

# **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

## **SEDE QUITO**

### **CARRERA:**

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

### **Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:**

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

### **TEMA:**

Estudio de la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite

esencial proveniente de las hojas de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell

### **AUTORAS:**

GARCÍA PONCE JOHANNA BRIGITTE

TAMBACO ARAQUE JESSICA LILIANA

### **DIRECTOR:**

PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA

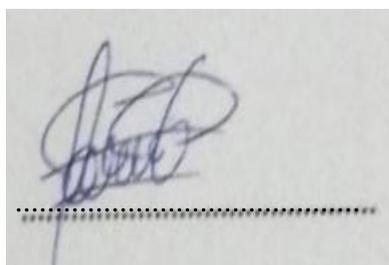
**Quito, octubre del 2020**

## Cesión de derechos de autor

Nosotros, García Ponce Johanna Brigitte y Tambaco Araque Jessica Liliana, con documento de identificación N° 1719904631 y 1725090839, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: “Estudio de la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial proveniente de las hojas de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, octubre del 2020



García Ponce Johanna Brigitte

CI: 1719904631



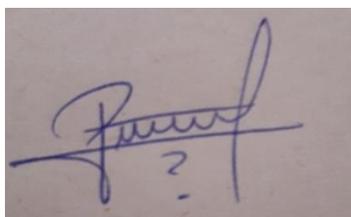
Tambaco Araque Jessica Liliana

CI: 1725090839

### **Declaratoria de coautoría del docente tutor**

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Estudio de la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial proveniente de las hojas de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell realizado por García Ponce Johanna Brigitte y Tambaco Araque Jessica Liliana, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, octubre del 2020

A handwritten signature in blue ink on a light-colored background. The signature is stylized and appears to read 'Paco Fernando Noriega Rivera'.

Paco Fernando Noriega Rivera

CI: 0602421323

## **Agradecimientos**

A la Universidad Politécnica Salesiana por ser el lugar de formación de grandes profesionales y por brindarnos los conocimientos necesarios para la ejecución de nuestro trabajo.

A nuestro tutor el Quím. Paco Noriega Rivera. Msc. PhD., pilar fundamental para la realización del este trabajo de investigación, por el tiempo, paciencia y el apoyo incondicional en el transcurso de toda nuestra carrera y en especial de la investigación.

Al docente Cristhian Larenas por su incondicional apoyo y contribución con la investigación y su disposición para ayudarnos en cualquier inquietud.

Al grupo de investigación y desarrollo en ciencias aplicadas a los recursos biológicos GIDCARB por sus conocimientos y apoyo de cada miembro del grupo.

A los laboratorios de Ciencias de la Vida y sus analistas por su asesoría con los equipos, materiales y metodologías. En especial a la Ing. Elisabeth Yugsi, Ing. Erika Paredes, Ing. Carina Hidalgo e Ing. Byron Fuertes por su colaboración y disposición.

## **Dedicatoria**

La presente investigación la dedico a mis padres Dina Ponce y Julio García, por ser el apoyo constante en la cotidianidad de mis días, el amor sin fronteras que me han brindado ha formado el excelente ser humano que soy hoy por hoy, las alegrías y tristezas compartidas dejan grandes enseñanzas en todas las etapas de mi vida siendo ellos el eje y soporte. Gracias por ser esos ejemplos de fortaleza, honestidad y dedicación que son para mí, guiando cada paso a dar para cumplir este gran sueño.

A mis hermanos Alisson y Jahir García, por ese apoyo incondicional en cada ocurrencia, noche de desvelo y sobre todo por ese amor incondicional que, gracias a nuestros mayores ejemplos, nuestros padres, hemos construido día a día, la felicidad de saber que cuento con unos amigos 24h, es satisfactorio y gratificante el saber que nos tenemos mutuamente.

A mi enamorado Diego Arcos, por llegar a convertirse en el compañero ideal para cursar esta trayectoria y la de la vida misma.

En especial la dedico a mi pequeño Esteban Samir, quien con sus risas y travesuras es mi razón de ser, es por él que todo el esfuerzo que he invertido en cumplir este sueño tiene sentido. El saber que soy ese ejemplo en tu vida, me asusta, pero a la vez me hace ser mejor persona. Te amo infinitamente.

Johanna García

Dedico esta investigación con especial cariño y gratitud a mis padres Anita Araque y Modesto Tambaco, quienes han sido mis maestros, amigos y sobre todo el pilar más importante de mi vida, ellos me han apoyado incondicionalmente en cada paso de mi carrera y por ellos, cada meta trazada, ha sido cumplida.

A mis hermanos Cristian y Alex por ser mis cómplices, mi compañía y fortaleza en esta aventura, a mi mamá Soly por su cariño y constante amor.

A toda mi familia y amigos que han contribuido para culminar una etapa más en mi vida,  
muchas gracias.

Liliana Tambaco

## Índice de contenidos

Introducción .....	1
Capítulo 1 .....	5
Marco conceptual .....	5
1.1 Investigación ecológica del género <i>Dalea</i> .....	5
1.2 Descripción y clasificación botánica de <i>Dalea coerulea</i> (L.f) Shinz & Thell.....	5
1.3 Composición química de especies del género <i>Dalea</i> .....	6
1.4 Estudios biológicos de especies del género <i>Dalea</i> .....	9
1.5 Aceites esenciales .....	10
1.6 Métodos de obtención de aceites esenciales .....	11
1.6.1 Extracción por destilación .....	12
1.6.2 Extracción por expresión.....	12
1.6.3 Extracción mediante disolventes .....	12
1.6.4 Extracción mediante fluidos supercríticos .....	13
1.7 Actividad antioxidante .....	13
1.8 Métodos de valoración de la actividad antioxidante .....	15
1.8.1 Métodos directos .....	15
1.8.2 Métodos indirectos .....	16
1.9 Bioautografía .....	17
1.9.1 Detección de agentes antioxidantes por bioautografía .....	18
1.10 Actividad antimicrobiana en aceites esenciales .....	18
1.11 Métodos de valoración de la actividad antimicrobiana.....	19

1.11.1	Métodos de difusión .....	20
1.11.2	Métodos de dilución .....	21
1.12	Infecciones respiratorias en humanos .....	21
1.12.1	Microorganismos patógenos asociados .....	22
1.12.2	Levaduras .....	24
Capítulo 2	.....	25
Materiales y métodos	.....	25
2.1	Localización y Material vegetal.....	25
2.2	Obtención del aceite esencial de las hojas de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz & Thell mediante hidrodestilación.....	25
2.3	Densidad del aceite esencial de las hojas de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz & Thell.	26
2.4	Índice de refracción del aceite .....	26
2.5	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la identificación de la composición química.....	27
2.6	Actividad antioxidante.....	28
2.6.1	Determinación de actividad antioxidante por el método DPPH (2,2difeníl -1-picrilhidrazil).....	28
2.6.2	Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS (2,2- azinobis 3 etilbensotiazolina-6-acidosulfónico) .....	29
2.7	Bioautografía de contacto .....	31
2.7.1	Identificación de compuestos con capacidad antioxidante.....	32
2.8	Determinación de la Actividad Antimicrobiana .....	33

2.8.1	Reactivación de cepas American Type Culture Collection (ATCC) .....	33
2.8.2	Preparación de controles .....	34
2.8.3	Preparación de las concentraciones del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz&Thell. ....	34
2.9	Método de dilución o micro-dilución en caldo.....	34
2.9.1	Preparación del inóculo bacteriano y fúngico .....	34
2.9.2	Elaboración del medio de cultivo.....	35
2.9.3	Inoculación en placas .....	35
2.9.4	Elaboración del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC).....	36
2.9.5	Valoración de las placas .....	37
2.9.6	Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	37
2.9.7	Análisis estadístico.....	38
Capítulo 3	.....	39
Resultados y Discusión	.....	39
3.1	Rendimiento de la Extracción de aceite esencial por hidrodestilación.....	39
3.2	Determinación de parámetros físicos del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L. f.) Schinz & Thell .....	39
3.3	Composición química del aceite por cromatografía de gases acoplada a masas .....	40
3.4	Comparación de la capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial mediante el método del DPPH y ABTS .....	42
3.5	Ensayo bioautográfico antirradical HPTLC con DPPH y ABTS .....	44

3.6 Método de dilución o micro-dilución en caldo para determinar la actividad antimicrobiana.....	45
Conclusiones .....	49
Recomendaciones.....	50
Bibliografía.....	51
Anexos.....	67

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación botánica de <i>Dalea coerulea</i> (L.f) Schinz & Thell.....	6
Tabla 2. Requerimientos de reactivación de cepas.....	33
Tabla 3. Valores de la concentración mínima inhibitoria en µg/mL.....	37
Tabla 4. Parámetros físicos del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L. f.) Schinz & Thell.....	39
Tabla 5. Composición química del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L. f.) Schinz & Thell.	40
Tabla 6. Comparación de los valores del IC <sub>50</sub> obtenidos mediante el. Método del DPPH y ABTS .....	42
Tabla 7. Porcentaje de inhibición y MIC del aceite esencial de <i>D. coerulea</i> y controles para los microorganismos de estudio.....	46

## Índice de figuras

Figura 1. Comparación de los valores del IC <sub>50</sub> del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz & Thell, frente a Hidroxibutilanisol y <i>Thymus vulgaris</i> . .....	43
Figura 2. 30µL, 2: 20 µL, 3:10 µL, 4:5 µL y 5:2,5 µL de la solución de aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz & Thell y metanol. Fase móvil: acetato de etilo, tolueno y éter de petróleo.....	44
Figura 3. Ensayo bioautográfico de DPPH y ABTS del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz & Thell. fase móvil: hexano. ....	45
Figura 4. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz & Thell .....	47

## Índice de anexos

Anexo 1. Estructura botánica de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz&Thell.....	67
Anexo 2. Secado y pesado del material vegetal del de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz&Thell..	68
Anexo 3. Obtención del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz&Thell .....	69
Anexo 4. Medición de la densidad del aceite esencial de <i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz&Thell .....	70
Anexo 5. Activación de cepas bacterianas y de levaduras .....	71
Anexo 6. Aplicación del método de microdilución en caldo .....	72
Anexo 7. Curvas de actividad antioxidante. Absorbancia vs Concentración-DPPH. ....	73
Anexo 8. Curvas de actividad antioxidante. % Inhibición vs Concentración.DPPH.....	75
Anexo 9. Curvas de actividad antioxidante método ABTS. Absorbancia vs Concentración. .	77
Anexo 10. Curvas de actividad antioxidante método ABTS. % Inhibición vs Concentración.	79
Anexo 11. Prueba no paramétrica de Tukey para los métodos DPPH y ABTS.....	80
Anexo 12. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las bacterias y levaduras para cadaaceite esencial por el método de dilución o micro-dilución en caldo.....	82

## Resumen

La especie *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz&Thell, es una planta medicinal nativa del Ecuador cuyo principal empleo está relacionado a tratar enfermedades del sistema respiratorio. De las hojas de la especie se extrajo su aceite esencial, los principales componentes del mismo fueron:  $\alpha$ -pineno (25,34 %),  $\alpha$ -tujeno (16,69 %),  $\beta$ -pineno (8,11 %), a varias de estas moléculas se les atribuyen propiedades, antiinflamatoria, broncodilatadora, antimicrobiana e insecticida.

Los métodos espectrofotométricos ABTS y DPPH fueron empleados para determinar la actividad antioxidante, la cual fue muy cercana al aceite esencial de *Thymus vulgaris* el cual fue empleado como referente natural, de forma paralela fue evaluada la actividad antioxidante del componente mayoritario del aceite (pineno), la cual fue inapreciable. La evaluación bioautográfica evidenció que la actividad es proporcionada por los sesquiterpenos cubebol y copaeno.

El Estudio de actividad antimicrobiana dio resultados muy fuertes en todas las cepas evaluadas. Gram positivas *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 con MIC 317,0  $\mu\text{g/mL}$  y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con MIC 317,0  $\mu\text{g/mL}$ ; bacterias Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 con MIC 64,1  $\mu\text{g/mL}$  y *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 con MIC 239,7  $\mu\text{g/mL}$ ; y levaduras *Candida tropicalis* ATCC 13803 con MIC 317,0  $\mu\text{g/mL}$  y *Candida albicans* ATCC 10231 con MIC 262,7  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados presentados validan el uso ancestral de los pueblos andinos de Ecuador, tanto en la presencia de metabolitos secundarios, como en los ensayos de actividad biológica.

**Palabras clave:** *Dalea coerulea*, antioxidantes, radicales libres, concentración mínima inhibitoria, porcentaje de inhibición.

## Abstract

The *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell species is a native medicinal plant of Ecuador whose main use is related to treating diseases of the respiratory system. Its essential oil was extracted from the leaves of the species, its main components were:  $\alpha$ -pinene (25,34 %),  $\alpha$ -thujene (16,69 %),  $\beta$ -pinene (8,11 %), a several of these molecules are attributed anti-inflammatory, bronchodilator, antimicrobial and insecticidal properties.

The spectrophotometric methods ABTS and DPPH were used to determine the antioxidant activity, which was very close to the essential oil of *Thymus vulgaris* which was used as a natural reference, in parallel the antioxidant activity of the major component of the oil (pinene) was evaluated, which was priceless. The bioautographic evaluation showed that the activity is provided by the sesquiterpenes cubebol and copaene.

The Antimicrobial Activity Study gave very strong results in all strains tested. Gram positive *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 with MIC 317,0  $\mu\text{g/mL}$  and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 with MIC 317,0  $\mu\text{g/mL}$ ; Gram negative bacteria *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 with MIC 64,1  $\mu\text{g/mL}$  and *Haemophilus influenzae* ATCC 10211 with MIC 239,7  $\mu\text{g/mL}$ ; and yeasts *Candida tropicalis* ATCC 13803 with MIC 317,0  $\mu\text{g/mL}$  and *Candida albicans* ATCC 10231 with MIC 262,7  $\mu\text{g/mL}$ . The results presented validate the ancestral use of the Andean peoples of Ecuador, both in the presence of secondary metabolites, and in the assays of biological activity.

**Key words:** *Dalea coerulea*, antioxidants, free radicals, minimum inhibitory concentration, percentage of inhibition.

## **Introducción**

Desde la antigüedad el hombre ha buscado los medios para alimentarse y curar sus enfermedades siendo los recursos animales, vegetales y minerales los que contribuyeron en su supervivencia (Avello & Cisternas, 2010). Dentro de los recursos antes mencionados el reino vegetal desempeña uno de los papeles más importante pues numerosas especies son usadas en el campo medicinal (Casamayor, Pérez, Morales & González, 2014).

