resistencia por parte de la bacteria *Bacillus cereus* tras haber sido incubada con concentraciones subletales del monoterpeno en cuestión. Igualmente, se registró un aumento de la tolerancia de *Pseudomona aeruginosa* al aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* debido a cambios promovidos por la bacteria en su membrana externa (Bakkali *et al.* 2008).

Con respecto a las bacterias multirresistentes, varios aceites esenciales han demostrado eficacia frente a SARM, como el aceite esencial de *Lippia origanoides*, *Mentha x piperita*, *Mentha arvensis*, *Mentha spicata* y *Melaleuca alternifolia* (Imai *et al.* 2001; Edris 2007; Baser 2010). Asimismo, se observó que otras bacterias multirresistentes (como algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) pueden ser inhibidas por el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) (Bozin *et al.* 2006; Edris 2007). Finalmente, se han ensayado el carvacrol y el timol, bien como sustancias aisladas, bien en combinación con antibióticos frente a cepas de SARM, de *Salmonella* spp. y de *E. coli*, encontrándose que la eficacia antimicrobiana del carvacrol puro era muy parecida a la del aceite esencial de orégano (que en su composición contiene ~ 80 % de carvacrol), lo que nos sugiere que los compuestos minoritarios (por lo menos en este caso) no parecen contribuir de manera significativa a la bioactividad del aceite esencial (Friedman 2015). No obstante, a pesar de los buenos resultados encontrados, hay investigadores que afirman que las bacterias del grupo de los SARM son, de entre todos los patógenos ensayados, los más resistentes a la acción antibiótica de los aceites esenciales (May *et al.* 2000; Dryden *et al.* 2004; Edris 2007).

III.2.4. El hipérico como antimicrobiano.

Existen numerosos trabajos que demuestran la acción antimicrobiana del hipérico, lo que respalda el uso popular de esta especie como antiséptico y cicatrizante de heridas (Bruneton 2001). Se evidencia en estos estudios que, en general, los hipéricos ensayados son más eficaces frente a bacterias Gram positivas que Gram negativas (Barnes *et al.* 2001; Gibbons *et al.*

2002; Avato *et al.* 2004; Cecchini *et al.* 2007; Wölflé *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015), si bien el mecanismo exacto de su acción se desconoce por ahora (Quiney *et al.* 2006).

Con respecto a sus principios activos, se considera que la hiperforina es el más potente en cuanto a actividad antimicrobiana, demostrándose que la potencia antibacteriana de la planta aumenta cuando se recolecta en el mes de agosto en lugar del mes de julio, dato que concuerda con un aumento proporcional de la cantidad de hiperforina al avanzar la fructificación de la planta (Avato *et al.* 2004; Wölflé *et al.* 2014). No obstante, el posible uso clínico de la hiperforina se ve limitado debido a su elevada lipofilicidad e inestabilidad, lo cual explica el interés reciente en el desarrollo de derivados semisintéticos de mejores características farmacocinéticas (p. ej. la aristoforina, tetrahidrohiperforina y octahidrohiperforina) (Immacolata Pia Schiavone *et al.* 2014).

La actividad antimicrobiana observada en los extractos de hipérico es debida también, aunque en menor medida, a la presencia de hipericina, la cual mostró una eficacia antimicrobiana media frente a Gram positivos como *S. aureus* y *Listeria* spp (Sperandio *et al.* 2013; Wölflé *et al.* 2014), presentado baja o nula actividad frente a los Gram negativos (Sperandio *et al.* 2013; Wölflé *et al.* 2014). Los resultados fueron mejores cuando se recurrió al desarrollo de derivados catiónicos semisintéticos o a formulaciones hidrosolubles y miscelares de hipericina (Sperandio *et al.* 2013). Debemos señalar que se quieren aprovechar las propiedades fotosensibilizantes de la hipericina para ejercer una acción antimicrobiana. El mecanismo pretende, a través de un haz de luz emitido a una determinada λ , excitar las moléculas de naftodiantronas, para así inducir la creación de especies radicalarias de O_2 que, finalmente, provocarían la muerte de las bacterias (Luksiene y Brovko 2013).

Además de la hipericina y de la hiperforina, los flavonoides también intervienen en la acción antimicrobiana encontrada para los extractos de hipérico, aunque parecen tener un papel secundario (Avato *et al.* 2004; Quiney *et al.* 2006).

Por otro lado, los aceites esenciales de varias especies de hipérico han demostrado poseer actividad antimicrobiana frente a una gran variedad de bacterias (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enteridis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otras) (Bertoli *et al.* 2011; Crockett 2010; Saddiqe *et al.* 2010). En relación a los componentes más activos, se ha observado que los aceites esenciales con altos porcentajes de α -pineno, β -pineno, (*E*)-cariofileno y de terpenos funcionalizados (alcoholes, aldehídos y cetonas) poseen una acentuada actividad antibacteriana (Bertoli *et al.* 2011; Crockett 2010; Guedes *et al.* 2012).

Con respecto a las bacterias multirresistentes (SARM), se ha descubierto la efectividad de los extractos clorofórmicos de hipéricos de diferentes especies, considerando a la hipericina y a la hiperforina, una vez más, los compuestos más activos (Gurevich *et al.* 1971; Schempp *et al.*

1999; Barnes *et al.* 2001; Reichling *et al.* 2001; Gibbons *et al.* 2002; Avato *et al.* 2004; Cecchini *et al.* 2007; Wölfle *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015).

III.3. Actividad citotóxica

III.3.1. Introducción

“Cáncer” es el término general que se aplica a una serie de enfermedades malignas que pueden afectar a partes muy diferentes del organismo. Estas enfermedades se caracterizan por una formación rápida e incontrolada de células anormales que son capaces de reunirse para formar un tumor y de proliferar en el organismo (Evans 1991). Hoy en día se considera ya un problema de salud mundial, siendo la segunda causa de muerte tras las enfermedades cardíacas (se calcula que cada año hay 10 millones de nuevos casos en todo el mundo). Existen numerosas causas que pueden producir esta enfermedad, como las radiaciones UV y las ionizantes, el humo de tabaco, los virus (como el virus de la hepatitis B que puede causar cáncer de hígado), parásitos (la esquistosomiasis produciría cáncer de vejiga), los alimentos contaminados por micotoxinas (induciría cáncer de hígado), así como las ROS (la excesiva producción de radicales libres puede desencadenar un daño oxidativo importante a biomoléculas como los lípidos y proteínas de membrana e incluso al ADN), entre otros (Bhalla *et al.* 2013).

Durante siglos, las plantas han sido utilizadas en el tratamiento de enfermedades cancerosas. El podofilo (*Phodophyllum hexandrum*), por ejemplo, se utilizaba hace ya más de 2000 años por los chinos como fármaco antitumoral. Posteriormente, se aislaron de la resina de esta planta diversos lignanos (podofilotoxina y peltatinas) con actividad antitumoral. Hacia finales de los años 50, comenzó una intensa búsqueda entre plantas, microorganismos y animales marinos con la intención de descubrir nuevas moléculas con actividad antitumoral, fomentada principalmente por un programa de detección selectiva financiado por el *National Cancer Institute*. Los investigadores de ese programa han utilizado y especificado el significado de los términos citotóxico, antitumoral y anticanceroso para describir las actividades de los nuevos compuestos aislados. Así, cuando una sustancia es tóxica para las células tumorales *in vitro* se define como agente citotóxico y, si esta toxicidad es transferible a células tumorales *in vivo*, se dice que dicha sustancia posee actividad antitumoral. Por último, esclarecieron que el término anticanceroso se emplea para compuestos que son tóxicos para las células tumorales en ensayos realizados en el ámbito de la experimentación clínica (Evans 1991).

Los metabolitos secundarios citotóxicos, generalmente, son productos naturales nuevos que comprenden un amplio conjunto de tipos estructurales (monoterpenos, sesquiterpenos, lignanos, alcaloides y flavonoides, entre otros). También hay algunos compuestos anticancerígenos, que habiendo sido aislados hace tiempo, no habían sido sometidos a ensayos rigurosos respecto a su actividad citotóxica (Evans 1991). El interés de los productos naturales en esta campo es grande, ya que en un estudio se ha encontrado que la mitad de los nuevos fármacos quimioterápicos aprobados internacionalmente entre los años 1940 y 2006 eran de origen natural (Bhalla *et al.* 2013).

III.3.2. Compuestos fenólicos como citotóxicos

En numerosos estudios se ha demostrado que los polifenoles presentan no solo actividad antioxidante sino también citotóxica. Ejemplo de ello son las numerosas investigaciones sobre las propiedades antitumorales del té verde y sus elevados niveles de polifenoles (especialmente de epigallocatequina-3-galato), así como también de sustancias aisladas (caso del ácido clorogénico (Demeule *et al.* 2000; Chung *et al.* 2004a; Chung *et al.* 2004b; Jin *et al.* 2005). De hecho, se ha puesto de manifiesto la capacidad de los polifenoles extraídos de los vegetales para actuar como preventivos y, en algunos casos, como tratamiento de tumores cutáneos, interaccionando con los mecanismos del envejecimiento celular, de las enzimas epigenéticas de la carcinogénesis y de los factores de crecimiento epidérmico (Korkina *et al.* 2013). Resultados parecidos se han obtenido para tumores de otra índole, como se pudo apreciar por ejemplo en ensayos realizados con células humanas de cáncer de mama (Berdowska *et al.* 2013).

III.3.2.1. Ácido clorogénico

Existen evidencias científicas de la capacidad del ácido clorogénico de inhibir la carcinogénesis de tumores de intestino, recto, hígado, próstata, lengua, células del estrato espinoso de la piel y glándulas salivales (Mori *et al.* 1986; Tanaka *et al.* 1990; Tanaka *et al.* 1993; Mori *et al.* 2000; Jiang *et al.* 2000; Chlopcíková *et al.* 2004; Jin *et al.* 2005; Rocha *et al.* 2012). Se ha demostrado, además, que el ácido clorogénico induce la muerte celular por apoptosis con fragmentación del ADN y estimulación de la actividad de las caspasas, aunque el mecanismo no se ha esclarecido del todo (Jiang *et al.* 2000; Granado-Serrano *et al.* 2007). Asimismo, se ha corroborado que ejerce actividad citotóxica casi exclusivamente sobre células tumorales, sin afectar a las células sanas (Jiang *et al.* 2000).

No obstante, a pesar de haber ensayado y confirmado su eficacia como inhibidor de varios tumores, hay que resaltar que la gran mayoría de los estudios se realizaron junto con otros polifenoles, siendo por ello difícil en ocasiones extrapolar y atribuir los resultados sólo a la acción del ácido clorogénico (Xiang y Ning 2008).

III.3.2.2.Flavonoides

Numerosos estudios epidemiológicos han puesto en evidencia la relación directa entre la ingesta de alimentos con presencia de flavonoides (se estima que su ingesta diaria en una dieta nutricionalmente equilibrada llega a alcanzar 1 g/día) y la reducción del riesgo de desarrollar cáncer y enfermedades cardiovasculares (Le Marchand 2002; Maron 2004; Neuhaus 2004; Calderón-Montaña *et al.* 2011; Chahar *et al.* 2011). Se ha demostrado en las investigaciones realizadas tanto *in vitro* como *in vivo* que existen varios mecanismos de acción para explicar la acción protectora de los flavonoides frente al cáncer (asumiendo una marcada función antiproliferativa) y frente a las enfermedades cardiovasculares, además de ser potentes antioxidantes y útiles alternativas terapéuticas en el tratamiento de otras enfermedades (Hirono 1987; Middleton *et al.* 2000; Russo *et al.* 2000; Pérez Trueba 2003; Calderón-Montaña *et al.* 2011). Entre los mecanismos propuestos tenemos, la supresión del ciclo celular, la inducción de apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, el efecto antioxidante y la reversión de la resistencia múltiple a los fármacos (Chahar *et al.* 2011). Por otro lado, se ha podido observar que, por lo general, la hidroxilación del anillo B (como en los flavonoles) aumenta su actividad antioxidante, citotóxica y antiinflamatoria respecto a otros flavonoides (Middleton *et al.* 2000; Pérez Trueba 2003; Calderón-Montaña *et al.* 2011; Ross y Kasum 2002).

Hay que señalar que algunos de estos descubrimientos se han hecho partiendo del estudio de plantas tradicionalmente empleadas para tratar diferentes patologías, en las cuales se ha observado un elevado contenido en flavonoides (Wang 2000; Lopez-Lazaro 2002; Ren *et al.* 2003; Hoensch y Kirch 2005; Li *et al.* 2007; Lopez-Lazaro 2009; Calderón-Montaña *et al.* 2011).

Entren las numerosas investigaciones realizadas, podemos comentar la potencial actividad anticancerígena mamaria de algunos flavonoides (como la apigenina y la hesperetina), ya que inhibieron la enzima aromatasa, que es la encargada de la biosíntesis del estradiol a partir de andrógenos, el cual se ha implicado directamente en el desarrollo de cáncer en el tejido mamario (Chahar *et al.* 2011). Asimismo, la quercetina produjo la inhibición del crecimiento de melanomas en animales de laboratorio y la reducción de la incidencia de cáncer de pulmón en un estudio clínico, observándose una relación inversa entre la ingesta de flavonoides y la aparición de nuevos casos (Nijveldt *et al.* 2001). Del mismo modo, otros flavonoides, como por

ejemplo la buteina, demostraron ser capaces de inhibir el crecimiento de células de cáncer de colon (HCT116) (Kang *et al.* 2004). Por otro lado, algunos estudios sugieren que el mecanismo por el que los flavonoides pueden inhibir la carcinogénesis está relacionado con su capacidad de actuar como antioxidantes: intervendrían en la inhibición de la proliferación descontrolada de las ROS, consideradas como uno de los factores implicados en la carcinogénesis, debido al daño directo que provocan sobre el ADN con el consiguiente desarrollo de mutaciones celulares (Loft y Poulsen 1996; Pryor 1997; Nijveldt *et al.* 2001).

III.3.3. Aceites esenciales como citotóxicos

En los últimos años, los aceites esenciales han llamado la atención de los investigadores como agentes citotóxicos, ya que parece ser que su mecanismo de acción podría ser diferente del que tienen los fármacos usados comúnmente en quimioterapia (Rajesh y Howard 2003; Edris 2007).

En líneas generales, se observa que los aceites esenciales, al contener sustancias lipófilas de pequeño tamaño, pasan rápidamente a través de las membranas citoplasmáticas y mitocondriales rompiendo sus estructuras y volviéndolas permeable a la salida de iones de calcio y proteínas. Además, se ha descrito un mecanismo de fototoxicidad, por el cual los aceites esenciales entrarían en las células y, tras activación por exposición directa a la luz, provocarían un daño irreversible en las estructuras de las mismas (Bakkali *et al.* 2008).

No obstante, debido al gran número de compuestos presentes en los aceites esenciales se cree que no tienen una única y específica diana, ni un único mecanismo de acción (Bakkali *et al.* 2008). Un mecanismo de acción general sería el de la apoptosis en las células dañadas, que se puede ocasionar por diversas vías como, por ejemplo, incrementando los niveles de ROS, que en este tipo de células lleva a que se incremente su muerte programada. Esto se observa, por ejemplo, en los aceites esenciales de *Aniba rosaeodora* o de *Zanthoxylum schinifolium* (Bakkali *et al.* 2008; Gautam *et al.* 2014). Además, el incremento de la producción de ROS va acompañado en muchas ocasiones por la disminución de enzimas antioxidantes necesarias para su neutralización (como el glutatión), ocasionando que el daño causado por ROS sea aún más acusado en las estructuras celulares.

También se ha demostrado que los aceites esenciales aumentan la expresión de proteínas celulares como la Akt, que a su vez regula genes tan importantes en la supresión de tumores como puede ser p53, lo cual explicaría la inhibición de la activación del NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) que producen (Gautam *et al.* 2014). Cabe recordar que NF- κ B se activa en las células tumorales y el bloqueo

del mismo produce que las células dejen de proliferar y que, además, sean más sensibles a la acción de los agentes antitumorales. Este mecanismo se ha descrito, por ejemplo, con monoterpenos como el terpineol o el acetato de linalilo y también con el aceite esencial de *Cryptomeria japonica* (Bhalla *et al.* 2013; Gautam *et al.* 2014). Otro factor de transcripción susceptible de inhibición por parte de los aceites esenciales es el AP-1, además de las quinasas de la ruta MAP, que se ha observado en el aceite esencial de *Artemisia capillaries* (Gautam *et al.* 2014).

También se ha encontrado que algunos aceites esenciales inhiben el ciclo celular de las células tumorales. Así, el aceite esencial de pachuli (*Pogostemon cablin*) inhibió la expresión del gen p21 que regula la fase G1 del ciclo celular, mientras que otros aceites esenciales y monoterpenos aislados detuvieron las fases S/G2 y G2/M (Gautam *et al.* 2014).

Asimismo, algunos aceites esenciales, como el *Citrus sinensis*, ejercen un efecto antiangiogénico y de supresión de la actividad proliferativa y de la metástasis de las células tumorales (Bhalla *et al.* 2013; Gautam *et al.* 2014).

Otros aceites esenciales, como el de las especies *Allium sativum*, *Ocimum sanctum* y *Wedelia chilensis*, o monoterpenos como el citral, aumentaron la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) (Edris 2007; Gautam *et al.* 2014).

También se ha observado que muchos aceites esenciales son capaces de modificar e inhibir las rutas bioquímicas encargadas de reparar el DNA dañado, por ejemplo por una presencia excesiva de ROS (estas rutas se controlan por genes como el H2AFX y HDAC4, o enzimas como las ADN polimerasas), siendo éste una forma efectiva para contrarrestar la elevada tasa de proliferación de las células cancerosas (Gautam *et al.* 2014).

Finalmente, se ha encontrado que algunos aceites esenciales así como algunos de sus componentes aislados redujeron drásticamente la resistencia de las células tumorales a los fármacos usados habitualmente en quimioterapia, probablemente por una acción sinérgica. Como ejemplos podemos citar los aceites esenciales de *Juniperus excels*, *Melaleuca alternifolia* y *Nigella sativa*, o monoterpenos como el terpinen-1-ol o el linalol, que han disminuido la resistencia celular a vincristina, cisplatino o doxorubicina (Bhalla *et al.* 2013; Gautam *et al.* 2014). Además, el (*E*)-cariofileno ha demostrado ser capaz de aumentar la actividad citotóxica de otros terpenos como α -humuleno o isocariofileno, e incluso la del diterpeno paclitaxel (Adorjan y Buchbauer 2010).

En general, se afirma que la actividad citotóxica de un aceite esencial se debe principalmente a la presencia en su composición de fenoles, aldehídos y alcoholes (Bakkali *et al.*

2008). Además, en una revisión realizada por Adorjan (2010) se observó que los grupos de mono- y sesquiterpenos más efectivos frente a células tumorales son los alcoholes monoterpénicos y los hidrocarburos sesquiterpénicos. De hecho, se han encontrado buenos resultados con terpenos como el limoneno y su metabolito, el alcohol perílico, que son los compuestos principales del aceite esencial de la cáscara del fruto del naranjo dulce (*Citrus sinensis*). Como consecuencia de ello, el alcohol perílico se ha propuesto como candidato para ensayos clínicos en la *National Cancer Institute* y, de momento, se han obtenido resultados prometedores en el control del cáncer pancreático, de hígado y de colon en animales de experimentación (Baser 2010). Además de los dos terpenos mencionados, también otros monoterpénicos con función alcohol (p. ej. geraniol, carveol, farnesol, nerolidol y mentol) mostraron actividad inhibidora sobre neoplasias del duodeno (Bakkali *et al.* 2008; Baser 2010) y el linalol, a su vez, frente a células del cáncer de mama (Adorjan y Buchbauer 2010). Asimismo, el hidrocarburo sesquiterpénico (*E*)-cariofileno ha obtenido resultados destacados en ensayos realizados con células de cáncer de mama (Raut y Karuppayil 2014).

III.3.4. El hipérico como citotóxico

Los extractos de *Hypericum perforatum* han demostrado en diversos trabajos que reducen el crecimiento de varias líneas celulares de cáncer humano *in vitro* e *in vivo*, como es el caso de las líneas celulares de leucemia (K562 y U937), de carcinoma humano del colon (HT-29) y de carcinoma de pulmón (H-460) (Wada *et al.* 2002; Martarelli *et al.* 2004; Guedes *et al.* 2012; Prakash *et al.* 2013).

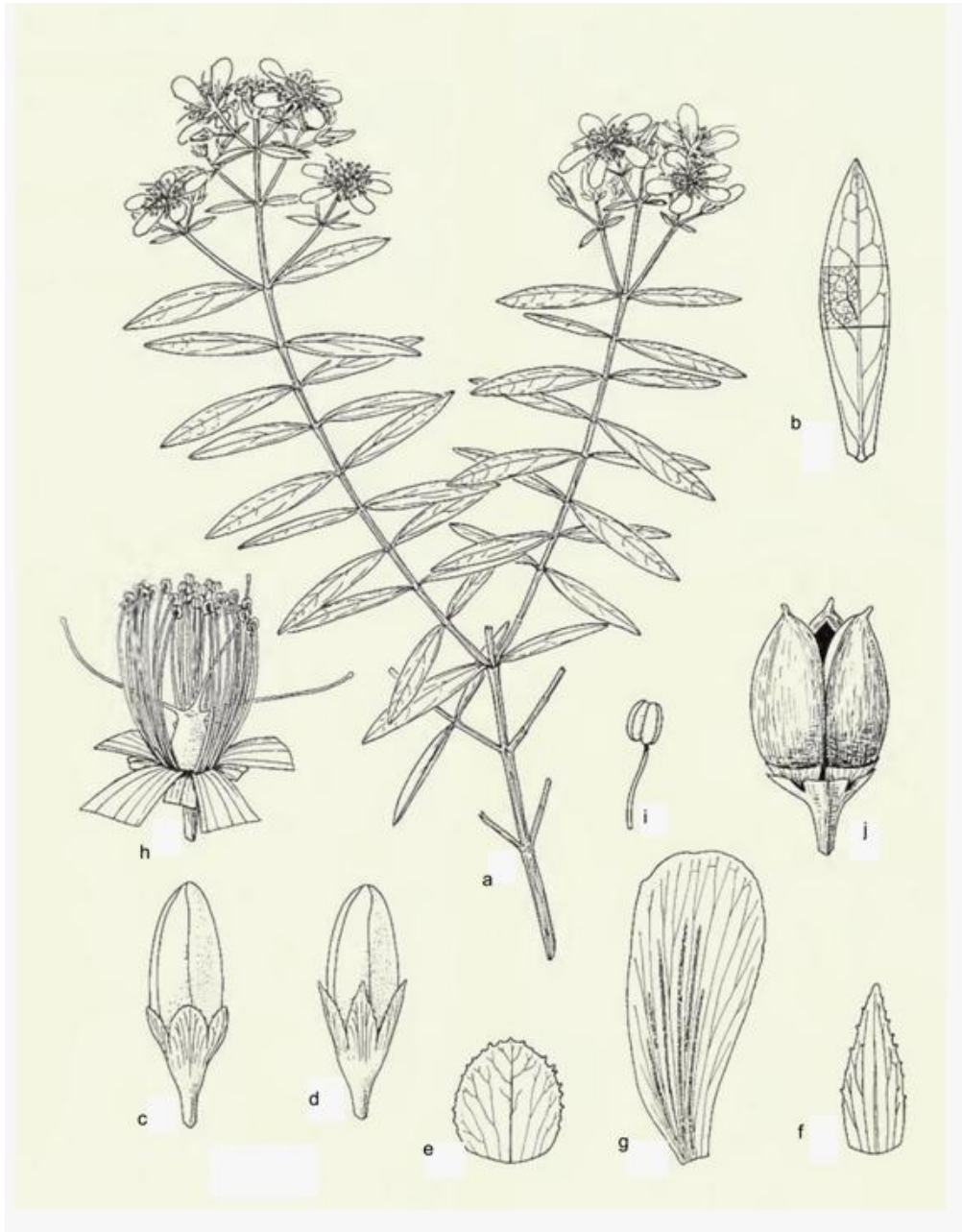
La actividad citotóxica del *Hypericum perforatum* se ha relacionado con la presencia de naftodiantronas (como la hipericina) y derivados prenilados del floroglucinol en la composición del mismo, pudiéndose explicar esta actividad básicamente por dos mecanismos (Avato 2005; Hostettmann y Wolfender 2005; Saddiqe *et al.* 2010).

El primer mecanismo depende de la presencia de la luz y está relacionado fundamentalmente con la fotoactivación de las naftodiantronas (Menichini *et al.* 2013; Marrelli *et al.* 2014; Wölfle *et al.* 2014). Se han descrito los efectos inductores de apoptosis y fototoxicidad por parte de la hipericina y de la pseudohipericina sobre células de linfomas, descubriendo una relación directa entre la dosis de naftodiantronas y la inhibición de la proliferación celular en presencia de luz visible. Por esta razón, se llegó a proponer y ensayar la hipericina como agente fotosensibilizante en terapia contra los melanomas (Schempp *et al.* 2002a; Saddiqe *et al.* 2010; Wölfle *et al.* 2014). De hecho, la hipericina se encuentra en la Fase II de un ensayo clínico para tratar a pacientes con linfomas cutáneos mediante terapia fotodinámica (Teiten *et al.* 2013).

Asimismo, se está estudiando su potencial uso como instrumento de diagnóstico en casos de gliomas debido a su capacidad para teñir y permitir así diferenciar células sanas de las tumorales (Teiten *et al.* 2013). No obstante, las naftodiantronas no son los únicos metabolitos secundarios que tienen propiedades fototóxicas, habiéndose demostrado la eficacia *in vitro* de tratamientos fotodinámicos realizados con hiperforina sobre las células de cáncer de colon (HCT116) (Šemeláková *et al.* 2012; Mikešová *et al.* 2013).

Por otro lado, el segundo mecanismo es independiente de la luz y prevé la acción directa de compuestos como las naftodiantronas y, especialmente, la hiperforina como agentes inhibidores del crecimiento de tumores. Así se observó que la hiperforina redujo la vascularización e indujo la apoptosis de diferentes líneas celulares humanas (*in vitro*) y de ratones (*in vivo*), sin producir toxicidad aguda (Schempp *et al.* 2002a; Schempp *et al.* 2002b; Hostanska *et al.* 2003; Dona *et al.* 2004; Schempp *et al.* 2005; Quiney *et al.* 2006). Asimismo, la hipericina y la pseudohipericina inhibieron la proteína quinasa C (PKC) y exhibieron actividad antiproliferativa sobre células de mamíferos y sobre células de gliomas, en este último caso con una eficacia comparable a la del tamoxifeno (Wada *et al.* 2002; Martarelli *et al.* 2004; Saddiqe *et al.* 2010; Prakash *et al.* 2013). Más concretamente, se demostró que la hipericina logró inducir la apoptosis sobre células de melanoma humano (A375) y de carcinoma mamario humano (MDA-MB-231) mediante un mecanismo que implica la externalización de la fosfatidilserina y la pérdida de la integridad de membrana (Medina *et al.* 2006; Kleemann *et al.* 2014).

Debemos señalar que otro grupo de compuestos abundante en los hipéricos, los flavonoides, han mostrado actividad citotóxica aunque no tan potente como la observada con las naftodiantronas y la hiperforina (Dajas 2012; Romagnolo y Selmin 2012; Wölflle *et al.* 2014).



3. MATERIAL Y MÉTODOS

Página anterior: *Hypericum canariense* L.

(a) hábito; (b) hoja; (c) yema (*var. canariense*); (d) yema (*var. floribundum*); (e) sépalo (*var. canariense*); (f) sépalo (*var. floribundum*); (g) pétalo; (h) estambres y ovario; (i) antera; (j) cápsula. (Adaptado de Robson 1996).

I. RECOLECCIÓN, IDENTIFICACIÓN, DESECACIÓN Y TRITURACIÓN

Para el trabajo de investigación que se presenta en esta Tesis Doctoral, se han utilizado las partes aéreas en flor de diferentes especies del género *Hypericum*, todas ellas recolectadas en la isla de Tenerife: *Hypericum canariense* L., *Hypericum grandifolium* Choisy e *Hypericum reflexum* L. f. (procedente de La Esperanza y de Ifonche). El material vegetal ha sido depositado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la ULL, siendo identificado por la Dra. Consuelo Hernández Padrón y procediéndose seguidamente a incluirlo en el Herbario situado en dicho departamento. Los detalles sobre el material recolectado se proporcionan en la **Tabla 3.1** y en la **Figura 3.1**.

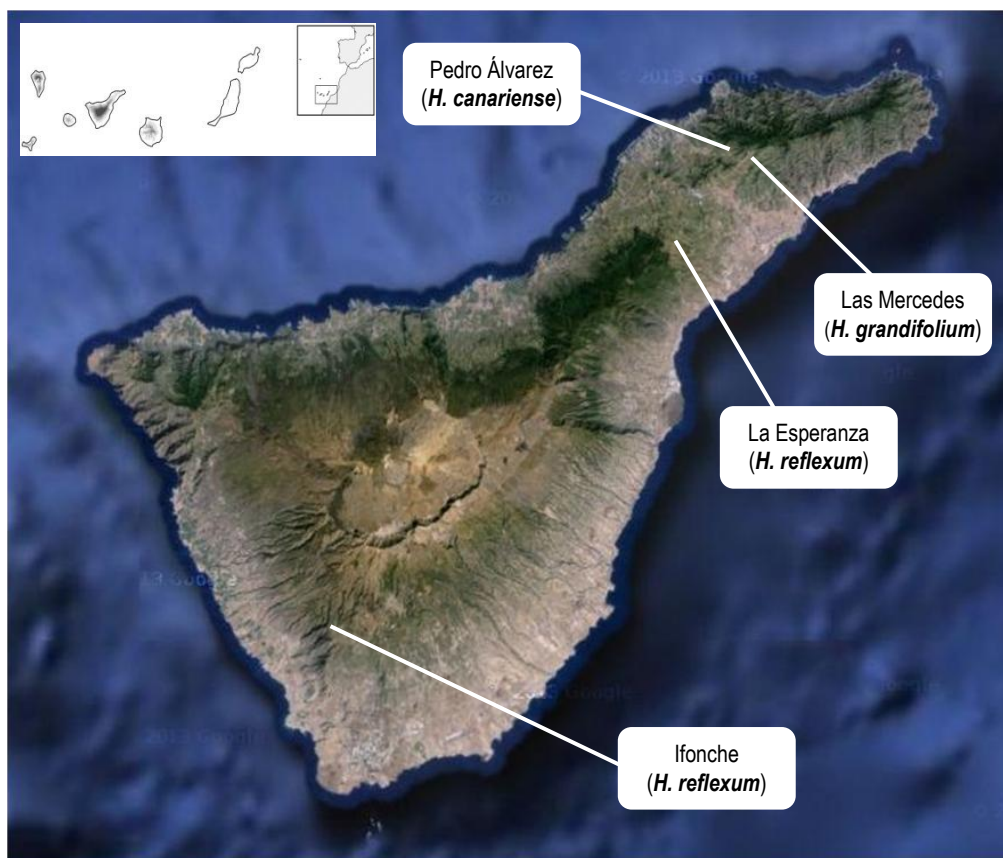


Figura 3.1. Imagen desde el satélite y posición geográfica de la isla de Tenerife (obtenida en Google Maps; <https://www.google.es/maps>) modificada señalando los puntos de recogida de los hipéricos bajo investigación.



Figura 3.2. Ejemplo de *H. grandifolium* desecándose en la estufa del laboratorio.

El material vegetal fue sucesivamente desecado en una estufa (JP Selecta, modelo 372, España) con libre circulación de aire a 38 °C (**Figura 3.2**), triturado en un molino (Electromotor Pact tipo 100 Ls de Mateu and Solé S.A., Barcelona) y almacenado hasta su utilización en recipientes herméticos en ausencia de humedad, luz y calor.

Tabla 3.1. Detalles del lugar de recolección y de los depósitos realizados en el herbario de las especies de *Hypericum* utilizadas para la realización de la investigación.

Especie	Pliego herbario ULL ^a	Lugar (fecha) de recolección / Coordenadas GPS ^b / altitud ^c (sobre el nivel del mar)
<i>H. canariense</i>	TFC 50776	Subida Pedro Álvarez (Mayo 2013) / 28°31'49.8"N 16°18'23.8"W / 635 m
<i>H. grandifolium</i>	TFC 50442 TFC 50777	Las Mercedes (Junio 2012) / 28°32'08.0"N 16°18'03.7"W / 880 m
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	TFC 50441 TFC 50779	El Rosario, La Esperanza (Junio 2012) / 28°25'38.6"N 16°22'59.1"W / 1160 m
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	TFC 50778	Ifonche (Junio 2013) / 28°08'07.9"N 16°41'15.0"W / 1018 m

^a Herbario del Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Farmacia, ULL. Incluido en el Index Herbariorum del "The New York Botanical Garden", <http://sweetgum.nybg.org/ih/herbarium.php?irn=126277> .