La medicina natural y tradicional se estableció gracias a la experiencia de alquimistas, boticarios y curanderos, quienes emplearon plantas o parte de ellas para la preparación de pócimas para el tratamiento de enfermedades (Prieto, De Ocampo, Fernández & Pérez, 2008), los conocimientos ancestrales sobre medicina herbolaria han sido atesorados durante toda la historia convirtiéndose en una alternativa sencilla para el tratamiento primario de enfermedades, razón por la cual su uso perdura hasta la actualidad (Casamayor et al., 2014).

La medicina convencional, especialmente el empleo de antibióticos han contribuido a curar o calmar enfermedades (Prieto et al., 2008), sin embargo, con el paso del tiempo su uso, ha desencadenado fuertes problemáticas a la salud, como es la resistencia a los mismos; un informe reveló que aproximadamente 25 000 pacientes mueren anualmente en Europa debido a infecciones por bacterias multirresistentes (Salehi, Upadhyay, Orhan, Jugran, Jayaweera, Dias, Sharopov, Taheri, Martins, Baghalpour, Cho & Sharifi-Rad, 2019), la OMS reconoce a esta problemática como una amenaza potencial para la salud humana por ello los estudios científicos se encuentran en la búsqueda otras de alternativas que ayuden a mitigar este problema (Medina, Machado & Machado, 2015).

La Organización Mundial de la Salud en el 2010 determinó que la medicina herbolaria, fitoterapia o fitomedicina es el conocimiento, las habilidades y prácticas involucradas con el cuidado de la salud de forma holística; por otro lado Prieto y colaboradores en el 2008 denominan a la herbolaría como el empleo de material de origen vegetal con la finalidad de prevenir, atenuar o curar un estado patológico. Sin importar el concepto otorgado a la fitomedicina, esta ciencia ha contribuido durante años con el ser humano; se estima que alrededor del mundo 10 000 especies vegetales son empleadas con fines terapéuticos (Cañigual, 2003) y el 30 % de los medicamentos terapéuticos disponibles se han derivado principalmente de plantas (Montes de Oca, Hernández, Orozco, García, Ávila, Ortiz, Peñalosa, López & Serrano, 2017)

En el Ecuador el 80 % de su población ha acudido al uso de plantas o sus productos para el alivio de alguna patología, según lo que menciona Fabricant & Farnsworth (2001) no obstante, la producción farmacéutica basada en plantas medicinales es deficiente, a pesar de que existen políticas de estado que buscan establecer, consolidar y reforzar la salud intercultural basado en la medicina ancestral (Gallegos, 2016) (Miranda & Hall, 2012).

El conocimiento ancestral transmitido por generaciones constituye un pilar importante para el desarrollo sostenible del país pues promueve la investigación de especies vegetales que carecen de estudios químico y farmacológicos (Gallegos, 2016) como es la especie *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell. Esta especie pertenece a la familia Fabaceae y está distribuida a lo largo de la Sierra ecuatoriana en las provincias de: Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo y Loja (Noriega & Taco, 2018), la infusión de sus hojas y

flores es usada para mitigar síntomas de afecciones respiratorias (Peralta, Cabrera, & Ortega, 2019).

En estudios de composición química realizados por Belofsky, Diamond, Foss, Santana, Darley, Dowd, Aronica, Coleman & Ferreira (2014), en el género *Dalea* en las especies *Dalea foliolosa* y *Dalea formosa* se encontró: taninos, terpenos, esteroides, flavonoides, flavonas, cumarinas, glucósidos, saponinas, alcaloides, chalconas y triterpenos (Arango & González, 2010).

Los aceites esenciales están constituidos de por una mezcla de componentes volátiles, lipofílicas y odoríferas provenientes del metabolismo secundario de algunas especies vegetales, en su composición encontramos: monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados (Silva, Lopes, Azevedo, Costa, Alviano & Alviano, 2012). Desde la antigüedad los aceites esenciales se han utilizado como agentes terapéuticos, y se ha evidenciado científicamente que algunos de ellos poseen propiedades medicinales, como: antiinflamatorios, antivirales, antitumorales, citotóxicos, antimicrobianas y antioxidantes (Lopez, 2019).

En el aceite esencial de las especies *Dalea strobilacea* Barney, *Dalea formosa* Torr y *Dalea carthagenensis* se han identificado compuestos principales como:  $\alpha$ -cubebeno, 2-careno,  $\beta$ -pineno, camfeno, P-cimeno,  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$  terpineno, limoneno, 3-careno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -mirceno,  $\beta$ -ocimeno,  $\alpha$ -amorpheno, alloocimeno, sabineno, triciclono, E-citral,  $\delta$ -cadieno,  $\alpha$ -copaeno, (Peralta, Santi, Cabrera & Ortega, 2019) (Benites, Moiteiro, Figueiredo, Rijo, Calderon, Brovo, Gafardo, Sánchez, Torres & Ganoza, 2016).

*Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell, o Iso de Quito, es una planta endémica empleada tradicionalmente para tratar la tos y problemas respiratorios, sin embargo, no existe evidencia científica que certifique estas propiedades, por lo que es importante conocer su composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante, para promover la conservación, estudio y uso para el tratamiento de las enfermedades respiratorias.

Tomando en cuenta lo mencionado, esta investigación asume como objetivo evaluar la composición química del aceite esencial obtenido de los folíolos de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell asimismo su potencial antimicrobiano y antioxidante. El aceite esencial de las hojas de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell fue obtenido mediante arrastre de vapor, a partir del aceite extraído se caracterizaron sus componentes mediante la técnica cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas; el potencial antimicrobiano fue evaluado realizando ensayos de microdilución ante 6 diferentes tipos de microorganismos causantes de enfermedades respiratorias; el método de DPPH y ABTS fue empleado para determinar la capacidad captadora de radicales libres, finalmente los compuestos con capacidad captadora de radicales libres se establecieron llevando a cabo la técnica de cromatografía en capa delgada.

## Capítulo 1

### Marco conceptual

#### 1.1 Investigación ecológica del género *Dalea*

*Dalea* es un género constituido de 172 especies, distribuidas en casi todo el continente americano, (Piñeros & González, 2019) su hábitat se extiende desde las regiones secas del oeste de Estados Unidos hasta la región central de Argentina y Chile. Las especies vegetales pertenecientes al género *Dalea* habitan sobre los 1700 m y están localizadas en bosques subxerofíticos o secos, en suelos pedregosos o arenosos, generalmente se pueden encontrar junto a las riberas de los ríos o a los costados del camino (Arango & González, 2010).

Las especies de este género son consideradas como elementos locales dominantes en las diferentes biomasas secas de América además no se comportan como malezas o especies invasoras lo que aumenta su valor ecológico pues ayuda a la preservación de la artropofauna local y a la preservación, mantenimiento y reparación del manto vegetal de estos ecosistemas (Piñeros & González, 2019).

#### 1.2 Descripción y clasificación botánica de *Dalea coerulea* (L.f) Shinz & Thell

*Dalea coerulea* (L.f) Shinz & Thell es una especie perenne de crecimiento arbustivo que mide de 60-70 cm de altura, se caracteriza por tener una inflorescencia de color lila misma que está constituida por 5 pétalos formando una quilla, 5 sépalos y un ovario súpero con estambre monadelfos, su fruto es una legumbre y posee un tallo leñoso de color café oscuro el cual sostiene a las hojas compuestas de tipo paripinnadas de forma lanceolada y de borde liso,

(Anexo 1) su raíz es fasciculada leñosa y perenne (León, 2010). En la tabla 1 se describe la clasificación botánica de *Dalea coerulea* (L.f) Shinz & Thell.

Tabla 1.

Clasificación botánica de *Dalea coerulea* (L.f) Shinz & Thell

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Superclase</b>	Angiospermae
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Fabales
<b>Familia</b>	Fabaceae
<b>Género</b>	<i>Dalea</i>
<b>Epíteto específico</b>	coerulea
<b>Autor del epíteto específico</b>	(L.f.) Shinz & Thell.
<b>Nombre científico</b>	<i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Shinz & Thell.

Fuente: (Herbario JBB en línea, 2014)

### 1.3 Composición química de especies del género *Dalea*

Los estudios de composición química realizados a partir de diferentes órganos vegetales de las especies de este género se encontró: triterpenos, terpenos, glucósidos, alcaloides, flavonoides, cumarinas, saponinas, flavonas, esteroides, taninos y aceites esenciales (Belofsky et al., 2014).

Las estructuras vegetales presentan estos componentes en respuesta a factores como: el hábitat de crecimiento, factores bióticos y abióticos, características genotípicas de la especie y condiciones geográficas de desarrollo (Ortega, Peralta, Mariel & Cabrera, 2011).

Los flavonoides son aislados de una amplia gama de plantas vasculares están formados por los compuestos fenólicos cuyo peso molecular es bajo (Ren, Oiao, Wang, Zhu & Zhang, 2003). Constituyen en grupo de más de 8000 compuestos individuales (Martínez, González, Culebras & Tuñón, 2002), y actúan en las plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atractores visuales, repelentes de insectos y detectores de luz (Cabrera & Perez, 2013). Los

compuestos fenólicos con propiedades de captación de radicales libres tienen poder de quelación del hierro además de un número versátil de grupos hidroxilo fenólicos, generando una defensa contra los fenómenos de oxidación (Quiñones, Miguel & Aleixandre, 2012).

En el año de 1975, Dreyer, Munderloh & Thiessen, realizaron el primer estudio químico en el género *Dalea*, investigaron las especies *Dalea emoryi* y *Dalea polyadenia*, como resultado de esta investigación se evidenció la presencia de la cumarina y de 5-metoxicumarina además de dos pigmentos rojos flavonoides dalrubona y 5-metoxidalrubona en el extracto benzoico de la especie *Dalea emoryi* (Peralta *et al.*, 2019) compuestos también reportados en *Dalea tinctoria* (Dreyer, 1978).

El extracto de *Dalea ornata* fue fraccionado por cromatografía de gel de sílice al vacío líquido, donde se encontró: (2S)-8-(3-metilbut-2-en-1-il)-6,7,4'-trihidroxi-flavanona, acetina, rotenoides, pterocarpan, entre otros (Deardorff, Ray, Winterstein, Brown, McCornack, Cardenas, Jones, McNutt, Fulkerson, Ferreira, Gény, Chen, Belofsky & Dondji, 2016).

En el aceite esencial de las especies *Dalea emoryi*, *Dalea polyadenia*, *Dalea foliolosa* y *Dalea formosa* se ha identificado compuestos terpénicos oxigenados como: limoneno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno,  $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -mirceno, triciclono, sabineno,  $\alpha$ -cubebeno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -amorfeno, E-citral, canfeno, 2-careno y  $\delta$ -cadineno (Peralta *et al.*, 2019) (Castro, 2013).

Según el artículo desarrollado por Benites y colaboradores (2016), el aceite esencial de *Dalea strobilacea* está constituido del 82 % de monoterpenos hidrocarbonados, 5 % de monoterpenos oxigenados, 7 % de sesquiterpenos hidrocarbonados, 3 % de sesquiterpenos oxigenados y 0,1 % de fenilpropanoides, siendo  $\beta$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno, limoneno y  $\delta$ -cadineno, los componentes más importantes debido a su actividad biológica como antimicrobiano, fungicida y antioxidante.

En el año 2017, Villa, Pacheco, Rubio, Zarate, Lozoya & Cruz, concluyeron que el aceite esencial obtenido a partir de los foliolos de *Dalea foliolosa* contiene: monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos alifáticos, siendo la criptona el monoterpeno más abundante, seguido del linalol, óxido de cariofileno, ascaridole y  $\beta$ -citronelol. El extracto mostró actividad antioxidante y una fuerte actividad anti- $\alpha$ -glucosidasa además inhibió el crecimiento de *Pseudomonas syringae*.

La especie *Dalea frutescens* posee una chalcona llamada san juanolina, responsable de la inhibición efectiva de expresiones de: ARNm de varias citocinas inflamatorias y de la inducida por lipopolisacáridos del factor de necrosis tumoral alfa (Fang, Xiao, Qiu, Shu, Chen, Zhuang, Zhao, Liang & Liu, 2019). La isoflavan, 3 S (+) - 7-metoximanuifolina K y la manuifolina K fueron aisladas de los extractos metanólicos de *Dalea aurea*, los compuestos obtenidos mostraron una actividad *in vitro* contra la ameba *Naegleria fowleri*, responsable de meningoencefalitis amebiana primaria (Belofsky, Carreno, Goswick & John, 2006).

#### 1.4 Estudios biológicos de especies del género *Dalea*

La composición química propia de los extractos y aceites que poseen las especies de este género *Dalea*, le atribuyen importantes actividades biológicas como: antialérgicas, antivirales, antiinflamatorias, vasodilatadores, antioxidantes, antimicrobianos, amebicida, inhibidores de la tirosina, inducción de enzimas dependientes de citocromo P-450 y regulación del crecimiento celular (Pietta, 2000) (Santi, Peralta, Mendoza Cabrera & Ortega, 2017) (Montes de Oca et al., 2017). Como se menciona en los estudios químicos, los flavonoides son los responsables de la actividad biológica, en especial en los flavonoides prenilados, moléculas que contienen radicales prenilo, es decir grupos hidrocarbonados con doble ligadura entre dos de sus carbonos (Cabrera & Perez, 2013).

Los flavonoides prenilados son uno de los compuestos del género con mayor riqueza farmacológica orientado hacia la actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de microorganismos patógenos incluidas aquellas cepas resistentes a los betalactámicos, cloranfenicol, trimetropin y tetraciclinas como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* (Peralta et al., 2019). La actividad antimicrobiana de *Dalea strobilacea barneby* está determinada por los hidroxilos fenólicos, los cuales tienen afinidad por proteínas e inhibe enzimas microbianas, en un estudio realizado por Benites y colaboradores, en el 2016 se evidenció que una alta concentración de  $\alpha$ -pineno atribuye una alta actividad antimicrobiana frente a *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Albifloran A9 y albifloran B10 son flavonas aisladas de los extractos de las raíces de *Dalea albiflora*, estos componentes inhibieron el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida glabrata* con concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de 42  $\mu\text{g/mL}$  y 167  $\mu\text{g/mL}$

respectivamente (Hansen, 2019), los aldehídos de 2-arilbenzofurano y los compuestos fenólicos del extracto de *Dalea spinosa*, fueron evaluados por Belofsky, León, Osorio, Torrenegra, González & Gil en el 2006 por su actividad antimicrobiana intrínseca y su capacidad como inhibidores de resistencia antimicrobiana. En el 2016, Deardorff y colaboradores, realizaron un bioensayo *ex vivo* a partir del extracto de *Dalea ornata*, los compuestos fenólicos obtenidos fueron evaluados frente al *Ancylostoma ceylanicum*, parásito causante de patologías tales como la anemia y la desnutrición; gracias a este estudio se demostró que el extracto de *D. ornata* reduce el 63 % de la supervivencia y motilidad del patógeno humano después de dos días a 100 µg/mL.

*Dalea searlsiae* es una especie originaria de Norteamérica. A partir de los extractos metanólicos de la raíz y de las partes aéreas de la especie se aisló nuevas flavonas malheuranas preniladas y geraniladas, flavonas conocidas, rotenoides e isoflavonas. Los bioensayos realizados a partir de los extractos de la raíz demostraron actividad antimicrobiana con un MIC de 2–7,5 µg/mL contra los microorganismos: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* resistentes a oxacilina, de lo contrario los extractos de la parte aérea demostraron actividad antiinsectana frente a la plaga de cultivo *Spodoptera frugiperda* o también conocido como gusano ejército de otoño (Belofsky, Kolaczowski, Adams, Schreiber, Eisenberg, Coleman, Zou & Ferreira, 2015).

### **1.5 Aceites esenciales**

Son moléculas lipofílicas responsables de sabores y fragancias de las plantas, se producen en glándulas formadas por células secretoras donde se acumula el aceite esencial (Noriega, 2009) estos componentes volátiles endógenos se han convertido en un eje fundamental en la investigación de la tecnología alimentaria, farmacéutica, perfumería y en el control biológico (Benites *et al.*, 2016).

Se puede encontrar alrededor de 40 a 250 componentes químicos en los aceites esenciales dependiendo de su origen vegetal, estos compuestos forman parte de los fenilpropanoides, cetonas, hidrocarburos terpénicos alcohólicos, aldehídos, éteres, fenoles y ésteres. Los compuestos terpénicos están formados por unidades de 5 carbonos denominadas isopreno, las cuales pueden ser monoterpenos y sesquiterpenos de 10 y 15 carbonos respectivamente (Ruiz, Díaz & Rojas, 2015).

Los aceites esenciales están presentes en varias especies vegetales, especialmente en las coníferas, lamiáceas, apiáceas, mirtáceas, rutáceas y asteráceas, y cumplen varias funciones vegetales como la protección frente a insectos y animales herbívoros, adaptación a situaciones de estrés hídrico, ayudan a la polinización debido a su volatilidad y marcado olor lo cual contribuye en la comunicación química entre especies (Lopez, 2019). Estas cualidades se ven reflejadas en propiedades farmacéuticas como: antisépticas, antiinflamatorias, antidepresivas, antibacterianas, afrodisíacas, entre otras (León, Del Rosario & Martínez, 2015).

## **1.6 Métodos de obtención de aceites esenciales**

Se distinguen considerando la composición química del aceite, el órgano vegetal donde se localiza y sus propiedades; los métodos tradicionales son: obtención de aceites empleando fluidos supercríticos, método de destilación, extracción utilizando grasas y disolventes y métodos de expresión (Noriega, 2009), la elección del método de extracción depende del objetivo del investigador con el aceite, la concentración del aceite requerida o la recuperación de algún compuesto en especial (Peredo, García & López, 2009).

### **1.6.1 Extracción por destilación**

Una gran cantidad de aceites esenciales son extraídos por destilación con agua, conforme el agua aumenta su temperatura se evapora y sus componentes volátiles se vaporizan también.

El método de arrastre de vapor extrae el componente volátil de una mezcla de componentes no volátiles este proceso es selectivo pues la introducción de vapor de arrastre es directo al objetivo, el agua en fase de vapor genera una capa inmisible al condensarse, esta comparte su calor latente al objetivo y se evapora, dejando el producto destilado (Peredo et al., 2009). A lo largo de este proceso las dos fases inmiscibles actual de forma autónoma ejerciendo su propia presión de vapor a una temperatura de referencia. Este método es sencillo y su costo económico es bajo, sin embargo, requiere intensos periodos de tiempo y se obtiene un rendimiento menor en comparación con otros métodos (Bandoni, 2003).

### **1.6.2 Extracción por expresión**

Es un método empleado para especies cuyo aceite esencial se localiza en las células superficiales como en el epicarpio de los cítricos, este es considerado un método simple que no emplea estrategias químicas o térmicas y que cuyo resultado es una emulsión agua-aceite impura constituida de sustancias proteicas y mucílagos, finalmente el aceite esencial se obtiene a través de la centrifugación (Noriega, 2009).

### **1.6.3 Extracción mediante disolventes**

Es un método de extracción de tipo sólido-líquido conocido también como lixiviación, permite extraer cantidades considerables de componentes con un mínimo de solvente, para ello se seca y se tritura el material vegetal y con la ayuda de solventes orgánicos como el cloroformo, acetato

de metilo, alcohol, ciclohexano, etc., se solubiliza y se extrae las sustancias obteniendo una sustancia impura, el resultado es filtrado se evapora al vacío o a presión atmosférica, el disolvente restante se separa a temperatura ambiente (Quintero, González & Stashenko, 2004).

#### **1.6.4 Extracción mediante fluidos supercríticos**

La materia en estado líquido o gaseoso cuyas condiciones de temperatura y presión se encuentran en las de su punto crítico se denominan fluidos supercríticos. El punto crítico se define cuando la fase vapor y fase líquida se diferencian, este factor se determina por tres parámetros: presión, temperatura y densidad críticas, aumentando su poder de difusión, también favorece la interacción solvente y soluto y la eliminación del solvente se realiza mediante la variación de presión y temperatura (Esquivel & Bernardo, 1993). Como fluido supercrítico se puede emplear propano, etileno, dióxido de carbono, agua, hexano, tolueno, óxido nitroso y amoníaco, los fluidos supercríticos permiten reducir los tiempos de extracción, obtener mayor rendimiento, modificar parámetros de extracción y requiere menor energía, sin embargo, uno de los limitantes de este proceso de extracción es que junto a los aceites esenciales se extraen las ceras de la cutícula vegetal y aquellos componentes de mayor peso molecular (Velasco, Villada & Carrera, 2007).

#### **1.7 Actividad antioxidante**

La capacidad antioxidante de un compuesto depende de átomos que cuentan con un electrón libre en su órbita externa convirtiéndolos en altamente inestables, oxidantes, reactivos y tóxicos; los radicales libres recorren todo el organismo con el objetivo de tomar un electrón disponible desbordando el funcionamiento normal de las células. Cuando aumenta la concentración de radicales libres se genera gran cantidad de OH, generando lesiones en las

proteínas, ácidos nucleicos (ADN), lipoproteínas de baja densidad, fosfolípidos de la membrana celular, enzimas con grupos sulfhidrilos (lisozima) o mitocondrias (Llacuna & Mach, 2012) (Hernández, 2013).

Los radicales libres pueden originarse de forma exógena o endógena, la primera hace referencia a los oxidantes originados factores externos como la contaminación ambiental, luz solar, entre otros, y los oxidantes endógenos son aquellos que se desarrollan en procesos naturales del cuerpo como la respiración, metabolismo, entre otros (Kumar, Sharma, & Vasudeva, 2017).

El antioxidante es una sustancia cuya concentración es menor a la de un sustrato oxidable por lo que retrasa o inhibe la captación de radicales libres del sustrato, actúan como captadores de radicales libres con capacidad de estabilizarlos o desactivarlos (San Miguel & Martin, 2009). La capacidad antioxidante de una especie está determinada por un componente o la mezcla de ellos, además del microambiente donde se desarrollan (Fernández, Villaño & Troncoso, 2006).

Hasta la actualidad se han realizado varios estudios entorno a la función de los antioxidantes responsabilizando a estas sustancias como moléculas que previenen el envejecimiento, enfermedades degenerativas, enfermedades cardiovasculares, deterioro del sistema inmunológico y la disfunción cerebral (Kumar et al., 2017).

La industria farmacéutica, la industria de producción de alimentos, cosmética y perfumería se encuentran en la búsqueda constante de alternativas que sustituyan el empleo de antioxidantes sintéticos, los aceites esenciales han sido propuestos como alternativa debido a sus

características antioxidantes y al ser productos naturales derivados de plantas son considerados como seguros (Boom, Orozco & Alean, 2018).

## **1.8 Métodos de valoración de la actividad antioxidante**

Para determinar la actividad antioxidante los métodos empleados evalúan la oxidación de un sustrato, el cual ha sido inducido por un agente oxidante, sin embargo, cuando existe un antioxidante la oxidación se reduce o se inhibe. La oxidación se inhibe de forma proporcional a la capacidad captadora de radicales libres del compuesto antioxidante (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini & Roseane, 2009) (Rendón, 2016)

Los métodos para evaluar la actividad antioxidante pueden clasificarse como métodos directos y métodos indirectos; los métodos directos evalúan la capacidad de captación de radicales libres de un antioxidante en la oxidación celular, en este tipo de método encontramos: la prueba CRHF o Capacidad para Reducir el Hierro Férrico, la prueba CARO o conocida como la Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno, los métodos indirectos valoran la estabilidad de los radicales libres en presencia de un compuesto antioxidante los métodos indirectos son: ABTS “ácido 2,2, azino - bis (3 - etilbenzotiazolin) - 6 - sulfónico, (DMPD) diclorhidrato de N, N- dimetil – fenilendiamina”, DPPH “2,2-Difenil-1- picrilhidrazilo” (Londoño, 2013).

### **1.8.1 Métodos directos**

#### **Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (CARO)**

Este método mide la capacidad de captación de radicales disponibles de modelos vivos in vitro, para ello se valora la disminución de oxidación de las moléculas con fluorescencia que pueden

ser fluoresceína o  $\beta$ -ficoeritrina en conjunto con moléculas que originan a los radicales disponibles tal como son las componentes azoderivados, al aumentar la temperatura estos generan radicales libres peroxilo que oxidan la molécula de fluoresceína o  $\beta$ -ficoeritrina, la actividad antioxidante se cuantifica usando un fluorómetro (Cao, Alessio & Cutler, 1993).

El radical peróxido se forma por la desintegración térmica de la molécula 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro, este radical origina algunos radicales alquilo y una molécula de dinitrógeno, estos reaccionan con la sonda de fluorescencia y forma un producto no fluorescente y sin color, la capacidad de captación de radicales libres de los radicales peróxido se valora cuantificando la disminución de la velocidad de degradación de la sonda (Granados, Yáñez & Acevedo, 2014).

### **Método del CRHF “Capacidad para Reducir el Hierro Férrico”**

Para medir la capacidad de reducción del plasma Benzie y Strain desarrollaron el método CRHF, sin embargo, en la actualidad este método es útil para valorar las propiedades de captación de radicales libres de los compuestos nutraceuticos. Los radicales libres se reducen al estar en contacto con la molécula 2,4,6-Tripiridiltriazina Férrica y originan una sustancia de color que ayuda a revelar compuestos antioxidantes (Londoño, 2013) (Rendón, 2016).

### **1.8.2 Métodos indirectos**

#### **Método de ácido 2, 2 azino-bis (3 - etilbenzotiazolin) 6 – sulfónico (ABTS)**

Este método fue desarrollado por Miller en 1993 y se basa en la capacidad antioxidante del ABTS para tomar aniones radicales de larga vida (Rodríguez, Andrade & Díaz, 2015).

Cuantifica la pérdida de color del radical ABTS, cuando interactúa con especies donantes de electrones, cuando la molécula de persulfato de potasio es expuesta al ácido 2, 2 azino-bis (3 - etilbenzotiazolin) 6 – sulfónico, la solución de ABTS se oxida, volviéndose incolora lo que se observa como la disminución de la absorbancia a 734 nm (Mesa, Gaviria, Cardoa, Sáez, Trujillo & Rojano, 2010).

### **Método del 2,2-Difenil -1- picrilhidrazilo (DPPH)**

Este ensayo se basa en el uso del 2,2-Difenil -1- picrilhidrazilo el cual es un radical nitrogenado orgánico y estable de color purpura característico, este es un método simple y que no requiere de numerosos instrumentos (Rodríguez et al., 2015), fue planteado en 1995 por Brand Williams y es empleado para determinar la capacidad antioxidante basado en su propiedad para estabilizar el radical DPPH, la disminución de color puede valorarse a través de la absorbancia a 517nm. La interpretación de los resultados se realizan en base al valor del  $EC_{50}$ , que es cuando el 50 % de la solución de 2,2-Difenil -1- picrilhidrazilo se encuentra estable gracias a la concentración de antioxidante necesaria (Londoño, 2013).

### **1.9 Bioautografía**

Es un método rápido, sencillo y económico combina la localización de la actividad biológica y química con la cromatografía en capa fina (Colorado, Galeano & Martínez, 2007), para revelar la actividad separada de los compuestos mediante la visualización de fracciones (Rossi, Maietti, Guerrini, Bruni, Poli, Scalvenzi, Paganetto, Radice, Saro & Sacchetti, 2011), sirve para detección de: actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, inhibición enzimática y aislamiento de compuestos activos (Dewanjee, Gangopadhyay, Bhattacharya, Khanra & Dua, 2015).

### **1.9.1 Detección de agentes antioxidantes por bioautografía**

La estabilidad del DPPH se reduce ante la presencia de un compuesto antioxidante (Molyneux, 2004) el ensayo TLC permite observar el cambio de color resultado de esta reacción, la placa TLC es rociada con una solución de DPPH, se deja secar la placa y luego de aproximadamente 30 minutos se observa franjas de color amarillo sobre un fondo morado, estas fracciones constituyen los compuestos responsables de la actividad antioxidante (Dewanjee et al., 2015).

Bioautografía utilizando ABTS como reactivo de detección

Este método es menos estable a comparación del uso de DPPH, el revelado se muestra en un fondo color verde y los compuestos antioxidantes se observan como manchas incoloras o rosadas (Dewanjee et al., 2015).