^b Coordenadas DMS (Grados, Minutos, Segundos).

^c Datos disponibles en PixelisMaps © 2014, <http://www.maps.pixelis.es> .

II.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS, FRACCIONES Y ACEITES ESENCIALES

El material vegetal recolectado y desecado (ver el apartado I del capítulo *Material y Métodos*) constituyó el punto de partida para la preparación de los extractos que con posterioridad fueron utilizados en ensayos fitoquímicos y biológicos (apartado III y IV del capítulo *Material y Métodos*).

II.1. Productos químicos utilizados

- Agua desionizada y purificada con sistema Milli-Q SP ReagentWaterSystem (Millipore, EUA).
- Acetona con un grado de pureza para análisis (Carlo Erba, Italia).
- Cloroformo (ScharlauChemie S.A., España)
- Metanol (Panreac Química S.A., España).
- Metanol con un grado de pureza para análisis (Carlo Erba, Italia).

II.2. Extracción discontinua con disolvente: maceración

El material vegetal seco y finamente triturado (*Hypericum canariense*, 300 g; *Hypericum grandifolium*, 95 g; *Hypericum reflexum* de La Esperanza, 303 g) se maceró en metanol durante tres días, repitiéndose esta operación tres veces. Los extractos se llevaron a sequedad, a temperatura inferior a 40 °C y presión reducida, con un Rotavapor (modelo R110, marca Büchi) acoplado a una bomba de vacío (Tokyo Rikakikai Co., LTD Tipo A-35).

Sucesivamente, parte del extracto metanólico se trató con cloroformo (CHCl₃) siguiendo el mismo procedimiento general, lo que nos permitió obtener dos fracciones: una fracción clorofórmica y otra compuesta por productos más polares insolubles en cloroformo, que de ahora en adelante vamos a llamar fracción polar (FP). Todo el material así obtenido se guardó en matraces con tapón de vidrio esmerilado, en frío y en ausencia de luz.

II.3. Extracción continua con disolvente: Soxhlet



Figura 3.3. Extracción de *H. canariense* realizada con el método Soxhlet.

El método de Soxhlet se basa en una extracción continua sólido-líquido que permite extraer hasta agotamiento los componentes de una planta en función de las características del disolvente que se utilice (**Figura 3.3**) (Kuklinski 2000; Bruneton 2004). Para su realización se siguieron los parámetros descritos en la literatura (Maggi *et al.* 2004).

El material vegetal seco (5 g por cada una de las cuatro muestras de hipérico) se trituró finamente con un molino (modelo DCFH 48 Ika-Werke; Staufen, Alemania) equipado con filtros de 1 mm de diámetro, se envolvió en papel de filtro y fue así introducido en el cuerpo extractor del

Soxhlet. Se utilizó en cada caso 400 ml de una mezcla 1:1 de metanol/acetona y se extrajeron durante 4 h. Los extractos resultantes se concentraron hasta sequedad de la manera habitual en un Rotavapor. Posteriormente, los diferentes extractos se disolvieron en 50 ml de metanol (MeOH), se concentraron hasta sequedad y se guardaron en matraces con tapón de vidrio esmerilado en frío.

II.4. Hidrodestilación

La hidrodestilación, uno de los métodos oficiales contemplados en varias farmacopeas para obtener aceites esenciales de uso farmacéutico, es una técnica que permite extraer los

componentes volátiles de un vegetal mediante arrastre de vapor (Kuklinski 2000; Bruneton 2004). En el caso concreto de esta investigación, se ha recurrido al uso de un equipo Clevenger para obtener los aceites esenciales de las especies anteriormente

Tabla 3.2. Cantidad de planta extraída en el Clevenger.

Especie	Pliego herbario	Peso (g)
<i>H. canariense</i>	TFC 50776	300
<i>H. grandifolium</i>	TFC 50777	340
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	TFC 50779	465
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	TFC 50778	361



Figura 3.4. (a, izquierda) equipo Clevenger extrayendo a *H. grandifolium*; (b, derecha) vial de cierre hermético utilizado para la conservación de los aceites esenciales tras su obtención por hidrodestilación; ejemplo de *H. reflexum* de Ifonche.

mencionadas. La droga seca y triturada se introdujo en el matraz del Clevenger (ver detalles de las cantidades iniciales en la **Tabla 3.2**), se añadieron 6 l de agua destilada y se mantuvo a temperatura de ebullición durante 4 h (**Figura 3.4 a**). Tras ser destilados, los aceites esenciales se guardaron en viales de cierre

hermético y se conservaron a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Figura 3.4 b**).

Con el fin de obtener un rendimiento más exacto del aceite esencial, se estimó el contenido de agua residual en el material vegetal seco siguiendo el procedimiento propuesto por Bicchi y Maffei (2012). Para ello, se pesaron 2 g de cada uno de los hipéricos y se introdujeron en una estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 8 h, hasta completa deshidratación de los tejidos vegetales. Transcurrido este tiempo, se calculó por diferencia de pesada el contenido de agua residual en cada una de las muestras.

III.

ESTUDIO FITOQUÍMICO

Uno de los objetivos de esta investigación fue determinar la composición química de los extractos, fracciones y aceites esenciales obtenidos de los hipéricos investigados, que posteriormente serán utilizados en el estudio biológico. Para ello, se recurrió a la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector con diodos en línea (HPLC-DAD) y a la acoplada a un espectrómetro de masas con ionización por electronebulización (HPLC/ESI-MS). Con estas técnicas realizamos el análisis cualitativo y cuantitativo de metabolitos secundarios de los extractos y fracciones. Además, se utilizó la cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (GC-FID) y a un espectrómetro de masas (GC-MS) para el análisis de los aceites esenciales.

III.1. Productos químicos utilizados

- En las técnicas de HPLC se emplearon: ácido clorogénico (Sigma-Aldrich, Italia), hiperforina (Sigma-Aldrich, Italia), hipericina (Sigma-Aldrich, Italia), hiperósido (Applied Biosystem, Italia), isoquercitrina (Applied Biosystem, Italia), quercetina (Sigma-Aldrich, Italia), quercitrina (Sigma-Aldrich, Italia), rutina (Sigma-Aldrich, Italia). Tanto el agua desionizada y purificada con sistema Milli-Q SP Reagent Water System (Millipore, EUA) como los disolventes acetato de etilo (Merck, Alemania), acetonitrilo (Merck, Alemania), ácido fosfórico (Merck, Alemania) y metanol (Merck, Alemania) que se emplearon, tenían un grado de pureza para análisis mediante cromatografía líquida.
- En el análisis con GC se utilizaron hexano (Carlo Erba, Italia) y mezcla de alcanos lineales C₈ – C₃₀ (Supelco, EUA) con grado de pureza para análisis.

III.2. HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

La técnica de HPLC se ha utilizado en esta investigación para detectar algunos componentes químicos que están presentes comúnmente en el *Hypericum perforatum*, especie

que se toma como referencia dentro del género *Hypericum*. Para ello se llevó a cabo la identificación en todos los extractos y fracciones de los hipéricos en estudio de las siguientes 11 moléculas: ácido clorogénico, hiperforina, hiperósido, isoquercitrina, quercetina, quercitrina, rutina y cuatro naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina, protohipericina, protopseudohipericina).

III.2.1. Fundamento teórico

La cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography* (HPLC) es una técnica ampliamente utilizada para la separación analítica y preparativa de productos naturales que resulta, en particular, muy útil en aquellos casos en los cuales existe mayor dificultad de separación. La HPLC es un sistema de cromatografía en columna de pequeño diámetro (2-5 mm) en el cual se requieren presiones de entrada relativamente elevadas para proporcionar un flujo controlado de la fase móvil. La fase estacionaria está formada por partículas entre 5-50 μm , lo que mejora notablemente la eficacia de separación, y la fase móvil está constituida por mezclas de disolventes de diferentes características. Los componentes de la muestra se distribuyen a lo largo de la columna en función de la afinidad que presenten con respecto a la fase estacionaria y la fase móvil. El tiempo que tarda un componente en ser eluido se denomina tiempo de retención (t_R), siendo éste una propiedad característica del mismo en función de unas determinadas condiciones. Las fases móviles están constituidas mayoritariamente por agua, metanol, acetonitrilo o mezclas de los mismos. El agua puede contener tampones o sales que ayudan a la separación de los compuestos. Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como elución en gradiente y que ha sido utilizada en nuestra investigación (Harris 2007; Skoog *et al.* 2001). Los detectores utilizados en esta investigación son el DAD y el ESI/MS. El DAD (*diode array detector*, o detector con diodos en línea) es uno de los detectores de absorción ultravioleta que se usa en HPLC, ya que proporciona un espectro completo de longitud de onda (λ) por unidad de tiempo. Este detector es uno de los más usados debido a su universalidad, bajo coste, rapidez de medida y la gran cantidad de información espectral que genera. La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que permite obtener datos de masa/carga (m/z) de un analito, siendo el punto de inicio de un análisis por MS la formación de iones a partir del analito. Para ello, se cuenta con numerosos instrumentos, como la ionización por electronebulización (ESI) que hemos utilizado en este trabajo. Esta técnica provoca la formación directa de iones gaseosos a partir de moléculas grandes y térmicamente frágiles consiguiendo una gran fragmentación de las mismas. El ión molecular y

los diversos fragmentos que se producen permiten identificar los diferentes componentes de la muestra bajo estudio (Harris 2007; Skoog *et al.* 2001).

III.2.2. HPLC-DAD. Protocolo experimental

El análisis se centró en la determinación cualitativa y cuantitativa de los 8 siguientes metabolitos secundarios: ácido clorogénico, hiperforina, hipericina, hiperósido, isoquercitrina, quercetina, quercitrina e rutina.

Para su realización se siguió el método descrito por Sagratini *et al.* (2008). Se utilizó un sistema HPLC Hewlett Packard HP-1090 (Palo Alto, EUA) equipado con una bomba ternaria para los disolventes, un sistema automático de carga de muestras HP-1090 (con volumen de inyección de 20 μ l) y DAD (**Figura 3.5**). El análisis se realizó utilizando una columna LUNA C₁₈ (250 mm de largo y diámetro interno de 4.6 mm, siendo el tamaño de partícula de 5 μ m y el



Figura 3.5. Cromatógrafo HPLC-DAD utilizado en la investigación.

tamaño de poro de 100 Å) de Phenomenex USA (distribuida por Chemtek Analytica, Italia). Como fase móvil se empleó una mezcla a proporciones variables de tres soluciones (A, B y C), según se detalla en la **Tabla 3.3**. Los sistemas eluyentes finalmente fueron: A = agua / ácido fosfórico al 0.02% con pH 2.7; B = acetonitrilo / metanol (90:10 v/v); C = acetato de etilo / [mezcla de A+B (10% A, 90% B v/v)] (10:90 v/v). La velocidad de flujo de la elución (caudal) fue de 1 ml/min por un total de 130 min por cada análisis. Los componentes se analizaron en relación con las

longitudes de onda características de cada uno de ellos: $\lambda=210$ nm para ácido clorogénico, hiperósido, isoquercitrina, quercetina, quercitrina y rutina; $\lambda=270$ nm para hiperforina y $\lambda=590$ nm para hipericina.

Para llevar a cabo el análisis, se disolvieron las muestras en metanol a una concentración de 1 mg/ml. Para el calibrado del instrumento se recurrió al método del patrón externo de estándares: se utilizaron soluciones disueltas en metanol a varias concentraciones de los ocho metabolitos secundarios a investigar (100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm y 5 ppm) (**Tabla 3.4**). La identificación de los analitos en las muestras se basó en la comparación directa de sus tiempos de retención con los tiempos de retención de los estándares analizados al HPLC bajo las mismas condiciones.

Tabla 3.3. Gradiente de elución lineal usado en el análisis con HPLC-DAD.

Tiempo (min)	Disolvente A (%) ^a	Disolvente B (%) ^b	Disolvente C (%) ^c
0	85	15	0
10	65	35	0
30	10	90	0
60	0	0	100
70	0	100	0
105	85	15	0
130	STOP	STOP	STOP

^a Disolvente A = agua / ácido fosfórico al 0.02%, pH 2.7

^b Disolvente B = acetonitrilo / metanol (90:10 v/v)

^c Disolvente C = acetato de etilo / [mezcla de A+B (10% A, 90% B v/v)] (10:90 v/v)

Además, como verificación de los resultados obtenidos, se compararon las muestras y los estándares en relación a sus espectros UV/visible usando el detector DAD. Finalmente, las concentraciones de los analitos en los extractos se hallaron estableciendo una proporción entre sus áreas bajo la curva y la de los respectivos estándares. Los resultados se expresaron en mg por cada g de planta (en el caso de los extractos MeOH y Soxhlet). El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla 3.4. Parámetros de los patrones externos usados para validar el método en HPLC-DAD.

Compuesto	Rango de concentraciones (mg/l) ^a	Longitud de onda (nm)	Tiempo de retención ^b (min)	Recta de calibrado	R ²	LOD ^c (mg/l)	LOQ ^d (mg/l)
Ácido clorogénico	5-100	210	5.15	y = 14.0486x - 9.0464	0.9980	1	5
Rutina	5-100	210	18.47	y = 26.466x + 2.6982	0.9982	0.1	0.5
Hiperósido	5-100	210	19.22	y = 32.426x - 20.7894	0.9993	0.1	0.5
Isoquercitrina	5-100	210	19.67	y = 28.7013x - 5.2504	0.9994	0.1	0.5
Quercitrina	5-100	210	22.70	y = 55.227x - 66.415	0.9996	0.1	0.5
Quercetina	5-100	210	30.58	y = 71.829x - 71.103	0.9996	0.2	0.8
Hiperforina	2.5-50	270	58.07	y = 7.7078x + 0.9519	0.9994	0.3	1
Hipericina	5-100	590	75.79	y = 37.864x + 9.7612	0.9998	0.1	0.5

^a Rango de 5 puntos de concentraciones: 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm y 5 ppm (para el rango 5-100 mg/l); 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2.5 ppm (para el rango 2.5-50 mg/l).

^b $\sigma \leq 2.52\%$.

^c LOD (*Limit Of Detection*, Límite de Detección) = 3 × ruido de fondo.

^d LOQ (*Limit Of Quantification*, Límite de Cuantificación) = 10 × ruido de fondo.



Figura 3.6. Cromatógrafo HPLC/ESI-MS utilizado en la investigación.

III.2.3. HPLC/ESI-MS. Protocolo experimental

Se investigaron desde el punto de vista cualitativo cuatro naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina, protohipericina, protopseudohipericina). En el caso de la hipericina se proporcionaron además datos cuantitativos.

El análisis se efectuó con un HPLC Agilent 1100 (Santa Clara, EUA) equipado con un sistema automático de carga de

muestra, una bomba binaria para los disolventes, un MS acoplado a un ESI operando en modo negativo (**Figura 3.6**).

Como fase estacionaria se utilizó una columna LUNA C18 (250 mm de largo y diámetro interno de 4.6 mm, tamaño de partícula 5 μm y tamaño de poro de 100 \AA) de Phenomenex USA (distribuida por ChemtekAnalytica, Italia). Como fase móvil se empleó una mezcla a proporciones variables de dos soluciones (A y B, siendo A = agua y B = acetonitrilo/metanol 90:10 v/v) en base a un gradiente lineal: a 0 min, 10% B; a 15 min, 100% B. La velocidad de flujo de la elución (caudal) fue de 1 ml/min y el volumen de inyección de 5 μl . Los parámetros de trabajo del ESI fueron: temperatura del nebulizador de 325 $^{\circ}\text{C}$, presión del gas secante (nitrógeno) de 50 psi, voltaje de 3500 V, velocidad de flujo del gas secante (nitrógeno) de 11 ml/min y rango operativo m/z de 100-1000. Las condiciones para el análisis se optimizaron para cuantificar la hipericina y detectar de forma cualitativa las otras naftodiantronas. Para ello se monitorearon los iones moleculares $[\text{M-H}]^{-}$ (como se describe en la **Tabla 3.5**) por medio de la identificación del pico ion molecular (EIC) partiendo del cromatograma total (TIC). Para el calibrado del instrumento se recurrió al método del patrón externo: se inyectaron 5 μl de una solución de hipericina a varias concentraciones (50 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 1 ppm y 5 ppm); se realizaron 5 inyecciones para cada

Tabla 3.5. Tiempos de retención y iones moleculares de los metabolitos analizados en HPLC/ESI-MS.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Ion molecular $[\text{M-H}]^{-}$ (m/z)
Hipericina	12.9	503.2
Pseudohipericina	10.2	519.3
Protohipericina	-	505.2
Protopseudohipericina	-	521.3

concentración determinando así la σ del método analítico en valores que iban de 2.43% a 3.70%, además de $R^2 = 0.9986$ (para la recta de calibrado), LOD = 0.01 mg/l y LOQ = 0.05 mg/l. Los resultados se expresaron en mg por cada g de planta de partida.

III.3. GC: Cromatografía de gases

La cromatografía de gases se ha utilizado en este trabajo de investigación para el análisis cualitativo y cuantitativo de los aceites esenciales de los diferentes hipéricos en estudio (ver apartado II.4 del capítulo *Material y Métodos*). Más concretamente se optó por realizar un estudio cualitativo con el GC-MS, tras el cual siguió un estudio cuantitativo por medio del GC-FID. Finalmente, se compararon los resultados obtenidos mediante una revisión estadística, el análisis de componentes principales (PCA).

III.3.1. Fundamento teórico

El método más adecuado para el análisis de los constituyentes de un aceite esencial, dada su gran volatilidad, es la cromatografía de gases (GC). Habida cuenta de su facilidad de ejecución, tiempo de análisis corto, fiabilidad de resultados y posibilidad de automatización del proceso, se considera como muy útil tanto para el análisis cualitativo como para el cuantitativo (Bruneton 2004).

La cromatografía de gases (GC) es una técnica cromatográfica en la cual se hace pasar la muestra en forma gaseosa a través de una columna cromatográfica. La GC usada en esta investigación es la que se clasifica como cromatografía gas-liquido, en la que se produce una distribución de los componentes de una muestra entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria constituida por un líquido no volátil inmovilizado sobre la superficie de un sólido inerte que recubre la pared interior de una columna. Los analitos, después de ser separados a través de la columna, llegan al detector (Harris 2007; Skoog *et al.* 2001).

Al igual que en la técnica de HPLC, se pueden usar diversos tipos de detectores. En este caso hemos utilizado la combinación del MS con el FID, como se requiere por la IOFI (*International Organization of the Flavor Industry*) y por revistas científicas como *Flavour and Fragrance Journal* y *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Rubiolo *et al.* 2010). El espectrómetro de masas MS es un aparato que mide la relación masa-carga (m/z) de iones, calentando el compuesto a analizar hasta vaporizarlo e ionizarlo. Con frecuencia se encuentra como detector de un cromatógrafo de gases en una técnica híbrida conocida por sus iniciales en

inglés, GC-MS. En el detector FID (*Flame Ionization Detector* o Detector de ionización de llama), el efluente de la columna cromatográfica (gas portador y analito) se quema a la temperatura de una llama de hidrógeno/aire haciendo que se pirolícen y produzcan iones y electrones, los cuales pueden conducir la electricidad a través de la misma llama. Los dos detectores proporcionan información cualitativa mediante los tiempos de retención (t_R) observados para cada componente, mientras que la información cuantitativa es dada por las áreas de los picos (Harris 2007; Skoog *et al.* 2001).

III.3.2. GC-MS. Protocolo experimental

El análisis se realizó con un cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technologies, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973N (Agilent Technologies, EUA) (**Figura 3.7**). Se usó una columna HP-5MS (Agilent J&W Scientific, EUA) con las siguientes características:



Figura 3.7. GC-MS utilizado en la investigación.

30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y recubierta con un espesor de 0.1 μm de 5%-fenilpoli(metilsiloxano) (fase estacionaria). Se mantuvo la programación de temperatura que sigue: 5 min a 60 $^{\circ}\text{C}$, transcurridos los cuales se incrementó la temperatura de 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 220 $^{\circ}\text{C}$; luego se subió hasta los 280 $^{\circ}\text{C}$ a razón de 11 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y se mantuvo por 15 min a esa temperatura por un total de 65 min. La temperatura del inyector se mantuvo en 280 $^{\circ}\text{C}$; el gas portador usado fue el helio (caudal de 1.0 ml/min); el volumen de inyección fue de 2 μl y se

recurrió a un inyector *split/spiltless* (relación *split* 1:50). El tiempo de escaneado del detector de masas fue de 75 min con un rango de masas de 29-400 m/z ; los espectros se obtuvieron por medio de una fuente de ionización por impacto de electrones (EI) operando con un voltaje de ionización de 70 eV. Los aceites esenciales se diluyeron en *n*-hexano en proporción 1:100. Los datos se recolectaron con el programa MSD ChemStation (Agilent, Version G1701DA D.01.00). La identificación cualitativa de los componentes volátiles de los aceites esenciales se realizó por comparación de los espectros de masa obtenidos por CG-MS con los archivos de las bibliotecas de espectros (Wiley275, NIST08, Adams2007, FFNSC2 y una biblioteca interna de los investigadores del departamento hecha con análisis de estándares comerciales) (Adams 2007; NIST08 2008; FFNSC02 2012; Maggi y Ferreti 2008; Maggi *et al.* 2010a).

III.3.3. GC-FID. Protocolo experimental

El análisis se realizó con un cromatógrafo Agilent 4890D (Agilent Technologies, EUA) acoplado a un detector de ionización de llama (FID) (**Figura 3.8**). Se usó una columna HP-5 (Agilent J&W Scientific, EUA) con las siguientes características: 5%-fenil-95%-metilpolisiloxano (fase estacionaria), 25 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y recubierta con un espesor de 0.17 μm de 5%-fenil-poli(metilsiloxano) (fase estacionaria). La programación de temperatura fue la misma que se usó para el análisis con GC-MS (ver apartado III.3.2 del capítulo *Material y Métodos*). La temperatura del inyector se mantuvo en 280 °C; se usó el helio como gas portador (caudal de 1.8 ml/min); el volumen de inyección fue de 1 μl y se recurrió a inyector *split/splitless* (relación *split* 1:34). Para calcular el índice de retención de cada analito (RI), se inyectó una mezcla de alcanos lineales $\text{C}_8 - \text{C}_{30}$ disueltos en *n*-hexano siguiendo la misma programación de temperatura utilizada para el análisis con GC-MS. Los aceites esenciales se diluyeron en *n*-



Figura 3.8. GC-FID utilizado en la investigación.

hexano en proporción 1:100. El análisis se realizó por triplicado. Los datos se analizaron con el programa HP3398A GC ChemStation (Hewlett Packard, Rev. A.01.01). La cuantificación de los componentes volátiles de los aceites esenciales se llevó a cabo usando como referencia las áreas de los picos de cada uno con respecto al área total de los picos del cromatograma (Maggi y Ferreti 2008; Maggi *et al.* 2010a).

III.3.4. PCA: Análisis de Componentes Principales

En la actualidad, muchos investigadores recurren a la utilización de análisis estadísticos multivariante para definir con mayor precisión los resultados de un análisis químico-analítico de los aceites esenciales, con el fin de definir los quimiotipos que puedan existir en el seno de variaciones intraespecíficas (Keefover-Ring *et al.* 2009). Uno de los más utilizados en el campo de la quimiotaxonomía ha sido el análisis de componentes principales (PCA, *Principal Component Analysis*), la cual es una técnica estadística que trata de representar un conjunto de datos en una nube de puntos en dos dimensiones, ordenándolos por importancia (Andrés y Luna del Castillo 2004). En el caso concreto de esta investigación, la técnica se ha utilizado para observar las posibles relaciones entre los aceites esenciales estudiados e identificar los principales componentes responsables de la variabilidad entre ellos. El análisis se llevó a cabo

con los resultados de las cantidades obtenidas en GC de los aceites esenciales de los hipéricos estudiados. Se ha realizado una tabla recurriendo al uso del programa estadístico STATISTICA 7.1 (StatSoft Italia, 2005), tomando los datos de los aceites esenciales de las cuatro especies estudiadas presentes en concentración igual o mayor al 1% (Sagratini *et al.* 2012).

En esta Tesis Doctoral se llevó a cabo el estudio *in vitro* de las actividades antioxidantes, antibacterianas y citotóxicas de diferentes extractos obtenidos de los hipéricos en estudio, las cuales comentamos a continuación.

IV.1. Productos químicos utilizados

- En los ensayos de capacidad antioxidante se utilizaron los siguientes productos químicos: ABTS (Sigma-Aldrich, Italia), ácido acético glacial (Sigma-Aldrich, Italia), ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich, Italia), ácido gálico (Sigma-Aldrich, Italia), carbonato de sodio anhidro (Sigma-Aldrich, Italia), citrato de sodio trihidrato (Sigma-Aldrich, Italia), DPPH (Sigma-Aldrich, Italia), metanol (Carlo Erba, Italia), persulfato potásico (Sigma-Aldrich, Italia), TPTZ (Sigma-Aldrich, Italia), reactivo Folin–Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Italia), tricloruro férrico hexahidrato (Sigma-Aldrich, Italia) y Trolox (Sigma-Aldrich, Italia).
- Para los ensayos de actividad citotóxica se utilizó: cisplatino, DMEM, DMSO, etanol, estreptomina, L-glutamina, HI-FBS, MTT, penicilina, PBS y RPMI 1640, siendo todos de Sigma-Aldrich, EUA.
- En las pruebas de actividad antimicrobiana se emplearon los siguientes productos y materiales: discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro (Oxoid, UK), discos antibióticos (amoxicilina/ácido clavulánico 20/10 µg; aztreonam 30 µg; ciprofloxacino 5 µg; oxacilina 30 µg; vancomicina 30 µg siendo todos de Oxoid, UK), DMSO (Sigma-Aldrich, EUA), medio de cultivo Müller Hinton (BioMérieux, Francia), placas de agar sangre (BioMérieux, Francia), vancomicina en polvo (potencia ≤ 900 µg/mg, Sigma-Aldrich, España).
- En todos los ensayos donde fue necesario utilizar agua desionizada y purificada, ésta se obtuvo con un sistema Milli-Q SP ReagentWaterSystem (Millipore, EUA).

IV.2. Capacidad antioxidante

Existen diversos métodos para la determinación del potencial antioxidante de diferentes muestras biológicas (como plasma sanguíneo o tejido), extractos o compuestos. Estos métodos se basan normalmente en la capacidad de las sustancias con poder antioxidante de retrasar la oxidación, detener la formación de radicales y/o impedir la ruptura de hidroperóxidos. En la actualidad, no existe un método que refleje de forma completa la actividad antioxidante de una muestra debido a la complejidad de los procesos de oxidación. Por ello, se hace necesario trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados (Sánchez-Moreno 2002; Aruoma 2003; Zou *et al.* 2004; Gioti *et al.* 2009; Miguel 2010b; Orčić *et al.* 2011; Amorati *et al.* 2013).

En base a las reacciones químicas implicadas, la mayor parte de los métodos sobre capacidad antioxidante *in vitro* se puede dividir en dos grupos: métodos basados en una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés) o métodos basados en una reacción de transferencia de un electrón (SET, por sus siglas en inglés). Los métodos HAT miden la habilidad que posee un antioxidante para captar radicales libres por donación de átomos de hidrógeno, mientras que los métodos SET detectan la capacidad potencial de un antioxidante de transferir un electrón para reducir cualquier compuesto incluidos los metales, carbonilos o radicales. No obstante, las reacciones HAT y SET pueden ser difíciles de distinguir ya que las reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno pueden ser el resultado de transferencia de electrones acoplada a protones (Tsuchii *et al.* 2004; Barata Vallejo y Postigo 2012; Slodowicz *et al.* 2011).

Dado que los extractos de plantas tienen una enorme variedad de compuestos fitoquímicos que pueden ejercer su actividad antioxidante por múltiples mecanismos, el estudio de su capacidad antioxidante no puede ser evaluado con un único método, sino que deben utilizarse diferentes métodos con diferentes reactivos y mecanismos para la medida de dicha capacidad.

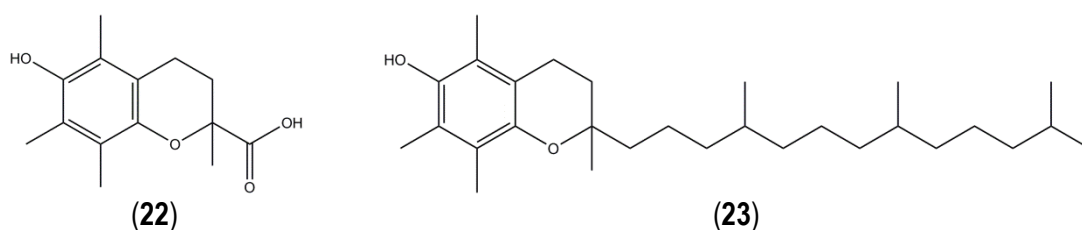


Figura 3.9. Trolox (22) y vitamina E (23).

Generalmente, la eficacia antioxidante de las muestras ensayadas se compara con patrones conocidos como, por ejemplo, el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (**22**), que es un análogo sintético de la vitamina E (**23**) (**Figura 3.9**) (Arnao *et al.* 1999). De hecho, los resultados se suelen expresar en la mayoría de los trabajos haciendo referencia a la capacidad antioxidante equivalente al Trolox: TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), que se define como la concentración mM de Trolox que tiene la misma capacidad antioxidante que una solución 1 mM de la muestra bajo investigación (Miller *et al.* 1993; Re *et al.* 1999; Antolovich *et al.* 2002).

En este trabajo de investigación, la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos obtenidos de las diferentes especies de *Hypericum* se ha estudiado a través de tres ensayos diferentes: la reacción con el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), la reacción con el radical ácido 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) y la medida de la capacidad reductora del hierro (del ión férrico) (método FRAP, por sus siglas en inglés). Estos ensayos son muy usados en el estudio de este tipo de compuestos por ser rápidos, fiables y no requerir un equipamiento sofisticado. Asimismo se determinó el contenido de fenoles totales de los extractos mediante el ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu, ya que se ha observado una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos libres de los extractos (Arnao *et al.* 1999; Aruoma 2003).

IV.2.1. Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

IV.2.1.1. Fundamento teórico

Este método se basa en la reducción del radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH, **24**) por los antioxidantes de la muestra. Se trata de un radical estable, de color violeta en su forma oxidada, que en presencia de un agente antioxidante (AH) se reduce a DPPH-H (**25**) y su color

cambia a amarillo debido a la presencia del grupo picrilo (**Figura 3.11**). Esta reacción se puede medir con un espectrofotómetro a una λ aproximada de 517 nm, ya que la absorbancia característica del radical DPPH en solución metanólica disminuye con la presencia de un antioxidante u otro radical. Es posible, por lo tanto, cuantificar la capacidad antioxidante que posee un extracto mediante la determinación del grado de decoloración que produce

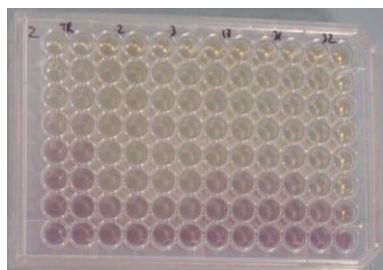


Figura 3.10. Reacción con DPPH en una microplaca utilizada en nuestra investigación.

a una solución metanólica de DPPH (**Figura 3.10**). Cuanto más rápidamente decrece la absorbancia, más potente es la actividad antioxidante de un extracto o sustancia en términos de capacidad de donar electrones. Entre las ventajas de usar este método, se tiene que el ensayo DPPH es un método rápido y sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado. La desventaja que tiene este método es que sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH (Blois 1958; Brand-Williams *et al.* 1995; Huang *et al.* 2005; Baser 2010; Miguel 2010b).

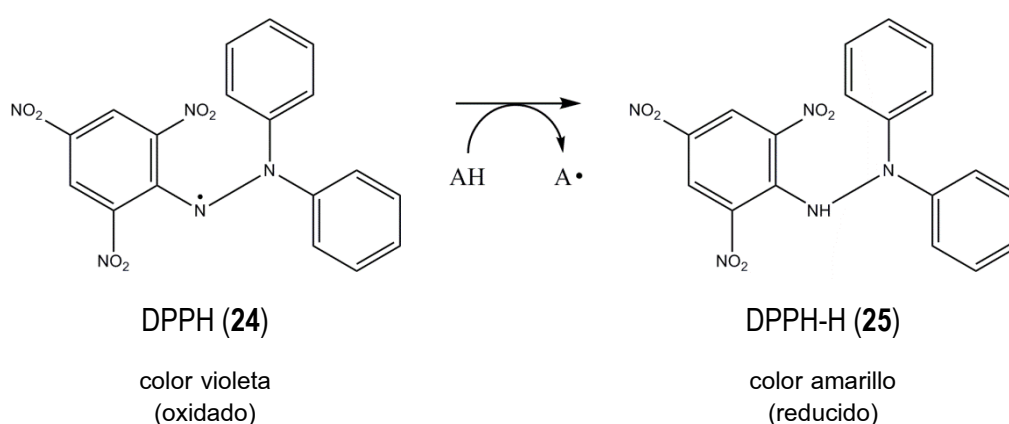


Figura 3.11. Reacción del 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) (**24**) con un antioxidante (AH) para dar DPPH-H (**25**). El esquema simplificado es solo ilustrativo, no pretende dar el mecanismo de reacción en sus detalles.

IV.2.1.2. Protocolo experimental

Para la evaluación de la actividad antioxidante por DPPH se siguió el método desarrollado por Blois (1958) y Brand-Williams *et al.* (1995) con las modificaciones de Srinivasan *et al.* (2007) y Woguem *et al.* (2014) para ser usados con lectores de microplacas. Se preparó una solución metanólica de DPPH ($M_{\text{DPPH}} = 394.32 \text{ g/mol}$) a una concentración de $100 \mu\text{M}$ (equivalente a $40 \mu\text{g/ml}$) en un recipiente opaco recubierto totalmente con papel de aluminio, conservándose a una temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Las muestras a ensayar se disolvieron en metanol en concentraciones de 0.6 mg/ml a 4.3 mg/ml para los extractos y fracciones y de 2 mg/ml a 6.3 mg/ml para los aceites esenciales. Se utilizó como sustancia antioxidante de referencia el Trolox (**22**) ($M_{\text{Trolox}} = 250.29 \text{ g/mol}$), preparándose una solución metanólica 0.4 mM (equivalente a 0.1 mg/ml).

El ensayo se realizó sobre microplacas BD Falcon (BD, EUA) de 96 pocillos, siendo el volumen final de los pocillos de $200 \mu\text{l}$: $50 \mu\text{l}$ de las muestras a ensayar y $150 \mu\text{l}$ de la solución

metanólica de DPPH. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las concentraciones iniciales de los extractos a ensayar o del Trolox desde el pocillo nº 1 hasta el pocillo nº 7, de tal manera que la primera dilución del extracto a ensayar era ya de 1/2 con respecto a la concentración inicial (pocillo 2) y así sucesivamente hasta una dilución 1/64 veces más baja que la concentración inicial en el pocillo nº 7. El pocillo nº 8 se reservó para el blanco (metanol, sin extracto ni Trolox). Finalmente, se adicionaron 150 µl de la disolución de DPPH preparada con anterioridad y se incubaron las microplacas en una estufa (37 °C) por 20 min. Transcurrido este tiempo, se procedió a la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, Alemania) a una $\lambda=517$ nm. Cada muestra se ensayó por triplicado con el fin de obtener una mayor correlación de los datos.

Con los resultados obtenidos, se construyó una curva de regresión no lineal con una ecuación de decaimiento exponencial en una fase, colocando en abscisas los valores de absorbancias obtenidos y en ordenadas las concentraciones de las muestras de partida (µg/ml) y se calculó el valor de IC₅₀ (expresado en µg/ml), que se define como la concentración de muestra necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial de DPPH. El porcentaje de inhibición de la actividad del DPPH se calculó empleando la **ecuación 3.1**, donde A_{blanco} representa la absorbancia del blanco (MeOH + DPPH) y A_{muestra} es la absorbancia de la muestra (muestra + DPPH).

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \frac{(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}}$$

Ecuación 3.1. Ecuación general para el cálculo del porcentaje de inhibición de la actividad del DPPH.

Al relacionar los valores de IC₅₀ del Trolox y el IC₅₀ de cada una de las muestras se calculó la TEAC mediante la **ecuación 3.2**, donde el término "x" representa el valor numérico de TEAC que se expresa en mg de equivalentes de Trolox por g de muestra (mg TE / g muestra).

$$IC_{50 \text{ Trolox}} : IC_{50 \text{ muestra}} = x : 1000 \text{ mg muestra}$$

Ecuación 3.2. Ecuación que relaciona el IC₅₀ del Trolox con el IC₅₀ de la muestra.

Conociendo la masa molar del Trolox ($M_{\text{Trolox}} = 250.29 \text{ g/mol}$), se expresaron finalmente los resultados obtenidos con las muestras ensayadas en $\mu\text{mol TE / g muestra}$.

El análisis de los datos se efectuó mediante el paquete estadístico GraphPadPrism (GraphPad Software, EUA) en su versión 6.0. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar de tres determinaciones.

IV.2.2. Reacción con el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)

IV.2.2.1. Fundamento teórico

El método consiste en observar con la ayuda de un espectrofotómetro la decoloración del radical estable $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (de color azul verdoso) cuando interacciona con un antioxidante (AH)

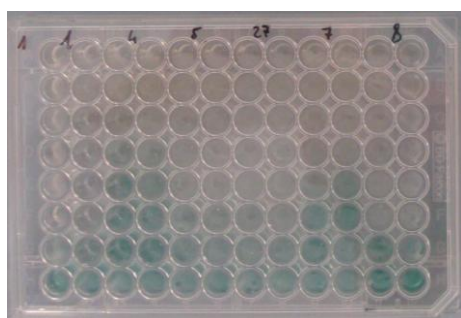


Figura 3.12. Reacción con $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en una microplaca utilizada en nuestra investigación.

(Figura 3.13). En este método, el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se genera directamente en el medio de reacción a partir del ABTS (26) (Figura 3.14) tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potásico), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o electroquímica, siendo la forma más usual generarlo químicamente utilizando persulfato potásico. Este radical es químicamente estable, presenta un color azul/verde con su máximo de absorbancia a 734 nm y es soluble tanto en agua como en

disolventes orgánicos, por lo que con este método se puede medir la actividad de compuestos tanto hidrófilos como lipófilos.

Tras la generación del cromóforo $\text{ABTS}^{\bullet+}$, la adición de sustancias antioxidantes al medio de reacción produce una disminución de la concentración de este

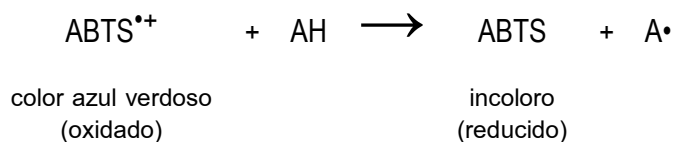


Figura 3.13. Reacción del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ con un antioxidante (AH) para dar ABTS. El paso previo (no ilustrado) es la formación del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ directamente en el medio de reacción. El esquema es solo ilustrativo, no pretende dar el mecanismo de reacción en sus detalles.

radical, produciéndose una caída de absorbancia que puede cuantificarse con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm (**Figura 3.12**) (Miller *et al.* 1993; Re *et al.* 1999; Antolovich *et al.* 2002; Henriquez *et al.* 2002).

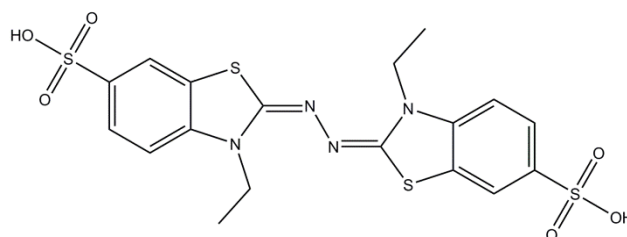


Figura 3.14. Ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) (**26**).

IV.2.2.2. Protocolo experimental

Para la realización del ensayo se siguió el protocolo descrito por Re *et al.* (1999) y modificado por Woguem *et al.* (2014) para su realización en microplacas de 96 pocillos. El radical ABTS^{•+} se generó mediante la reacción de 10 ml de una solución 7 mM de ABTS ($M_{\text{ABTS}} = 514.62 \text{ g/mol}$ equivalente a 3.8 mg/ml) con 10 ml de una solución 2.45 mM de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, equivalente a 0.7 mg/ml), dejando esta mezcla reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 12 h antes de usarla. Después, una alícuota del radical ABTS^{•+} así formado (1 ml) se diluyó en 60 ml de MeOH hasta proporcionar una absorbancia de 1.0 ± 0.02 unidades a $\lambda=734 \text{ nm}$, guardándose en un recipiente opaco recubierto totalmente con papel de aluminio a una temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de su uso. Las muestras a ensayar se disolvieron en metanol en concentraciones de 0.6 mg/ml a 4.3 mg/ml para los extractos y fracciones y de 2 mg/ml a 6.3 mg/ml para los aceites esenciales. Se utilizó como sustancia antioxidante de referencia (control positivo) el Trolox (**22**), preparándose una solución metanólica 0.4 mM (equivalente a 0.1 mg/ml).

El ensayo se realizó sobre microplacas BD Falcon (BD, EUA) de 96 pocillos, en los que se colocó 50 μl de las muestras a ensayar y 150 μl de la solución diluida de ABTS^{•+}. En este ensayo se realizaron diluciones en serie siguiendo el mismo protocolo que el descrito en el método del DPPH (ver apartado IV.2.1.2 del capítulo *Material y Métodos*). Las microplacas se incubaron en una estufa ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) por 20 min y transcurrido este tiempo se procedió a la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, Alemania) a una longitud de onda de 714 nm. Cada muestra fue ensayada por triplicado.

Con los resultados obtenidos, se calculó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) y la capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC), igual que en el ensayo del DPPH (ver apartado IV.2.1.2 del capítulo *Material y Métodos*).

IV.2.3. Medida de la capacidad reductora del hierro: método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

IV.2.3.1. Fundamento teórico

El método de FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica, por sus siglas en inglés) es un método de transferencia de electrones que se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el Fe³⁺ a Fe²⁺. El método consiste en la reducción del hierro férrico (Fe³⁺) que se encuentra formando un complejo con el compuesto orgánico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (más comúnmente llamada tripiridiltriiazina, TPTZ) (**27**) (Figura 3.16). Cuando el

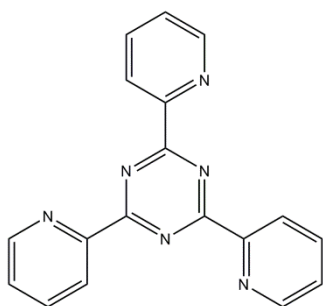


Figura 3.16. 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (**27**)

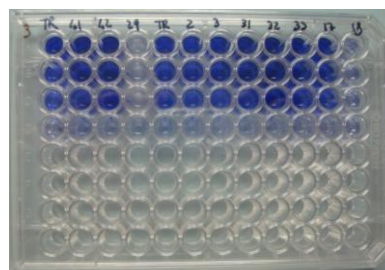


Figura 3.15. Reacción por el método FRAP en una microplaca utilizada en nuestra investigación.

complejo TPTZ-Fe³⁺ (incoloro) es reducido por un antioxidante (AH) a la forma ferrosa (TPTZ-Fe²⁺) toma un color azul intenso que presenta un máximo de absorción a 593 nm, siendo la intensidad de color proporcional a la capacidad reductora del compuesto ensayado (Figuras 3.15, 3.17). (Benzie y Strain 1996; Benzie y Szeto 1999).

IV.2.3.2. Protocolo experimental

Para la realización del ensayo se siguió el método propuesto por de Benzie *et al.* (1996, 1999) modificado para adaptarlo a las microplacas BD Falcon (BD, EUA) de 96 pocillos (Müller *et al.* 2010; Quassinti *et al.* 2013a; Venditti *et al.* 2013).

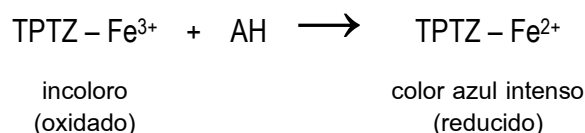


Figura 3.17. Reacción de reducción del complejo TPTZ – Fe³⁺ con un antioxidante (AH). El esquema es solo ilustrativo, no pretende dar el mecanismo de reacción en sus detalles.

El reactivo FRAP consiste en la mezcla de tres soluciones preparadas por separado: A, B y C. La solución A consta de un tampón acetato (300 mM a pH 3,6) preparado mezclando citrato de sodio trihidrato (C₂H₃NaO₂ · 3H₂O; 3.1 g) con ácido acético glacial (CH₃COOH; 16 ml) en 1 litro de agua destilada. La solución B (TPTZ 10 mM en HCl) se prepara disolviendo TPTZ (M_{TPTZ} = 312.33 g/mol; 9.37 mg) en 3 ml de HCl 40 mM, mientras que la solución C está constituida por tricloruro férrico hexahidrato (FeCl₃ · 6H₂O, 20 mM, M_{FeCl₃ · 6H₂O} = 270.26 g/mol; 16.2 mg) disuelto en agua destilada (3 ml). La soluciones A, B y C se mezclan usando una relación volumétrica de 10:1:1 (2.5 ml solución A + 0.25 ml solución B + 0.25ml solución C). El reactivo FRAP así preparado se introduce en una estufa a 37 °C por 30 min antes de ser usado. Las soluciones deben ser preparadas el mismo día del ensayo.

Las muestras a ensayar se disolvieron en metanol en concentraciones de 0.6 mg/ml a 4.3 mg/ml para los extractos y fracciones y de 2 mg/ml a 6.3 mg/ml para los aceites esenciales. Se utilizó como blanco el reactivo FRAP y como sustancia antioxidante de referencia (control positivo) el Trolox (**22**), preparándose una solución metanólica 0.4 mM (equivalente a 0.1 mg/ml).

En este ensayo se realizaron diluciones en serie de las concentraciones iniciales de los extractos a ensayar o del Trolox al igual que en los ensayos descritos anteriormente, pero se decidió realizar las diluciones en tubos de microcentrífuga del tipo “eppendorf” de 0.6 ml (Eppendorf, Alemania) antes de depositarlos en las microplacas porque se observó formación de precipitados. El volumen final de los eppendorf fue de 300 µl: 50 µl de las muestras a ensayar y 250 µl de la solución FRAP anteriormente preparada. La mezcla se mantuvo en la oscuridad durante 10 min y después fue centrifugada (centrífuga Hermle Z 200 MH, Alemania). Inmediatamente se tomaron 200 µl de cada muestra centrifugada y se depositó en una microplaca BD Falcon (BD, EUA) de 96 pocillos, procediéndose a la lectura de la absorbancia en un lector de microplacas modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, Alemania) a una longitud de onda de 593 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado.

El análisis de los datos se realizó igual que como ya se describió para el ensayo del DPPH (ver apartado IV.2.1.2 de del capítulo *Material y Métodos*), obteniéndose la concentración

inhibitoria 50 (IC₅₀) y la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC), siendo la media de tres repeticiones. Se ha optado por expresar el valor de la capacidad antioxidante como μmol equivalentes de Trolox por g de muestra ($\mu\text{mol TE / g muestra}$) al ser ésta una de las unidades más utilizadas en la bibliografía.

IV.2.4. Determinación del contenido fenólico total

IV.2.4.1. Fundamento teórico

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas que poseen un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo en su estructura molecular. Estos compuestos muestran una importante actividad antioxidante, debida sobre todo a sus propiedades redox que

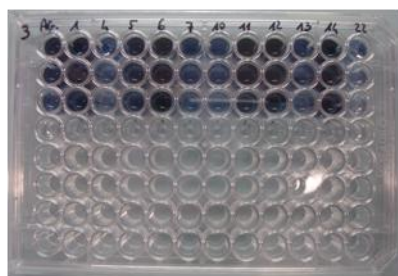


Figura 3.18. Determinación del contenido fenólico total en una microplaca utilizada en nuestra investigación.

les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno o simplemente como captadores de oxígeno. La determinación de fenoles totales no está directamente relacionada con la medición de la actividad antioxidante, pero puede ser útil si se combina con métodos para medir dicha actividad, ya que se ha observado que existen una correlación positiva entre el contenido en compuestos fenólicos libres y la actividad antioxidante total de la muestra (Elmastas *et al.* 2006; Gioti *et al.* 2009). El contenido fenólico total

de una muestra se puede evaluar por distintos métodos, siendo el colorimétrico de Folin – Ciocalteu uno de los más comunes y que más se han usado. Este método mide la capacidad que tienen los compuestos fenólicos para reducir el Mo (VI) a Mo (V), que se resume habitualmente de forma gráfica como se observa en el **Figura 3.19**.

El reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo está formado por una mezcla de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) y ácido fosfotúngstico (o fosfowolfrámico) ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) que, en presencia de los grupos hidroxilos de los compuestos fenólicos y a pH básico, es reducido a óxidos de wolframio (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), de color azul

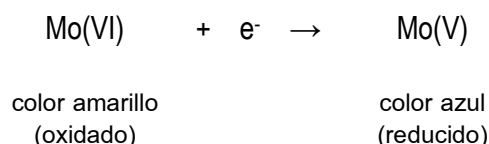


Figura 3.19. Esquema de reacción general del reactivo Folin con una especie fenólica en medio básico.

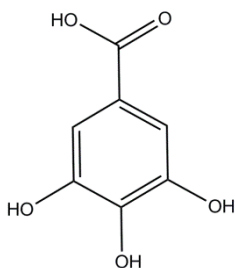


Figura 3.20. Ácido gálico (28).

intenso. Esta reacción, que se basa en la transferencia de electrones, se puede medir con un espectrofotómetro a $\lambda = 760$ nm, siendo proporcional el color azul desarrollado al número de grupos hidroxilos de la molécula fenólica (**Figura 3.18**) (Folin y Ciocalteu 1927; Singleton y Rossi Jr. 1965; Singleton *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2006). Este es un método simple, preciso y reproducible, pero hay que tener en cuenta que el reactivo de Folin-Ciocalteu no es específico de los compuestos fenólicos y puede reducirse por diversas sustancias no fenólicas, como la vitamina C, entre otras. Por ello, se le añade al medio de reacción carbonato sódico para obtener un pH en torno a 10 para que el fenol esté en forma de fenolato y reaccione con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Huang *et al.* 2005). El contenido de fenoles totales generalmente, se expresa respecto a diferentes patrones, siendo lo usual expresarlo en equivalentes de ácido gálico (28) (**Figura 3.20**) (Singleton y Rossi Jr. 1965; Huang *et al.* 2005).

IV.2.4.2. Protocolo experimental

Para la determinación del contenido de fenoles totales se siguió el método descrito por Singleton *et al.* (1999) adaptado para su uso en microplacas BD Falcon (BD, EUA) de 96 pocillos (Zhang, 2006). El reactivo de Folin-Ciocalteu, disponible comercialmente, fue diluido con agua destilada a una concentración final de 0.25 mg/ml. Se utilizó como blanco este reactivo diluido de Folin-Ciocalteu y como polifenol de referencia (control positivo) el ácido gálico, preparándose una solución en agua destilada 0.2 mM (equivalente a 1 mg/3 ml agua, siendo $M_{\text{ácido gálico}} = 170.12$ g/mol;). Las muestras a ensayar se disolvieron en metanol en concentraciones de 0.6 mg/ml a 4.3 mg/ml para los extractos y fracciones y de 2 mg/ml a 6.3 mg/ml para los aceites esenciales. En este ensayo se realizaron diluciones seriadas siguiendo el mismo protocolo que el descrito en los anteriores métodos de actividad antioxidante (ver apartado IV.2.1.2 del capítulo *Material y Métodos*).

En una microplaca de 96 pocillos se colocaron 50 μ l de las muestras a ensayar a diferentes concentraciones y 150 μ l de la solución diluida del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se dejó a temperatura ambiente y a oscuras durante 8 min. A continuación se añadieron 50 μ l de carbonato de sodio (Na_2CO_3) saturado y diluido con agua destilada en proporción 2:3, y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se midió la

absorbancia a 760 nm en un lector de microplacas (modelo FLUOstar Omega BMG Labtech, Alemania).

El análisis de los datos se realizó mediante el paquete estadístico GraphPadPrism (GraphPad Software, EUA) en su versión 6.0, como ya se describió para el ensayo del DPPH (ver apartado IV.2.1.2 del capítulo *Material y Métodos*), con la diferencia de que los resultados se expresaron como μg equivalentes de ácido gálico por mg de muestra ($\mu\text{g GA Eq/mg}$ muestra), siendo la media de tres repeticiones.

IV.3. Actividad antimicrobiana

Parte de este trabajo de investigación fue el análisis de la actividad antimicrobiana de las especies de hipérico estudiadas. Se realizaron ensayos de sensibilidad microbiana con el método de difusión en agar (también conocido como método Kirby-Bauer) y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) de todos los extractos y fracciones obtenidos a lo largo del estudio. Los ensayos microbiológicos se realizaron utilizando bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como varias cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE).

IV.3.1. Método de difusión en agar

IV.3.1.1. Fundamento teórico

El antibiograma basado en el método de difusión en agar es también conocido como método Kirby-Bauer por el nombre de los investigadores que lo describieron (Bauer *et al.* 1966). La técnica consiste en depositar sobre la superficie de agar de una placa de Petri, previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes extractos en estudio. Transcurridas unas 18-24 horas de incubación, los discos aparecen rodeados por una zona de no crecimiento, registrándose un mayor diámetro del halo cuanto mayor sea el grado de inhibición (**Figura 3.21**) (Winn *et al.* 2008).

IV.3.1.2. Protocolo experimental

El método que se siguió está estandarizado y sigue las recomendaciones del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI 2012).

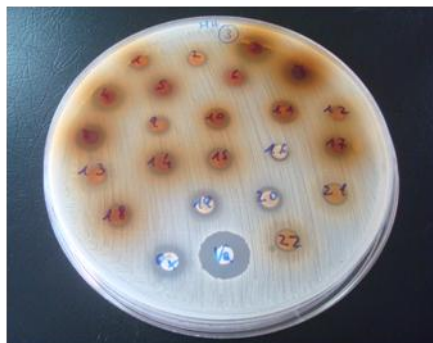


Figura 3.21. Ejemplo de desarrollo de una placa utilizada en la investigación.

Los microorganismos ensayados para los aceites esenciales y los extractos obtenidos por Soxhlet de las especies de *Hypericum* estudiadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Por otro lado, el estudio la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y las fracciones obtenidas de éstos se realizó sobre diferentes cepas de SARM y BLEE aisladas por el

Hospital Universitario de Canarias: SARM cepa patrón humano (452-3265); SARM origen humano (colonización); SARM origen humano (infección); SARM origen porcino (cerdo negro canario vivo) *SCCmec IV*; SARM origen porcino (cerdo blanco sacrificado) *SCCmec IV*; SARM origen porcino (cerdo blanco sacrificado) *SCCmec V*; BLEE humano *Escherichia coli*; BLEE humano *Klebsiella pneumoniae*; BLEE cepa aviar *Escherichia coli*.

Para la preparación del inóculo de cada microorganismo se utilizaron colonias aisladas de un cultivo puro y resembradas en placas de agar sangre que se incubaron en estufa con atmósfera de aire (JP Selecta, modelo Incudigit, España) a 37 °C durante las 24 horas anteriores a la realización de los ensayos. Con estas colonias se realizó una suspensión bacteriana equivalente a 0.5 del estándar de turbidez de la escala de McFarland (equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml) y, a continuación, se realizó la siembra en medio agar Müller Hinton. Transcurridos 5 min, se colocaron los discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro y se inocularon con 10 µl de las muestras en estudio (anteriormente preparadas disolviéndolas en DMSO en concentraciones de 375 mg/ml a 100 mg/ml, a excepción de los aceites esenciales que se utilizaron sin diluir). Se incubaron las placas de Petri a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se realizó la lectura de los halos de inhibición (medidos en mm) por medio de un calibre, considerando que valores mayores de 6 mm indican una inhibición del crecimiento. Se utilizó ciprofloxacino (5 µg/disco) como antimicrobiano de referencia frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas y DMSO como control negativo. Por otro lado, cuando se ensayaron las cepas de SARM y BLEE, se usó como controles positivos vancomicina (30 µg) y amoxicilina/ácido clavulánico 20/10 µg y como controles negativos oxacilina (30 µg) y aztreonam (30 µg). Todos los ensayos se realizaron como mínimo por duplicado y los resultados se expresaron como medias de los valores.

IV.3.2. Determinación de la CIM

IV.3.2.1. Fundamento teórico

La cuantificación *in vitro* de la actividad de los antimicrobianos (naturales o de síntesis) se evalúa habitualmente mediante métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo). La concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación se conoce en microbiología como concentración mínima inhibitoria (CIM) (**Figura 3.22**). La CIM puede ser determinada siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*) o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (Winn *et al.* 2008).

IV.3.2.2. Protocolo experimental

Para la realización de esta prueba se siguieron las recomendaciones del CLSI (CLSI 2012). Los microorganismos ensayados para los aceites esenciales y los extractos obtenidos por

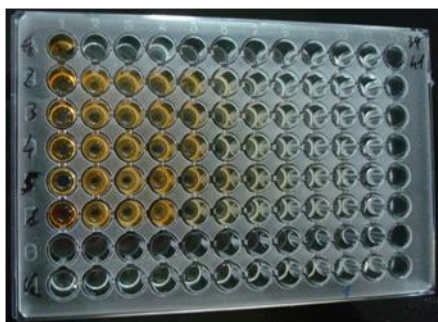


Figura 3.22. Ejemplo de una microplaca utilizada en la investigación para la determinación de la MIC.

Soxhlet de las especies de *Hypericum* estudiadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Por otro lado, el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos y las fracciones obtenidas de éstos se realizó sobre diferentes cepas de SARM

aisladas por el Hospital Universitario de Canarias: SARM cepa patrón humano (452-3265); SARM origen humano (colonización); SARM origen humano (infección); SARM origen porcino (cerdo negro canario vivo) *SCCmec IV*; SARM origen porcino (cerdo blanco sacrificado) *SCCmec IV* y SARM origen porcino (cerdo blanco sacrificado) *SCCmec V*.

El medio de cultivo recomendado por el CLSI para la determinación de la CIM es el caldo Müller Hinton. Se trabajó con placas de microtitulación con 96 pocillos de fondo en U, donde en cada una se ensayó un muestra diferente. Con una pipeta multicanal se rellenaron los 96 pocillos con 100 µl de caldo Müller Hinton. En el pocillo nº 1 se depositaron 100 µl del extracto/fracción

previamente disuelto en DMSO (a una concentración de 375 mg/ml para los extractos metanólicos y fracciones obtenidos de éstos, y de 2.05 mg/ml para los extractos por Soxhlet), mientras que los aceites esenciales se depositaron puros y se realizaron diluciones en serie. Se utilizó vancomicina (preparada a una concentración de 128 µg/ml en DMSO) como antibiótico de referencia para las cepas SARM y el ciprofloxacino preparado a una concentración de 32 µg/ml en agua) para el resto de las bacterias ensayadas, realizándose las diluciones en serie similares a las de las muestras en estudio. Se realizó un control negativo de esterilidad (sin inóculo) y un control positivo de crecimiento (sin antimicrobiano). Para la preparación de los inóculos se siguió los mismos pasos descritos en el método de difusión en agar (ver apartado IV.3.1.2 de del capítulo *Material y Métodos*).

Tras realizar todas las diluciones en serie, se adicionaron 10 µl del inóculo en cada pocillo, se sellaron las placas con parafilm (Bemis, EUA) y se incubaron a 37 °C en estufa con atmósfera de aire (JP Selecta, modelo Incudigit, España) durante 24 horas. Tras la incubación se procedió a la lectura de los resultados, determinándose la concentración mínima inhibitoria (CIM) de cada una de las muestras, la cual se definió como la menor concentración de antimicrobiano que inhibió el crecimiento visible del microorganismo estudiado (no considerando crecimiento la aparición de colonias aisladas ni de un velo débil). Los ensayos se realizaron por duplicado.

IV.4. Actividad citotóxica: ensayo con líneas celulares tumorales

En la presente Tesis Doctoral se llevaron a cabo ensayos con líneas células tumorales para evaluar la citotoxicidad de los extractos, fracciones y aceites esenciales objetos de estudio.

IV.4.1. Fundamento teórico

Este ensayo se basa en la reducción intracelular del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol] (**29**) de color amarillo por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) para formar el formazán (**30**), un compuesto de color azul intenso/violeta insoluble en soluciones acuosas que queda así retenido en el interior de las células vivas (**Figura 3.23**). Esta reacción se puede medir en un espectrofotómetro a una $\lambda = 540$ nm, siendo la cantidad de formazán generado directamente proporcional al número de células vivas. Por tanto, esta reacción se usa como indicador de la viabilidad celular relativa: mide la supervivencia y proliferación celular (Mosmann 1983).

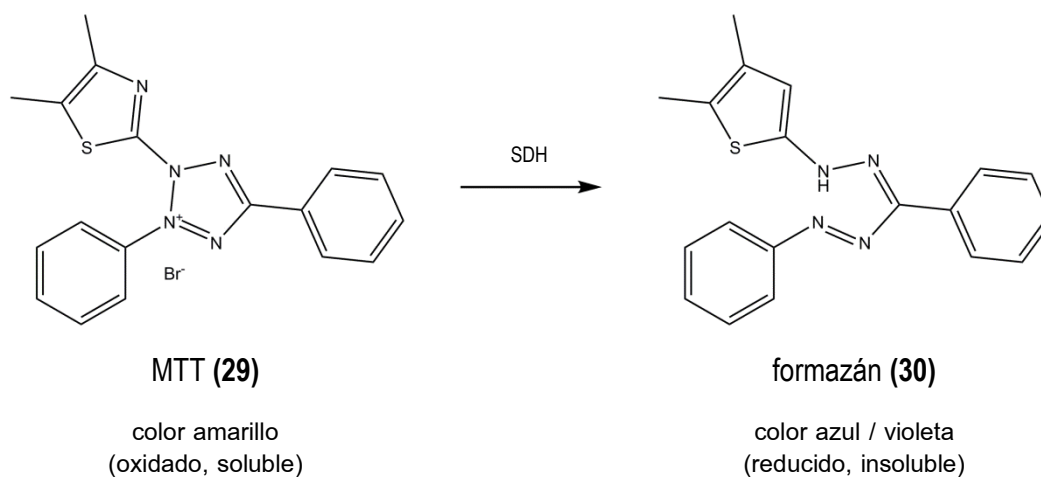


Figura 3.23. Reacción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (29) con la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) que lleva a la formación del compuesto insoluble formazán (30).

Este ensayo se basa en la reducción intracelular del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol] (29) de color amarillo por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) para formar el formazán (30), un compuesto de color azul intenso/violeta insoluble en soluciones acuosas que queda así retenido en el interior de las células vivas (Figura 3.23). Esta reacción se puede medir en un espectrofotómetro a una $\lambda = 540$ nm, siendo la cantidad de formazán generado directamente proporcional al número de células vivas. Por tanto, esta reacción se usa como indicador de la viabilidad celular relativa: mide la supervivencia y proliferación celular (Mosmann 1983).

IV.4.2. Protocolo experimental

El ensayo se ha llevado a cabo usando la metodología descrita por Mosmann (1983) con las pequeñas modificaciones introducidas por Quassinti *et al.* (2013 b). En las pruebas se utilizaron tres líneas celulares: A375 (línea celular de melanoma humano), HCT116 (línea celular de carcinoma humano de colon) y MDA-MB 231 (línea celular de carcinoma mamario humano). La línea celular HCT116 se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 10% de HI-FBS. Las líneas celulares MDA-MB 231 y A375 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 10% de HI-FBS. Todas las líneas celulares se cultivaron en incubadora a 37 °C en presencia de atmósfera húmeda para prevenir la evaporación (95% de humedad) y con 5% de CO₂. La manipulación de las células se realizó en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar.

Las células se sembraron directamente en placas de cultivo de 96 pocillos (Iwaki, Japón) a una densidad de 2×10^4 células/ml y se incubaron por 24 horas a 37 °C para permitir su adherencia. Transcurridas 24 horas, se añadieron a las células los extractos o los aceites esenciales disueltos en etanol a una concentración de 200 µg/ml y por medio de diluciones en serie se llevaron hasta 0.78 µg/ml y se incubaron por 72 horas a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se añadió a cada pocillo 10 µl de MTT preparado previamente a una concentración de 5 mg/ml disolviéndolo en PBS (tampón fosfato salino con pH = 7.3). Seguidamente, la placa se incubó por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de las sales de formazán. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de los pocillos, se añadieron 100 µl de DMSO y se mantuvo en agitación la placa por 15 min a temperatura ambiente para disolver las sales de formazán formados. La intensidad de la reducción intracelular del MTT se evaluó midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro a una $\lambda = 540$ nm usando un Titertek Multiscan micro Elisa (Labsystems, Finlandia). Como control positivo se usó el cisplatino en concentraciones entre 0.1 y 0.0015 µg/ml y como control negativo etanol (0.2%). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para el análisis estadístico se empleó el paquete estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, EUA) en su versión 4.0. Se construyó una recta de regresión lineal colocando en abscisas los valores de absorbancias obtenidos y en ordenadas las concentraciones de partida en los pocillos de la microplaca, obteniéndose el valor de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), que se define como la concentración de la muestra a ensayar que inhibe el 50% del crecimiento celular (IC₅₀) con respecto al control negativo (etanol). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) considerando como significativa una $p < 0.01$.