### **1.10 Actividad antimicrobiana en aceites esenciales**

La medicina convencional dio un giro trascendental tras el descubrimiento de los antibióticos, sin embargo con el pasar de los años se ha originado un nuevo problema: la resistencia de los microorganismos a los antibióticos (Bermúdez, Granados & Molina, 2019) a pesar de los estudios para combatir esta situación los sistemas de salud humano y veterinario se encuentran en alerta, pues las opciones de tratamiento frente a múltiples infecciones se ve limitada, la búsqueda de nuevas alternativas a llevado al estudio de remedios ancestrales basados en plantas (Boire, Riedel & Parrish, 2013).

En el Ecuador el empleo de especies vegetales medicinales para el tratamiento de diferentes patologías forma parte de la cultura tradicional, Ecuador es un país megadiverso donde sólo el

26 % de su diversidad vegetal ha sido estudiado como potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades causadas por hongos, virus, bacterias y parásitos (Araujo, Vimos, Cruz & Falconí, 2019). El primer registro del uso de aceites esenciales a 4 500 a.C. en Egipto, los egipcios empleaban los aceites para tratar infecciones e inflamaciones (Boire et al., 2013). Las plantas tienen la capacidad de producir un sin número de metabolitos secundarios, se estima que existe más de 3000 aceites esenciales que cumplen funciones protectoras, biocidas, antimicrobianas y repelentes (Bermúdez et al., 2019).

La combinación de diferentes compuestos químicos que conforman a los aceites esenciales determinan su actividad antimicrobiana, la cual puede ser por interacción o abstracción de estos compuestos con los diana de la unidad celular (Bermúdez et al., 2019) también existen aceites esenciales cuyos efectos antimicrobianos no son específicos, por ejemplo su propiedad hidrofóbica aumenta la permeabilidad celular y permite su ingreso a la célula degradando la bicapa lipídica, a consecuencia la célula pierde contenido intracelular, genera cambios de pH, reduce de concentración de ATP y finalmente muere (Perricone, Arace, Corbo, Sinigaglia & Bevilacqua, 2015).

### **1.11 Métodos de valoración de la actividad antimicrobiana**

Existen diferentes métodos para evaluar la susceptibilidad de bacterias frente a los aceites esenciales, cada método se diferencia por su sensibilidad y especificidad (Ramirez & Marin, 2009) por lo que los resultados obtenidos se ven influenciados por el método seleccionado, método de extracción de aceite empleado, volumen del inóculo, fase fisiológica del microorganismo, entre otros (Perricone et al., 2015).

Estos métodos se clasifican en: métodos de dilución, métodos auxográficos y métodos de difusión. Para valorar la calidad en aceites esenciales se realizan análisis de cuantificación e identificación microbiana como: concentración mínima bactericida (MBC), concentración bacteriostática y concentración mínima inhibitoria (MIC) (Argote, Suarez, Tobar, Perez, Hurtado & Delgado, 2017). El valor del MIC es cantidad mínima de agente antimicrobiano ( $\mu\text{g/mL}$ ), el cual transcurrido las 24 horas de incubación inhabilita el desarrollo de un microorganismo (Horna, Silva, Vicente & Tamariz, 2012) (Suárez, 2015).

### **1.11.1 Métodos de difusión**

Esta metodología se fundamenta en la determinación cualitativa del efecto generado por un conjunto de sustancias sobre las cepas bacterianas ensayadas (Ramirez & Marin, 2009).

#### Difusión en agar

Esta técnica permite valorar la sensibilidad de los microorganismos bacterianos frente a la exposición de los antibióticos, especialmente es empleada en microorganismos de crecimiento rápido o de requerimientos nutricionales especiales como los microorganismos aerobios (Herrera, 2000). Para llevar a cabo este procedimiento se inocula el microorganismo en placas de agar, luego se añaden en la superficie del agar discos de papel filtro impregnados con el antibiótico, el antimicrobiano se esparce en el agar de manera que inhibe el crecimiento bacteriano (Balouiri, Sadiki & Ibsouda, 2016). En estas pruebas se observa la presencia o ausencia de zonas de inhibición, interpretando los resultados como sensible, intermedio o resistente, a pesar de ser una prueba económica y simple, no es un procedimiento apropiado para establecer el valor del MIC.

### **1.11.2 Métodos de dilución**

La metodología que emplea la dilución en caldo o en agar es de carácter cuantitativo, por lo que se emplea de forma dual para calcular el valor de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida (Ramírez & Marin, 2009), en microorganismos que tienen una tasa de crecimiento variable o en microorganismos anaeróbicos o microaerófilos (López & Gavara, n.d.).

#### Método de dilución en agar

Este método es adecuado para pruebas de susceptibilidad tanto en bacterias como en hongos, implica la incorporación del inóculo bacteriano en diferentes concentraciones en un medio de agar fundido, generalmente se emplean diluciones dobles en serie, además permite el análisis de varios microorganismos contra un solo compuesto (Balouiri et al., 2016).

#### Método de dilución en caldo o microdilución

En este ensayo de sensibilidad se puede emplear tubos de ensayo o placas de plástico de 96 pocillos, para este proceso se agrega un inóculo bacteriano en caldo de cultivo no selectivo y extracto vegetal o aceite esencial a diferentes concentraciones, se incuba a condiciones adecuadas y pasado un tiempo se observa la turbidez como indicador de crecimiento bacteriano (Balouiri et al., 2016).

### **1.12 Infecciones respiratorias en humanos**

La infección respiratoria se considera un proceso inflamatorio complejo de las vías aéreas del sistema respiratorio (Álvarez, Castro, Abdo, Orta, Gómez & Álvarez, 2008). El agente

etiológico responsable de las infecciones respiratorias son: virus, bacterias, hongos o una combinación de ellos (Quizphe, Uphoff, Encalada, Andrade & Francoise, 2013). Es decir que todo microorganismo y virus cuando existe susceptibilidad ambiental y las células hospederas lo permiten, pueden desencadenar enfermedades respiratorias, sin embargo, las infecciones más comunes son causadas por bacterias (Somogyi, Alfaro, Herrera & Herrera, 1998).

Las infecciones respiratorias son las que afectan de forma común a los seres humanos. Estas infecciones lo acompañan durante toda su vida e incluso llegan a causar su muerte (Fonseca, Pérez, Ramírez & Hevia, 2013). Según Coronel y colaboradores en el 2018, la infección respiratoria causa el mayor número de personas fallecidas en el mundo. Según las estadísticas, en el Ecuador representan la primera causa de morbilidad en adultos; con 38,3 % de personas afectadas en la zona rural y 45,7 % de habitantes afectados en la zona urbana, además tiene una alta tasa de recurrencia, presentándose entre 4 a 6 veces por año (Gallegos, 2016).

### **1.12.1 Microorganismos patógenos asociados**

Los microorganismos fueron los únicos habitantes del planeta por alrededor de 3 mil millones de años; desde su origen han convivido con el ser humano simultáneamente. Las bacterias son una pieza importante en nuestra naturaleza y generalmente conviven de forma armónica con el hombre, sin embargo en ocasiones sobrevive a expensas de ellos, como agente causal de enfermedades (Bertrand, Brochier, Gouy & Westall, 2015).

Estudios han evaluado que la neumonía se asocia con los siguientes microorganismos: *Legionella* sp, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, y *Streptococcus pneumoniae*, seguido de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pneumoniae* y

*Haemophilus influenzae* (Somogyi et al., 1998), además las enfermedades neumónicas atípicas se generan por: virus respiratorios, *Legionella*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Coxiella burnetti* (Sahadulla, 2018).

La faringitis es una enfermedad común causada por agentes bacterianos o víricos como el Estreptococo hemolítico  $\beta$  del grupo A (Grief, 2013), como el *Streptococcus pyogenes*, que es un Estreptococo beta-hemolítico Gram positivo, es un organismo anaerobio facultativo que suele agruparse formando colonias blancas o grises (Galeano et al., 2015). Según Olmsted, Zagurs, & Winter en el 2002, esta bacteria es el agente causal de un amplio espectro de enfermedades como: la erisipela, impétigo, celulitis, e infecciones más graves como: el síndrome del shock tóxico estreptocócico y fiebre reumática aguda.

*Staphylococcus aureus* es un constituyente natural de la microbiota intestinal humana, es una bacteria Gram positiva que se caracteriza por tener una capa gruesa de peptidoglicano, además es el agente etiológico de múltiples patologías, entre ellas las infecciones cutáneas, infección del SNC y tejidos blandos (Gil, 2000).

La laringotraqueobronquitis aguda (LTB) es una infección inflamatoria de la tráquea, los bronquios, bronquiolos y la laringe, esta infección se genera por la presencia de virus o bacterias como *Haemophilus influenzae* o *Mycoplasma pneumoniae* (Grief, 2013). *Haemophilus influenzae* es un bacilo Gram negativo descubierto en 1892, anaerobio facultativo, habita la vía respiratoria superior, aunque también coloniza el tracto gastrointestinal y genital, una vez que invade la zona nasofaringe puede ocasionar infecciones como meningitis, nasofaringitis,

epiglotitis, conjuntivitis, septicemia, endocarditis, peritonitis, artritis y neumonía (Zepeda, 2002).

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria inmóvil, Gram negativa, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracteriza por ser anaerobia facultativa y en ocasiones se encuentra encapsulada, este patógeno invade la piel y las superficies mucosas como la nasofaringe y el tracto gastrointestinal (Echeverri & Cataño, 2010), es responsable de neumonías bacterianas y pueden causar condensación hemorrágica además de infecciones del sistema urinario, infecciones de tejidos blandos y sepsis (González Nieves, Solórzano, Cruz, Puig, & Moreno, 2013).

### **1.12.2 Levaduras**

*Candida albicans* es una levadura comensal dismórfica, se localiza en los tegumentos de las células mucolíticas de la cavidad oral y vaginal, además del tracto gastrointestinal del ser humano, pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*. Si el individuo se encuentra inmunológicamente comprometido puede ser susceptible a afecciones como: candidiasis, uretritis, vaginitis, inclusive puede causar la muerte (Panizo & Reviákina, 2001).

*Candida tropicalis* es un hongo oportunista que forma parte de los microorganismos vivos de la flora intestinal, sin embargo, a consecuencia de los factores de virulencia del patógeno y susceptibilidad del hospedero puede provocar infecciones, dolores estomacales, diarrea y alergias (Zuza, Silva & Chavez, 2017).

## Capítulo 2

### Materiales y métodos

#### 2.1 Localización y Material vegetal

Las hojas de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell fueron recolectadas en Penipe cantón de la provincia de Chimborazo- Ecuador, cuyas coordenadas geográficas son: Latitud: -1,546590, Longitud: -78,538987, Altitud: 2530 m.s.n.m (Muñoz et al., 2014).

El estudio se realizó en la Universidad Politécnica Salesiana, sede Quito, campus El Girón en los Laboratorios de Ciencias de la Vida.

#### 2.2 Obtención del aceite esencial de las hojas de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell mediante hidrodestilación

Las hojas colectadas de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell fueron secadas a temperatura ambiente durante 48 horas, a continuación, se pesaron 50 g y trituraron para ser procesadas inmediatamente (Anexo 2). Para la obtención del aceite esencial por hidrodestilación se utilizó un equipo Clevenger en donde se colocó el material vegetal triturado en el balón de vidrio de 1000 mL con 500 mL de agua destilada, la extracción se realizó durante 3 horas (Anexo 3) (Ferhat, Meklati, Smadja & Chemat, 2006).

El producto destilado se recolectó y de forma posterior se añadió 0,60 g de sulfato de sodio anhidro para separación del agua presente en el destilado, el aceite esencial obtenido se colocó en viales ámbar de 2 mL y se almacenó en refrigeración a 4 °C para evitar su deterioro (Canella, 2016).

Para el cálculo del porcentaje de rendimiento en el proceso de obtención del aceite esencial se utilizó la siguiente ecuación, en donde se pesó el aceite obtenido de cada destilación (Noriega, 2009).

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{gramos de aceite esencial obtenido}}{\text{gramos de material vegetal}} \times 100$$

### **2.3 Densidad del aceite esencial de las hojas de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell**

El método del picnómetro a 20 °C se empleó para determinar la densidad del aceite esencial, una vez calibrado el picnómetro, se pesa el picnómetro seco, limpio y vacío, a continuación, se coloca 1 mL de agua destilada en el picnómetro y se procede a pesarlo, por último se pesa el picnómetro con 1 mL de aceite esencial (Anexo 4), el ensayo se realizó por triplicado utilizando una balanza analítica, marca New Classic MP, modelo M 1204 y aplicando la siguiente ecuación (Torrenegra, Granados, Osorio & León, 2015).

$$\text{Densidad} = \frac{\text{peso del picnómetro con aceite esencial} - \text{peso del picnómetro vacío}}{\text{peso del picnómetro con agua} - \text{peso del picnómetro vacío}}$$

### **2.4 Índice de refracción del aceite**

Para determinar el índice de refracción del aceite esencial se empleó un refractómetro marca Atago Narit Liquid a 20 °C. Para la lectura se empleó un capilar con el cual se colocó dos gotas de aceite esencial en el prisma del refractómetro. La lectura se realizó por triplicado (León, Osorio, Torrenegra, & González, 2015).

## **2.5 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas para la identificación de la composición química**

Los compuestos químicos del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, fueron determinados en un equipo GC-MS, mismo que posee un cromatógrafo de gases con cabida para 100 pruebas modelo EVOQ 436 GC - TQ Select EI, tiene una columna apolar marca Zebron ZB-5MS con un espesor: 0,25 mm, una longitud de 30 m, ancho de película: 0,25  $\mu\text{m}$  este tiene una interconexión con un espectrofotómetro de masas además posee 2 Inyectores: detector y detector de espectro de masas (MS). El cromatógrafo de gases se empleó bajo las siguientes condiciones: modo de inyección split 1:25 y flujo de gas helio (1 mL/min). El horno inició a una temperatura de 45 °C, llegando a 100 °C cuya velocidad fue de 1 °C/min, posteriormente se elevó a 250 °C y velocidad de 5 °C/min, esta temperatura fue constante alrededor de 15 minutos, el análisis se llevó acabo en 90 minutos. Las condiciones del espectrofotómetro de masas EVOQ 436 GC - TQ Select EI fueron: voltaje: 100 - 240 V, frecuencia de corriente alterna: 50/60 Hz, horno con una rampa de calentamiento: temperatura máxima: 325 °C a 350 °C, control electrónico de flujo (EFC) con 3 canales con resolución de 0,001 psi, 170 °C/min, (Noriega, Mosquera, Paredes, Parra, Zappia, Herrera, Villegas & Osorio, 2018) (Veloz, 2018). Para la identificación química del aceite esencial se comparó el espectro de masas con el tiempo de retención utilizando como referente la base de datos EI- MS librería comercial NIST.