4. RESULTADOS

Página anterior: *Hypericum grandifolium* Choisy.

[Imagen disponible en <http://www.jardincanario.org/inicio>, web del Jardín Botánico Viera y Clavijo de Gran Canarias].

I.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS, FRACCIONES Y ACEITES ESENCIALES

Dentro de los objetivos de esta Tesis Doctoral se encuentra la caracterización de los constituyentes químicos de las especies que hemos seleccionado para nuestro estudio. Por lo tanto, se han realizado diferentes tipos de extractos del material vegetal que, posteriormente, han sido evaluados cualitativa y cuantitativamente mediante diversas técnicas cromatográficas, seleccionadas en función de las características de los mismos. De acuerdo con lo anterior, se han preparado los extractos metanólicos (MeOH) de las plantas seleccionadas (recogidas y debidamente tratadas como se indica en los apartados I y II.2 del capítulo *Material y Métodos*). Posteriormente, parte de dicho extracto se ha fraccionado tratándolo con cloroformo, obteniéndose así dos fracciones: la fracción clorofórmica (CHCl₃) y la fracción polar (FP), que contiene aquellos productos que no fueron arrastrados por el cloroformo. Por otro lado, se realizó una extracción continua en Soxhlet y una hidrodestilación mediante Clevenger, que nos ha permitido obtener el extracto Soxhlet y el aceite esencial de las plantas seleccionadas (ver apartado II.3 y II.4 del capítulo *Material y Métodos*).

Tabla 4.1. Rendimientos obtenidos en las preparaciones de los extractos, fracciones y aceites esenciales de los hipéricos investigados. Valores expresados en % con respecto al peso de droga seca.

Muestra	Aceite ^a esencial	Soxhlet	Extracto / Fracción		
			MeOH	CHCl ₃	FP
<i>H. canariense</i>	0.11	28.7	29.1	2.8	20.7
<i>H. grandifolium</i>	0.11	36.5	29.5	10.8	15.4
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	0.14	42.6	32.2	1.4	30.6
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	0.15	33.7	n.r. ^b	n.r.	n.r.

^a Los valores están corregidos con los resultados de las estimaciones del agua residual (ver apartado II.4 del capítulo *Material y Métodos*).

^b n.r. = no realizado.

Los rendimientos obtenidos en los diferentes métodos se muestran en la **Tabla 4.1**, expresando los valores como porcentaje respecto al peso de la droga seca. En el caso de los aceites esenciales, los rendimientos están corregidos con los resultados de las estimaciones del agua residual (ver apartado II.4 del capítulo *Material y Métodos*).

Al analizar los resultados presentados en la tabla anterior, podemos observar que los rendimientos obtenidos han sido en general mayores cuando la extracción se realiza mediante el método de Soxhlet, lo que viene a ratificar que es una técnica más exhaustiva. También es de reseñar, aunque era un resultado esperado, el bajo rendimiento de los aceites esenciales (con valores entre un 0.11% y un 0.15%), siendo las dos especies de *Hypericum reflexum* las que presentan el contenido de aceite esencial más alto.

II.

ESTUDIO FITOQUÍMICO

II.1. HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

En esta Tesis Doctoral se han analizado cualitativa y cuantitativamente ocho componentes característicos del género *Hypericum* (ácido clorogénico, hiperforina, hipericina, hiperósido, isoquercitrina, quercetina, quercitrina y rutina) mediante técnicas cromatográficas de alta eficacia: HPLC-DAD y HPLC/ESI-MS. A continuación pasamos a comentar los resultados obtenidos.

II.1.1. HPLC-DAD

Los resultados encontrados mediante esta técnica cromatográfica para los diferentes extractos y fracciones de las especies de hipérico investigadas se muestran en las **Tablas 4.2**.

Tabla 4.2. Concentración de los componentes característicos en los extractos Soxhlet y MeOH obtenida mediante HPLC-DAD y expresada en mg por cada g de planta seca.

Muestra ^a	Extracto	Ácido clorogénico	Hiperforina	Hipericina	Hiperósido	Isoquercitrina	Quercitrina	Quercetina	Rutina
HC	Soxhlet	3,191 ^b	n.d. ^c	n.d.	0,262	0,911	n.d.	0,179	1,704
	MeOH	1,590	n.d.	n.d.	1,460	0,430	1,500	0,090	0,110
HGF	Soxhlet	0,221	n.d.	n.d.	3,623	0,248	1,977	0,132	n.d.
	MeOH	1,210	n.d.	n.d.	2,660	0,170	1,820	0,170	n.d.
HRE	Soxhlet	10,982	n.d.	n.d.	0,126	0,780	n.d.	0,143	7,875
	MeOH	8,680	n.d.	n.d.	n.d.	0,430	n.d.	0,080	8,650
HRI	Soxhlet	12,220	n.d.	n.d.	0,137	0,638	n.d.	0,224	7,600

^a HC = *Hypericum canariense*, HGF = *Hypericum grandifolium*, HRE = *Hypericum reflexum* (La Esperanza), HRI = *Hypericum reflexum* (Ifonche).

^b Las desviaciones estándar de todos los valores oscilan entre 0.21% y 5.46%.

^c n.d. = no detectado.

Si observamos la tabla anterior, podemos constatar que todas las especies de hipérico analizadas poseen ácido clorogénico, hiperósido, isoquercitrina y quercetina. Además, se

encontró rutina (0,11- 8,65 mg/g) en todas las especies estudiadas excepto en el *Hypericum grandifolium*, mientras que la quercitrina (1,50-1,98 mg/g) sólo fue detectada en *Hypericum canariense* y en *Hypericum grandifolium*.

Debemos destacar los altos valores encontrados de ácido clorogénico (10,982-12,22 mg/g) y rutina (7,6-8,65 mg/g) para la especie *Hypericum reflexum* y los valores de hiperósido (3,63 mg/g) para *Hypericum grandifolium*.

Por otro lado, no se ha podido detectar la presencia por este método de hiperforina y de hipericina en ninguno de los extractos o fracciones analizadas.

II.1.2. HPLC/ESI-MS

Con el fin de confirmar la ausencia de algunas naftodiantronas (hipericina, pseudohipericina, protohipericina, protopseudohipericina) en los hipéricos en estudio, se recurrió a una técnica analítica más selectiva y sensible, como es el HPLC/ESI-MS. Solo se sometieron a esta técnica analítica los extractos hechos con el método de Soxhlet, ya que eran los que habían dado mayor rendimiento en los análisis anteriores.

Tras la realización de esta técnica, confirmamos la ausencia de este tipo de compuestos en las especies analizadas, excepto para el *Hypericum reflexum* donde se encontró trazas de pseudohipericina tanto en la especie recogida en La Esperanza como en Ifonche, así como una pequeña proporción de hipericina (0.153 mg/g de planta seca) en la especie recogida en Ifonche.

II.2. GC: Cromatografía de gases: Determinación de componentes volátiles

Mediante la cromatografía de gases se analizó la composición cualitativa y cuantitativa de los diferentes aceites esenciales de los hipéricos en estudio, que se obtuvieron como se indica en el apartado II.4 del capítulo *Material y Métodos*.

II.2.1. GC-MS y GC-FID

Los resultados obtenidos tras el análisis de los aceites esenciales con esta técnica se presentan en la **Tabla 4.3**, donde los componentes vienen ordenados en función de su índice de retención (RI).

Tabla 4.3. Composición de los aceites esenciales de *H. reflexum*, *H. canariense* y *H. grandifolium*. En la parte baja de la tabla se indican los rendimientos complessivos, los compuestos totales identificados y se propone una clasificación por tipos de compuestos.

N	Compuesto ^a	RI calculado ^b	RI literatura ^c		% ^d				ID ^e
			ADAMS	NIST 08	HC ^f	HGF ^f	HRE ^f	HRI ^f	
1	(2E)-hexenal	846	846	846	tr ^g	-	-	-	RI, MS
2	2-metil-octano	850	-	855	tr	0.1	-	-	RI, MS
3	(3Z)-hexenol	850	846	850	-	-	tr	tr	RI, MS
4	n-hexanol	860	863	860	tr	-	tr	tr	RI, MS
5	n-nonano	895	900	900	44.3	42.3	0.2	0.1	Std
6	α-thujene	917	924	917	0.1	-	1.0	0.1	RI, MS
7	α-pineno	922	932	922	3.1	0.3	3.3	16.7	Std
8	α-fencheno	933	945	933	0.1	-	-	0.1	RI, MS
9	canfeno	935	946	935	tr	tr	0.1	0.1	Std
10	sabineno	961	969	961	-	-	1.3	tr	RI, MS
11	β-pineno	963	974	962	7.7	0.5	4.6	7.6	Std
12	mircenol	984	988	983	0.5	0.1	0.3	0.2	Std
13	2-pentil furano	984	984	984	-	tr	-	-	RI, MS
14	deshidroxi-trans-linalool oxido	991	983	1007	-	-	0.1	-	RI, MS
15	α-felandreno	998	1002	998	tr	-	tr	tr	Std
16	n-decano	1000	1000	1000	0.1	0.1	0.1	0.1	Std
17	deshidroxi-cis-linalool oxido	1004	1006	1007	tr	-	0.1	tr	RI, MS
18	α-terpineno	1010	1014	1010	tr	-	0.1	tr	Std
19	p-cimeno	1018	1020	1018	0.1	tr	0.1	0.1	Std
20	limoneno	1021	1024	1021	0.4	0.1	0.4	0.7	Std
21	1,8-cineolo	1024	1026	1023	tr	-	tr	tr	Std
22	2,2,6-trimetil-ciclohexanona	1029	-	1029	-	-	tr	tr	RI, MS
23	(Z)-β-ocimeno	1033	1032	1034	tr	0.1	0.1	tr	RI, MS
24	(E)-β-ocimeno	1043	1044	1043	tr	0.1	0.7	0.1	RI, MS
25	γ-terpineno	1051	1053	1051	tr	tr	0.2	0.2	Std
26	terpinoleno	1081	1086	1080	0.1	0.1	0.2	0.2	Std
27	3-nonanona	1085	-	1089	-	tr	-	-	RI, MS
28	n-undecano	1100	1100	1100	2.8	2.2	9.7	17.6	Std
29	2-nonanol	1100	1097	1100	-	tr	-	-	RI, MS
30	n-nonanal	1102	1100	1102	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
31	endo-fenhol	1105	1116	1105	0.1	-	tr	0.1	RI, MS
32	α-canfolenal	1120	1122	1123	tr	-	tr	0.1	RI, MS
33	trans-pinocarveol	1130	1135	1130	0.1	-	-	-	Std
34	canfeno hidrato	1138	1145	1140	tr	-	-	-	RI, MS
35	trans-pinocanfona	1151	1158	1148	-	0.1	-	-	RI, MS
36	pinocarvona	1154	1160	1154	0.1	0.1	-	-	RI, MS
37	borneol	1157	1165	1156	tr	-	tr	0.1	Std
38	cis-pinocanfona	1164	1172	1163	0.3	0.1	-	-	RI, MS
39	mentol	1166	1167	1164	-	-	0.1	-	Std
40	terpinen-4-ol	1170	1174	1169	0.1	0.1	0.1	0.2	Std
41	n-nonanol	1171	1165	1171	0.1	-	-	-	RI, MS
42	α-terpineol	1183	1186	1182	0.8	0.1	0.5	1.3	Std
43	metil salicilato	1185	1185	1185	-	-	0.1	-	RI, MS
44	mirtenal	1188	1195	1188	0.1	-	-	-	Std
45	safranal	1192	1197	1192	tr	tr	tr	tr	RI, MS
46	n-dodecano	1200	1200	1200	-	tr	tr	0.1	Std
47	n-decanal	1202	1201	1202	0.1	0.2	-	-	Std

(continúa en la página siguiente)

N	Compuesto ^a	RI calculado ^b	RI literatura ^c		% ^d				ID ^e
			ADAMS	NIST 08	HC ^f	HGF ^f	HRE ^f	HRI ^f	
48	β-ciclocitral	1212	1217	1210	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
49	geraniol	1253	1247	1253	-	-	0.3	0.1	Std
50	geranial	1269	1265	1270	-	-	0.1	-	Std
51	2-undecanona	1292	1293	1292	0.5	-	tr	tr	RI, MS
52	n-tridecano	1300	1300	1300	-	tr	0.1	0.2	Std
53	δ-elemeno	1328	1335	1327	0.2	0.1	tr	-	RI, MS
54	α-longipineno	1335	1350	1334	0.1	-	-	0.3	RI, MS
55	α-cubebeno	1339	1345	1339	-	tr	0.2	0.3	RI, MS
56	α-ylangeno	1359	1373	1358	0.1	0.1	0.4	0.2	RI, MS
57	ciclosativeno	1360	1357	1360	-	-	0.2	0.1	RI, MS
58	α-copaeno	1363	1374	1363	0.2	0.1	1.2	3.5	RI, MS
59	β-bourboneno	1371	1387	1370	0.3	0.1	0.5	0.2	RI, MS
60	sativeno	1374	1390	1387	-	-	-	0.1	RI, MS
61	β-cubebeno	1378	1387	1378	-	-	0.2	tr	RI, MS
62	β-elemeno	1381	1389	1381	0.1	0.1	0.1	tr	RI, MS
63	isoledeno	1383	1376	1380	-	-	tr	tr	RI, MS
64	(Z)-cariofileno	1392	1408	1396	0.1	0.1	0.1	0.1	RI, MS
65	α-gurjuneno	1395	1409	1393	-	-	0.1	0.2	RI, MS
66	β-longipineno	1398	1400	-	0.2	-	-	-	RI, MS
67	italiceno	1402	1405	-	0.1	-	-	-	RI, MS
68	(E)-cariofileno	1404	1417	1404	7.9	24.2	8.2	4.9	Std
69	β-ylangeno	1414	1419	1416	-	tr	-	-	RI, MS
70	α-trans-bergamoteno	1425	1432	1425	0.1	-	-	-	RI, MS
71	aromadendreno	1427	1439	1427	-	-	0.1	tr	RI, MS
72	β-copaeno	1428	1430	-	0.8	0.1	1.1	0.4	RI, MS
73	γ-elemeno	1430	1434	-	0.2	0.4	-	-	RI, MS
74	α-himachaleno	1432	1449	1433	-	-	-	0.4	RI, MS
75	α-humuleno	1440	1452	1440	0.4	1.3	3.4	1.5	Std
76	6,9-guaiadieno	1441	1442	-	1.5	0.6	0.1	-	RI, MS
77	cis-muurool-3,5-dieno	1443	1448	-	-	-	0.2	-	RI, MS
78	allo-aromadendreno	1445	1458	1445	-	-	0.9	0.5	RI, MS
79	geranilacetona	1448	1453	1448	tr	tr	-	-	RI, MS
80	β-acoradieno	1449	1469	1440	tr	-	-	-	RI, MS
81	(E)-β-farneseno	1451	1454	1451	0.3	tr	-	tr	RI, MS
82	cis-cadin-1(6),4-dieno	1463	1463	-	-	-	tr	-	RI, MS
83	γ-muuroleno	1465	1478	1465	0.5	0.6	1.6	1.0	RI, MS
84	germacreno D	1467	1484	1466	-	-	1.6	0.2	RI, MS
85	α-amorpheno	1467	1483	1465	-	0.2	-	-	RI, MS
86	γ-himachaleno	1468	1481	1468	0.2	-	-	0.2	RI, MS
87	trans-cadin-1(6),4-diene	1470	1475	1470	-	-	0.4	0.1	RI, MS
88	β-selineno	1470	1489	1488	-	1.3	tr	tr	RI, MS
89	4,5-di-epi-aristolocheno	1471	1471	-	-	0.1	-	-	RI, MS
90	eremophileno	1473	-	1474	-	0.4	-	-	RI, MS
91	ar-curcumeno	1473	1479	1473	0.6	-	-	-	RI, MS
92	(E)-β-ionona	1476	1487	1477	-	0.3	1.4	0.4	Std
93	δ-selineno	1478	1492	1478	0.2	0.3	-	-	RI, MS
94	amorfa-4,7(11)-dieno	1479	1479	-	0.9	1.2	-	-	RI, MS
95	α-selineno	1480	1498	1480	0.3	0.6	0.4	0.1	RI, MS
96	valenceno	1481	1496	1481	0.2	-	-	-	RI, MS
97	γ-curcumeno	1483	1481	-	1.0	-	-	-	RI, MS
98	β-himachaleno	1485	1500	1479	0.1	-	-	0.3	RI, MS
99	epizonareno	1486	1501	1475	-	0.1	0.6	-	RI, MS
100	α-muuroleno	1488	1500	1488	tr	0.1	1.1	0.5	RI, MS

(continúa en la página siguiente)

N	Compuesto ^a	RI calculado ^b	RI literatura ^c		% ^d				ID ^e
			ADAMS	NIST 08	HC ^f	HGF ^f	HRE ^f	HRI ^f	
101	(Z,E)- α -farneseno	1490	-	1491	tr	-	-	-	RI, MS
102	cis-cadin-1,4-dieno	1491	1495	-	-	-	0.8	0.3	RI, MS
103	γ -cadineno	1500	1513	1500	0.2	0.5	2.7	1.0	RI, MS
104	(E,E)- α -farneseno	1502	1505	1502	-	-	-	tr	RI, MS
105	trans-calameneno	1509	1521	1509	-	0.1	tr	tr	RI, MS
106	δ -cadineno	1511	1522	1511	0.7	1.1	6.1	7.0	RI, MS
107	δ -amorfeno	1512	1511	-	tr	0.2	0.7	0.2	RI, MS
108	α -alaskeno	1513	1512	-	0.2	-	-	-	RI, MS
109	β -curcumeno	1514	1514	-	0.7	-	-	-	RI, MS
110	α -cadineno	1524	1537	-	-	-	0.6	0.2	RI, MS
111	selin-3,7(11)-dieno	1525	1545	-	0.3	1.1	-	-	RI, MS
112	trans-cadin-1,4-dieno	1527	1533	1527	-	-	0.4	0.2	RI, MS
113	selin-4(15),7(11)-dieno	1530	-	1531 ⁿ	-	1.1	-	-	RI, MS
114	(E)- α -bisaboleno	1534	-	1532	-	-	0.4	0.5	RI, MS
115	germacreno B	1540	1559	1540	1.1	1.2	-	-	RI, MS
116	α -calacoreno	1543	1544	-	tr	tr	0.5	0.2	RI, MS
117	palustrol	1550	1567	1550	-	-	-	0.1	RI, MS
118	cariofilenil alcohol	1552	1570	1569	0.1	0.2	0.1	0.2	RI, MS
119	(E)-nerolidol	1556	1561	1556	0.2	0.1	-	-	Std
120	espatulenol	1561	1577	1572	0.1	-	0.8	0.2	RI, MS
121	β -calacoreno	1562	1564	-	-	-	0.1	tr	RI, MS
122	1 α ,10 α -epoxi-amorf-4-eno	1565	1570	-	-	-	0.3	-	RI, MS
123	óxido de cariofileno	1565	1582	1566	4.1	2.5	1.4	1.6	Std
124	salvial-4(14)-en-1-ona	1577	1594	-	0.2	-	1.2	0.3	RI, MS
125	gleenol	1582	1586	-	-	0.1	0.4	0.2	RI, MS
126	copaborneol	1587	-	1592 ⁱ	-	-	0.6	1.0	RI, MS
127	β -copaen-4- α -ol	1590	1590	-	-	-	0.5	0.3	RI, MS
128	β -oplopenona	1599	1607	1600	0.3	-	1.1	0.4	RI, MS
129	junenol	1599	1618	1603	-	-	1.1	0.9	RI, MS
130	rosifoliol	1607	1600	-	-	-	0.2	tr	RI, MS
131	1- <i>epi</i> -cubenol	1613	1627	-	-	-	0.6	0.5	RI, MS
132	muurol-4,10(14)-dien-1- β -ol	1616	1630	-	1.0	0.3	0.3	0.1	RI, MS
133	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	1618	1616	-	-	-	0.3	0.2	RI, MS
134	α -corocaleno	1620	1622	-	-	-	-	tr	RI, MS
135	α -acorenol	1628	1632	-	0.1	-	-	0.5	RI, MS
136	α -muurolol	1632	1644	-	-	-	0.7	0.3	RI, MS
137	<i>epi</i> - α -cadinol	1637	1640	-	-	-	-	0.5	RI, MS
138	<i>epi</i> - α -muurolol	1637	1640	-	-	-	2.2	-	RI, MS
139	cariofil-4(12),8(13)-dien-5-ol ^l	1638	1639	-	0.1	0.3	0.2	0.1	RI, MS
140	α -cadinol	1650	1652	1640	0.4	0.2	2.8	1.1	RI, MS
141	cadaleno	1659	1676	1659	-	-	0.1	0.2	RI, MS
142	eudesm-7(11)-en-4-ol	1678	1700	1678	0.1	0.3	-	-	RI, MS
143	eudesm-4(15),7-dien-1- β -ol	1688	1688	-	0.1	-	1.0	0.4	RI, MS
144	<i>n</i> -heptadecano	1700	1700	1700	-	-	tr	0.1	Std
145	sulfuro de menta	1734	1740	-	-	-	0.1	-	RI, MS
146	2-pentadecanon,6,10,14-trimetilo	1838	-	1838	0.1	tr	0.2	0.2	RI, MS
147	<i>n</i> -nonadecano	1900	1900	1900	-	-	0.3	0.3	Std
148	hexadecanoato de metilo	1920	1921	1920	-	0.1	-	-	RI, MS
149	ácido hexadecanoico	1958	1959	1957	1.1	0.8	1.1	1.2	Std
150	hexadecanoato de etilo	1988	1992	1987	-	tr	-	-	RI, MS
151	filocladeno	2013	2016	-	-	tr	-	-	RI, MS
152	fitol	2098	-	2100	tr	0.1	0.1	0.1	Std
153	<i>n</i> -heneicosano	2100	2100	2100	-	0.1	tr	0.1	Std

(continúa en la página siguiente)

N	Compuesto ^a	RI calculado ^b	RI literatura ^c		% ^d				ID ^e
			ADAMS	NIST 08	HC ^f	HGF ^f	HRE ^f	HRI ^f	
154	<i>n</i> -tricosano	2300	2300	2300	0.4	0.1	0.1	0.1	Std
155	<i>n</i> -tetracosano	2400	2400	2400	0.2	0.1	-	-	Std
156	<i>n</i> -pentacosano	2500	2500	2500	1.3	0.3	0.3	0.6	Std
157	<i>n</i> -hexacosano	2600	2600	2600	-	-	0.1	0.1	Std
158	<i>n</i> -heptacosano	2700	2700	2700	0.4	0.3	0.4	0.7	Std
159	<i>n</i> -octacosano	2800	2800	2800	-	-	tr	tr	Std
160	<i>n</i> -nonacosano	2900	2900	2900	0.2	0.2	0.2	0.3	Std
Rendimiento (%)					0.11	0.11	0.14	0.15	
Total identificado (%)					92.0	91.3	79.2	84.3	
Tipo de compuesto (%)									
Alcanos					49.7	46.0	11.6	20.4	
Hidrocarburos monoterpénicos					12.2	1.3	12.3	26.2	
Monoterpenos oxigenados					1.8	0.6	1.4	1.9	
Hidrocarburos sesquiterpénicos					19.5	37.5	35.0	24.9	
Sesquiterpenos oxigenados					6.8	3.8	16.0	7.9	
Otros ^m					2.0	1.9	2.8	1.9	

^a Los compuestos están según el orden de elución en la columna HP-5MS.

^b RI calculado experimentalmente usando la serie homóloga de alcanos lineales C₈ – C₃₀.

^c RI publicado en literatura: Adams 2007 y NIST08.

^d Los porcentajes son medias de los valores de tres determinaciones, con una $\sigma < 5\%$ en todos los casos.

^e Métodos de identificación: MS (comparación de los espectros de masas obtenidos con los descritos en literatura), RI (comparación con los RI presentes en literatura), Std (= abreviatura de estándar: comparación de los MS y RI con estándares comerciales).

^f HC = *Hypericum canariense*, HGF = *Hypericum grandifolium*, HRE = *Hypericum reflexum* (La Esperanza), HRI = *Hypericum reflexum* (Ifonche).

^g tr = trazas: se refiere a un valor $< 0.1\%$.

^h RI publicado en Duquesnoy *et al.* 2006.

ⁱ RI publicado en Paolini *et al.* 2005.

^l isómero no identificado.

^m Compuesto que no se clasifica en ninguno de los otros 5 grupos.

Para poder analizar más fácilmente los detalles de la **Tabla 4.3** y, a la vez, tener una visión comparativa de las especies de hipérico estudiadas, los compuestos identificados se agruparon atendiendo a su porcentaje en fundamentales ($> 10\%$) y mayoritarios (1-10%), presentándose los resultados resumidos así en la **Tabla 4.4**. Hay que señalar que los compuestos minoritarios (0.1-1%) y las trazas ($< 0.1\%$) se han obviado en este resumen para responder a la exigencia de presentar una tabla más compacta y de más fácil lectura.

Tabla 4.4. Resumen de los compuestos fundamentales y mayoritarios presentes en los aceites esenciales de *H. reflexum*, *H. canariense* y *H. grandifolium*.

N	Compuesto ^a	RI calculado ^b	RI literatura ^c		% ^d				Tipo ^e
			ADAMS	NIST 08	HC ^f	HGF ^f	HRE ^f	HRI ^f	
FUNDAMENTALES									
1	<i>n</i> -nonano	895	900	900	44.3	42.3	-	-	Alc
2	α -pineno	922	932	922	-	-	-	16.7	MoH
3	<i>n</i> -undecano	1100	1100	1100	-	-	-	17.6	Alc
4	(<i>E</i>)-cariofileno	1404	1417	1404	-	24.2	-	-	SeH
MAYORITARIOS									
1	α -thujene	917	924	917	-	-	1.0	-	MoH
2	α -pineno	922	932	922	3.1	-	3.3	(...) ^g	MoH
3	β -pineno	963	974	962	7.7	-	4.6	7.6	MoH
4	<i>n</i> -undecano	1100	1100	1100	2.8	2.2	9.7	(...)	Alc
5	α -terpineol	1183	1186	1182	-	-	-	1.3	MoOx
6	α -copaeno	1363	1374	1363	-	-	1.2	3.5	SeH
7	(<i>E</i>)-cariofileno	1404	1417	1404	7.9	-	8.2	4.9	SeH
8	β -copaeno	1428	1430	-	-	-	1.1	-	SeH
9	α -humuleno	1440	1452	1440	-	1.3	3.4	1.5	SeH
10	6,9-guaiadieno	1441	1442	-	1.5	-	-	-	SeH
11	γ -muuroloeno	1465	1478	1465	-	-	1.6	1.0	SeH
12	germacreno D	1467	1484	1466	-	-	1.6	-	SeH
13	β -selineno	1470	1489	1488	-	1.3	-	-	SeH
14	(<i>E</i>)- β -ionona	1476	1487	1477	-	-	1.4	-	SeOx
15	amorfa-4,7(11)-dieno	1479	1479	-	-	1.2	-	-	SeH
16	γ -curcumeno	1483	1481	-	1.0	-	-	-	SeH
17	α -muuroloeno	1488	1500	1488	-	-	1.1	-	SeH
18	γ -cadineno	1500	1513	1500	-	-	2.7	1.0	SeH
19	δ -cadineno	1511	1522	1511	-	1.1	6.1	7.0	SeH
20	selin-3,7(11)-dieno	1525	1545	-	-	1.1	-	-	SeH
21	selin-4(15),7(11)-dieno	1530	-	1531	-	1.1	-	-	SeH
22	germacreno B	1540	1559	1540	1.1	1.2	-	-	SeH
23	óxido de cariofileno	1565	1582	1566	4.1	2.5	1.4	1.6	SeOx
24	salvial-4(14)-en-1-ona	1577	1594	-	-	-	1.2	-	SeOx
25	copaborneol	1587	-	1592	-	-	-	1.0	SeOx
26	β -oplopenona	1599	1607	1600	-	-	1.1	-	SeOx
27	junenol	1599	1618	1603	-	-	1.1	-	SeOx
28	muurol-4,10(14)-dien-1- β -ol	1616	1630	-	1.0	-	-	-	SeOx
29	<i>epi</i> - α -muurolol	1637	1640	-	-	-	2.2	-	SeOx
30	α -cadinol	1650	1652	1640	-	-	2.8	1.1	SeOx
31	eudesm-4(15),7-dien-1- β -ol	1688	1688	-	-	-	1.0	-	SeOx
32	ácido hexadecanoico	1958	1959	1957	1.1	-	1.1	1.2	Alc
33	<i>n</i> -pentacosano	2500	2500	2500	1.3	-	-	-	Alc

^a Los compuestos están según el orden de elución en la columna HP-5MS.

^b RI calculado experimentalmente usando la serie homóloga de alcanos lineales C₈ – C₃₀.

^c RI publicado en literatura: Adams 2007 y NIST08.

^d Los porcentajes son medias de los valores de tres determinaciones, con una $\sigma < 5\%$ en todos los casos.

^e Clasificación por tipos de compuestos: Alc = alcano; MoH = hidrocarburo monoterpénico; MoOx = monoterpéno oxigenado; SeH = hidrocarburo sesquiterpénico; SeOx = sesquiterpéno oxigenado.

^f HC = *Hypericum canariense*, HGF = *Hypericum grandifolium*, HRE = *Hypericum reflexum* (La Esperanza), HRI = *Hypericum reflexum* (Ifonche).

^g Valor ya reflejado entre los fundamentales.

El análisis de los resultados nos muestra que todos los hidrodestilados presentaron rendimientos similares ($\pm 0.1\%$), siendo el porcentaje de los dos *Hypericum reflexum* ligeramente superior al de los demás (0.14% y 0.15%). El total de los picos identificados en los cromatogramas oscilan entre el 79.2 y el 92.0 por ciento. De las 160 moléculas identificadas, solo 45 son comunes a los cuatro aceites esenciales analizados. El aceite esencial mejor definido fue el de *Hypericum reflexum*, donde se han podido identificar 120 compuestos, mientras que en el aceite esencial de *Hypericum grandifolium* sólo se identificaron 82 compuestos.

Los componentes mayoritarios están relacionados en los cuatro aceites esenciales estudiados con la fracción de hidrocarburos. En el aceite esencial de *Hypericum reflexum* (Ifonche) está equilibrada la proporción de alcanos, hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos (20.4%, 26.2% y 24.9%, respectivamente). Podemos destacar entre estos componentes las cantidades encontradas para el *n*-undecano (17.6%) en los alcanos, el α -pineno y β -pineno (16.7% y 7.6%, respectivamente) en los hidrocarburos monoterpénicos y el δ -cadineno (7.0%) en los hidrocarburos sesquiterpénicos.

En el caso del aceite esencial de *Hypericum reflexum* (La Esperanza), esta fracción está compuesta en mayor medida por hidrocarburos sesquiterpénicos (35.0%), presentando además una proporción no despreciable de sesquiterpenos oxigenados (16%). En este sentido, podemos destacar los porcentajes encontrados para el (*E*)-cariofileno y δ -cadineno (8.2% y 6.1%) entre los hidrocarburos sesquiterpénicos y para el α -cadinol (2.8%) entre los sesquiterpenos oxigenados.

Por otro lado, tanto en el aceite esencial de *Hypericum canariense* como en el de *Hypericum grandifolium* los compuestos más abundantes fueron los alcanos (49.7 y 46.0 %, respectivamente), siendo en ambos casos el *n*-nonano el constituyente mayoritario (44.3 y 42.3 %, respectivamente). Si bien en ambos aceites esenciales siguen por orden de abundancia los hidrocarburos sesquiterpénicos, hay que señalar que el aceite esencial de *Hypericum grandifolium* presentó una mayor proporción de los mismos (37.5 %), destacando entre ellos el (*E*)-cariofileno (24.2%).

II.2.2. PCA

La PCA (*Principal Component Analysis* o Análisis de componentes principales) es una técnica estadística que trata de representar en una nube en dos dimensiones un conjunto de datos ordenándolos por importancia (Andrés y Luna del Castillo 2004). En el caso concreto de esta investigación, esta técnica se ha utilizado para esclarecer las posibles relaciones entre los

diferentes aceites esenciales estudiados, así como para identificar los principales componentes responsables de la variabilidad entre ellos. Los resultados obtenidos con esta técnica estadística se representan en la **Fig. 4.1**, donde puede observarse la distribución de los compuestos volátiles de los aceites esenciales estudiados en función de sus componentes fundamentales y mayoritarios.