Se realizó una dilución (1:10) de 100  $\mu\text{L}$  del aceite en 1000  $\mu\text{L}$  de diclorometano en un vial ámbar de 2 mL, para inyectar en el equipo GC-MS. La cuantificación de los componentes químicos se realizó a través de una comparación de los Índices de Kovats (IK) obtenidos frente a los índices teóricos del libro “Identificación componentes de aceites esenciales por espectrometría de masas/ trampa iónica” (Adams, 2012).

## 2.6 Actividad antioxidante

### 2.6.1 Determinación de actividad antioxidante por el método DPPH (2,2difeníl -1-picrilhidrazil)

La actividad antioxidante se determinó mediante una solución de DPPH al  $1 \times 10^4$  molar en alcohol al 96 % con una elaboración previa de 24 h, la cual se envasó en un frasco ámbar y refrigeró a 4 °C.

Una solución al 10 % del aceite de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell se diluyó en DMSO (dimetilsulfóxido) a las siguientes concentraciones: 0/100  $\mu\text{L}$ , 5/95  $\mu\text{L}$ , 10/90  $\mu\text{L}$ , 20/80  $\mu\text{L}$ , 50/50  $\mu\text{L}$ , 80/20  $\mu\text{L}$  y 100/0  $\mu\text{L}$  (Gibran et al., 2017).

Como controles para valorar la capacidad antioxidante se utilizó una solución de BHA (hidroxibutilanisol) al 0,1 % en alcohol al 96 %, a partir del cual se realizaron diluciones en las siguientes concentraciones: 0/100  $\mu\text{L}$ , 10/90  $\mu\text{L}$ , 25/75  $\mu\text{L}$ , 50/50  $\mu\text{L}$ , 80/20  $\mu\text{L}$ , y 100/0  $\mu\text{L}$ . Además, diluciones de Pineno en concentraciones de: 0/200  $\mu\text{L}$ , 25/175  $\mu\text{L}$ , 50/150  $\mu\text{L}$ , 100/100  $\mu\text{L}$ , 150/50  $\mu\text{L}$ , 180/20  $\mu\text{L}$  y 200/0  $\mu\text{L}$  (Mendoza, Parra& Loza, 2014).

Se tomó 2,9 mL de la solución de DPPH y se colocó a las diluciones del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz&Thell y BHA, mientras que para las diluciones de Pineno se utilizó 2,8 mL, las cuales fueron puestas en agitación por 30 minutos.

Para valorar la actividad antioxidante se empleó un equipo espectrofotométrico UV marca JASSCO, modelo V-730, las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 517 nm, el equipo

fue blanqueado con agua destilada, posteriormente se colocó las muestras en celdas de plástico para leer sus absorbancias, se realizó cuatro repeticiones por ensayo (Gibran et al., 2017).

Para determinar la actividad antioxidante mediante el método de DPPH se empleó la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \frac{\text{Absorbancia del blanco} - \text{absorbancia de las muestras}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

### **2.6.2 Determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS (2,2- azinobis 3 etilbensotiazolina-6-acidosulfónico)**

La solución ABTS fue preparada en una concentración de 2 mM, colocando 27,51 mg de ABTS en 25 mL de agua ultra pura. Inmediatamente se pesó 188,20 mg de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y se disolvió en 10 mL de agua ultra pura. Una vez preparada la disolución ABTS se le aumenta 0,25 mL de la solución de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y se coloca en un frasco ámbar y se almacena en oscuridad a 4 °C durante 24 horas para la radicalización.

Transcurridas las 24 h, de la solución de ABTS radicalizado se tomó 2 mL y se mezcla con 80 mL de etanol absoluto para obtener 0,68 a 0,72 de absorbancia, leído a una longitud de onda de 734 nm (Noriega, Guerrini, Sacchetti, Grandini, Ankuash, & Manfredin, 2019).

El aceite de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell se diluyó en DMSO (dimetilsulfóxido) a las siguientes concentraciones: 0/100 µL, 2/98 µL, 5/95 µL, 10/80 µL, 20/80 µL, 50/50 µL y 80/20 µL y 100 µL.

Como controles para la evaluar la actividad antioxidante se utilizó una solución de BHA (hidroxibutilanisol) al 0,1 % en alcohol al 96 %, a partir del cual se realizaron diluciones en las siguientes concentraciones: 0/100 µL, 5/95 µL, 10/90 µL, 20/80 µL, 50/50 µL, 80/20 µL y 100/00 µL. Además, diluciones de Pineno en concentraciones de: 0/200 µL, 10/190 µL, 50/150 µL, 100/100 µL, 150/50 µL, y 200/0 µL. Se tomó 2,9 mL de la solución de ABTS para colocarlas en las diluciones del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell y BHA, mientras que para las diluciones de Pineno se utilizó 2,8 mL, y se leyó en el espectrofotómetro UV marca JASSCO, modelo V-730 a una longitud de onda de 734 nm (Mendoza et al., 2014).

La capacidad captadora de radicales libres del ABTS se midió con la siguiente formula:

$$\%Inhibición\ ABTS = \frac{Absorbancia\ del\ blanco - absorbancia\ de\ las\ muestras}{Absorbancia\ del\ blanco} \times 100$$

La actividad antioxidante del aceite esencial fue valorada calculando mediante polarización el valor IC<sub>50</sub>, que es la cantidad de antioxidante necesaria para inhibir el 50 % de las soluciones de DPPH y ABTS respectivamente (Noriega et al., 2018). Finalmente se realizó cálculos de regresión lineal o logarítmica en curvas de inhibición vs concentración para el aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell y cada control.

## 2.7 Bioautografía de contacto

Para la identificación de los compuestos con capacidad antioxidante se llevó a cabo la técnica de cromatografía en capa delgada (TLC). Se utilizó como fase estacionaria, placas HPTLC sílica gel 60 F<sub>254</sub> de 10x10 cm, la fase móvil utilizada fue: una solución de 93 mL de tolueno, 20 mL de éter de petróleo y 7 mL de acetato de etilo y otra solución de hexano (Lorenzo, Frías, Villa, & Del Valle, 2006). La muestra se preparó con 30 µL de aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell y 970 µL de metanol la cual atomizada en la placa de sílice con las siguientes especificaciones: ancho de la banda, distancia entre bandas, volumen 30 µL, 20 µL, 10 µL, 5 µL y 2,5 µL respectivamente, con la ayuda de un equipo aplicador para TLC marca CAMAG, modelo LINOMAT 5.

La fase móvil se agregó en la cámara cromatográfica y se tapó inmediatamente para que no se escaparan vapores y también para que la cámara alcance la saturación necesaria, posteriormente, se colocó la placa de sílice en la cámara cromatográfica previamente saturada y se empezó a dejar correr la fase móvil en la fase estacionaria. Esto se dejó durante 30 minutos, momento en el cual la fase móvil estaba a un centímetro de finalizar la corrida dentro de la placa cromatográfica (Medina & Lozano, 2016).

A continuación, se dejó secar la placa en una cámara de flujo laminar durante 20 minutos y se verificó la separación de sustancias utilizando una cámara de UV, el cual permitió determinar distancias recorridas por el compuesto y el solvente para la calcular el Factor de retención (RF).

Mediante la siguiente fórmula:

$$RF = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra desde el punto de siembra (cm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente(cm)}}$$

Para el revelado se utilizó DPPH al 0,5 % en alcohol al 96 % y ABTS, para lo cual se atomizó por toda la placa y se dejó reposar durante 10 minutos (Medina & Lozano, 2016).

### **2.7.1 Identificación de compuestos con capacidad antioxidante.**

Una vez identificada la distancia recorrida por los compuestos con capacidad captadora de radicales libres, se realizó un raspado de la placa de sílice en la zona en donde se encuentran dichos compuestos, cada uno de los cuales se depositaron en tubos Eppendorf con 2 mL de Diclorometano, con la ayuda de un vórtex se mezcló la solución por 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante, se filtró y colocó en viales ámbar de 2 mL debidamente etiquetados y utilizó cromatografía de gases acoplada a masas GC-MS marca Bruker, modelo EVOQ 436 GC - TQ Select EI en las siguientes condiciones: voltaje: 100 - 240 V, frecuencia de corriente alterna: 50/60 Hz, horno con una rampa de calentamiento: 170 °C/min, con 2 Inyectores: detector y detector de espectro de masas (MS), control electrónico de flujo (EFC) con 3 canales con resolución de 0,001 psi, capacidad para 100 ensayos, columna apolar marca Zebron ZB-5MS con una longitud de 30 m, espesor: 0,25 mm, ancho de película: 0,25 µm, temperatura máxima: 325 °C a 350 °C para la identificación de componentes (Noriega et al., 2018). Las condiciones del cromatógrafo de gases fueron: flujo de gas helio (1 mL/min), modo de inyección split 1:25. La temperatura inicial del horno 45 °C, llegando a 100 °C con una velocidad de 1 °C /min, después fue elevada a 250 °C con una velocidad de 5 °C/min, esta temperatura fue constante por 15 minutos, el análisis se llevó a cabo durante 90 minutos (Veloz, 2018).

## 2.8 Determinación de la Actividad Antimicrobiana

Se identificó la actividad antimicrobiana empleando el método de dilución o micro dilución en caldo descrito por Matiz et al., 2015, para ello se empleó dos bacterias Gram positivas: *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATTC 6328, dos bacterias Gram negativas: *Haemophilus influenzae* ATTC 10211, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 y dos levaduras: *Candida tropicalis* ATCC y *Candida albicans* ATTC 10231 1380. Los controles positivos empleados en el ensayo fueron soluciones de Terpeneol y antibióticos en DMSO (dimetilsulfóxido) al 10 % y el control negativo fue DMSO (dimetilsulfóxido).

### 2.8.1 Reactivación de cepas American Type Culture Collection (ATCC)

Para la reactivación de cepas de bacterias y hongos se efectuó una hidratación y siembra en cajas Petri (Anexo 5), manejando la técnica de estriado simple y considerando los requerimientos de cada microorganismo, como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2.

Requerimientos de reactivación de cepas

Cepa	ATTC	Medio	Temperatura
<i>S. pyogenes</i>	19615	Agar Sangre de Cordero	35 °C
<i>S. aureus</i>	6328	Agar Müller-Hinton	35 °C
<i>H. influenzae</i>	10211	Agar Müller-Hinton	35 °C
<i>K. pneumoniae</i>	10031	Agar Müller-Hinton	35 °C
<i>C. albicans</i>	10231	TSA (triptycase soy agar)	25 °C
<i>C. tropicalis</i>	13803	TSA (triptycase soy agar)	25 °C

Fuente: (Disk, 2006).

## **2.8.2 Preparación de controles**

Los controles positivos de actividad antimicrobiana fueron: Terpeneol como control natural; para bacterias Gram negativas se empleó gentamicina, un antibiótico de 20 mg/2 mL, para bacterias Gram positivas: eritromicina con concentración de 500 mg, y para Levaduras: clotrimazol en concentración de 500 mg; estos controles se utilizaron al 10 % en DMSO (dimetilsulfóxido). Como control negativo se empleó DMSO (dimetilsulfóxido) estas soluciones fueron filtrados para garantizar su homogeneidad (Matiz et al., 2015).

## **2.8.3 Preparación de las concentraciones del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz&Thell.**

El aceite esencial obtenido a partir de las hojas de la especie se diluyó en DMSO (dimetilsulfóxido) al 5 %, (5 µL de aceite esencial en 95 µL de DMSO).

## **2.9 Método de dilución o micro-dilución en caldo**

### **2.9.1 Preparación del inóculo bacteriano y fúngico**

Con las colonias aisladas de las placas previamente activadas se preparó un inóculo. Con un asa de siembra microbiológica se embutió las colonias aisladas en tubos de ensayo que contienen 5 mL de caldo de cultivo (Lucena, Escalante, González, Rojas Cordero, Ustariz, Carmona & Torres, 2019). En un tubo de ensayo con 5 mL de caldo dextrosa Sabouraud para levaduras y Mueller Hinton para bacterias y dejó incubar durante 24 horas a 35 °C o a 25 °C respectivamente.

Luego de las 24 horas el inóculo se centrifugó a 3000 rpm en un equipo Hermle Z400 durante 30 minutos, luego se eliminó el sobrenadante y se conserva la bacteria y levadura suspendida,

a esto se añadió 5 mL de disolución fisiológica estéril al 0,9 % y se coloca en el vórtex por 3 min hasta lograr una turbidez establecida por la escala McFarland 0,5.

Para estandarizar el inóculo se empleó un el equipo espectrofotómetro UV marca JASSCO, modelo V-730. Para bacterias la absorbancia osciló entre 0,08 a 0,12 equivalente a  $10^8$  UFC/mL leídos a una longitud de onda de 625 nm, para levaduras la absorbancia fue de 0,15 equivalente a  $10^6$  UFC/mL la lectura se realizó a una longitud de onda de 530 nm (Sánchez, Castillo & García, 2016).

### **2.9.2 Elaboración del medio de cultivo**

En 300 mL de agua destilada se agregó 6,6 g de caldo Muller Hilton para bacterias, para levaduras se colocó 0,15 g del caldo dextrosa Sabouraud en 50 mL de agua destilada, para utilizarse en el método de dilución o micro-dilución el medio de cultivo fue esterilizado (Sánchez et al., 2016).

### **2.9.3 Inoculación en placas**

Se emplearon microplacas estériles de 96 pocillos, se puso 15  $\mu$ L de las disoluciones al 5 % del aceite esencial en la columna 1, 2 y 3 de la fila A, en la columna 4 se colocó 15  $\mu$ L Terpeneol y en la columna 5, 15  $\mu$ L del antibiótico seleccionado para cada microorganismo, a continuación, utilizando una micropipeta multicanal se añadió 185  $\mu$ L de medio de cultivo en los pocillos sobrantes se puso 100  $\mu$ L del caldo de cultivo de la fila B a la fila H. Se tomó 100  $\mu$ L de la fila A y se colocó en la fila B homogenizando el medio de cultivo y la sustancia inicial por 50 veces con ayuda de la micropipeta se repitió continuamente hasta llegar a la fila H, se tomó 100  $\mu$ L de la mezcla homogénea y se desechó, por último se añadió 60  $\mu$ L del inóculo

para obtener un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , en la columna 7 se colocó dimetilsulfóxido más medio de cultivo como control negativo de crecimiento bacteriano y en la columna 8 un control de crecimiento bacteriano en donde se añadió DMSO más medio de cultivo más el inóculo de microorganismo respectivo (Anexo 6) (Sánchez et al., 2016) (Veloz, 2018).

Para impedir la evaporación del medio de cultivo, las placas de microdilución se sellaron con plástico adhesivo luego fueron incubadas, a una temperatura de  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas para bacterias y a una temperatura de  $25 \pm 2$  °C para levaduras. La incubadora rotatoria marca TECNAL, modelo TE-420 y agitación de 40 rpm se empleó para bacterias y mientras que para las levaduras se utilizó se utilizó una incubadora marca MEMMERT sin agitación, durante 48 horas (Disk, 2006).

#### **2.9.4 Elaboración del colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)**

El colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) fue preparado 24 horas antes de adicionarse al ensayo, para lo cual se pesó en la balanza analítica 0,1 g del reactivo y fue diluido en 10 mL de agua destilada previamente esterilizada, la solución se mantuvo en refrigeración, debido a la reacción que la luz o el calor pudieran ocasionar.

Concluido el tiempo de incubación de las microplacas, se añadió 40  $\mu\text{L}$  del colorante en cada pocillo y se incubó por 30 minutos según los requerimientos de los microorganismos, las bacterias fueron incubadas con agitación (Can Başer & Buchbauer, 2015).

### 2.9.5 Valoración de las placas

La lectura de las absorbancias de las microplacas se realizó en el equipo Microplate Reader a una longitud de onda de 405 nm.

### 2.9.6 Análisis de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

El MIC fue valorado mediante la técnica de micro dilución en placa la cual ayuda a determinar la inhibición bacteriana del aceite esencial al 5 %, frente al control sintético y control natural, los valores obtenidos son expresados en  $\mu\text{g/mL}$ .

Can, Başer & Buchbauer en el 2015, interpretan los valores obtenidos en unidades de  $\mu\text{g/mL}$  evaluando las filas de los pocillos una vez agregado el colorante de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) bajo las cuantificaciones que se observan en la Tabla 3, con una modificación debido a que el aceite en estudio presenta parámetros menores de  $500 \mu\text{g/mL}$ , que es el valor establecido.

Tabla 3.

Valores de la concentración mínima inhibitoria en  $\mu\text{g/mL}$

MIC	Código	$\mu\text{g/mL}$
Muy Fuerte	MF	$\text{MIC} < 500$
Fuerte	F	$\text{MIC} \geq 500$
Moderada	M	$500 > \text{MIC} < 5000$
Débil	D	$5000 > \text{MIC} < 20000$
Ausente	A	$\text{MIC} > 20000$

Elaborado por: Las autoras, 2020

Para conocer la concentración de cada pocillo, una vez determinada la concentración de la comuna A se divide a la mitad continuamente haciendo uso del método de microdilución en caldo.

Con la absorbancia obtenida se determinó el porcentaje de inhibición empleando la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{\text{absorbancia del medio y bacteria} - \text{absorbancia de la muestra}}{\text{absorbancia del medio y bacteria}} \times 100$$

### **2.9.7 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos fueron examinados en el software estadístico Infostat además se realizó un diagrama de perfil multivariado y un gráfico de sectores, para el estudio de la actividad de captación de radicales libres se empleó una prueba de valores independientes U Mann Whitney con un nivel de significancia de 0,05.

## Capítulo 3

### Resultados y Discusión

#### 3.1 Rendimiento de la Extracción de aceite esencial por hidrodestilación

El rendimiento del aceite esencial obtenido a partir de 50 g de material vegetal seco de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell en 500 mL de agua destilada fue de  $0,722 \% \pm 0,097$ .

El rendimiento obtenido del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell se considera como bajo, tomando en cuenta que el promedio general de rendimiento de aceites esenciales oscila entre el 1 y 3 % (Muñoz, Stashenko & Reyes, 2007).

#### 3.2 Determinación de parámetros físicos del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L. f.)

Schinz & Thell

Generalmente los aceites esenciales refractan la luz monocromática, por lo que el índice de refracción es una característica de los aceites que ayuda al control de su pureza, su densidad es normalmente menor que la del agua, con algunas excepciones (Bandoni, 2003), en la tabla 4, se detalla los parámetros físicos del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell, su densidad es menor que 1 g/mL por lo que cumple con lo establecido para aceites esenciales.

Tabla 4.

Parámetros físicos del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell

<b>Índice de refracción</b>	1.285±0.005
<b>Densidad</b>	0.676 g/mL ±0.002

Elaborado por: Las autoras, 2020

### 3.3 Composición química del aceite por cromatografía de gases acoplada a masas

En el estudio de Composición Química del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L. f.) Shinz & Thell se identificaron 40 compuestos. Las moléculas principales encontradas fueron  $\alpha$ -tujeno (16,69 %),  $\alpha$ -pineno (25,34 %),  $\beta$ -pineno (8,11 %), mirceno (4,43 %), cimeno<para> (4,28 %), D-limoneno (4,04 %),  $\beta$ -felandreno (4,44 %), (z)- $\beta$ -ocimeno (4,39 %),  $\gamma$ -terpineno(2,32 %), (E)-cariofileno (4,28 %),  $\alpha$ -copaeno (2,07 %),  $\alpha$ -farneseno (2,10 %) y  $\delta$ -amorfenno (2,46 %) (Observar Tabla 5).

Tabla 5.

Composición química del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell.

Compuesto	IK	IK	RDA%
	Teórico	Experimental	
$\alpha$ -tujeno	924	921	16,69±0,35
$\alpha$ - pineno	932	936	25,34±0,25
canfeno	954	943	0,69±0,03
sabineno	975	972	0,93±0,02
$\beta$ - pineno	979	976	8,11±0,40
mirceno	990	988	4,43±0,04
$\alpha$ - felandreno	1002	1006	1,32±0,01
No identificado	-	1015	0,83±0,06
Cimeno<para>	1024	1023	4,28±0,22
D-limoneno	1029	1026	4,04±0,21
$\beta$ -felandreno	1029	1028	4,44±0,22
(z)-beta-Ocimeno	1032	1016	4,39±0,22
$\gamma$ -terpineno	1059	1054	2,32±0,06
No identificado	-	1065	0,27±0,01
No identificado	-	1150	0,40±0,02
terpinen 4-ol	1174	1190	0,62±0,03
$\alpha$ -terpineol	1186	1180	0,29±0,01
$\alpha$ -cubebeno	1351	1352	0,57±0,02
$\alpha$ -copaeno	1376	1377	2,07±0,05
No identificado	-	1380	0,29±0,01
(E)-cariofileno	1417	1415	4,28±0,22
Aromadendreno	1441	1442	1,06±0,05
Prezizaeno	1444	1450	0,29±0,01

<b><math>\alpha</math>-humuleno</b>	1452	1462	0,22±0,01
<b><math>\gamma</math>-muroleno</b>	1479	1477	0,82±0,04
<b><math>\alpha</math>-muroleno</b>	1500	1501	0,26±0,01
<b>viridiflorol</b>	1496	1485	0,34±0,01
<b><math>\alpha</math>-farneseno</b>	-	1500	2,10±0,01
<b>(E,E)-<math>\alpha</math>-farneseno</b>	1505	1508	0,89±0,04
<b><math>\alpha</math>-muroleno</b>	1500	1515	0,39±0,01
<b>No identificado</b>	-	1524	0,97±0,05
<b>delta-amorfeno</b>	1511	1539	2,46±0,12
<b>No identificado</b>	-	1593	0,74±0,04
<b>Óxido de cariofileno</b>	1583	1584	0,51±0,03
<b>Aromandendreno</b>	1441	1450	0,66±0,03
<b>Alo-aromadendrenoepoxide</b>	1460	1457	0,37±0,05
<b>cis-muurolo-3,5-dieno</b>	1450	1447	0,37±0,01
<b>Copaeno</b>	-	1505	0,34±0,01
<b>No identificado</b>	-	1508	0,31±0,00
<b>Cubebol</b>	1514	1512	0,30±0,01
<b>Porcentaje identificado</b>		96,19	
<b>Porcentaje no identificado</b>		3,81	

Elaborado por: Las autoras, 2020

En estudios anteriores de composición química del aceite esencial de *Dalea strobilacea* Barney se encontraron a  $\alpha$ -Pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ - felandreno y cadineno como componentes mayoritarios (Lucero et al., 2005). Numerosos estudios indican composiciones similares en especies como *Dalea formosa* Torr y *Dalea carthagenensis*, donde el  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -pineno son los constituyentes más abundantes (Muñoz et al., 2019) (Villa et al., 2017).

En el aceite esencial de *Dalea foliolosa*, Benites y colaboradores, en el 2016, encontraron que el Linalool y Geranial son los componentes principales mientras que el  $\beta$ -pineno y  $\alpha$ -felandreno son sus componentes minoritarios (Villa et al., 2017). El aceite esencial de *Dalea pazensis* Rusby está constituido mayoritariamente por  $\beta$ -cariofileno y óxido de cariofileno (Santi et al., 2017).

### 3.4 Comparación de la capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial mediante el método del DPPH y ABTS

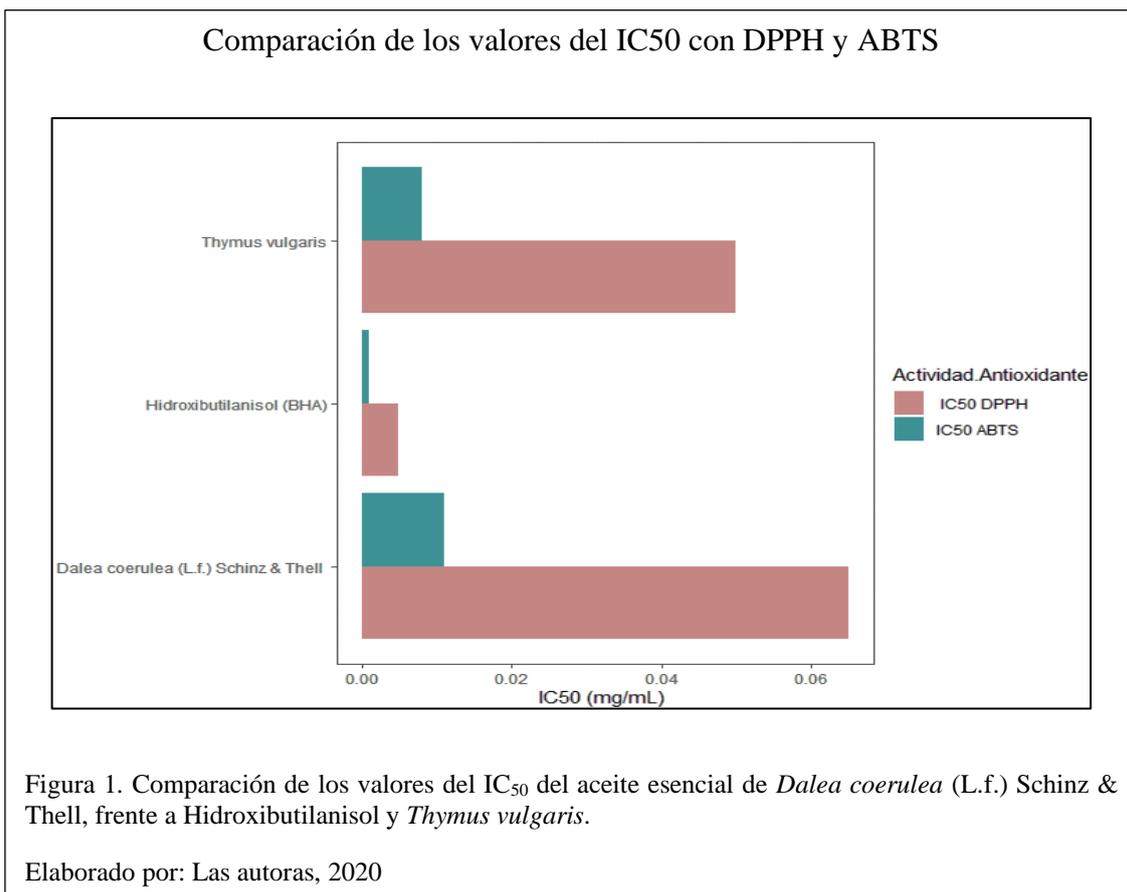
Los valores del IC<sub>50</sub> se obtuvieron interpolando datos al 50 % de la inhibición a partir de la ecuación de regresión lineal o logarítmica de los datos obtenidos de las curvas de inhibición (Anexo 7). Los IC<sub>50</sub> representan la concentración de antioxidante capaz de reducir el 50 % de DPPH y ABTS. Los IC<sub>50</sub> obtenidos de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, fueron evaluados frente al control positivo Hidroxibutilanisol (BHA) y al referente natural *Thymus vulgaris* (Observar tabla 6 y figura 1).

Tabla 6.