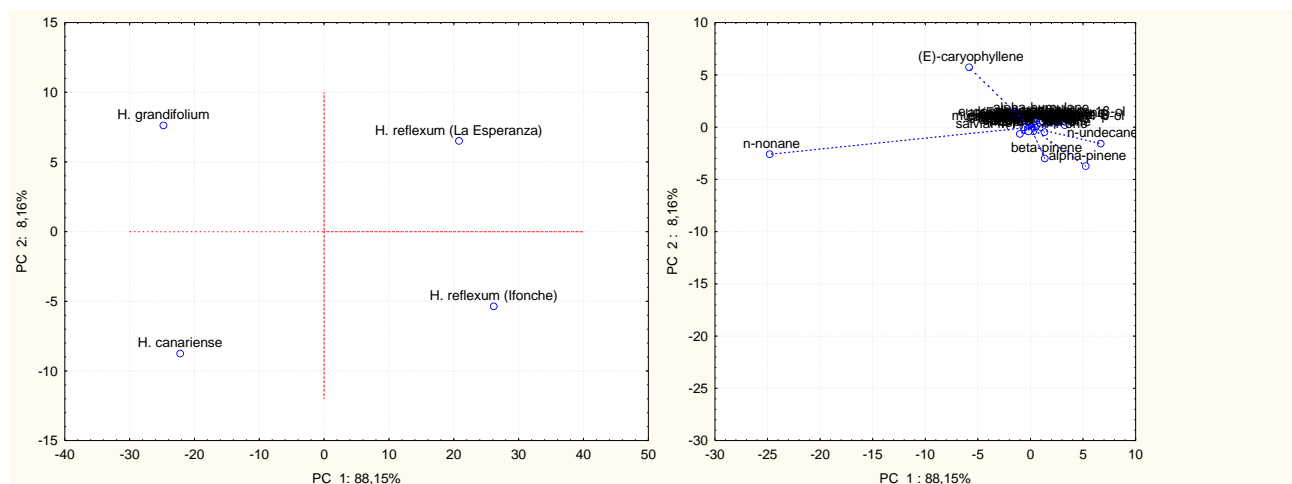


Figura 4.1. Gráficos obtenidos tras el análisis estadístico PCA de los aceites esenciales en estudio.

La **Fig. 4.1** muestra que el 96.31% de la variabilidad total del sistema se explica con dos componentes principales (PC1 = 88.15%, PC2 = 8.16%). Al observar el gráfico de la izquierda, se aprecia una clara separación de las cuatro especies de hipéricos y de las composiciones de sus aceites esenciales. El gráfico de la derecha muestra que PC1 está mayormente relacionado con el *n*-nonano (eigenvectors: -24.78; -2.59) y PC2 con el (*E*)-cariofileno (-5.82; 5.72) y en menor medida con el α -pineno (5.25 -3.74) y el β -pineno (1.36 -2.99).

El aceite esencial de *Hypericum canariense* se encuentra en el cuadrante inferior izquierdo (gráfico de la izquierda), muy relacionado en su composición con la presencia de *n*-nonano que se encuentra en la misma posición del gráfico de la derecha; este mismo compuesto, común también al *Hypericum grandifolium*, determina la posición de éste último en el cuadrante superior izquierdo, estando también bajo la influencia parcial del (*E*)-cariofileno. En los cuadrantes de la derecha se colocan los dos especies de *Hypericum reflexum*: en el cuadrante derecho superior el ejemplar de La Esperanza por estar influenciado en su composición por un

mayor contenido en (*E*)-cariofileno, mientras que en el inferior derecho se coloca el ejemplar de lfonche, más rico en su composición en α -pineno, β -pineno y *n*-undecano.

III.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

III.1. Capacidad antioxidante

Con el fin de evaluar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos de las especies de *Hypericum* en estudio se han realizado cuatro ensayos diferentes (ver apartado IV.2 del capítulo *Material y Métodos*), cuyos resultados comentamos a continuación.

III.1.1. Reacción con el radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

Los resultados obtenidos en el ensayo con DPPH se muestran en la **Tabla 4.5**. Vemos que los extractos y fracciones de las especies en estudio, con excepción de los aceites esenciales, mostraron actividad antirradicalaria en esta prueba, presentando valores de IC₅₀ entre 5.1 y 63.9 µg/ml. Debemos destacar los valores encontrados para las fracciones polares de las tres especies en estudio (IC₅₀ entre 5.1 y 7.9 µg/ml), los cuales son comparables a los obtenidos con el antioxidante de referencia Trolox (IC₅₀ 1.3 µg/ml), teniendo en cuenta que se tratan de mezclas complejas de compuestos y no sustancias puras.

Tabla 4.5. Capacidad antioxidante en el ensayo con DPPH de los extractos y fracciones de las especies de hipérico estudiadas.

Muestra	Soxhlet		Aceite esencial		MeOH		CHCl ₃		Fracción polar	
	IC ₅₀ ^a	TEAC ^b	IC ₅₀	TEAC	IC ₅₀	TEAC	IC ₅₀	TEAC	IC ₅₀	TEAC
<i>H. canariense</i>	11.7 (±0.4) ^c	457.8 (±14.1)	578.5 (±57.8)	10.0 (±1.0)	11.7 (±0.9)	713.3 (±56.3)	49.6 (±0.1)	168.6 (±0.4)	6.7 (±0.2)	854.9 (±21.4)
<i>H. grandifolium</i>	9.9 (±0.2)	540.0 (±10.8)	430.7 (±2.5)	19.4 (±0.7)	10.2 (±0.7)	523.8 (±37.3)	54.4 (±1.9)	153.8 (±5.4)	5.1 (±0.02)	1056.0 (±3.3)
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	16.8 (±0.3)	343.8 (±6.6) ¹¹	309.1 (±9.0) ¹	27.0 (±0.8)	8.3 (±0.2)	1011.3 (±20.7)	63.9 (±2.6)	130.9 (±5.4)	7.9 (±0.5)	1055.3 (±73.9)
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	8.2 (±0.2)	1014.0 (±21.1)	943.3 (±62.3)	8.9 (±10.4)	n.e. ^d	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
Control positivo	Trolox (IC ₅₀) 1.3 (±0.01) ^a									

^a Valor de IC₅₀ expresado en µg/ml.

^b Valor de TEAC expresado en µmol (de TE)/g (de muestra).

^c Entre paréntesis la σ del valor.

^d n.e. = no ensayado.

III.1.2. Reacción con el radical ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico)

Como puede observarse en la **Tabla 4.6**, todos los extractos y fracciones ensayadas presentaron una importante acción antioxidante en esta prueba, con valores de IC₅₀ entre 1.46 y 143.0 µg/ml. Al igual que en el ensayo con DPPH, los mejores captadores de radicales fueron las fracciones polares de las tres especies en estudio (con valores de IC₅₀ entre 1.46 y 4.9 µg/ml), mientras que los aceites esenciales presentaron la menor actividad (con valores de IC₅₀ entre 41.0 y 143.0 µg/ml). El Trolox (antioxidante utilizado como referencia) presentó una actividad antirradicalaria superior (IC₅₀ de 0.45 µg/ml) en esta prueba.

Tabla 4.6. Capacidad antioxidante en el ensayo con ABTS^{•+} de los extractos y fracciones de las especies de hipérico estudiadas.

Muestra	Soxhlet		Aceite esencial		MeOH		CHCl ₃		Fracción polar	
	IC ₅₀ ^a	TEAC ^b	IC ₅₀	TEAC	IC ₅₀	TEAC	IC ₅₀	TEAC	IC ₅₀	TEAC
<i>H. canariense</i>	5.6 (±0.8) ^c	323.1 (±49.9)	50.1 (±4.0)	36.2 (±2.9)	11.6 (±0.7)	156.6 (±9.4)	32.3 (±1.2)	56.1 (±2.1)	3.8 (±0.1)	480.1 (±15.4)
<i>H. grandifolium</i>	2.4 (±0.1)	766.5 (±43.3)	143.0 (±1.6)	12.7 (±0.1)	3.3 (±0.1)	552.8 (±13.8)	37.0 (±1.8)	48.9 (±2.3)	1.46 (±0.1)	1238.5 (±34.8)
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	8.3 (±0.4)	218.3 (±9.4)	37.1 (±4.6)	48.8 (±6.1)	6.2 (±0.1)	292.5 (7.4)	30.9 (±2.5)	58.6 (±4.7)	4.9 (±0.2)	366.6 (±17.5)
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	7.2 (±0.8)	251.2 (±29.8)	41.0 (±2.3)	44.2 (±2.5)	n.e. ^d	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.	n.e.
Control positivo	Trolox (IC ₅₀) 0.45 (±0.01) ^a									

^a Valor de IC₅₀ expresado en µg/ml.

^b Valor de TEAC expresado en µmol (de TE)/g (de muestra).

^c Entre paréntesis la σ del valor.

^d n.e. = no ensayado.

III.1.3. Medida de la capacidad reductora del hierro: método FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

En la **Tabla 4.7** se recogen los resultados obtenidos tras la realización de esta prueba. Se encontró que todas las muestras ensayadas presentaron capacidad reductora del hierro (valores de TEAC entre 51.6 y 1192.2 µmol/g), con la excepción de los aceites esenciales (valores de TEAC entre 0.3 y 2.5 µmol/g). Podemos observar que la capacidad antioxidante es mayor para las fracciones polares (valores de TEAC entre 992 y 1192.2 µmol/g) que para las fracciones clorofórmicas (valores de TEAC entre 51.6 y 156.8 µmol/g), resultados que

concuerdan con los encontrados en los ensayos de actividad antioxidante anteriormente comentados.

Tabla 4.7. Capacidad antioxidante en el ensayo con FRAP de los extractos y fracciones de las especies de hipérico estudiadas.

Muestra	Soxhlet	Aceite esencial	MeOH	CHCl ₃	Fracción polar
	TEAC ^a	TEAC	TEAC	TEAC	TEAC
<i>H. canariense</i>	598.3 (±93.6) ^b	0.3 (±0.1)	621.7 (±119.5)	156.8 (±34.2)	1192.2 (±587.6)
<i>H. grandifolium</i>	459.0 (±70.8)	0.5 (±0.1)	403.0 (±56.7)	65.9 (±10.1)	922.1 (±151.7)
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	736.6 (±112.3)	0.8 (±0.2)	835.8 (±157.4)	51.6 (±10.4)	1011.7 (±232.8)
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	655.8 (±177.1)	2.5 (±0.8)	n.e. ^c	n.e.	n.e.

^a Valor de TEAC expresado en $\mu\text{mol (de TE)/g (de muestra)}$.

^b Entre paréntesis la σ del valor.

^c n.e. = no ensayado.

III.1.4. Determinación del contenido fenólico total: Método de Folin-Ciocalteu

Los datos obtenidos de esta prueba se muestran en la **Tabla 4.8**. Vemos que las fracciones polares, como era de esperar, presentan el mayor contenido en fenoles totales (con valores entre 246.1 y 484.6 $\mu\text{g GA Eq/mg}$), mientras que los aceites esenciales mostraron los valores más bajos (entre 3.2 y 26.96 $\mu\text{g GA Eq/mg}$). Cabe destacar que los resultados obtenidos en el análisis de los fenoles totales muestran una correlación significativa con la actividad antioxidante evaluada.

Tabla 4.8. Contenido fenólico total de los extractos y fracciones de las especies de hipérico estudiadas.

Muestra	Soxhlet	Aceite esencial	MeOH	CHCl ₃	Fracción polar
	$\mu\text{g GA Eq/mg}$	$\mu\text{g GA Eq/mg}$	$\mu\text{g GA Eq/mg}$	$\mu\text{g GA Eq/mg}$	$\mu\text{g GA Eq/mg}$
<i>H. canariense</i>	222.1 (±35.9) ^a	12.23 (±3.0)	209.6 (±44.5)	105.6 (±21.7)	484.6 (±159.0)
<i>H. grandifolium</i>	194.1 (±29.8)	3.2 (±0.7)	175.5 (±35.7)	78.0 (±14.5)	364.5 (±65.3)
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	189.6 (±46.2)	26.96 (±4.3)	259.2 (±75.6)	71.2 (±12.4)	246.1 (±62.2)
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	223.9 (±48.1)	25.05 (±5.6)	n.e. ^b	n.e.	n.e.

^a Entre paréntesis la σ del valor.

^b n.e. = no ensayado.

III.2. Actividad antimicrobiana

Se presentan a continuación los resultados de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) mediante el método de microdilución.

III.2.1. Método de difusión en agar

Los resultados de la investigación de la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de hipérico frente a varias bacterias Gram positivas y Gram negativas por el método de difusión en agar se resumen en la **Tabla 4.9**. En ella se puede apreciar que todos ellos presentaron una moderada actividad frente a las bacterias Gram positivas ensayadas, con halos de inhibición comprendidos entre 7 y 12 mm. No obstante, en ningún caso los valores obtenidos alcanzaron el grado de inhibición mostrado por el ciprofloxacino (valores > 20 mm), fármaco utilizado como referencia. Con respecto a las bacterias Gram negativas ensayadas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), ninguno de los extractos ejerció actividad inhibitoria frente a las mismas (datos no mostrados, halos de inhibición ≤ 6 mm).

Tabla 4.9. Resultados de la actividad antimicrobiana mediante difusión en agar.

Extracto	Muestra	Dosis	Halos de inhibición (mm) ^a	
			<i>S. aureus</i> ^b	<i>E. faecalis</i> ^c
Soxhlet	<i>H. canariense</i>	1.00 ^d	11	8
	<i>H. grandifolium</i>	1.00	12	9
	<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	1.00	9	8
	<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	1.00	10	9
Aceite esencial	<i>H. canariense</i>	10 ^e	11	9
	<i>H. grandifolium</i>	10	7	7
	<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	10	11	9
	<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	10	11	9
Control positivo	Ciprofloxacino	5 ^f	22	21

^a Se muestran solo los valores obtenidos frente a Gram positivos (halo de inhibición ≥ 6 mm).

^b *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

^c *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

^d Dosis expresada en mg/disco.

^e Los aceites esenciales se inocularon sin diluir (10 µl/disco).

^f Dosis: 5 µg/disco.

Por otro lado, también se evaluó por este método la actividad antimicrobiana de los extractos de hipérico frente a varias cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

(SARM) y de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), mostrándose los resultados en la **Tabla 4.10**.

Tabla 4.10. Resultados de la actividad antimicrobiana mediante difusión en agar.

Extracto / fracción	Muestra	Dosis ^a	Halos de inhibición (mm) ^b					
			1 ^c	2	3	4	5	6
MeOH	<i>H. canariense</i>	3.75	12.3	13	9.3	11.7	10.7	10.3
		2.50	10	11	10.3	10.3	10.3	11
		1.25	9.7	10.3	9.3	9.7	9.3	9.7
	<i>H. grandifolium</i>	3.75	11	11	12	11.3	11	11
		2.50	10	11	13.7	11	10.7	12.7
		1.25	10	9.7	12.7	10.7	9.7	12
	<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	3.75	11.3	13.7	14	13.3	12.3	13
		2.50	10.7	12.7	14.7	11.7	12.3	13
		1.25	11.7	13	13.7	13	12	12.3
CHCl ₃	<i>H. canariense</i>	3.75	8.3	9.3	9.3	8.7	8.3	8.3
		2.50	9	10	9.7	8.7	9	9
	<i>H. grandifolium</i>	3.75	9.7	9.7	9.7	9.3	8.7	10
		2.50	9	10	9.7	8.7	9	9
	<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	3.75	10	12	13.7	11	12	11.7
		2.50	14.7	15.7	17.7	15.7	14.3	14.7
Fracción polar	<i>H. canariense</i>	3.75	14.7	17.7	16	16.7	15.3	16.6
		2.50	12.7	16.3	14.7	14.3	14	15.3
		1.25	10.7	11.7	12.7	11.7	11.7	12
	<i>H. grandifolium</i>	3.75	R ^d	R	17.3	R	R	R
		2.50	R	R	16.3	R	R	R
	<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	3.75	9	11.7	12.7	11.3	10.3	11.3
		2.50	9	11.3	13	9.7	9.7	11
		1.25	9.3	10	13.7	8.7	9.3	11
	Control (-) ^e	Oxacilina	30 ^f	R	R	R	R	R
Control (+) ^e	Vancomicina	30 ^f	18.3	21	19.7	19.3	19.3	

^a Dosis expresada en mg/disco.

^b Se muestran solo los valores obtenidos frente a SARM (halo de inhibición ≥ 6 mm).

^c 1 = SARM cepa patrón humano (452-3265); 2 = SARM origen humano (colonización); 3 = SARM origen humano (infección); 4 = SARM origen porcino (cerdo negro canario vivo) SCCmec IV; 5 = SARM origen porcino (cerdo blanco sacrificado) SCCmec IV; 6 = SARM origen porcino (cerdo blanco sacrificado) SCCmec V.

^d R = resistente.

^e - = control negativo; + = control positivo.

^f Dosis: 30 μ g/disco.

Podemos observar que, en general, todos los extractos y fracciones estudiados presentaron moderada capacidad inhibitoria frente al crecimiento de las cepas de SARM ensayadas, con valores que oscilan entre 8.3 y 17.7 mm, teniendo el control positivo

(Vancomicina 30 µg) valores comprendidos entre 18.3 mm y 21 mm. Entre ellos sobresalen los valores encontrados para las fracciones polares de *Hypericum canariense* y de *Hypericum grandifolium* (17.7 mm frente a SARM 2 y 17.3 mm frente a SARM 3, respectivamente), así como la fracción CHCl₃ del *Hypericum reflexum* de La Esperanza (17.7 mm frente a SARM 3), que presentaron halos de inhibición próximos a los mostrados por la vancomicina, antimicrobiano utilizado como referencia. Por el contrario, ninguno demostró tener actividad inhibitoria frente a las tres cepas de BLEE utilizadas (datos no mostrados, halos de inhibición con valores ≤ 6 mm).

III.2.2. Determinación de la CIM

En la **Tabla 4.11** se reflejan los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) de los extractos Soxhlet de los diferentes hipéricos sólo frente a las bacterias Gram positivas, ya que fueron los microorganismos más sensibles en el método de difusión en agar. Como se puede ver, todos los extractos presentaron valores de CIM comprendidos entre 32 y 128 µg/ml, siendo el extracto más activo el de *Hypericum grandifolium* frente a *Staphylococcus aureus* (32 µg/ml). El ciprofloxacino (antimicrobiano usado de referencia) inhibió el crecimiento bacteriano a una CIM inferior a la de los extractos (0.5 µg/ml). Debemos comentar que no se pudo determinar los valores de CIM de los aceites esenciales, ya que se produjo un precipitado en los pocillos de las placas de microdilución, lo cual dificultó la lectura final del resultado.

Tabla 4.11. Resultados obtenidos en la determinación de la CIM de los extractos Soxhlet de las especies de hipérico estudiadas frente a Gram positivos.

Muestra	Extracto	CIM (µg/ml)	
		<i>S. aureus</i> ^a	<i>E. faecalis</i> ^b
<i>H. canariense</i>	Soxhlet	64	128
<i>H. grandifolium</i>	Soxhlet	32	128
<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)	Soxhlet	128	128
<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	Soxhlet	64	128
Control positivo	Ciprofloxacino ^c	0.5	0.5

^a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

^b *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

^c Dosis: 5 µg/disco.

Por otro lado, dado que los extractos analizados no produjeron inhibición por el método de difusión en agar de ninguna de las cepas de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

utilizadas (ver apartado III.2.1 del capítulo *Resultados*), solo se calculó la CIM de los diferentes extractos en estudio frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Tras la realización de esta prueba se encontró que todos los extractos de las especies de hipérico ensayadas presentaron valores de CIM altos frente a todas las SARM ensayadas (CIM > 170.4 mg/ml), a excepción de la fracción polar del *Hypericum canariense* que mostró un valor de CIM inferior (82.5 mg/ml). La vancomicina, fármaco utilizado como referencia, presentó un valor de CIM de 1 µg/ml.

III.3. Actividad citotóxica

Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de los diferentes extractos en estudio sobre las líneas celulares A375 (línea celular de melanoma humano), MDA-MB 231 (línea celular de carcinoma mamario humano) y HCT116 (línea celular de carcinoma humano de colon) mediante el método colorimétrico del MTT, el cual es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. En la **Tabla 4.12** (ver página siguiente) se reflejan los valores de IC₅₀ (concentración de la muestra a ensayar que inhibe el 50% del crecimiento celular) obtenidos en este ensayo.

Los datos muestran que todos los extractos Soxhlet estudiados inhibieron significativamente el crecimiento de todas las células tumorales ensayadas, con valores de IC₅₀ comprendidos entre 4.64 y 58.71 µg/ml. No obstante, debemos comentar que todos ellos presentaron la máxima inhibición frente a la línea celular HCT116, destacando en este sentido al *Hypericum grandifolium* que mostró un valor de IC₅₀ (4.64 µg/ml) cercano al obtenido para el cisplatino (fármaco utilizado como referencia).

Con respecto a los aceites esenciales, todos presentaron una actividad citotóxica sobre todas las líneas celulares tumorales ensayadas superior a la mostrada por los extractos Soxhlet (IC₅₀ entre 3.04 y 23.50 µg/ml). Entre estos, el aceite esencial de *Hypericum reflexum* mostró la mayor actividad con valores de IC₅₀ entre 3.04 y 3.87 µg/ml, los cuales están muy próximos a los obtenidos con el cisplatino (IC₅₀ entre 0.43 y 2.42 µg/ml). En contraste, el aceite esencial de *Hypericum grandifolium* presentó la menor actividad con valores de IC₅₀ entre 9.62 y 23.50 µg/ml.

Tabla 4.12. Actividad citotóxica (in vitro) sobre líneas celulares de tumores humanos realizada con los extractos Soxhlet y los aceites esenciales de los hipéricos investigados.

Extracto	Muestra	Línea celular (IC ₅₀) (µg/ml) ^a		
		A375 ^b	MDA-MB 231 ^c	HCT116 ^d
Soxhlet	<i>H. canariense</i> *	15.78 (14.28 - 17.44) ^e	58.71 (51.13 - 67.40)	8.22 (7.26 - 9.30)
	<i>H. grandifolium</i> *	7.12 (6.74 - 7.52)	11.02 (10.26 - 11.83)	4.64 (4.38 - 4.93)
	<i>H. reflexum</i> (La Esperanza) *	14.01 (12.75 - 15.41)	23.60 (21.58 - 25.80)	7.65 (6.88 - 8.51)
	<i>H. reflexum</i> (Ifonche) *	24.60 (22.54 - 26.84)	33.49 (31.99 - 35.05)	13.50 (12.22 - 14.91)
AE	<i>H. canariense</i> **	9.41 (8.35 - 10.60)	11.01 (9.36 - 12.96)	8.25 (7.52 - 9.05)
	<i>H. grandifolium</i> *	15.83 (12.05 - 16.83)	23.50 (19.56 - 26.48)	9.62 (7.760 - 11.92)
	<i>H. reflexum</i> (La Esperanza)**	3.04 (2.61 - 3.55)	3.65 (3.32 - 4.01)	3.04 (2.82 - 3.27)
	<i>H. reflexum</i> (Ifonche)	3.28 (2.87 - 3.76)	3.87 (3.53 - 4.23)	3.33 (3.08 - 3.60)
Control positivo	Cisplatino	0.43 (0.3 - 0.48)	2.94 (2.22 - 3.13)	2.42 (2.00 - 2.85)

^a IC₅₀ = Concentración que reduce a un 50% el crecimiento celular (tras 72 h de incubación).

^b Línea celular de melanoma humano.

^c Línea celular de carcinoma mamario humano.

^d Línea celular de carcinoma humano de colon.

^e Intervalo de confianza del 95 %.

* p < 0.0001, comparado con el control.

** p < 0.001, comparado con el control.



5. DISCUSIÓN

Página anterior: *Hypericum reflexum* L.f. var. *reflexum*.

[Imagen disponible en <http://www.jardincanario.org/inicio>, web del Jardín Botánico Viera y Clavijo de Gran Canarias].

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo el estudio fitoquímico de diferentes extractos de tres especies del género *Hypericum*, de las cuales una es endémica de las Islas Canarias, *Hypericum reflexum* L. f. (popularmente conocida como “cruzadilla”), mientras que las otras dos, *Hypericum canariense* L. (“granadillo”) e *Hypericum grandifolium* Choisy (“malfurada”), son endémicas de la región macaronésica (Arechavaleta *et al.* 2010), utilizando para ello diferentes técnicas cromatográficas (HPLC-DAD, HPLC-MS, GC-FID y GC-MS). Asimismo, se llevó a cabo el estudio *in vitro* de la actividad antioxidante, citotóxica y antimicrobiana de estos extracto mediante los métodos anteriormente descritos en el capítulo *Material y Métodos*, con el fin de completar su potencial terapéutico. A continuación, vamos a hacer una discusión de los resultados obtenidos para cada uno de estos apartados por separado.

I.

ESTUDIO FITOQUÍMICO

En el género *Hypericum* existen ciertos componentes característicos que aportan una información valiosa sobre el mismo, ya que su presencia no sólo se relaciona con algunas de sus actividades biológicas sino también con los diferentes grupos taxonómicos que lo componen (Crockett *et al.* 2005; Toker 2009; Nicoletti 2011; Crockett 2011; Zhao *et al.* 2015). Por ello, nuestra investigación se ha centrado en la caracterización de dichos compuestos, para lo que se ha realizado un análisis del contenido de los mismos a través de técnicas cromatográficas de alta eficacia (HPLC-DAD y HPLC/ESI-MS).

Hemos encontrado que todas las especies de hipérico analizadas poseen ácido clorogénico, hiperósido, isoquercitrina y quercetina, siendo el ácido clorogénico el metabolito secundario más abundante en todas las especies de hipérico estudiadas, excepto en *Hypericum grandifolium* en donde el hiperósido fue el más abundante. En este sentido, debemos destacar los valores encontrados para el ácido clorogénico en las dos especies de *Hypericum reflexum* estudiadas (> 10.9 mg/g), que son superiores a los encontrados por Filippini *et al.* (2010) en otras especies de *Hypericum* (6.09 mg/g). Estos altos niveles son de gran interés, ya que se ha demostrado que la aplicación tópica de ácido clorogénico puede acelerar la cicatrización de heridas por su capacidad de aumentar la síntesis de colágeno a través de la activación de agentes claves como el factor de necrosis tumoral α y la transformación del factor de crecimiento β_1 en diferentes fases del proceso de cicatrización de la herida, así como por su capacidad antioxidante (Chen *et al.* 2013; Kaur y Verma 2015). Este hecho podría justificar el uso que se hace de estas especies canarias en la medicina tradicional como cicatrizantes (Darias *et al.* 1986, 1989; Pérez de Paz y Hernández Padrón 1999). Por otra parte, se ha demostrado que el ácido cafeico, que es un producto de hidrólisis del ácido clorogénico, presenta actividad antidepresiva mediante la modulación de los receptores adrenérgicos α_{1A} (Takeda *et al.* 2003), por lo que este metabolito podría explicar en parte la acción antidepresiva encontrada para estas especies en trabajos anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación (Prado *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2005, 2007, 2009).

Debemos comentar que en un estudio fitoquímico realizado con anterioridad por nuestro equipo de investigación con *Hypericum grandifolium* (Bonkanka *et al.* 2008) no se encontró ácido

clorogénico, lo cual no concuerda con los datos obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Dado que se ha observado que la producción de ácido clorogénico varía en función de factores como el grado de desarrollo de la planta o el estrés ambiental (Moral del 1972; Grace *et al.* 1998; Çirak *et al.* 2007), es posible que estas discrepancias encontradas puedan explicarse por diferentes factores como la zona o época de recolección de la planta o el método analítico utilizado para su estudio.

Con respecto a los otros metabolitos secundarios analizados, la quercitrina sólo fue detectada en *Hypericum canariense* y en *Hypericum grandifolium*, mientras que la rutina se encontró en todas las especies estudiadas excepto en el *Hypericum grandifolium*. Es interesante resaltar los altos valores de rutina hallados para la especie *Hypericum reflexum* (> 7.6 mg/g), similares a los mostrados por *Hypericum perforatum* (4.25-9.23 mg/g) (Sagrati *et al.* 2008). Dado que se ha asociado la actividad antidepresiva de los extractos de hipérico con su contenido en rutina (Nöldner y Schötz 2002), es posible que una parte de los efectos antidepresivos observados para las especies canarias en trabajos anteriores (Prado *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2005, 2007) sea debido a la presencia de este compuesto.

En relación a las naftodiantronas, no se pudo detectar hiperforina e hipericina en ninguno de los extractos o fracciones analizadas por la técnica de HPLC-DAD. Como es bien sabido, las naftodiantronas, como la hipericina y la pseudohipericina, son consideradas marcadores quimiotaxonómicos importantes del género *Hypericum* y han sido asociadas con la mayoría de las acciones farmacológicas de las especies de este género (Bombardelli y Morazzoni 1995; Butterweck *et al.* 1997; Barnes *et al.* 2001; Avato 2005; Crockett *et al.* 2005; Hostettmann y Wolfender 2005; Saddiqe *et al.* 2010; Crockett y Robson 2011; Šemeláková *et al.* 2012; Menichini *et al.* 2013; Mikešová *et al.* 2013; Prakash *et al.* 2013; Teiten *et al.* 2013; Marrelli *et al.* 2014; Wölfl *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015).

Otros autores tampoco han encontrado naftodiantronas en las especies de *Hypericum canariense* (Nürk y Crockett 2011) y de *Hypericum grandifolium* (Crockett *et al.* 2005; Bonkanka *et al.* 2008; Bonkanka *et al.* 2011), lo cual está en consonancia con los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Por lo que se refiere a la especie *Hypericum reflexum*, es la única de las especies estudiadas que contiene glándulas secretoras de color oscuro en el borde de las hojas y flores donde las naftodiantronas, como hipericina y/o pseudohipericina se almacenan (Bramwell y Bramwell 2001; Crockett y Robson 2011). De hecho, su extracto muestra un color rojizo oscuro, lo cual suele ser indicativo de la presencia de naftodiantronas (Ciccarelli *et al.* 2001; Çirak *et al.* 2007a; Çirak *et al.* 2007b; Guedes *et al.* 2012; Akhtar *et al.* 2014). Por ello, para confirmar la ausencia de este tipo de compuestos en nuestras especies en estudio se utilizó

una técnica analítica más selectiva y sensible para identificar compuestos a bajas concentraciones, el HPLC/ESI-MS. Tras la realización de esta técnica, confirmamos la ausencia de este tipo de compuesto en las especies analizadas, excepto para el *Hypericum reflexum* donde se encontraron trazas de pseudohipericina así como una pequeña proporción de hipericina (0.153 mg/g), si bien los niveles detectados son inferiores a los hallados para *Hypericum perforatum* (0.35-1.72 mg/g) (Sagrati *et al.* 2008). En resumen, los resultados encontrados en nuestro estudio, ausencia de naftodiantronas en *Hypericum canariense* e *Hypericum grandifolium* y presencia en *Hypericum reflexum*, están de acuerdo con la relación entre las secciones del género *Hypericum* propuesta por Robson (2003).

Con respecto a la hiperforina, debemos comentar que en un estudio fitoquímico previo del extracto metabólico de la especie *Hypericum grandifolium* (recolectada en Tenerife) se detectó su presencia, pero en una cantidad muy pequeña (< 0.1 mg/g de planta seca) (Bonkanka *et al.* 2008). Es necesario señalar que la hiperforina es una molécula bastante inestable (Avato 2005; Hostettmann y Wolfender 2005; Saddiqe *et al.* 2010) y que su concentración puede variar en función de diversos factores como el origen geográfico de las plantas, época de recolección o la conservación del material desecado (Hostettmann y Wolfender 2005; Bagdonaitė *et al.* 2012; Wölfle *et al.* 2014). Además, es posible que el método analítico utilizado en nuestro estudio sea poco sensible a las concentraciones tan bajas de hiperforina detectadas para *Hypericum grandifolium* con anterioridad, lo que justificaría su ausencia.

Por otra parte, dado el interés que los aceites esenciales han suscitado en las últimas décadas y el hecho de que se encontraran escasas o nulas referencias bibliográficas sobre la composición de estos metabolitos en las especies de *Hypericum* seleccionadas para nuestro estudio (Mathis 1964; Avato 2005; Lotocka y Osinska 2010; Bertoli 2011), se consideró de interés realizar el estudio de los componentes volátiles de las mismas. Para ello se extrajo el aceite esencial de cada una de ellas y se analizó en un GC-MS y GC-FID, lo que nos permitió conocer el rendimiento y la composición cualitativa y cuantitativa de los diferentes aceites esenciales. Asimismo, se pudo constatar la variabilidad que existe en la composición de las sustancias volátiles entre dos especies de *Hypericum reflexum* recogidas en diferentes zonas de la isla.

Tras la realización del análisis, se observó que los componentes mayoritarios en los cuatro aceites esenciales estudiados están relacionados con la fracción de hidrocarburos. Tanto en el aceite esencial de *Hypericum canariense* como en el de *Hypericum grandifolium* los compuestos más abundantes fueron los alcanos seguidos de los hidrocarburos sesquiterpénicos, siendo los constituyente mayoritarios el *n*-nonano y el (*E*)-cariofileno.

Con respecto a la composición del aceite esencial del *Hypericum reflexum* recogido en dos zonas diferentes de la Isla de Tenerife, es interesante resaltar que hemos encontrado diferencias significativas en la composición cuantitativa de ambos aceites esenciales. Así, la especie recogida en Ifonche presentó una proporción equilibrada de alcanos, hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, mientras que la especie recogida en La Esperanza mostró una mayor proporción de hidrocarburos sesquiterpénicos en su composición. Debemos señalar que, en conjunto, los componentes más representativos de estos dos aceites esenciales son el *n*-undecano entre los alcanos, el α -pineno y β -pineno dentro de los hidrocarburos monoterpénicos, y, en el grupo de los sesquiterpenos, el (*E*)-cariofileno y el δ -cadineno entre los hidrocarburos y el α -cadinol y el óxido de cariofileno dentro de los oxigenados.

Para apreciar mejor las posibles relaciones entre los diferentes aceites esenciales estudiados e identificar los principales componentes responsables de la variabilidad entre ellos, se compararon por medio del análisis estadístico de componentes principales (PCA). Tras realizar este análisis, comprobamos que los componentes fundamentales de los cuatro aceites esenciales analizados son *n*-nonano, (*E*)-cariofileno, α -pineno y β -pineno. El aceite esencial de *Hypericum canariense* está muy relacionado con el de *Hypericum grandifolium* debido a la presencia en ambos de *n*-nonano, pero en el de *Hypericum grandifolium* influye además el alto contenido en (*E*)-cariofileno. Los aceites esenciales de las dos especies de *Hypericum reflexum* contienen una alta proporción de *n*-undecano, pero en el ejemplar de La Esperanza se encontró un mayor contenido de (*E*)-cariofileno, mientras que el ejemplar de Ifonche fue más rico en α -pineno y β -pineno. Estos resultados nos hacen pensar en la posible existencia de una variabilidad intraespecífica en *Hypericum reflexum*, lo cual no sería extraño ya que algunos estudios apuntan a la existencia de variedades en el seno de esta especie (Kunkel 1991; Robson 1996; Arechavaleta *et al.* 2010; JBVC 2013; Bramwell 2014).

Además hay que tener en cuenta que los aceites esenciales son uno de los componentes metabólicos que sufren mayor variabilidad con respecto a la diferente distribución geográfica y distintas condiciones medioambientales (Kuklinski 2000; Figueiredo *et al.* 2008; Barra 2009; Miguel 2010a; Miguel 2010b; Amorati *et al.* 2013). Por eso, no es de extrañar las diferencias encontradas entre los aceites esenciales de las dos especies de *Hypericum reflexum* de hábitats diferentes que han sido estudiadas.

Algunos autores consideran los aceites esenciales como marcadores quimiotaxonómicos del género *Hypericum* (Mathis y Ourison 1964a, 1964b, 1964c; Avato 2005), pero sólo en algunos casos se encuentran grupos homogéneos de aceites esenciales relacionados con la clasificación taxonómica, presentando la mayoría variabilidad tanto en el contenido como en la

composición (Crockett 2010). Este es el caso del *Hypericum reflexum*, que mostró no sólo una variabilidad intraespecífica (como comentamos anteriormente), sino que también presentó diferencias en los componentes volátiles mayoritarios con respecto a otros miembros de la sección *Adenosepalum* a la que pertenece, como *Hypericum delphicum*, *Hypericum montanum* e *Hypericum tomentosum*. Así, se ha encontrado que los componentes mayoritarios para *Hypericum delphicum* procedente de la Península Arábiga fueron óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno y *n*-undecano (Crockett *et al.* 2007); para *Hypericum montanum* de Italia fueron germacreno D y (*E*)-cariofileno (Maggi *et al.* 2010); para *Hypericum tomentosum* procedente de Portugal fueron (*E*)-cariofileno, *n*-undecano y α -humuleno, mientras que para *Hypericum tomentosum* procedente de Túnez fueron mentona, *n*-octano, (*E*)-cariofileno y α -pineno (Nogueira *et al.* 1998; Hosni *et al.* 2008).

Hay que comentar que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral para la composición química de los aceites esenciales están en concordancia con los encontrados para otras especies del género *Hypericum*. Así, se ha observado que, en general, las especies del género *Hypericum* tienen una gran cantidad de compuestos sesquiterpénicos en sus aceites esenciales, siendo el (*E*)-cariofileno uno de los más representativos en la mayoría de las esencias de las especies de *Hypericum* (Guedes *et al.* 2012). Asimismo, los compuestos más representativos entre los hidrocarburos monoterpénicos son el α -pineno y β -pineno, mientras que los *n*-alcanos son los componentes más abundantes sólo en algunas especies del género, siendo los mayoritarios el *n*-nonano y el *n*-undecano (Guedes *et al.* 2012).

II.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Desde hace varios años el equipo de investigación del que formo parte ha venido realizando numerosos trabajos encaminados a poner de manifiesto las potenciales actividades farmacológicas de diferentes especies vegetales utilizadas con fines medicinales en las Islas Canarias, con el ánimo no sólo de evaluar su uso popular sino también encontrar posibles moléculas con potencial actividad farmacológica. A este respecto, anteriores estudios realizados por nuestro equipo han puesto de manifiesto las propiedades antibacterianas, analgésicas antiinflamatorias y antidepresivas de diferentes extractos y fracciones obtenidas de las sumidades floridas de unas especies nativas de las Islas Canarias, *Hypericum canariense* L., *Hypericum glandulosum* Aiton e *Hypericum grandifolium* Choisy y una endémica del Archipiélago, *Hypericum reflexum* L. f. (Herrera *et al.* 1996; Pardo *et al.* 2002; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2002, 2004; Rabanal *et al.* 2005; Sánchez-Mateo *et al.* 2005, 2006a, 2006b, 2006c, 2007; Bonkanka *et al.* 2008; Sánchez-Mateo *et al.* 2009, 2015 *in press*).

La presentes Tesis Doctoral es una continuación del estudio previo realizado por parte de nuestro grupo de investigación sobre las propiedades farmacológicas de tres de estas especies del género *Hypericum* (*Hypericum canariense* L., *Hypericum grandifolium* Choisy e *Hypericum reflexum* L. f.), centrándonos en este caso en el estudio de su potencial actividad antioxidante, citotóxica y antimicrobiana frente a cepas multiresistentes.

II.1. Capacidad antioxidante

En los últimos años ha habido un creciente interés en estudiar las propiedades antioxidantes de compuestos procedentes del reino vegetal (principalmente de los compuestos polifenólicos), ya que constituyen una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos que adquirimos a través de la dieta, jugando un papel importante en el mantenimiento del equilibrio redox y en disminuir la incidencia del daño producido por los radicales libres (Youdim y Joseph 2001; Issa *et al.* 2006; Lotito y Frei 2006; Russo 2007; Holst y Williamson 2008).

Como es bien sabido, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, una evaluación correcta y completa de la actividad antioxidante requiere el uso de diferentes métodos de ensayo, ya que los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos y obtenerse así distintos resultados dependiendo del método de análisis utilizado (Arnao *et al.* 1999; Sánchez-Moreno 2002; Aruoma 2003; Zou *et al.* 2004; Dudonné *et al.* 2009; Gioti *et al.* 2009; Miguel 2010b; Orčić *et al.* 2011; Amorati *et al.* 2013).

Por consiguiente, para evaluar el potencial efecto antioxidante *in vitro* de las especies de hipérico que forman parte de este estudio se han utilizado tres métodos, que miden tanto la capacidad de captación de radicales libres (métodos del DPPH y del ABTS) como la capacidad reductora (método del FRAP). Estos métodos elegidos son usados frecuentemente para evaluar el potencial antioxidante por ser rápidos, sensibles y reproducibles (Arnao *et al.* 1999; Aruoma 2003). También se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, que, aunque no está directamente relacionado con la medición de la actividad antioxidante, puede ser útil para tales estudios, sobre todo si se combina con métodos para medir dicha actividad, ya que se ha observado una correlación positiva entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante (Meir *et al.* 1995; Benzie y Strain 1996; Benzie y Szeto 1999; Gioti *et al.* 2009).

Todos los extractos y fracciones de las especies en estudio, con excepción de los aceites esenciales, mostraron una eficaz actividad antioxidante en el ensayo con DPPH, sobresaliendo entre ellos las fracciones polares de las tres especies en estudio que presentaron valores de IC₅₀ comparables a los del antioxidante de referencia (Trolox), sobre todo si tenemos en cuenta que se tratan de mezclas complejas de compuestos y no de sustancias puras.

Tras la realización del ensayo con ABTS, comprobamos que todos los extractos y fracciones ensayadas presentaron una importante acción antioxidante en esta prueba, observándose que las fracciones polares de las tres especies en estudio obtuvieron la mayor capacidad secuestradora del radical, al igual que sucedió en el ensayo con DPPH. Por su parte, los aceites esenciales, aunque presentaron una buena actividad captadora de radicales libres, fueron los que presentaron la menor capacidad antioxidante por este método.

Cuando se llevó a cabo el método FRAP, que mide la capacidad de una muestra de reducir el ión férrico, encontramos que todos los extractos ensayados, con la excepción de los aceites esenciales, fueron activas en esta prueba. En consonancia con los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, las fracciones polares presentaron la mayor capacidad reductora en este método.

Por otro lado, es interesante destacar que en nuestro estudio se observó una correlación entre el contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante encontrada en los métodos realizados para todos los extractos, con excepción de los aceites esenciales. Así, las fracciones polares de las tres especies en estudio, que son las que poseen una mayor proporción de contenido fenólico total, mostraron mayor eficacia antioxidante, mientras que las fracciones clorofórmicas, con la menor proporción, presentaron una actividad inferior.

Dado que la mayoría de los compuestos polifenólicos encontrados en estas especies (ácido clorogénico, hiperósido, quercetina, quercitrina, rutina) han demostrado una notable actividad antioxidante (Chen y Ho 1997; Fukumoto y Mazza 2000; Pérez Trueba 2003; Zou *et al.* 2004; Li *et al.* 2008, Gioti *et al.* 2009; Saddiqe *et al.* 2010; Chahar *et al.* 2011; Sato *et al.* 2011; Razzaghi-Asl *et al.* 2013; Li *et al.* 2014), consideramos que los efectos observados en el presente estudio se deben en buena parte a la presencia de estos compuestos. De hecho, en otros estudios realizados con otras especies del género *Hypericum* se ha relacionado la actividad antioxidante con los compuestos fenólicos y, en especial, con el ácido clorogénico (Hunt *et al.* 2001; El-Sherbiny *et al.* 2003; Silva *et al.* 2005; Gioti *et al.* 2009; Orčić *et al.* 2011; Asgarpanah 2012; Kanmani *et al.* 2014; Wölflle *et al.* 2014).

No obstante, debe señalarse que aunque generalmente se considera que la capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido fenólico total, esta relación no siempre se cumple, ya que en mezclas complejas como los extractos vegetales, la presencia de otros compuestos distintos a los fenólicos con propiedades reductoras puede proporcionar discrepancias entre los valores de las propiedades antioxidantes y el contenido fenólico (Zafrilla *et al.* 2003; Elmastas *et al.* 2006; Gioti *et al.* 2009).

En este sentido, los aceites esenciales, como era de esperar, mostraron el contenido fenólico más bajo por el método de Folin-Ciocalteu, lo que podría corresponderse con la nula o débil actividad antioxidante en los métodos DPPH y FRAP. Sin embargo, presentaron una capacidad antioxidante moderada en el método ABTS, lo que nos sugiere que contienen otro tipo de compuestos responsables de la actividad encontrada. En este sentido, debemos comentar que se han obtenido muy buenos resultados con aceites esenciales ricos en monoterpenos (*p*-cimeno, terpinoleno, α -terpineno, γ -terpineno y sabineno) y en (*E*)-cariofileno (Ruberto y Baratta 2000; Edris 2007; Edziri *et al.* 2010; Mechergui *et al.* 2010; Miguel 2010a), componentes que se encuentran en los aceites esenciales estudiados. No obstante, al ser los aceites esenciales mezclas complejas es difícil atribuir la actividad antioxidante encontrada a un componente determinado, por lo que se considera que la mayoría de las acciones observadas son

consecuencia de la acción sinérgica de varios de estos compuestos (Adorjan y Buchbauer 2010; Miguel 2010b; Amorati *et al.* 2013).

En resumen, podemos decir que los resultados que se han obtenido en este estudio con las especies de *Hypericum* evaluadas están en consonancia con la potente actividad antioxidante encontrada para otras especies de este género (Hunt *et al.* 2001; El-Sherbiny *et al.* 2003; Zou *et al.* 2004; Silva *et al.* 2005; Radulović *et al.* 2007; Sagratini *et al.* 2008; Gioti *et al.* 2009; Dordević *et al.* 2010; Orčić *et al.* 2011; Asgarpanah 2012; Guedes *et al.* 2012; Kanmani *et al.* 2014; Wölflé *et al.* 2014).

II.2. Actividad antimicrobiana

La creciente aparición y diseminación de resistencias a los antimicrobianos clásicos y los graves efectos secundarios que ocasionan, así como la aparición de micosis y otras infecciones oportunistas en pacientes inmunodeprimidos, justifican la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas que resuelvan o palien estas limitaciones (Díaz Granados *et al.* 2008; Lagamayo 2008; Bockstael y van Aerschot 2009; Srivastava *et al.* 2014; Fukuda 2015). En esta búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, en los últimos años ha aumentado el interés en el estudio de las propiedades antimicrobianas de los productos de origen natural (vegetal y animal), ya que pueden aportar nuevos compuestos activos con estructuras diferentes y/o nuevos mecanismos de acción (Cowan 1999; Domingo y López-Brea 2003; Ríos y Recio, 2005; Cos *et al.* 2006; Rahman 2015).

En la presente Tesis Doctoral, se llevó a cabo el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de hipérico frente a diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como varias cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) mediante el método de difusión en agar y el de microdilución.

Al realizar el estudio mediante el método de difusión en agar, encontramos que todos los extractos ensayados presentaron una actividad moderada frente a las bacterias Gram positivas, pero no mostraron actividad frente a las Gram negativas. Estos resultados concuerdan con los de otros estudios en donde se ha observado que las bacterias Gram negativas son resistentes a la acción de los extractos de hipéricos (Barnes *et al.* 2001; Gibbons *et al.* 2002; Avato *et al.* 2004; Cecchini *et al.* 2007; Saddiqe *et al.* 2010; Wölflé *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015) y, en especial, a la de los aceites esenciales (Burt 2004; Vergis *et al.* 2015). Mediante el método de microdilución,

sólo pudimos determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos Soxhlet, ya que en los aceites esenciales se observó un precipitado que dificultó la lectura e interpretación de los resultados. Teniendo en cuenta que un extracto se considera activo en el método de microdilución cuando su CIM es igual o menor a 100 µg/ml (Rios *et al.* 1988; Rabanal *et al.* 2002; Rios y Recio 2005; Cushnie y Lamb 2011), las especies estudiadas sólo mostraron actividad apreciable en este ensayo frente a *Staphylococcus aureus*, destacando los valores de CIM encontrados para *Hypericum grandifolium* (32 µg/ml).

Conviene reseñar que la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos y fracciones (clorofórmica, butanólica y acuosa) de estas especies había sido estudiada con anterioridad por nuestro equipo de investigación, presentando también en esa ocasión estos extractos mayor actividad frente a las bacterias Gram positivas (Herrera *et al.* 1996; Rabanal *et al.* 2002; Sánchez-Mateo *et al.* 2006a). Sin embargo, la actividad antimicrobiana encontrada para todas las especies en esos trabajos fue, en general, ligeramente mayor a la observada en esta Tesis Doctoral, lo cual podría explicarse por los diferentes métodos de extracción (extractos metanólicos y sus fracciones en lugar de metanol/acetona como en la presente Tesis Doctoral) y las dosis utilizadas (en la anterior investigación fueron superiores: 1.25 mg/disco), así como las distintas cepas bacterianas ensayadas.

Por otro lado, todos los extractos y fracciones estudiados presentaron moderada actividad antibacteriana frente al crecimiento de las cepas de SARM ensayadas con el método de difusión en agar, pero no se observó actividad frente a las tres cepas de BLEE utilizadas. Debemos destacar la actividad encontrada para las fracciones polares de *Hypericum canariense* y de *Hypericum grandifolium*, así como para la fracción CHCl₃ del *Hypericum reflexum* de La Esperanza, que mostraron halos de inhibición próximos a los mostrados por la vancomicina (antimicrobiano utilizado como referencia).

Sin embargo, todos los extractos de las especies de hipérico ensayadas presentaron valores de CIM altos frente a todas las SARM ensayadas por el método de microdilución, a excepción de la fracción polar de *Hypericum canariense* (CIM = 82.5 mg/ml), si bien reconocemos que es una concentración alta para definir una apreciable actividad antibacteriana frente a cepas SARM, sobre todo si recordamos que para considerar que un extracto posee actividad antimicrobiana apreciable su CIM debe ser ≤ 100 µg/ml en el método de microdilución (Rios *et al.* 1988; Rabanal *et al.* 2002; Rios y Recio 2005; Cushnie y Lamb 2011).

En definitiva, es necesario resaltar que si bien la actividad antibacteriana encontrada en la presente Tesis Doctoral para los extractos ensayados de las especies de hipérico en estudio fue baja, consideramos que sería necesario investigar más en profundidad esta actividad, sobre

todo teniendo en cuenta que, al no existir puntos de corte en los ensayos de la actividad antimicrobiana para los productos naturales mediante las técnicas de difusión en agar ni microdilución en caldo, nos hemos basado en lo publicado por algunos autores (Rios *et al.* 1988; Rabanal *et al.* 2002; Rios y Recio 2005; Cushnie y Lamb 2011). Por otro lado, existen numerosos trabajos que demuestran las interesantes propiedades antimicrobianas (Schwob *et al.* 2002; Couladis *et al.* 2003; Kalemba y Kunicka 2003; Cecchini *et al.* 2007; Saraglou *et al.* 2007; Saddiqe *et al.* 2010; Bertoli *et al.* 2011; Sperandio *et al.* 2013; Wölflle *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2015;) y antiestafilocócicas (Reichling *et al.* 2001; Gibbons *et al.* 2002, 2005; Shiu y Gibbons, 2006; Gibbons 2008; Sarkisian *et al.* 2012; Zuo *et al.* 2012; Shiu *et al.* 2013; Jiang *et al.* 2015; Li *et al.* 2015) que tienen otras especies del género *Hypericum*.

II.3. Actividad citotóxica

La citotoxicidad puede ser definida como la capacidad que poseen ciertos compuestos de inducir una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado. Se han desarrollado diferentes ensayos para determinar la citotoxicidad *in vitro* de un compuesto, siendo uno de los métodos más empleados para evaluarla el ensayo colorimétrico del MTT. Como es bien sabido, este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto de color azul-violeta (formazán), cuya concentración es proporcional al número de células vivas. Por lo tanto, este método permite medir supervivencia y proliferación celular, así como también determinar la citotoxicidad de potenciales agentes terapéuticos. Si estos estudios de evaluación de citotoxicidad se realizan frente a grupos de líneas celulares derivadas de tumores humanos, la capacidad citotóxica observada *in vitro* se relaciona con una potencial actividad antitumoral *in vivo* de los compuestos ensayados (Astashkina *et al.* 2012; Judson *et al.* 2013; Gustafsson *et al.* 2014).

En la presente Tesis Doctoral, se utilizó el método colorimétrico del MTT para determinar el posible efecto citotóxico *in vitro* de los diferentes extractos de las especies de hipérico sobre tres líneas celulares tumorales: A375 (línea celular de melanoma humano), MDA-MB 231 (línea celular de carcinoma mamario humano) y HCT116 (línea celular de carcinoma humano de colon), obteniéndose así una valoración preliminar *in vitro* de la potencial actividad antitumoral de estos extractos.

Tras la realización de esta prueba, comprobamos que todos los extractos ensayados presentaron actividad citotóxica frente a todas las líneas tumorales ensayadas, mostrando los aceites esenciales una potencia superior a los extractos Soxhlet estudiados.

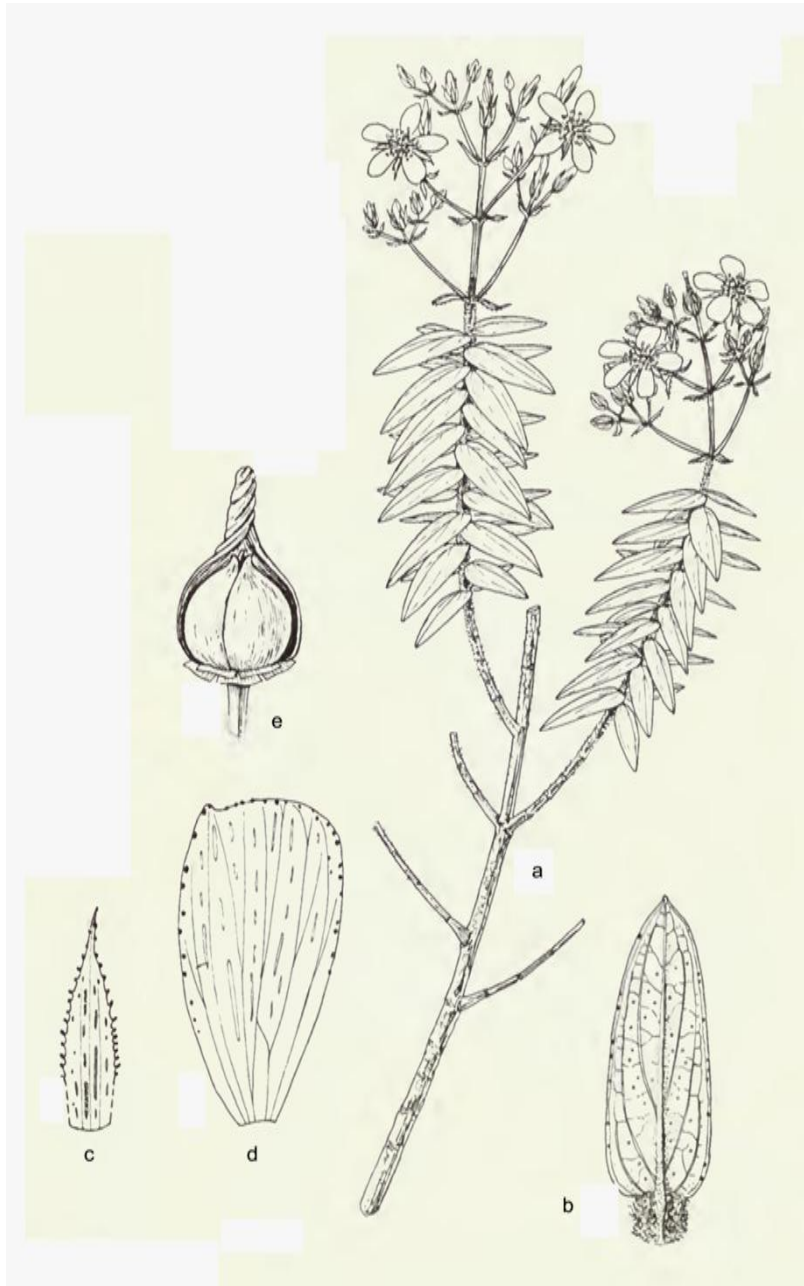
Dentro de los extractos Soxhlet, *Hypericum grandifolium* presentó la mayor actividad citotóxica frente a todas las líneas tumorales, obteniendo valores de IC₅₀ frente a la línea celular HCT116 próximos a los del fármaco utilizado como referencia (cisplatino). Debemos reseñar que, en general, la línea celular más sensible a los extractos Soxhlet fue la derivada de carcinoma humano de colon (HCT116), seguida de la de melanoma humano (A375) y, por último, la de carcinoma mamario humano (MDA-MB 231).

Con respecto a los posibles componentes responsables de la actividad observada, recordemos que en el estudio fitoquímico se detectaron ácido clorogénico, hiperósido, isoquercitrina y quercetina en todas las especies de hipérico analizado. Asimismo se encontró rutina en todas las especies excepto en el *Hypericum grandifolium*, mientras que quercitrina sólo fue detectada en *Hypericum canariense* y en *Hypericum grandifolium*. Dado que se ha encontrado para varios de estos metabolitos secundarios (como son ácido clorogénico, quercetina, rutina y quercitrina) actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares tumorales (Jiang *et al.* 2000; Nijveldt *et al.* 2001; Li *et al.* 2009; Loizzo *et al.* 2009; Cincin *et al.* 2015), es posible que una parte de los resultados observados en el presente estudio pudieran deberse también a la presencia de estos compuestos. No obstante, debemos comentar que estos efectos se observaron con dosis altas de los mismos, ensayándose además como compuestos puros, por lo que cabe suponer que existen otros metabolitos en nuestros extractos que contribuyan a dicha actividad citotóxica. En este sentido, cabe reseñar que algunas xantonas y xantolignanos identificadas en los tres hipéricos estudiados (Cardona *et al.* 1985; Cardona 1986; Bennett 1989; Cardona 1990; Cardona *et al.* 1992; Díaz 2010) han demostrado poseer una actividad citotóxica relativamente elevada (Zhao *et al.* 2015).

Asimismo, todos los aceites esenciales estudiados presentaron una actividad citotóxica potente sobre todas las líneas celulares tumorales ensayadas con la misma sensibilidad, sobresaliendo entre todos ellos el *Hypericum reflexum* que mostró unos resultados comparable a los obtenidos con el cisplatino. En la literatura revisada hemos encontrado que algunos compuestos presentes en nuestros aceites esenciales (α -pineno, β -pineno, *n*-nonano y especialmente (*E*)-cariofileno) han mostrado actividad antitumoral frente a diferentes líneas tumorales (Rogers *et al.* 2004; Adorjan 2010; Venditti *et al.* 2013; Raut y Karuppayil 2014; Woguem *et al.* 2014), si bien esta actividad es menor a la encontrada para los aceites

esenciales. Por ello, suponemos que se ha producido un efecto sinérgico entre los diferentes componentes del aceite esencial (Williamson 2001; Adorjan 2010).

Los resultados que hemos obtenido en este estudio con las especies de *Hypericum* evaluadas están en consonancia con los interesantes efectos antitumorales encontrados para otras especies de este género (Guedes *et al.* 2012; Romagnolo y Selmin 2012; Šemeláková *et al.* 2012; Mikešová *et al.* 2013; Prakash *et al.* 2013; Quassinti *et al.* 2013, Teiten *et al.* 2013; Kleemann *et al.* 2014; Marrelli *et al.* 2014; Wölfle *et al.* 2014).



6.a. CONCLUSIONES

Página anterior: *Hypericum reflexum* L. f.

(a) hábito; (b) hoja (envés); (c) sépalo; (d) pétalo; (e) cápsula (Adaptado de Robson 1996).

1. Tras el estudio fitoquímico de las especies *Hypericum canariense* L., *Hypericum grandifolium* Choisy e *Hypericum reflexum* L. f. se ha encontrado que todas las especies analizadas poseen ácido clorogénico, hiperósido, isoquercitrina y quercetina. La rutina se encontró en todas las especies estudiadas excepto en el *Hypericum grandifolium*, mientras que la quercitrina sólo fue detectada en *Hypericum canariense* y en *Hypericum grandifolium*. Hay que destacar, además, las cantidades especialmente elevadas de ácido clorogénico y rutina en los extractos de *Hypericum reflexum*.

2. Con respecto a las naftodiantronas (hipericina y pseudohipericina), consideradas marcadores quimiotaxonómicos importantes del género *Hypericum*, no se han detectado en las especies estudiadas, a excepción de *Hypericum reflexum* en el cual se encontró trazas de pseudohipericina así como una pequeña proporción de hipericina mediante la técnica HPLC/ESI-MS. Esto está en consonancia con la relación entre las secciones del género *Hypericum* propuesta por Robson.

3. Tras la realización del análisis de los aceites esenciales de *Hypericum canariense* y de *Hypericum grandifolium* por GC-MS y GC-FID se observó que los componentes más abundante fueron los alcanos seguidos de los hidrocarburos sesquiterpénicos, siendo el n-nonano y el (*E*)-cariofileno los constituyentes mayoritarios.

4. El estudio del aceite esencial de la especie de *Hypericum reflexum* recogida en dos zonas diferentes de la Isla de Tenerife ha revelado diferencias significativas en la composición cuantitativa de ambos aceites esenciales, presentando la especie recogida en Ifonche una proporción equilibrada de alcanos, hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, mientras que la especie recogida en La Esperanza mostró una mayor proporción de hidrocarburos sesquiterpénicos en su composición. Los componentes más representativos en ambos aceites esenciales fueron el n-undecano, α -pineno y β -pineno, (*E*)-cariofileno, δ -cadineno, α -cadinol y el óxido de cariofileno.

5. En los ensayos realizados para evaluar el potencial efecto antioxidante *in vitro*, todos los extractos y fracciones de las especies en estudio mostraron una eficaz capacidad antioxidante *in vitro* en los tres métodos utilizados (el ensayo con DPPH, ABTS y FRAP), con excepción de los aceites esenciales que presentaron sólo actividad en el método de ABTS. Sobresale en este sentido las fracciones polares de las tres especies en estudio que presentaron una actividad comparable a la mostrada por el antioxidante de referencia.

6. Debemos comentar que se observó en nuestro estudio una correlación entre el contenido de fenoles totales determinado por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante encontrada en los métodos realizados para todos los extractos, con excepción de los aceites esenciales.

7. Con respecto a la actividad antimicrobiana, todos los extractos ensayados presentaron actividad moderada frente a las bacterias Gram positivas mediante el método de difusión en agar, encontrando sólo para *Hypericum grandifolium* actividad frente a *Staphylococcus aureus* tras la realización del método de microdilución.

8. Si bien todos los extractos y fracciones estudiados presentaron actividad antibacteriana frente al crecimiento de las cepas de SARM ensayadas con el método de difusión en agar, todos presentaron valores de CIM altos por el método de microdilución.

9. Todos los extractos ensayados de las especies de hipérico estudiadas presentaron una interesante actividad citotóxica *in vitro* en el ensayo colorimétrico del MTT frente a todas las líneas tumorales ensayadas (A375, MDA-MB 231, HCT116), mostrando los aceites esenciales una potencia superior a los extractos Soxhlet estudiados. Debemos destacar en este sentido la actividad citotóxica del extracto Soxhlet de *Hypericum grandifolium* frente a la línea celular de carcinoma humano de colon (HCT116) y la del aceite esencial de *Hypericum reflexum* frente a todas las líneas tumorales ensayadas, ya que mostraron resultados comparables a los obtenidos con el fármaco utilizado como referencia.

10. Con respecto a los principios activos, consideramos que los compuestos polifenólicos detectados en estas especies (ácido clorogénico, hiperósido, quercetina, quercitrina, rutina) son responsables en buena parte de las actividades encontradas en los extractos Soxhlet, metanólico y derivados, mientras que la actividad observada para los aceites esenciales sería consecuencia de la acción sinérgica de varios componentes terpénicos.

6.b. CONCLUSIONI

1. Dall'analisi fitochimica di *Hypericum canariense* L., *Hypericum grandifolium* Choisy e *Hypericum reflexum* L. f. si è giunti alla conclusione che tutte le specie in questione presentano acido clorogenico, iperoside, isoquercitrina e quercetina. La rutina, invece, è stata rinvenuta in tutte le specie tranne che in *H. grandifolium*, mentre la quercitrina solo ed esclusivamente in *H. canariense* e *H. grandifolium*. Da rimarcare sono le elevate quantità di acido clorogenico e rutina presenti negli estratti di *H. reflexum*.
2. Per quanto riguarda i naftodiantroni, che sono importanti markers chemotassonomici del genere *Hypericum*, essi non sono presenti negli estratti di *H. canariense* e *H. grandifolium*, mentre sono stati rinvenuti in quelli di *H. reflexum* mediante HPLC/ESI-MS; in particolare quest'ultimo risulta contenere una modesta quantità di ipericina e pseudoipericina. Tali risultati sarebbero in linea con la classificazione botanica operata da Robson per distinguere le diverse sezioni all'interno del genere *Hypericum*.
3. Le analisi gascromatografiche (GC-FID e GC-MS) effettuate sugli oli essenziali distillati dalle parti aeree fiorite di *H. canariense* e *H. grandifolium*, hanno evidenziato come componenti volatili principali alcani e idrocarburi sesquiterpenici quali *n*-nonano e (*E*)-cariofillene.
4. L'analisi dell'olio essenziale di *H. reflexum* raccolto in due zone diverse dell'isola di Tenerife ha mostrato differenze più quantitative che qualitative nella composizione. La specie raccolta in Ifonche ha mostrato livelli simili di alcani, idrocarburi monoterpenici e sesquiterpenici, mentre quella raccolta a La Esperanza è risultata essere più ricca in idrocarburi sesquiterpenici. I componenti presenti in maggior quantità in entrambi gli oli sono *n*-undecano, α - e β -pinene, (*E*)-cariofillene, δ -cadinene, α -cadinol e cariofillene ossido.
5. Dai saggi antiossidanti realizzati per mezzo di tre diversi metodi (DPPH, ABTS, FRAP) è emerso che tutti gli estratti e le frazioni delle specie di iperici esaminati presentano una buona attività, mentre gli oli essenziali, hanno mostrato un'attività degna di nota solo nel saggio con ABTS. Da sottolineare i risultati ottenuti con le frazioni più polari di tutti e tre gli iperici che hanno mostrato una capacità antiossidante simile a quella dello standard antiossidante di riferimento (Trolox).
6. Dai risultati ottenuti con gli estratti nei saggi antiossidanti inoltre è emerso che esiste una correlazione tra il contenuto in fenoli totali determinati con il metodo di Folin-Ciocalteu e l'attività antiossidante.
7. Per quanto concerne l'analisi dell'attività antimicrobica, per tutti gli estratti si sono evidenziati dei valori modesti di inibizione mediante il test di Kirby – Bauer realizzato su batteri Gram positivi, mentre degna di nota è risultata l'inibizione dell'estratto di *H. grandifolium*, determinata mediante il metodo delle microdiluzioni (MIC) su *Staphylococcus aureus*.