Comparación de los valores del IC<sub>50</sub> obtenidos mediante el Método del DPPH y ABTS

	<b>IC<sub>50</sub> DPPH (mg/mL)</b>	<b>IC<sub>50</sub> ABTS (mg/mL)</b>
<i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Schinz & Thell	0,065 ± 0,001	0,011 ± 0,001
Hidroxibutilanisol (BHA)	0,005 ± 0,0008	0,001 ± 0,0002
<i>Thymus vulgaris</i>	0,050 ± 0,001	0,008 ± 0,002

Elaborado por: Las autoras, 2020



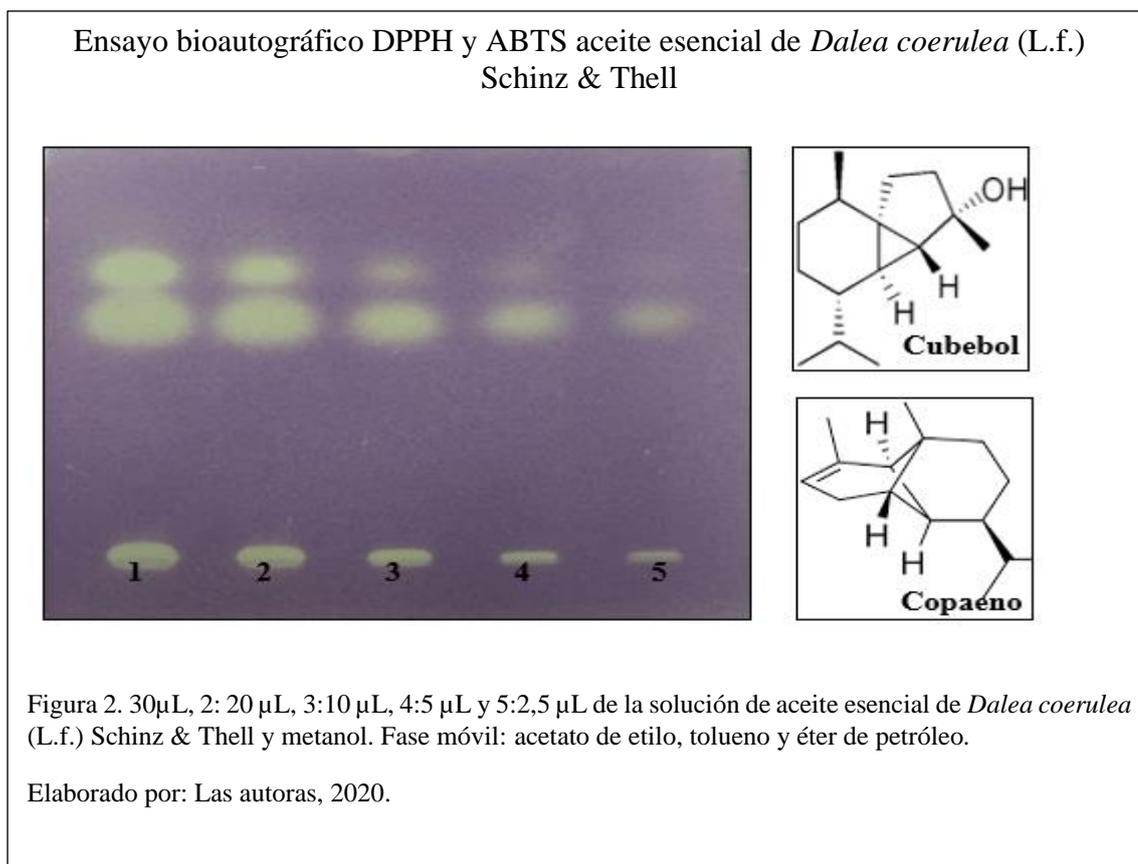
Cuando existe una alta concentración del aceite esencial el porcentaje de inhibición aumenta, estableciendo una relación directamente proporcional entre concentración y porcentaje de inhibición de los aceites esenciales, por otro lado, la capacidad de captar radicales libres es mayor, cuando el valor del IC<sub>50</sub> es menor, es decir existe una relación inversamente proporcional, en la tabla 6 y en la figura 1 se observa que *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell presenta una capacidad menor de captar radicales disponibles en comparación con el referente natural *Thymus vulgaris*. Para evidenciar si existe diferencia significativa entre la actividad antioxidante del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell y el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se realizó una prueba estadística para muestras independientes U de Mann-Whitney, el p valor obtenido es mayor a 0,05 es decir que la hipótesis planteada se acepta demostrando que la diferencia significativa entre el valor del IC<sub>50</sub> obtenidos del método DPPH

y ABTS (Anexo 11) para los aceites analizados es nula, es decir que la actividad antioxidante es similar en ambos aceites.

### 3.5 Ensayo bioautográfico antirradical HPTLC con DPPH y ABTS

Los resultados revelaron una alta actividad antioxidante del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, correspondiente a la fracción con  $R_f = 0,5125$  y  $R_f = 0,5875$  donde encontramos copaeno y cubebol respectivamente.

El cubebol y el copaeno son sesquiterpenos de 15 átomos de carbono derivados biosintéticamente de farnesilpirofosfato (FPP) (Martínez, 2003); según, Abuashwashi en su estudio realizado en el 2018, los terpenos actúan como antioxidantes debido a sus radicales hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) que toman radicales disponibles responsables de la oxidación (Gutiérrez, 2002)



Ensayo bioautográfico de DPPH y ABTS aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell

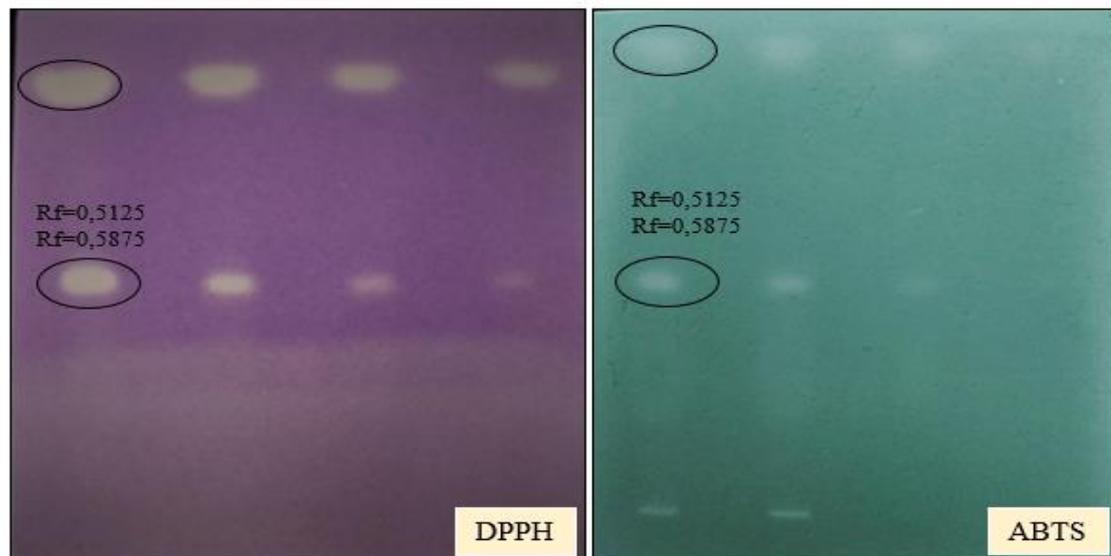


Figura 3. Ensayo bioautográfico de DPPH y ABTS del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell. fase móvil: hexano.

Elaborado por: Las autoras, 2020

### 3.6 Método de dilución o micro-dilución en caldo para determinar la actividad antimicrobiana

La concentración mínima inhibitoria expresada en  $\mu\text{g/mL}$ , se determinó por la técnica de micro dilución, misma que permite la determinación de concentraciones del aceite esencial de *Dalea coerulea*, que inhiben el crecimiento de los microorganismos y fueron comparadas con dos controles. Según Mahon Lehman, & Manuselis, (2015), el revelado de la concentración mínima inhibitoria se efectúa con empleo de colorantes como TTC.

En la Tabla 7 se observan las diferentes concentraciones mínimas inhibitorias junto con su respectivo porcentaje de inhibición obtenidos frente a los microorganismos de estudio, además

se detalla el código planteado por Can Başer & Buchbauer en el 2015 empleados para categorizar el nivel de actividad antimicrobiana del aceite esencial de *D. coerulea*

Tabla 7.

Porcentaje de inhibición y MIC del aceite esencial de *D. coerulea* y controles para los microorganismos de estudio

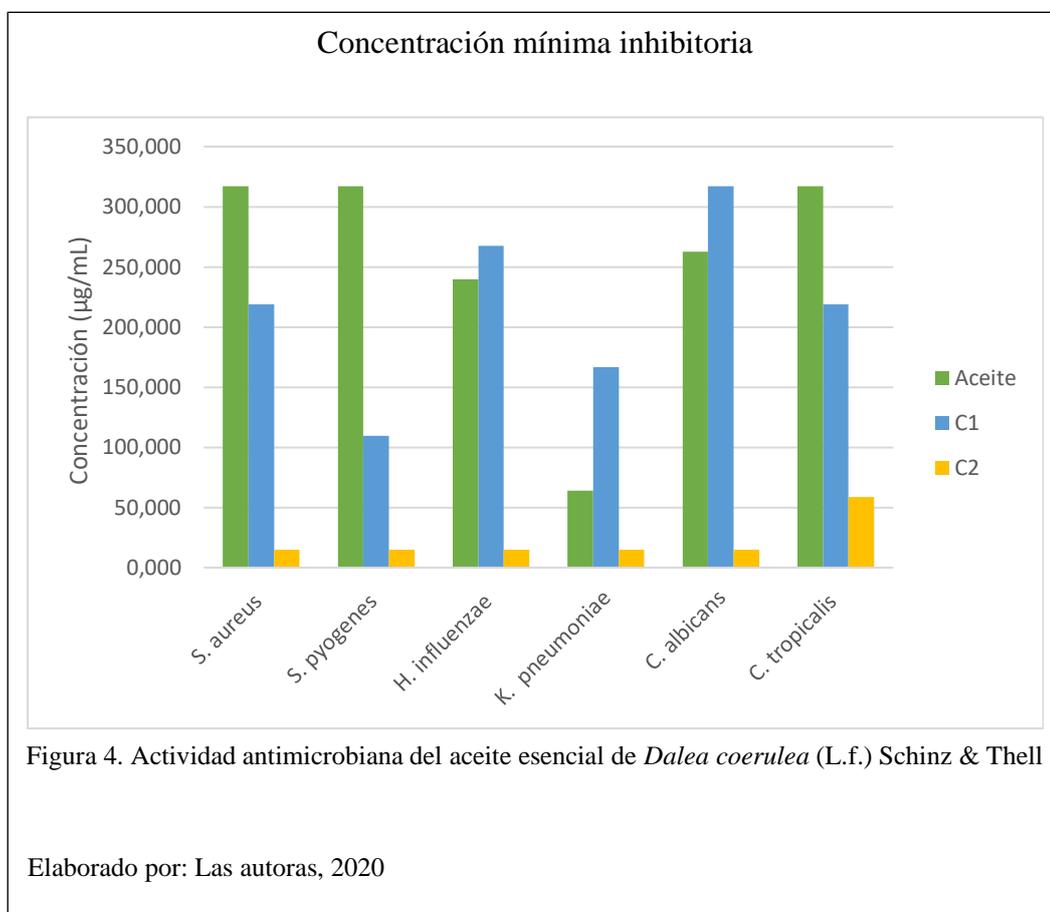
Microorganismo	Aceite esencial <i>D. coerulea</i>			C1			C2		
	MIC (µg/mL)	% Inh	Código	MIC (µg/mL)	% Inh	Código	MIC (µg/mL)	% Inh	Código
<i>S. aureus</i>	316,969	45,34	MF	218,906	38,58	MF	14,648	60,81	MF
<i>S. pyogenes</i>	316,969	45,37	MF	109,453	58,32	MF	14,648	50,00	MF
<i>H. influenzae</i>	239,665	40,00	MF	267,342	40,00	MF	14,648	61,15	MF
<i>K. Pneumoniae</i>	64,138	40,10	MF	166,791	40,01	MF	14,648	44,29	MF
<i>C. albicans</i>	262,719	40,00	MF	317,136	40,00	MF	14,648	56,07	MF
<i>C. tropicalis</i>	316,969	42,16	MF	218,906	39,18	MF	58,594	44,05	MF

**Nota:** Código de inhibición; (MF) Muy fuerte; (C1) Control Natural; (C2) Control sintético.

Elaborado por: Las autoras, 2020

Como se puede observar en la tabla 7. El aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, en general presenta una inhibición microbiana categorizada como muy fuerte (MF), debido a que, considerando la concentración mínima inhibitoria en todos los casos es inferior a 500 µg/mL, en un rango aproximado de 260 a 320 µg/mL para la mayoría de los microorganismos excepto para *K. pneumoniae*, en donde la concentración necesaria es de 64,138 µg/mL. Con todos los microorganismos evaluados el porcentaje de inhibición supera el 40 % lo que corrobora con la alta capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell.

En la figura 4, se representa la comparación de las concentraciones mínimas inhibitorias del aceite esencial de *D. coerulea* y los dos controles empleados frente a cada microorganismo.



La alta inhibición presentada del aceite esencial de *D. coerulea* frente a los diferentes microorganismos concuerdan con la investigación realizada por Villa, Pacheco, Rubio, Zarate, Lozoya & Cruz (2017) en *Dalea foliosa*, en donde se señala un MIC de 85 µg/mL por lo que se concluye que se puede contemplar el posible uso del aceite esencial para el control biológico de las variedades bacterias con *Pseudomonas syringae*.

Como control natural, se utilizó Terpineol al 5 % el cual reflejo una gran activada antimicrobiana, con una MIC no mayor a 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y porcentajes de inhibición alrededor del 40% para todos los microorganismos, siendo *S. aureus* la bacteria que presenta mayor resistencia ante este. El Terpinen-4-ol, es utilizado como control debido a su elevada capacidad inhibitoria como lo menciona Ossa-Tabares, Lanos & García, (2020) en donde indica que el compuesto que favorece la actividad antimicrobiana.

Los controles sintéticos empleados para bacterias Gram negativas: ampolla de gentamicina (20 mg/2 mL), bacterias Gram positivas: eritromicina (500 mg) y para Levaduras: clotrimazol (500 mg) demuestran ser altamente efectivos, como se observa en la tabla 15 la MIC obtenida resulta ser a concentración de 14,67  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con excepción de *C. tropicalis* en donde se obtuvo una MIC de 58,59  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que, si bien es una concentración mayor a la de las otras MIC resultantes, su código de clasificación es muy efectiva (MF). Es importante mencionar que 14,67  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de control sintético es la dosis mínima utilizada en el estudio, sin embargo, el porcentaje de inhibición es elevado.

Un estudio realizado por Córdor & Portero (2014), en donde se analizó la capacidad expectorante de *D. coerulea*, menciona la presencia de aceite esencial en la especie, además indica que sus componentes son eficientes para utilizalos en infecciones del aparato respiratorio, los cuales se ven ocasionados por bacterias, virus u hongos (Alois & Wagner, 2010)

## Conclusiones

En el aceite esencial obtenido de las hojas de *Dalea coerulea* (L. f.) Shinz & Thell, los compuestos que se encontraron mayoritariamente son,  $\beta$ -pineno, felandreno y  $\alpha$ -pineno, los cuales son prominente en el género *Dalea*. Los pinenos son moléculas conocidas como antibacterianos en enfermedades respiratorias y también se les atribuye propiedades expectorantes, lo que confirmaría su empleo tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias.