- 8.** *Dai saggi antimicrobici realizzati con il metodo per diffusione (test di Kirby–Bauer) si è potuto appurare, inoltre, che tanto gli estratti come le frazioni presentano una azione inibente sui ceppi batterici multiresistenti MRSA; tali risultati sono stati poi invece accompagnati da valori alti ottenuti con il metodo delle microdiluizioni MIC.*
- 9.** *Dall'esame dell'attività antiproliferativa in vitro realizzata mediante il saggio MTT su tre linee tumorali umane (A375, MDA-MB 231 e HCT116), è emersa per gli estratti un'interessante azione inibente su tutte le linee che è risultata essere ancora più marcata per gli oli essenziali. Senz'altro degni di nota sono i risultati ottenuti con l'estratto Soxhlet di *H. grandifolium* e, soprattutto, quelli raggiunti con l'olio essenziale di *H. reflexum* con dei valori di IC_{50} comparabili a quelli del farmaco chemioterapico di riferimento (cisplatino).*
- 10.** *Si ritiene che i composti polifenolici (soprattutto acido clorogenico, iperoside, quercetina, quercitrina e rutina) identificati negli estratti Soxhlet, nei metanolici e nelle frazioni di questi, siano i principali responsabili delle attività biologiche osservate. L'attività riscontrata per gli oli essenziali si attribuisce alle sinergie dei vari composti (terpenici e non) presenti negli oli stessi.*

Página anterior: Recortes de publicaciones antiguas realizadas por los primeros autores describiendo a las especies de hipéricos incluidas en nuestra investigación.
[Imágenes disponibles en <http://www.jardincanario.org/inicio>, web del Jardín Botánico Viera y Clavijo de Gran Canarias].

- Abreu AC, Serra SC, Borges A, Saavedra MJ, McBain AJ, Salgado AJ, Simões M. **2015**. Combinatorial activity of flavonoids with antibiotics against drug-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbial Drug Resistance [Internet]. [Consultado en 12/09/2015]. Disponible en: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2014.0252>.
- Abreu R, Morcillo A, González JC, Castro B, Pérez-Dorado F, Álvarez-Marante R, Rodríguez-Álvarez C, Arias A. **2011**. Detección y caracterización molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) aislados de cerdo negro canario. Higiene y Sanidad Ambiental. 11:752-758.
- Adams RP. **2007**. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry. Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Adeyinka A, Richard F. **2015**. Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: a review. International Journal of Biotechnology and Food Science. 3(3):31-35.
- Adorjan B, Buchbauer G. **2010**. Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour and Fragrance Journal. 25:407-426.
- Agatonovic-Kustrin S, Loescher C, Morton D. **2015**. Quantitative errors and uncertainty in High-Performance Thin-Layer Chromatographic method for the quality assessment of *Calendula officinalis* plant extracts. Journal of Planar Chromatography. 28(3):213-217.
- Akhtar NF, Aharizad S, Mohammadi SA, Motallebi-Azar A, Movafeghi A. **2014**. The study of relationship between morphological traits and hypericins content in *Hypericum perforatum* L. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences. 4(2):45-47.
- Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. **2013**. Antioxidant activity of essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61:10835-10847.
- Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL, Suffness M. **1991**. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. Phytochemical Analysis. 2(3):107-111.
- Andrés M, Luna del Castillo JD. **2004**. Bioestadística para Ciencias de la salud. Madrid: Ediciones Norma Capitel.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. **2002**. Methods for testing antioxidant activity. Analyst. 127:183-198.
- Arechavaleta M, Rodríguez S, Zurita N, García A (coord.). **2010**. Lista de especies silvestres de Canarias. Hongos, plantas y animales terrestres 2009. Gobierno de Canarias.
- Arnao MB, Acosta M, Cano A. Methods to measure the antioxidant activity in plant material. **1999**. A comparative discussion. Free Radical Research. 31:89-96.
- Aruoma OI. **2003**. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutation Research. 523-524:9-20.
- Asgarpanah J. **2012**. Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Hypericum perforatum* L. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 6(19):1387-1394.
- Astashkina A, Mann B, Grainger DW. **2012**. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. Pharmacology & Therapeutics. 134(1):82-106.

N. del A.: Para la bibliografía se siguieron las normas de estilo del Council of Science Editors (CSE) [disponibles en: <http://www.scientificstyleandformat.org/Tools/SSF-Citation-Quick-Guide.html>].

- Avato P, Raffo F, Guglielmi G, Vitali C, Rosato A. **2004**. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. *Phytotherapy Research*. 18:230–232.
- Avato P. **2005**. A survey on the *Hypericum* genus: secondary metabolites and bioactivity. En: Atta-ur-Rahman, editor. *Studies in natural products chemistry*, vol. 30. *Bioactive Natural Products (Part K)*. Elsevier. p. 603-634.
- Axarlis S, Mentis A, Demetzos C, Mitaku S, Skaltsounis AL, Marselos M, Malamas M. **1998**. Antiviral in vitro activity of *Hypericum perforatum* L. extract on the human cytomegalovirus (HCMV). *Phytotherapy Research*. 12(7):507-511.
- Bagdonaitė E, Mártonfi P, Repčák M, Labokas J. **2012**. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Hypericum perforatum* L. from Lithuania. *Industrial Crops and Products*. 35(1):302–308.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. **2008**. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46:446–475.
- Barata Vallejo S, Postigo A. **2012**. Reactions of fluorinated organic radicals in aqueous media. *European Journal of Organics Chemistry*. 10:1889-1899.
- Barnes J, Anderson LA, Phillipson JD. **2001**. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): A review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53(5):583-600.
- Barra A. **2009**. Factors affecting chemical variability of essential oils: a review of recent developments. *Natural Product Communications*. 4(8):1147-1154.
- Baser KHC (editor). **2010**. *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. **1966**. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4):493-496.
- Beerhues L. **2006**. Hyperforin. *Phytochemistry*. 67(20):2201-2207.
- Behl C. **1999**. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. *Progress in Neurobiology*. 57:301-323.
- Bennett GJ. **1989**. Xanthonenes from Guttiferae. *Phytochemistry*. 28:967-998.
- Benzie IFF, Strain JJ. **1996**. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70-76.
- Benzie IFF, Szeto YT. **1999**. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing / antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47:633-636.
- Berdowska I, Zieliński B, Fecka I, Kulbacka J, Saczko J, Gamian A. **2013**. Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chemistry*. 141:1313–1321.
- Bertoli A, Cirak C, Teixeira da Silva JA. **2011**. *Hypericum* species as sources of valuable essential oils. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 5(Special Issue 1):29-47.
- Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. **2013**. Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93:3643–3653.
- Bicchi C, Maffei M. **2012**. The plant volatilome: methods of analysis. En: Normanly J, editor. *High-throughput phenotyping in plants—methods in molecular biology*. London: Springer. p. 289-310.
- Blaylock RL. **1998**. Neurodegeneration and aging of the central nervous system: prevention and treatment by phytochemicals and metabolic nutrients. *Integrative Medicine*. 1:117-133.

- Blois MS. **1958**. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 181(4617):1199-1200.
- Bockstael K, van Aerschot A. **2009**. Antimicrobial resistance in bacteria. *Central European Journal of Medicine*. 4:141-155.
- Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Krok A. **1998**. Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of foods and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Ernahrungswiss*. 2:147-63.
- Bombardelli E, Morazzoni P. **1995**. *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*. 66(1):43-48.
- Bonkanka CX, Smelcerovic A, Zuehlke S, Rabanal RM, Spitteller M, Sánchez-Mateo CC. **2008**. HPLC–MS analysis of anti-oedematogenic activity of *Hypericum grandifolium* Choisy (Hypericaceae). *Planta Medica*. 74:719–725.
- Bonkanka CX; Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM. **2011**. Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. *Journal of Natural Medicines*. 65:122–128.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. **2006**. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:1822–1828.
- Bramwell D, Bramwell ZI. **2001**. Flores Silvestres de las Islas Canarias. 4º Edición. Madrid: Ed. Rueda S.L.
- Bramwell D, **2006**. Medicinal plants of the Canary Islands. En: *Medicinal Plant Conservation Volume 12*. 36-39.
- Bramwell D, Bramwell A. **2014**. Excursiones botánicas por las Islas Canarias. Madrid: Editorial Rueda, S.L.
- Bramwell D. **2014**. Flora de las Islas Canarias. Guía de bolsillo. Versión española. Reimpresión. Madrid: Ed. Rueda S.L.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. **1995**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 28:25-30.
- Bravo L. **1998**. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56:317-33.
- Brenner R, Azbel V, Madhusoodanan S, Pawlowska M. **2000**. Comparison of an extract of *Hypericum* (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clinical Therapeutics*. 22(4):411-419.
- Bruneton J. **2001**. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª edición. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.
- Bruneton J. **2004**. *Fitoterapia*, 82-96. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.
- Buendía Sánchez E. **2000**. El hipérico en el tratamiento de la depresión. *Revista de Fitoterapia*. 1:37-42.
- Burt S. **2004**. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:223– 253.
- Butterweck V, Wall A, Liefländer-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A. **1997**. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry*. 30(Supplement):117-124.
- Butterweck V, Jürgenliemk G, Nahrstedt A, Winterhoff H. **2000**. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Medica*. 66(1):3-6.

- Butterweck V, Christoffel V, Nahrstedt A, Petereit F, Spengler B, Winterhoff H. **2003**. Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different *Hypericum* preparations in behavioural models. *Life Sciences*. 73(5):627-639.
- Cabrera AC, Prieto JM. **2010**. Application of artificial neural networks to the prediction of the antioxidant activity of essential oils in two experimental in vitro models. *Food Chemistry*. 118:141-146.
- Cakir A, Mavi A, Yildirim A, Duru ME, Harmandar M, Kazaz C. **2003**. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *Journal of Ethnopharmacology*. 87:73-83.
- Calderón-Montaño JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. **2011**. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 11(4):298-344.
- Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Filho VC, Yunes RA. **2000**. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy Research*. 14:401-418.
- Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS. **2003**. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NF-kB). *Planta Medica*. 69:973-983.
- Calixto JB, Campos MM, Otuki MF, Santos ARS. **2004**. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Medica*. 70:93-103.
- Cantón R, Sánchez Moreno MP. **2003**. Plantas medicinales con actividad antiinfecciosa y antiparasitaria. En: *Plantas Medicinales y Fitoterapia III*. Plan Nacional de Formación Continuada. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
- Cardona ML, Pedro JR, Seoane E, Vidal R. **1985**. Xanthone constituents of *Hypericum canariensis*. *Journal of Natural Products*. 48(3):467-469.
- Cardona ML. **1986**. Additional new xanthenes and xanthonolignoids from *Hypericum canariensis*. *Journal of Natural Products*. 49(1):95-100.
- Cardona ML, Fernandez I, Pedro JR, Serrano A. **1989**. A new pyranoxanthone and flavonoids from *Hypericum canariensis*. *Heterocycles*. 29(12):2297-3000.
- Cardona ML. **1990**. Xanthenes from *Hypericum reflexum*. *Phytochemistry*. 29(9):3003-3006.
- Cardona L, Fernández I, Pedro JR. **1992**. Xanthone constituents of *Hypericum inodorum*. *Heterocycles*. 34(3):479-482.
- Cardona ML. **1993**. Spiroterpenoids from *Hypericum reflexum*. *Phytochemistry*. 33(5):1185-1187.
- Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Lucarini D, Maggi F. **2007**. Antimicrobial activity of seven *Hypericum* entities from central Italy. *Planta Medica*. 73:564-566.
- Chahar MK, Sharma N, Dobhal MP, Joshi YC. **2011**. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Review*. 5(9):1-12.
- Chen JH, Ho CT. **1997**. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:2374-2378.
- Chen WC, Liou SS, Tzeng TF, Lee SL, Liu IM. **2013**. Effect of topical application of chlorogenic acid on excision wound healing in rats. *Planta Medica*. 79:616-21.
- Chatterjee SS, Nolder M, Koch E, Erdelmerier C. **1998**. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* 31(Suppl.):7-15.

- Chlopcíková S, Psotová J, Miketová P, Sousek J, Lichnovský V, Simánek V. **2004**. Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part II. Caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytotherapy Research*. 18:408–413.
- Chung TW, Lee YC, Kim CH. **2004a**. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3K/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB Journal*. 18:1123–1125.
- Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim CH. **2004b**. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB Journal*. 18(14):1670–1681.
- Ciccarelli D, Andreucci AC, Pagni AM. **2001**. The “black nodules” of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum*: morphological, anatomical, and histochemical studies during the course of ontogenesis. *Israel Journal of Plant Sciences*. 49:33–40.
- Cimpoiou C. **2006**. Analysis of Some Natural Antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 29: 1125–1142.
- Cincin ZB, Unlu M, Kiran B, Bireller ES, Baran Y, Cakmakoglu B. **2015**. Apoptotic effects of quercitrin on DLD-1 colon cancer cell line. *Pathology and Oncology Research*. 21(2):333-8.
- Çirak C, Radušienė J, Ivanauskas L, Janulis V. **2007a**. Variation of bioactive secondary metabolites in *Hypericum organifolium* during its phenological cycle. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29(3):197-203.
- Çirak C, Radušienė J, Ivanauskas L, Karabük B(S), Janulis V. **2007b**. Variation of bioactive substances and morphological traits in *Hypericum perforatum* populations from Northern Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35:403-409.
- CLSI. **2012**. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard – eleventh edition. CLSI document M02-A11. Vol. 32(1). 11^a ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. **2006**. Anti-infective potencial of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. *Journal of Ethnopharmacology*. 106:290-302.
- Costa SRAG. **2010**. Técnicas de estudo micromorfológico e molecular aplicadas ao género *Hypericum*, Tesis. [Internet]. [Consultado en 12/09/2015]. Disponible en: <http://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/2472> .
- Couladis M, Chinou IB, Tzakou O, Petrakis PV. **2003**. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subsp. *apollinis* (Boiss. & Heldr.). *Phytotherapy Research*. 17:152-154.
- Cowan MM. **1999**. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4):564–582.
- Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. **2009**. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews*. 109(7):3012-43.
- Crockett SL, Schaneberg B, Khan IA. **2005**. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John’s Wort) species. *Phytochemical Analysis*. 16:479–485.

- Crockett S, Demirci B, Baser K, Khan I. **2007**. Analysis of the volatile constituents of five African and Mediterranean *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hypericoideae) species. *Journal of Essential Oil Research*. 19:302–6.
- Crockett SL, Wenzig EM, Kunert O, Bauer R. **2008**. Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochemistry Letters*. 1:37-43.
- Crockett SL. **2010**. Essential oil and volatile components of the genus *Hypericum* (Hypericaceae). *Natural Product Communications*. 5(9):1493-1506.
- Crockett SL, Robson NKB. **2011**. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 5(Special Issue 1):1–13.
- Cushnie TP, Lamb AJ. **2011**. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 38:99–107.
- Daglia M. **2012**. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23:174–181.
- Dajas F. **2012**. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of Ethnopharmacology*. 143:383–396.
- Dall’Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, Sarmento L, Lamb L, Hass M, von Poser G, Schapoval EES. **2003**. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine*. 10:511-516.
- Darias V, Bravo L, Barquin D, Martín Herrera D, Fraile C. **1986**. Contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*. 15:169-193.
- Darias V, Bravo L, Rabanal R, Sánchez Mateo C, González Luis RM, Hernández Pérez AM. **1989**. New contribution to the ethnopharmacological study of the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*. 25:77-92.
- De Smet PA. **1997**. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*. 54:801-840.
- Decosterd L, Hoffmann E, Kyburz R, Bray D, Hostettmann K. **1991**. A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. *Planta medica*. 57:548-551.
- Demeule M, Brossard M, Pagé M, Gingras D, Béliveau R. 2000. Matrix metalloproteinase inhibition by green tea catechins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1478:51–60.
- Díaz Granados CA, Cardo DM, McGowan Jr. JE. **2008**. Antimicrobial resistance: international control strategies, with a focus on limited-resource settings. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 32:1-9.
- Díaz JG. **2010**. New water soluble flavone and xanthone glycosides from *Hypericum canariense* L. *Phytochemistry letters*. 3:171-175.
- Dlugosch KM, Parker IM. **2007**. Molecular and quantitative trait variation across the native range of the invasive species *Hypericum canariense*: evidence for ancient patterns of colonization via pre-adaptation? *Molecular Ecology*. 16:4269-4283.
- Dlugosch KM. **2008a**. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*. 17:431-449.
- Dlugosch KM. **2008b**. Invading populations of an ornamental shrub show rapid life history evolution despite genetic bottlenecks. *Ecology Letters*. 11:701-709.
- Do Rego JC, Benkiki N, Chosson E, Kabouche Z, Seguin E, Costentin J. **2007**. Antidepressant-like effect of hyperfoliatin, a polysioprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum*

- perfoliatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamine uptake. *European Journal of Pharmacology*. 569:197-203.
- Domingo D, López-Brea M. **2003**. Plantas con actividad antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16:385-393.
- Dona M, Dell'Aica I, Pezzato E, Sartor L, Calabrese F, Della Barbera M, Donella-Deana A, Appendino G, Borsarini A, Caniato R, Garbisa S. **2004**. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Research*. 64:6225–6232.
- Dryden M, Dailly S, Crouch M. **2004**. A randomized, controlled trial of tea tree topical preparations versus a standard topical regimen for the clearance of MRSA colonization. *Journal of Hospital Infection*. 58:86–87.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon J-M. **2009**. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5):1768–1774.
- Duquesnoy E, Dinh NH, Castola V, Casanova J. **2006**. Composition of a pyrolytic oil from *Cupressus funebris* Endl. of Vietnamese origin. *Flavour and Fragrance Journal*. 21(3):453–457.
- Edris AE. **2007**. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research* 21(4):308–323.
- Edziri H, Mastouri M, Chéraif I, Aouini M. **2010**. Chemical composition and antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the flower oil of *Retama raetam* (Forssk.) Webb from Tunisia. *Natural Product Research*. 24:789-796.
- Elmastas M, Gulcin I, Beydemir S, Kufrevioglu OI, Aboul-Enein HY. **2006**. A study on the in vitro antioxidant activity of juniper (*Juniperus communis* L.) fruit extracts. *Analytical Letters*. 39(1):47–65.
- El-Sherbiny DA, Khalifa AE, Attia AS, Eldenshary Eel-D. **2003**. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 76(3-4):525-533.
- Erlund I. **2004**. Review of the flavonoids quercetin, hesperidin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. 24:851-874.
- Evans WC. **1991**. *Farmacognosia: Trease y Evans*, 13ª edición. México DF: McGraw-Hill Interamericana.
- Fang J, Schneider B. **2014**. Laser microdissection: a sample preparation technique for plant micrometabolic profiling. *Phytochemical Analysis*. 25(4):307-313.
- Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. **2011**. Plant polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules*. 16:1486-1507.
- FFNSC02. **2012**. Flavors and fragrances of natural and synthetic compounds. Mass spectral database. Kyoto: Shimadzu Corps.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC. **2008**. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23(4):213–226.
- Filippini R, Piován A, Borsarini A, Caniato R. **2010**. Study of dynamic accumulation of secondary metabolites in three subspecies of *Hypericum perforatum*. *Fitoterapia*. 81:115–119.

- Flausino Jr. OA, Zangrossi Jr. H, Salgado JV, Viana MB. **2002**. Effects of acute and chronic treatment with *Hypericum perforatum* L. (LI 160) on different anxiety-related responses in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*. 71:259-265.
- Folin O, Ciocalteu V. **1927**. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 73:627-650.
- Frey M, Perlmutter M, Williams A, Gluesenkamp D. **2015**. The San Francisco Bay area early detection network. *Management of Biological Invasions*. 5(3):231-241.
- Friedman M. **2015**. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63:3805-3822.
- Fukuda K. **2015**. OMS. As the world stands on the edge of a post-antibiotic era, the time has come for decisive action. Commentary. [Internet]. [Consultado en 28/05/2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/commentaries/antibiotic-resistance/en/>.
- Fukumoto LR, Mazza G. **2000**. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48(8):3597-604.
- Gadotti VM, Schmeling LO, Machado C, Liz FH, Cechinel V, Meyre-Silva C, Santos ARS. **2005**. Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercitrin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 57:1345-1351.
- Gastpar M. **2013**. *Hypericum* extract WS® 5570 for depression--an overview. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*. 17(Suppl 1):1-7.
- Gautam N, Mantha AK, Mittal S. **2014**. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International*. Article ID 154106, 23 pages.
- Gibbons S, Ohlendorf B, Johnsen I. **2002**. The genus *Hypericum* – a valuable resource of anti-Staphylococcal leads. *Fitoterapia*. 73:300-304.
- Gibbons S, Moser E, Hausmann S, Stavri M, Smith E, Clennett C. **2005**. An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. *Phytochemistry*. 66:1472-1475.
- Gibbons S. **2008**. Phytochemical for bacterial resistance –strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Medica*. 74:594-602.
- Gil D de MM. **2000**. *Staphylococcus aureus*: microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilicina. *Revista chilena de infectología*. 17(2):145-152.
- Gil Ruiz P. **2002**. *Productos naturales*. Pamplona: Universidad Pública de Navarra.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. **2001**. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 40:959-975.
- Gioti EM, Fiamegos YC, Skalkos DC, Stalikas CD. **2009**. Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus. *Greece Food Chemistry*. 117:398-404.
- Gobierno de Canarias. Paisaje Protegido Ifonche. Plan especial. Documento informativo. [Internet]. <ftp://ftp.gobiernodecanarias.org/planeamientoenp/ifonche/aprobaciondefinitiva/informativo.pdf>. [Consultado en 26/05/2015].
- Goodman L, Gilman A. **2003**. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, décima edición. McGraw-Hill Interamericana Editores.

- Grace SC, Logan BA, Adams WW. **1998**. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant, Cell & Environment*. 21(5):513-521.
- Granado-Serrano AB, Martín MA, Izquierdo-Pulido M, Goya L, Bravo L, Ramos S. **2007**. Molecular mechanisms of (-)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:2020–2027.
- Greeson JM, Sanford B, Monti DA. **2001**. St John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*. 153(4):402-414.
- Grobler AC, Matthews G, Molenberghs G. **2014**. The impact of missing data on clinical trials: a re-analysis of a placebo controlled trial of *Hypericum perforatum* (St Johns wort) and sertraline in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 231(9):1987-99.
- Guardia T, Rotelli AE, Juárez O, Pelzer LE. **2001**. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *II Farmaco*. 56:683-687.
- Guedes AP, Franklin G, Fernandes-Ferreira M. **2012**. *Hypericum* sp.: essential oil composition and biological activities. *Phytochemistry Reviews*. 11:127–152.
- Gurevich AI, Dobrynin VN, Kolosov MN, Popravko SA, Riabova. **1971**. Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *Antibiotiki*. 16:510–513.
- Gustafsson F, Foster AJ, Sarda S, Bridgland-Taylor MH, Kenna JG. **2014**. A correlation between the in vitro drug toxicity of drugs to cell lines that express human P450s and their propensity to cause liver injury in humans. *Toxicological Sciences*. 137(1):189-211.
- Harris DC. **2007**. Análisis químico cuantitativo. 3ª ed. (6ª ed. original). Barcelona: Editorial Reverté.
- Hässig A, Liang WX, Schwabl H, Stampfli K. **1999**. Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Medical Hypotheses*. 52(5):479-81.
- Hatano T, Kusuda M, Inada K, Ogawa TO, Shiota S, Tsuchiya T, Yoshida T. **2005**. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 66:2047–2055.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. **2002**. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13:572-584.
- Henriquez C, Aliaga C, Lissi E. **2002**. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparation procedures. *International Journal of Chemical Kinetics*. 34:659–665.
- Herrera RM, Pérez M, Martín-Herrera DA, López-García RE, Rabanal RM. **1996**. Antimicrobial activity of extracts from plants endemic to the Canary Islands. *Phytotherapy Research*. 10:364-366.
- Hirono I. **1987**. Bioactive molecular. Naturally occurring carcinogens of plant origin: toxicology pathology and Biochemistry. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2:120-58.
- Hoensch HP, Kirch W. **2005**. Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia: a review of their mode of action and their clinical perspectives. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*. 35:187-95.

- Hölscher D. **2009**. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *The Plant Journal*. 60:907-918.
- Holst B, Williamson G. **2008**. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*. 19:73-82.
- Hosni K, Msaada K, Ben Taarit M, Ouchikh O, Kallel M, Marzouk B. **2008**. Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum tomentosum* L. growing wild in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 27:308–14.
- Hostanska K, Bommer S, Weber M, Krasniqi B, Saller R. **2003**. Comparison of the growth-inhibitory effect of *Hypericum perforatum* L. extracts, differing in the concentration of phloroglucinols and flavonoids, on leukaemia cells. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*. 55:973–980.
- Hostettmann K, Wolfender J-L. **2005**. Phytochemistry. En: Müller WE, editor. *St. John's Wort and its active principles in depression and anxiety*. Switzerland: Birkhäuser Verlag. p. 5-20.
- Huang D, Ou B, Prior RL. **2005**. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53:1841-1856.
- Hunt EJ, Lester CE, Lester EA, Tackett RL. **2001**. Effect of St. John's wort on free radical production. *Life Sciences*. 69:181–190.
- Imai H, Osawa K, Uasuda H, Hamashima H, Arai T, Sasatsu M. **2001**. Inhibition by the essential oils of peppermint and spearmint of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios*. 106(S1):31–39.
- Immacolata Pia Schiavone B, Verotta L, Rosato A, Marilena M, Gibbons S, Bombardelli E, Franchini C, Corbo F. **2014**. Anticancer and antibacterial activity of hyperforin and its derivatives. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 14(10):1397-1401.
- Issa AY, Volate SR, Wargovich MJ. **2006**. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: new directions and perspectives. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19:405-419.
- Jakovljević V, Popović M, Mimica-Dukić N, Sabo A, Gvozdenović Lj. **2000**. Pharmacodynamic study of *Hypericum perforatum* L. *Phytomedicine*. 7:449-452.
- Jayasena DD, Jo C. **2014**. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: a review. *Food Reviews International*. 30(1).
- JBVC Jardín Botánico Viera y Clavijo. Cabildo de Gran Canaria. **2013**. Flora de Gran Canaria. [Internet]. [Consultado en 30/08/2015]. Disponible en: <http://www.jardincanario.org/busqueda-de-la-flora-de-gran-canaria>.
- Jiang L, Numonov S, Bobakulov K, Qureshi MN, Zhao H, Aisa HA. **2015**. Phytochemical profiling and evaluation of pharmacological activities of *Hypericum scabrum* L. *Molecules*. 20(6):11257-71.
- Jiang Y, Kusama K, Satoh K, Takayama E, Watanabe S, Sakagami H. **2000**. Induction of cytotoxicity by chlorogenic acid in human oral tumor cell lines. *Phytomedicine*. 7(6):483-91.
- Jin UH, Lee JY, Kang SK, Kim JK, Park WH, Kim JG, Moon SK, Kim CH. **2005**. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sciences*. 77(22):2760-9.

- Judson R, Kavlock R, Martin M, et al. **2013**. Perspectives on validation of high-throughput assays supporting 21st century toxicity testing. *ALTEX*. 30(1):51-56.
- Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. **2004**. Aging and oxidative stress. *Molecular Aspects of Medicine*. 25:5-16.
- Kale Ma, Bindu SM, Khadkikar P. **2015**. Role of antioxidants and nutrition in oxidative stress: a review. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 7(1).
- Kalembe D, Kunicha A. **2003**. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10:813-829.
- Kang H-M, Kim J-H, Lee M-Y, Son K-H, Yang DC, Baek N-I, Kwon B-M. **2004**. Relationship between flavonoid structure and inhibition of farnesyl protein transferase. *Natural Product Research*. 18(4):349-356.
- Kanmani S, Murugan S, Umadevi P. **2014**. In vitro antioxidant potential of ethanolic extract of *Hypericum hookerianum* and its glycosidic flavonoid enriched extract. *International Journal of Phytomedicine*. 6(1):122-131.
- Karioti A, Bilia AR. **2010**. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*. 11:562-594.
- Karunanidhi A, Thomas R, van Belkum A, Neela V. **2013**. In vitro antibacterial and antibiofilm activities of chlorogenic acid against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia* including the trimethoprim/sulfamethoxazole resistant strain. *BioMed Research International* [Internet]. Volume 2013, artículo ID 392058, 7 pages. [Consultado en 12/09/2015]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/392058>.
- Kasper S, Gastpar M, Müller WE, Volz HP, Diene A, Kieser M, Möller HJ. **2008**. Efficacy of St. John's wort extract WS® 5570 in acute treatment of mild depression. A reanalysis of data from controlled clinical trials. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 258:59-63.
- Kaur G, Verma N. **2015**. Nature curing cancer – review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. *Biotechnology Reports*. 6:64–78.
- Keefover-Ring K, Thompson JD, Linhart YB. **2009**. Beyond six scents: defining a seventh *Thymus vulgaris* chemotype new to southern France by ethanol extraction. *Flavour and Fragrance Journal*. 24:117–122.
- Kitanov GM. **2001**. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 29:171–178.
- Kleemann B, Loos B, Scriba TJ, Lang D, Davids LM. **2014**. St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photomedicine: hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. *PLoS One*. 9(7).
- Klejdus B. **2013**. PAL inhibitor evokes different responses in two *Hypericum* species. *Plant Physiology and Biochemistry*. 63:82-88.
- Kono Y, Kashine S, Yoneyama T, Sakamoto Y, Matsui Y, Shibata H. **1998**. Iron chelation by chlorogenic acid as a natural antioxidant. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62(1):22-7.
- Korkina LG, Pastore S, Dellambra E, De Luca C. **2013**. New molecular and cellular targets for chemoprevention and treatment of skin tumors by plant polyphenols: a critical review. *Current Medicinal Chemistry*. 20(7):852-68.
- Kuklinski C. **2000**. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Ediciones Omega.

- Kunkel G. **1991**. Flora y vegetación del Archipiélago Canario. Tratado florístico. 2ª parte. Dicotiledóneas. Las Palmas de Gran Canarias: Edirca S.L.
- Lagamayo EN. **2008**. Antimicrobial resistance in major pathogens of hospital-acquired pneumonia in Asian countries. *American Journal of Infection Control*. 36 (Suppl.2), S101-S108.
- Le Marchand L. **2002**. Cancer preventive effects of flavonoids: a review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 56:296-301.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. **2014**. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*. 6(12):6020-6047.
- Li L, Henry GE, Seeram NP **2009**. Identification and bioactivities of resveratrol oligomers and flavonoids from *Carex folliculata* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:7282-7.
- Li N, Liu J-H, Zhang J, Yu B-Y. **2008**. Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(10):3876-3883.
- Li XM, Luo XG, Wang N, Zhou H, Si CL, Li K, Ma N, Zhang TC. **2015**. The extract of *Hypericum ascyron* L. induces bacterial cell death through apoptosis pathway. *Journal of Ethnopharmacology*. 166:205-10.
- Li Y, Fang H, Xu W. **2007**. Recent advance in the research of flavonoids as anticancer agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 7:663-678.
- Linde K, Knüppel L. **2005**. Large-scale observational studies of hypericum extracts in patients with depressive disorders –a systematic review. *Phytomedicine*. 12:148-157.
- Liu LS, Liu MH, He JY. **2014**. *Hypericum japonicum* Thunb. ex Murray: phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics of an important herbal medicine. *Molecules*. 19(8):10733-54.
- Loft S, Poulsen HE. **1996**. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine*. 74:297-312.
- Loizzo MR, Said A, Tundis R, Hawas UW, Rashed K, Menichini F, Frega NG, Menichini F. **2009**. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. *Plant Foods for Human Nutrition*. 64:264-70.
- López-García RE, Rabanal RM, Darias V, Matrn-Herrera D, Carreiras MC, Rodriguez B. **1991**. A preliminary study of *Cedronella canariensis* (L.) var. *canariensis* extracts for antiinflammatory and analgesic activity in rats and mice. *Phytotherapy Research*. 5(6):273-275.
- López-García RE, Hernández-Pérez M, Rabanal RM, Darias V, Martín-Herrera D, Arias A, Sanz J. **1992**. Essential oils and antimicrobial activity of two varieties of *Cedronella canariensis* (L.) W. et B. *Journal of Ethnopharmacology*. 36(3):207-211.
- López-García RE, Martín-Herrera D, Darias V, Rabanal RM. **1996**. Study of the Hypoglycaemic, Diuretic and Cardiovascular Activity of *Cedronella canariensis* var. *canariensis* (L.) W. & B. *Phytotherapy Research*. 10(6):541-543.
- Lopez-Lazaro M. **2002**. Flavonoids as anticancer agents: structure activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*. 2:691-714.
- Lopez-Lazaro M. **2009**. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 9:31-59.

- Lotito SB, Frei B. **2006**. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or ephiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine*. 41:1727-1746.
- Lotocka B, Osinska E. **2010**. Shoot anatomy and secretory structures in *Hypericum* species (Hypericaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 163:70-86.
- Luksiene Z, Brovko L. **2013**. Antibacterial photosensitization-based treatment for food safety. *Food Engineering Reviews*. 5(4):185-199.
- Ma J, Liu JH, Lv L, Zong Z, Sun Y, Zheng H, Chen Z, Zeng ZL. **2012**. Characterization of extended-spectrum β -lactamase genes found among *Escherichia coli* isolates from duck and environmental samples obtained on a duck farm. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012. 78:3668-3673.
- Maggi F, Ferretti G, Pocceschi N, Menghini L, Ricciutelli M. **2004**. Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the Central Italy. *Fitoterapia*. 75:702-711.
- Maggi F, Ferretti G. **2008**. Essential oil comparison of *Hypericum perforatum* L. subsp. *perforatum* and subsp. *veronense* (Schrank) Ces. from Central Italy. *Journal of Essential Oil Research*. 20:492-494.
- Maggi F, Cecchini C, Cresci A, ComanMM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F, Vittori S. **2010a**. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* essential oil. *Chemistry of Natural Compounds*. 46(1):125-129.
- Maggi F, Cecchini C, Cresci A, Coman MM, Tirillini B, Sagratini G, Papa F, Vittori S. **2010b**. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* taxa (Guttiferae) growing in central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). *Chemistry & Biodiversity*. 7:447-66.
- Maggi F, Tirillini B, Vittori S, Sagratini G, Papa F. **2010c**. Chemical composition and seasonal variation of *Hypericum hircinum* L. subsp. *majus* (Aiton) N. Robson essential oil. *Journal of Essential Oil Research*. 22:434-443.
- Maron DJ. **2004**. Flavonoids for reduction of atherosclerotic risk. *Current Atherosclerosis Reports*. 6:73-8.
- Marrelli M, Conforti F, Toniolo C, Nicoletti M, Statti G, Menichini F. **2014**. *Hypericum perforatum*: influences of the habitat on chemical composition, photo-induced cytotoxicity, and antiradical activity. 52(7):909-918.
- Martarelli D, Martarelli B, Pediconi D, Nabissi MI, Perfumi M. **2004**. *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. *Cancer Letters*. 210(1):27
- Martínez AL, González-Trujano ME, Aguirre-Hernández E, Moreno J, Soto-Hernández M, López-Muñoz FJ. **2009**. Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. *mexicana* inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. *Neuropharmacology*. 56:564-571.
- Mathis C, Ourisson G. **1964a**. Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*: II. Identification de constituants de diverses huiles essentielles d' *Hypericum*. *Phytochemistry*. 3:115-31.
- Mathis C, Ourisson G. **1964b**. Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum* III. Repartition des carbures saturés et des monoterpènes dans les huiles essentielles d' *Hypericum*. *Phytochemistry*. 3:133-141.

- Mathis C, Ourisson G. **1964c**. Etude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*: IV. Repartition des sesquiterpenes, des alcools monoterpéniques et des aldehydes saturés dans les huiles essentielles d' *Hypericum*. *Phytochemistry*. 3:377–8.
- Mattace Raso G, Pacilio M, Di Carlo G, Esposito E, Pinto L, Meli R. **2002**. In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 54:1379-1383.
- May J, Chan C, King A, Williams L, French G. **2000**. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45: 639–643.
- Mechergui K, Coelho JA, Serra MC, Lamine SB, Boukhchina S, Khouja ML. **2010**. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. glandulosum (Desf.) letswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90:1745-1749.
- Mederos-Molina S. **2002**. Micropropagation of *Hypericum canariense* L. for the production of hypericin. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. 51:95–117.
- Medina MA, Martínez-Poveda B, Amores-Sánchez MI, Quesada AR. **2006**. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sciences*. 79(2):105-111.
- Meir S, Kanner J, Akiri B, Philosoph-Hadas S. **1995**. Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(7), 1813–1819.
- Menichini G, Alfano C, Marrelli M, Toniolo C, Provenzano E, Statti GA, Nicoletti M, Menichini F, Conforti F. **2013**. *Hypericum perforatum* L. subsp. perforatum induces inhibition of free radicals and enhanced phototoxicity in human melanoma cells under ultraviolet light. *Cell Proliferation*. 46(2):193-202.
- Michael AS, Thompson CG, Abramovitz M. **1956**. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science*. 123(3194):464.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. **2000**. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 52(4):673-751.
- Miguel MG. **2010a**. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*. 15:9252-9287.
- Miguel MG. **2010b**. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 25:291–312.
- Mikešová L, Mikeš J, Koval' J, Gyurászová K, Culka L, Vargová J, Valeková B, Fedoročko P. **2013**. Conjunction of glutathione level, NAD(P)H/FAD redox status and hypericin content as a potential factor affecting colon cancer cell resistance to photodynamic therapy with hypericin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 10(4):470–483.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. **1993**. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. 84:407-412.
- Moral del R. **1972**. On the variability of chlorogenic acid concentration. *Oecologia*. 9(3):289-300.
- Morcillo A, Castro B, Rodríguez-Álvarez C, Abreu R, Aguirre-Jaime A, Angeles Arias. **2015**. Descriptive analysis of antibiotic-resistant patterns of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) st398 isolated from healthy swine. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 12, 611-622.

- Mori H, Kawabata K, Matsunaga K, Ushida J, Fujii K, Hara A, Tanaka T, Murai H. **2000**. Chemopreventive effects of coffee bean and rice constituents on colorectal carcinogenesis. *Biofactors*. 12:101–105.
- Mori H, Tanaka T, Shima H, Kuniyasu T, Takahashi M. **1986**. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. *Cancer Letters*. 30:49–54.
- Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi K, Oyoshikawa T, Kumazawa Y, Morikawa S. **2003**. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sciences*. 74:709-721.
- Mosmann T. **1983**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65:55-63.
- Müller L, Theile K, Böhm V. **2010**. *In vitro* antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50:731-742.
- Nahrstedt A, Butterweck V. **1997**. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 30(Supplement):129-134.
- Negi JS, Bisht VK, Singh P, Rawat MSMS, Joshi GP. **2013**. Naturally occurring xanthenes: chemistry and biology. *Journal of Applied Chemistry*. vol. 2013, Article ID 621459, 9 pages.
- Neuhouser ML. **2004**. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*. 50:1-7.
- Newman DJ, Cragg GM. **2007**. Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*. 70:461-477.
- Nicoletti M. **2011**. HPTLC fingerprint: a modern approach for the analytical determination of botanicals. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 21(5):818-823.
- Niggeweg R, Michael AJ, Martin C. **2004**. Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology*. 22:746-754.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. **2001**. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74(4):418-425.
- NIST08. **2008**. Mass spectral library (NIST/EPA/NIH). Gaithersburg, USA: National Institute of Standards and Technology.
- Nogueira T, Duarte F, Venâncio F, Tavares R, Lousã M, Bicchi C, Rubiolo P. **1998**. Aspectos quimiotaxonómicos do género *Hypericum* L. em Portugal. *Silva Lusitana*. 6:55–61.
- Nogueira T, Marcelo-Curto MJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Rubiolo P, Bicchi C. **2008**. Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linarifolium* and *Hypericum pulchrum*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 36:40-50.
- Nöldner M, Schötz K. **2002**. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Medica*. 68:577–80.
- Nürk NM, Crockett SL. **2011**. Morphological and phytochemical diversity among *Hypericum* species of the Mediterranean basin. *Medicinal and aromatic plant science and biotechnology*. 5 (Special Issue 1):14-28.

- Nürk NM, Madriñán S, Carine MA, Chase MW, Blattner FR. **2013**. Molecular phylogenetics and morphological evolution of St. John's wort (*Hypericum*; Hypericaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 66:1-16.
- Olthof MR, Hollman PC, Buijsman MN, van Amelsvoort JM, Katan MB. **2003**. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. *Journal of Nutrition*. 133(6):1806-1814.
- OMS. **2015**. Medicina tradicional: definiciones. [Internet]. [Consultado en 28/05/2015]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
- Orčić DZ, Mimica-Dukić NM, Francišković MM, Petrović SS, Jovin ED. **2011**. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chemistry Central Journal*. 2011:5-34.
- Öztürk Y, Aydin S, Beis R, Hüsnü Can Baser K. **1996**. Effects of *Hypericum calycinum* L. extract on the central nervous system in mice. *Phytotherapy Research*. 10(8):700-702.
- Öztürk N, Korkmaz S, Öztürk Y. **2007**. Wound-healing activity of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*. 111:33-39.
- Paolini J, Costa J, Bernardini AF. **2005**. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1076(1-2):170-8.
- Patel M, Bowe WP, Heughebaert C, Shalita AR. **2010**. The development of antimicrobial resistance due to the antibiotic treatment of acne vulgaris: a review. *Journal of Drugs in Dermatology*. 9(6):655-64.
- Perazzo FF, Lima LM, Padilha MD, Rocha LM, Sousa PJC, Carvalho JCT. **2008**. Anti-inflammatory and analgesic activities of *Hypericum brasiliense* (Willd) standardized extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia-Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 18:320-325.
- Pérez de Paz PL. **1982**. Perspectiva histórica de los últimos 50 años (1932-1982) de la botánica en Canarias. En: Instituto de Estudios Canarios: 50 aniversario (1932-1982). I - Ciencia. Santa Cruz de Tenerife: Instituto de Estudios Canarios: Aula de Cultura , Cabildo Insular de Tenerife. p. 294-340.
- Pérez de Paz PL, Hernández Padrón CE. **1999**. Plantas medicinales o útiles en la flora canaria. Aplicaciones populares. La Laguna: Francisco Lemus editor.
- Pérez Trueba G. **2003**. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 22(1):48-57.
- Pilepić KH. **2011**. Estimation of phylogenetic relationships among some *Hypericum* (Hypericaceae) species using internal transcribed spacer sequences. *Plant Biosystems*. 145(1):81-87.
- Pinto MMM. **2003**. Natural and synthetic xanthonolignoids: chemistry and biological activities. *Current Medicinal Chemistry*. 10:1-12.
- Pistelli L, Bertoli A, Zucconelli S, Morelli I, Panizzi L, Menichini F. **2000**. Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia*. 71(Suppl. 1):S138-S140.
- Prado B, Rabanal RM, Sánchez-Mateo CC. **2002**. Evaluation of the central properties of several *Hypericum* species from the Canary Islands. *Phytotherapy Research*. 16:740-744.

- Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet. **2013**. Anticancer potential of plants and natural products: a review. *American Journal of Pharmacological Sciences*. 1(6):104-115.
- Pryor WA. **1997**. Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity. *Environmental Health Perspectives*. 105:875–82.
- Pujol M, Peña C. **2003**. El significado clínico de las betalactamasas de espectro extendido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 21.
- Quassinti L, Bramucci M, Lupidi G, Barboni L, Ricciutelli M, Sagratini G, Papap F, Caprioli G, Petrelli D, Vitali LA, Vittori S, Maggi F. **2013 a**. *In vitro* biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniololus atrum* L. (Apiaceae). *Food Chemistry*. 138:808-813.
- Quassinti L, Lupidi G, Maggi F, Sagratini G, Papa F, Vittori S, Bianco A, Bramucci M. **2013 b**. Antioxidant and antiproliferative activity of *Hypericum hircinum* L. subsp. majus (Aiton) N. Robson essential oil. *Natural Product Research*. 27(10):862-868.
- Quiney C, Billard C, Salanoubat C, Fourneron JD, Kolb JP. **2006**. Hyperforin, a new lead compound against the progression of cancer and leukemia? *Leukemia*. 20:1519–1525.
- Qureshi GA, Baig S, Sawar M, Parvez SH. **2004**. Neurotoxicity, oxidative stress and cerebrovascular disorders. *NeuroToxicology*. 25:121-138.
- Rabanal RM, Arias A, Prado B, Hernández-Pérez M, Sánchez-Mateo CC. **2002**. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*. 81(2):287–292.
- Rabanal RM, Bonkanka CX, Hernández-Pérez M, Sánchez-Mateo CC. **2005**. Analgesic and topical anti-inflammatory activity of *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. *Journal of Ethnopharmacology*. 96:591–596.
- Radulović N, Stankov-Jovanović V, Stojanovic G, Šmelcerović A, Spiteller M, Asakaw Y. **2007**. Screening of in vitro antimicrobial and antioxidant activity of nine *Hypericum* species from the Balkans. *Food Chemistry*. 103:15-21.
- Rahman M. **2015**. Chapter 23 – Antimicrobial Secondary Metabolites—Extraction, Isolation, Identification, and Bioassay. En: Mukherjee PK, editor. *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine*. Elsevier. p: 495-513.
- Rahman SZ, Basilakis J, Rahmadi A, Lujic S, Musgrave I, Jorm L, Hay P, Münch G. **2013**. Use of serotonergic antidepressants and St John's wort in older australians: a population-based cohort study. *Australasian Psychiatry*. 21(3):262-266.
- Rajesh D, Howard SP. **2003**. Perillyl alcohol mediated radiosensitization via augmentation of the Fas pathway in prostate cancer cells. *The Prostate*. 57(1):14-23.
- Ramos AF. **1984**. Estudio taxonómico del género *Hypericum* L. (Guttiferae) en la Península Ibérica y Baleares. En: Castroviejo S, Aedo C, Lainz M, Muñoz Garmendia F, Nieto Feliner G, Paiva J, Benedí C, editors. *Flora iberica 3*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC. p. 157-185
- Randløv C, Mehlsen J, Thomsen CF, Hedman C, von Fircks H, Winther K. **2006**. The efficacy of St. John's Wort in patients with minor depressive symptoms or dysthymia – a double-blind placebo-controlled study. *Phytomedicine*. 13:215-221.
- Raut JS, Karuppaiyl SM. **2014**. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 62:250–264.

- Razzaghi-Asl N, Garrido J, Khazraei H, Borges F, Firuzi O. **2013**. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships. *Current Medicinal Chemistry*. 20(36):4436-50.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. **1999**. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*. 26:1231-1237.
- Reichling J, Weseler A, Saller R. **2001**. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry*. 34(Suppl 1):S116–S118.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L. **2003**. Flavonoids: promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*. 23:519-34.
- Rios JL, Recio MC, Villar A. **1988**. Screening methods for natural antimicrobial products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 23:127–149.
- Rios JL, Recio MC. **2005**. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:80-84.
- Rivera D, Obón C. **1995**. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 46:73-93.
- Robson NKB. **1996**. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae). 6. Sections 20. Myriandra to Elodes. En: *Bulletin of the British Museum of Natural History (Botany Series)*. 26(2):75–217.
- Robson NKB. **2003**. *Hypericum* botany. In: Ernst E, editor. *Hypericum: the genus Hypericum*. New York (USA): Taylor and Francis. p. 1–22.
- Rocha LD, Costa Monteiro M, Junger Teodoro A. **2012**. Anticancer properties of hydroxycinnamic acids-a review. *Cancer and Clinical Oncology*. 1(2):109-121.
- Rodríguez-Landa JF, Contreras CM. **2003**. A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and side effects produced by *Hypericum perforatum* extracts. *Phytomedicine*. 10:688-699.
- Rogers JV, Siegel GL, Pollard DL, Rooney AD, McDougald JN. **2004**. The cytotoxicity of volatile JP-8 jet fuel components in keratinocytes. *Toxicology*. 197:113–21.
- Romagnolo DF, Selmin OI. **2012**. Flavonoids and cancer prevention: a review of the evidence. *Journal of Nutrition in Gerontology and Geriatrics*. 31:206–238.
- Ross JA, Kasum CM. **2002**. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. 22(1):19-34.
- Rotelli AE, Guardia T, Juárez AO, de la Rocha NE, Pelzer LE. **2003**. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacological Research*. 48:601-606.
- Ruberto G, Baratta MT. **2000**. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chemistry*. 69:167-174.
- Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, Cordero C, Bicchi C. **2010**. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. *Flavour and Fragrance Journal*. 25(5):282-290.
- Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C. **2000**. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*. 16:91-8.
- Russo GL. **2007**. Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*. 74:533-544.

- Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona A. **2010**. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 131:511–521.
- Sagratini G, Ricciutelli M, Vittori S, Öztürk N, Öztürk Y, Maggi F. **2008**. Phytochemical and antioxidant analysis of eight *Hypericum* taxa from Central Italy. *Fitoterapia*. 79:210-213.
- Sagratini G, Maggi F, Caprioli G, Cristalli G, Ricciutelli M, Torregiani E, Vittori S. **2012**. Comparative study of aroma profile and phenolic content of Montepulciano monovarietal red wines from the Marche and Abruzzo regions of Italy using HS-SPME–GC–MS and HPLC–MS. *Food Chemistry*. 132:1592–1599.
- Sánchez-Mateo CC, Prado B, Rabanal RM. **2002**. Antidepressant effects of the methanol extract of several *Hypericum* species from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*. 79:119–127.
- Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Prado B, Rabanal RM. **2005**. Antidepressant properties of some *Hypericum canariense* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. extracts in the forced swimming test in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 97:541–547.
- Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Hernández-Pérez M, Rabanal RM. **2006 a**. Recent research on several *Hypericum* species used in the Canary Islands for their medicinal properties. En: Singh VK, Govil JN, Ahmad K, Sharma RK, editors. *Recent Progress in Medicinal Plants Vol. 15. Natural Products*. Houston, USA: Studium Press LLC. p. 115-126.
- Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Hernández-Pérez M, Rabanal RM. **2006 b**. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *Journal of Ethnopharmacology*. 107:1–6.
- Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Prado B, Rabanal RM. **2006 c**. Effects of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. *Congress Abstract. Planta Medica*. 72 - P_225.
- Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Prado B, Rabanal RM. **2007**. Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 112:115–121.
- Sánchez-Mateo CC, Bonkanka CX, Rabanal RM. **2009**. *Hypericum grandifolium* Choisy: a species native to Macaronesian Region with antidepressant effect. *Journal of Ethnopharmacology*. 121:297–303.
- Sánchez-Mateo CC, Zorzetto C, Rabanal RM. *In press*, **2015**. A review on phyto-pharmacological aspects of two *Hypericum* species from the Canary Islands: *Hypericum grandifolium* Choisy and *Hypericum reflexum* L. fil. En: Gupta VK, editor. *Natural Products: Research Reviews – Vol. 4*. New Delhi: Daya Publishing House. p. 325-341.
- Sánchez-Moreno C. **2002**. Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8:121-137.
- Saraglou V, Marin PD, Rancic A, Veljic M, Skaltsa H. **2007**. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. *Biochemical Systematic and Ecology*. 35:146-152.
- Sarkisian SA, Janssen MJ, Matta H, Henry GE, Laplante KL, Rowley DC. **2012**. Inhibition of bacterial growth and biofilm production by constituents from *Hypericum* spp. *Phytotherapy Research*. 26(7):1012-6.
- Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. **2011**. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*. 403(1-2):136–138.

- Šavikin K, Dobrić S, Tadić V, Zdunić G. **2007**. Antiinflammatory activity of ethanol extracts of *Hypericum perforatum* L., *H. barbatum* Jacq., *H. hirsutum* L., *H. richeri* Vill. and *H. androsaemum* L. in rats. *Phytotherapy Research*. 21(2):176-180.
- Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schopf E, Simon JC. **1999**. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and Gram-positive bacteria. *Lancet*. 353:2129.
- Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, Gilb B, Kaufmann T, Borner C, Sleeman JP, Simon JC. **2002b**. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* 21:1242–1250.
- Schempp CM, Simon-Haarhaus B, Simon JC. **2002a**. Phototoxic and apoptosis inducing capacity of pseudohypericin. *Planta Medica*. 68:171–173.
- Schempp CM, Kiss J, Kirkin V, Averbek M, Simon-Haarhaus B, Kremer B, Termeer CC, Sleeman J, Simon JC. **2005**. Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. *Planta Medica* 71:999–1004.
- Schulz V, Hänsel R, Tyler VE. **1998**. *Rational Phytotherapy*, 3^a edition. New York: Springer-Verlag. p. 50-65.
- Schulz V. **2001**. Incidence and clinical relevance of the interactions and side effects of *Hypericum* preparations. *Phytomedicine*. 8(2):152-160.
- Schulz V. **2002**. Clinical trials with *Hypericum* extracts in patients with depression - Results, comparisons, conclusions for therapy with antidepressant drugs. *Phytomedicine*. 9(5):468-474.
- Schwob I, Bessiere JM, Dherbomez M, Viano J. **2002**. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum coris*. *Fitoterapia*. 73:511-513.
- Šemeláková M, Mikeš J, Jendželovský R, Fedoročko P. **2012**. The pro-apoptotic and anti-invasive effects of hypericin-mediated photodynamic therapy are enhanced by hyperforin or aristoforin in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 117:115–125.
- Shiu WK, Malkinson JP, Rahman MM, Curry J, Stapleton P, Gunaratnam M, Neidle S, Mushtaq S, Warner M, Livermore DM, Evangelopoulos D, Basavannacharya C, Bhakta S, Schindler BD, Seo SM, Coleman D, Kaatz GW, Gibbons S. **2013**. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 42(6):513–518.
- Shiu WKP, Gibbons S. **2006**. Anti-staphylococcal acylphloroglucinols from *Hypericum beanii*. *Phytochemistry*. 67:2568-2572.
- Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP. **2005**. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*. 90:157–167.
- Silva BA, Malva JO, Dias ACP. **2008**. St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) extracts and isolated phenolic compounds are effective antioxidants in several in vitro models of oxidative stress. *Food Chemistry*. 110:611-619.
- Singleton VL, Rossi Jr. JA. **1965**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16(3):144-158.

- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. **1999**. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299:152-178.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. **2001**. *Principios de análisis instrumental*. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España.
- Slodowicz M, Barata Vallejo S, Vázquez A, Sbarbati Nudelman N, Postigo A. **2011**. Light-induced iodoperfluoroalkylation reactions of carbon-carbon multiple bonds in water. *Journal of Organics Chemistry*. 135:137-143.
- Sosa S, Pace R, Bornancin A, Morazzoni P, Riva A, Tubaro A, Della Loggia R. **2007**. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 59, 703-709.
- Sperandio FF, Huang Y-Y, Hamblin MR. **2013**. Antimicrobial photodynamic therapy to kill gram-negative bacteria. *Recent patents on anti-infective drug discovery*. 8(2):108-120.
- Srinivasan R, Chandrasekar MJN, Nanjan MJ, Suresh B. **2007**. Antioxidant activity of *Caesalpinia digyna* root. *Journal of Ethnopharmacology*. 113:284-291.
- Srivastava A, Singhal N, Goel M, Virdi JS, Kumar M. **2014**. Identification of family specific fingerprints in β -lactamase families. *The Scientific World Journal*. 2014:980572.
- Stojanović G, Đorđević A, Šmelcerović A. **2013**. Do other *Hypericum* species have medical potential as St. John's wort (*Hypericum perforatum*)? *Current Medicinal Chemistry*. 20(18):2273-95
- Takeda H, Tsuji M, Miyamoto J, Masuya J, Imori M, Matsumiya T. **2003**. Caffeic acid produces antidepressive- and/or anxiolytic-like effects through indirect modulation of the alpha 1A-adrenoceptor system in mice. *Neuroreport*. 14:1067–70.
- Tanaka T, Nishikawa A, Shima H, Sugie S, Shinoda T, Yoshimi N, Iwata H, Mori H. **1990**. Inhibitory effects of chlorogenic acid, reserpine, polyphenolic acid (E-5166), or coffee on hepatocarcinogenesis in rats and hamsters. *Basic Life Sciences*. 52:429–440.
- Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Wang A, Suzui M, Okamoto K, Mori H. **1993**. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*. 14:1321–1327.
- Teiten MH, Gaascht F, Dicato M, Diederich M. **2013**. Anticancer bioactivity of compounds from medicinal plants used in European medieval traditions. *Biochemical Pharmacology*. 86:1239–1247.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. **2005**. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*. 90:333-340.
- Toker Z. **2009**. Variation of total hypericin, phenolic and flavonoid compounds in *Hypericum triquetrifolium* during its phenological cycle. *Pharmaceutical Biology*. 47(4):285–288.
- Tsuchii K, Imura M, Kamada N, Hirao T, Ogawa A. **2004**. An efficient photoinduced iodoperfluoroalkylation of carbon-carbon unsaturated compounds with perfluoroalkyl iodides. *Journal of Organic Chemistry*. 69:6658-6665.
- Turek C, Stintzing FC. **2013**. Stability of essential oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12:40-53.
- Uchida S, Hiral K, Hatanaka J, Hanato J, Umegaki K, Yamada S. **2008**. Antinociceptive effects of St. John's wort, *Harpagophytum procumbens* extract and grape seed proanthocyanidins extract in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 31:240-245.

- Vanaclocha B, Cañigüeral S. **2003**. Hipérico. En: Fitoterapia. Vademécum de prescripción, 4ª edición. Barcelona: Masson, S.A. p. 300.
- Venditti A, Bianco A, Nicoletti M, Quassinti L, Bramucci M, Lupidi G, Vitali LA, Petrelli D, Papa F, Vittori S, Lucarini D, Bini LM, Giuliani C, Maggi F. **2013**. Phytochemical analysis, biological evaluation and micromorphological study of *Stachys alopecuroides* (L.) Benth. subsp. *divulsa* (Ten.) Grande endemic to central Apennines, Italy. *Fitoterapia*. 90:94-103.
- Venditti A, Muscolo C, Bianco A, Maggi F, Zorzetto C. **2014**. "Análisis fitoquímica de *Schizogyne sericea* (L. fil.) DC". En Actas del XXV Congreso Nacional della Società Chimica Italiana, Arcavacata di Rende 07-12 Septiembre 2014: 854.
- Vergis J, Gokulakrishnan P, Agarwal RK, Kumar A. **2015**. Essential oils as natural food antimicrobial agents: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 55(10).
- Villaescusa Castillo L, Zaragoza García F. **2003**. Plantas medicinales empleadas para obtener fármacos por semisíntesis. En: Plantas Medicinales y Fitoterapia III. Plan Nacional de Formación Continuada. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
- Vlietinck AJ, Apers S. **2000**. Biological screening methods in the search for pharmacologically active natural products. En: Tringali C, editor. *Bioactive compounds from natural sources: isolation, characterization and biological properties*. CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 1-29.
- Wada A, Sakaeda T, Takara K, Hirai M, Kimura T, Ohmoto N., Zhou J, Nakamura T, Kobayashi H, Okamura N, Yagami T, Okumura K. **2002**. Effects of St John's wort and hypericin on cytotoxicity of anticancer drugs. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics*. 17(5):467-74.
- Wagner H, Blatt S. **2001**. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. 2ª edición, 2ª reimpression. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wagner H. **2006**. Futuro en la investigación en Fitoterapia: tendencias y retos. *Revista de Fitoterapia*. 6:101-117.
- Wang HK. **2000**. The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 9:2103-2119.
- Wang N, Li P, Wang Y, Peng W, Wu Z, Tan S, Liang S, Shen X, Su W. **2008**. Hepatoprotective effect of *Hypericum japonicum* extract and its fractions. *Journal of Ethnopharmacology*. 116:1-6.
- WHO World Health Organization. **2002**. WHO monographs on selected medicinal plants, Vol. 2. Geneva: WHO. p.151.
- Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. **2004**. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology & Medicine*. 36:838-849.
- Williamson EM. **2001**. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*. 8:401-9.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. **2008**. Koneman Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color. Argentina: Editorial medica panamericana.
- Woguem V, Fogang HPD, Maggi F, Tapondjou LA, Womeni HM, Quassinti L, Bramucci M, Vitali LA, Petrelli D, Lupidi G, Papa F, Vittori S, Barboni L. **2014**. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopiya parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. *Food Chemistry*. 149:183-189.
- Wölfle U, Seelinger G, Schempp CM. **2014**. Topical Application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Medica*. 80(02/03):109-120.

- Xiang Z, Ning Z. **2008**. Scavenging and antioxidant properties of compound derived from chlorogenic acid in South-China honeysuckle. *LWT - Food Science and Technology*. 41(7):1189–1203.
- Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. **2015**. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. 22(1):132-149.
- Youdim KA, Joseph JA. **2001**. A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine*. 30:583-594.
- Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, Cayuela JM, Martínez-Cachá A, Pardo F, López Nicolás JM. **2003**. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(16):4694–4700.
- Zapesochnaya GG, Kuptsova LP, Kyshtymova TV, Ban'kovskii AI, Mel'nikova TM. **1967**. Flavonoids of *Hypericum maculatum* and *H. inodorum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 3(4):234.
- Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis DA, Barrow CJ. **2006**. A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 18:445-450.
- Zhao J, Wei L, Jin-Cai W. **2015**. Recent advances regarding constituents and bioactivities of plants from the genus *Hypericum*. *Chemistry & Biodiversity*. 12(3):309-349.
- Zorzetto C, Abreu R, Arias A, Rabanal RM, Sánchez-Mateo CC. **2013 a**. “Actividad antibacteriana de dos especies de *Hypericum* de las Islas Canarias frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina”. En Actas del 7º Congreso de Fitoterapia SEFIT, Alicante 18-20 Octubre 2013.
- Zorzetto C, Abreu R, Arias A, Rabanal RM, Sánchez-Mateo CC. **2013 b**. “Antibacterial Effects of two species of *Hypericum* from the Canary Islands against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” En Actas del 17th International Congress, Viena (Austria) 8-10 Julio 2013.
- Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, Bramucci M, Quassinti L, Caprioli G, Papa F, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Maggi F. **2014 a**. “Composizione e attività biológica di oli essenziali ed estratti di 3 specie del genere *Hypericum* (*H. canariense*, *H. reflexum*, *H. grandifolium*) endemiche delle Isole Canarie”. En Actas del II Congreso nazionale per la ricerca sugli oli essenziali, Terni (Italia) 14-16 Noviembre 2014: ISTISAN Congressi 14/C8, 14-15.
- Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM, Venditti A, Muscolo C, Bianco A, Iannarelli R, Lupidi G, Damiano S, Bramucci M, Quassinti L, Maggi F. **2014 b**. “Composizione e attività biologica dell’olio essenziale di *Schizogyne sericea* (L.f.) DC. (Asteraceae)”. En Poster scientifici del II Congreso nazionale per la ricerca sugli oli essenziali, Terni (Italia) 14-16 Noviembre 2014: gennaio – febbraio 2015. *Natural 1*, 76-77.
- Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM, Lupidi G, Bramucci M, Quassinti L, Iannarelli R, Papa F, Maggi F. **2015 a**. Antioxidant activity and cytotoxicity on tumour cells of the essential oil from *Cedronella canariensis* var. *canariensis* (L.) Webb & Berthel. (Lamiaceae). *Natural Product Research*. 29(17):1641-9.
- Zorzetto C, Sánchez-Mateo CC, Rabanal RM, Lupidi G, Petrelli D, Vitali LA, Bramucci M, Quassinti L, Caprioli G, Papa F, Ricciutelli M, Sagratini G, Vittori S, Maggi F. **2015 b**. Phytochemical analysis and in vitro biological activity of three *Hypericum* species from

- the Canary Islands (*H. reflexum*, *H. canariense* and *H. grandifolium*). *Fitoterapia*. 100:95-109.
- Zorzetto C, Lupidi G, Maggi F, Rabanal RM, Sánchez-Mateo CC. **2015 c.** “Capacidad antioxidante de diversos extractos de *Hypericum reflexum* L. fil, especie endémica de las Islas Canarias”. En Actas del 8º Congreso de Fitoterapia SEFIT; Zaragoza 23-24 Octubre 2015.
- Zou Y, Lu Y, Wei D. **2004.** Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(16):5032–5039.
- Zuo GY, An J, Han J, Zhang YL, Wang GC, Hao XY, Bian ZQ. **2012.** Isojacareubin from the Chinese herb *Hypericum japonicum*: potent antibacterial and synergistic effects on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Molecular Sciences*. 13(7):8210-8.