Se concluye que existe actividad antioxidante, en donde estadísticamente que no existe diferencia significativa frente al aceite esencial del referente natural *Thymus vulgaris*. La capacidad antioxidante presentada corresponde, según lo indica el ensayo bioautográfico antirradical al copaeno y cubebol, moléculas con alta capacidad de captación de radicales libres y a compuestos presentes mayoritariamente.

La capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell presenta una inhibición de los diferentes microorganismos analizados, esto se complementa con los estudios realizados en las flores de esta especie por De la Cruz, Ulloa & Noriega en el 2020, la investigación fue realizada en la Universidad Politécnica Salesiana, evidenciando la capacidad de la especie de ser empleadas en enfermedades del sistema respiratorio.

## **Recomendaciones**

Promover el uso abundante material vegetal previo a la extracción del aceite esencial, para obtener suficiente muestra de estudio y así no interrumpir el desarrollo de la investigación.

Ejecutar de forma meticulosa la destilación por arrastre de vapor para la obtención del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L. f.) Shinz & Thell, controlando tiempo y temperatura, con la finalidad de no afectar propiedades del mismo que se pueden ver modificadas con la temperatura u otros factores.

Valorar las sustancias con potencial antioxidante mediante metodologías distintas, con el propósito de destacar una sustancia antioxidante de manera efectiva.

### Bibliografía

- Abuashwashi, M. (2018). Estudio analítico y de la actividad antioxidante de *Rosmarinus officinalis L.* de la península Ibérica.
- Adams, R. P. (2012). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24(6), 594. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083116584>
- Alois, D., & Wagner, G. (2010). Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Enciclopedia de Salud y Seguridad En El Trabajo.
- Álvarez, M., Castro, R., Abdo, A., Orta, S., Gómez, M., & Álvarez, M. (2008). Infecciones respiratorias altas recurrentes: Algunas consideraciones. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21252008000100011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252008000100011)
- Arango, A., & González, J. (2010). Flavanonas preniladas de dalea caerulea. *Revista Colombiana de Química*, 23(2), 1–7.
- Araujo, L., Vimos, K., Cruz, R., Falconí, F., Rojas, L., & González, A. (2019). Componentes químicos y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lasiocephalus ovatus* (Asteraceae) que crece en Ecuador. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 22–28. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75728>
- Argote, F., Suarez, Z., Tobar, M., Perez, J., Hurtado, A., & Delgado, J. (2017). Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Capacidade de avaliação inibitório de óleos essenciais em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)EdiciónEspecialn2.578](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)EdiciónEspecialn2.578)
- Avello, L., & Cisternas, F. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Medica de Chile*, 138(10), 1288–1293. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872010001100014>

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bandoni, A. (2003). *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica cyted ciencia y tecnologia para el desarrollo (segunda)*.
- Belofsky, G., Aronica, M., Foss, E., Diamond, J., Santana, F., Darley, J., Dowd, P. F., Coleman, C. M., & Ferreira, D. (2014). Antimicrobial and antiinsectan phenolic metabolites of *Dalea searlsiae*. *Journal of Natural Products*, 77(5), 1140–1149. <https://doi.org/10.1021/np401083g>
- Belofsky, G., Aronica, M., Foss, E., Diamond, J., Santana, F., Darley, J., Dowd, P. F., Coleman, C. M., & Ferreira, D. (2015). Antimicrobial and antiinsectan phenolic metabolites of *Dalea searlsiae*. *Journal of Natural Products*, 77(5), 1140–1149. <https://doi.org/10.1021/np401083g>
- Belofsky, G., Carreno, R., Goswick, S. M., & John, D. T. (2006). Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. *Planta Medica*, 72(4), 383–386. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916252>
- Belofsky, G., Carreno, R., Lewis, K., Ball, A., Casadei, G., & Tegos, G. P. (2006). Metabolites of the “Smoke Tree”, *Dalea spinosa*, Potentiate Antibiotic Activity against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products*, 69(2), 261–264. <https://doi.org/10.1021/np058057s>
- Benites, J., Moiteiro, C., Figueiredo, A., Rijo, P., Calderon, P., Bravo, F., Gajardo, S., Sánchez, I., Torres, I., & Ganoza, M. (2016). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of essential oil of peruvian *Dalea strobilacea* Barneby. *Biotechnology(Faisalabad)*, 1(1). <https://doi.org/10.3923/biotech.2002.45.48>

- Bermúdez, M., Granados, F., & Molina, A. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Psidium guajava* and *Cymbopogon citratus*. *Agronomy Mesoamerican*, 30(1), 147–163. <https://doi.org/10.15517/am.v30i1.33758>
- Bertrand, J. C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., & Sime-Ngando, T. (2015). Environmental microbiology: Fundamentals and applications. In *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9118-2>
- Boire, N., Riedel, S., & Parrish, N. (2013). Essential Oils and Future Antibiotics: New Weapons against Emerging ‘Superbugs’? *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, 01(02), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000105>
- Boom, E., Orozco, J., Alean, J., & Rojano, B. (2018). Evaluación de la Actividad Antioxidante de Aceites Esenciales de Eucaliptos Cultivados en Colombia. *Scielo*, 29(6), 57–66. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v29n6/0718-0764-infotec-29-06-00057.pdf>
- Cabrera, J. L., & Perez, C. (2013). Flavonoides prenilados como potenciales componentes de medicamentos Peralta M A 1 ; Cabrera J L 1 ; Pérez C 2 \*. April 2017.
- Can Başer, K. H., & Buchbauer, G. (2015). Handbook of essential oils: Science, technology, and applications, second edition. In *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition*. <https://doi.org/10.1201/b19393>
- Canella, E. (2016). Aceites, aromas, esencias, sales de baño. In Vecchi.
- Cañigueral, S. (2003). La Fitoterapia: ¿ una terapéutica para el tercer milenio? [www.fitoterapia.net](http://www.fitoterapia.net)
- Cao, G., Alessio, H., & Cutler, R. (1993). Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. In *Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 14).

- Casamayor, P., Campos, P., Esperanza, Y., Guerrero, M., Coloma, C., & Heredia, G. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *Medisan*, 18(10), 1467–1474.
- Castro, E. (2013). Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de las Hojas y Flores de Iso (*Dalea mitisii*). <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2555>
- Colorado, J., Galeano, E., & Martínez, A. (2007). Desarrollo de la Bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*.
- Cóndor, G., & Portero, F. (2014). Evaluación de la actividad expectorante de Molle (*Schinus molle* L.), Iso (*Dalea coerulea*), Jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), Jengibre (*Zingiber officinale*), Romero (*Rosmarinus officinalis*), Marrubio (*Marrubium vulgare*), en ratones (*Mus musculus*). Facultad de Ciencias, Bachelor, 85. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3492/1/56T00457UDCTFC.pdf%0Ahttp://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/3492>
- Coronel, C., Huerta, Y., & Ramos, O. (2018). Factores de riesgo de la infección respiratoria aguda en menores de cinco años. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552018000200009](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552018000200009)
- De la Cruz, A., Ulloa, N., & Noriega, P. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides presentes en las flores de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell. Tesis, 1–112. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18443>
- Deardorff, K., Ray, W., Winterstein, E., Brown, M., McCornack, J., Cardenas-Garcia, B., Jones, K., McNutt, S., Fulkerson, S., Ferreira, D., Gény, C., Chen, X., Belofsky, G., & Dondji, B. (2016). Phenolic Metabolites of *Dalea ornata* Affect Both Survival and Motility of the Human Pathogenic Hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *Journal of*

- Natural Products, 79(9), 2296–2303. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00444>
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>
- Disk, L. (2006). Aseguramiento de la Calidad , Servicios y Garantías Informaciones Sobre Cultivos de Material de Referencia Informaciones Sobre Láminas Microbiológicas Informaciones Sobre Microorganismos Ensayados para el Control ÍNDICE Informaciones Sobre Microorganismos.
- Dreyer, D. (1978). Dalrubones and coumarins in *Dalea tinctoria*. *Phytochemistry*, 17(3), 585. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89385-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89385-1)
- Dreyer, D., Munderloh, K., & Thiessen, W. (1975). Extractives of *Dalea* species (Leguminosae). *Tetrahedron*, 31(4), 287–293. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(75\)80035-4](https://doi.org/10.1016/0040-4020(75)80035-4)
- Echeverri, L., & Cataño, J. (2010). *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: epidemiology and drug resistance. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-07932010000300006](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000300006)
- Esquivel, M., & Bernardo, G. (1993). El uso de fluidos supercríticos en la industria de aceites alimentarios. *Grasas y Aceites*, 44(1), 1–5. <https://doi.org/10.3989/gya.1993.v44.i1.1112>
- Fabricant, D., & Farnsworth, N. (2001). The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109(March), 69. <https://doi.org/10.2307/3434847>
- Fang, B., Xiao, Z., Qiu, Y., Shu, S., Chen, X., Chen, X., Zhuang, F., Zhao, Y., Liang, G., & Liu, Z. (2019). Synthesis and Anti-inflammatory Evaluation of (R)-, (S)-, and (±)-

- Sanjuanolide Isolated from *Dalea frutescens*. *Journal of Natural Products*, 82(4), 748–755.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00596>
- Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., Smadja, J., & Chemat, F. (2006). An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.030>
- Fernández, S., Villaño, D., Troncoso, A., & García, C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222006000200002](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222006000200002)
- Fonseca, V., Pérez, X., Ramirez, L., & Hevia, E. (2013). Relación entre las infecciones respiratorias agudas altas y el asma bronquial Relationship between Acute High Respiratory Infections and Asthma. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 29(3), 297–305. <http://scielo.sld.cu>
- Galeano, F., Sanabria, G., Lovera, D., Araújo, P., Irala, J., Guillén, R., Rodríguez, D., & Arbo, A. (2015). Caracterización molecular de caso fatal por *Streptococcus pyogenes*. *Rev. Inst. Med. Trop*, 10(2), 26–30. <https://doi.org/10.18004/imt/201510226-30>
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832016000400002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1025-55832016000400002&script=sci_arttext)
- Gibrán, N., Sumaya, M., Jiménez, E., Balois, R., Medina, R., & Guzmán, J. (2017). Propiedades antimicrobianas y antioxidantes de Jamaica Antimicrobial and antioxidant properties of roselle calyces. 3(3), 61–69.
- Gil, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia

a metilina.

- González, A., Nieves, B., Solórzano, M., Cruz, J., Puig, J., & Moreno, M. (2013). Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of two intensive care units. [www.sochinf.cl](http://www.sochinf.cl)
- Granados, C., Yáñez, X., & Acevedo, D. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). *Información Tecnológica*, 25(3), 11–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300003>
- Grief, S. (2013). Respiratory infections. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 40(3), 757–770. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2013.06.004>
- Gutiérrez, J. (2002). Daño oxidativo , radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Med Milit*, 31(2), 126–133.
- Hansen, N. (2019). The Chemical Analysis and Biological Activities of the Secondary Metabolites from *Dalea mollis* and *Dalea albiflora*. <https://digitalcommons.cwu.edu/etd/1197>
- Hernández, P. (2013). Actividad antioxidante de *Asclepias curassavica* L., en un modelo de cáncer.
- Herrera, M. (2000). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461999000100010](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010)
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W., & Tamariz, J. (2012). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, 16(1), 39. <https://doi.org/10.20453/rmh.v16i1.862>

- Kumar, S., Sharma, S., & Vasudeva, N. (2017). Review on antioxidants and evaluation procedures. *Review on Antioxidants and Evaluation Procedures*, 125001, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11655-017-2414-z>
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., & Roseane, F. (2009). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, 23(3), 181–183. <https://doi.org/10.1007/s10877-009-9165-0>
- León, G., Del Rosario, M., & Martínez, S. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4), 742–750. <http://scielo.sld.cu>
- León, H. (2010). Inventario florísticos del sector de Buga bajo del bosque de Paquiestancia Cayambe- Ecuador 2008 (Vol. 21).
- León Méndez, G., Osorio Fortich, M. del R., Torrenegra, M. E., & González, J. G. (2015). Extraction, characterization and antioxidant activity of essential oil from *Plectranthus amboinicus* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(4), 708–718.
- Llacuna, L., & Mach, N. (2012). Papel de los antioxidantes en la prevención del cáncer. *Revista Espanola de Nutricion Humana y Dietetica*, 16(1), 16–24. [https://doi.org/10.1016/S2173-1292\(12\)70067-4](https://doi.org/10.1016/S2173-1292(12)70067-4)
- Londoño, J. (2013). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. 129–162.
- López, G., & Gavara, R. (n.d.). Dilución de agar - una visión general. ScienceDirect. Retrieved June 30, 2020, from <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/agar-dilution>

- Lopez, M. (2019). Los aceites esenciales. *Ámbito Farmacéutico-Fitoterapia*, 23(7), 88–91.  
[http://es.labo-hevea.com/downloads/HE\\_es.pdf](http://es.labo-hevea.com/downloads/HE_es.pdf)
- Lorenzo, M., Frías, A., Villa, P., & Del Valle, M. (2006). Detección por cromatografía de capa fina (CCF) de metabolitos antifúngicos producidos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS. Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar (ICIDCA).
- Lucena, M. E., Escalante, M., González, V., Rojas, L., Cordero, Y., Ustáriz, F., Carmona, J., & Torres, S. (2019). Composición y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) King & Robinson (Asteraceae) Composition and antibacterial activity of *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) King and Robinson (Asteraceae) essential. *Revista Cubana de Farmacia.*, 52(4), 1–16.
- Lucero, M. E., Estell, R. E., & Sedillo, R. L. (2005). The Composition of *Dalea formosa* Oil Determined by Steam Distillation and Solid-Phase Microextraction. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 645–647. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9699022>
- Mahon, C., Lehman, D., & Manuselis, G. (2015). *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th edition. Clinical Research and Leadership Faculty Publications.  
[https://hsrc.himmelfarb.gwu.edu/smhs\\_crl\\_facpubs/37](https://hsrc.himmelfarb.gwu.edu/smhs_crl_facpubs/37)
- Martínez, A. (2003). Aceites Esenciales. Universidad de Antioquia, 1–33.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278.  
<https://doi.org/10.3305/nutr>
- Matiz, G., León, G., & Osorio, M. (2015). Actividad antibacteriana in vitro de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(1),

103–116.

Medina, D., Machado, M., & Machado, J. (2015). Resistencia a antibióticos, una crisis global.

<http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122->

06672015000100013&script=sci\_arttext&tlng=pt

Medina, J. P., & Lozano, J. J. (2016). Muestra De Yogurt Por Cromatografía En Capa Fina.

Mendoza, D., Parra, L., & Loza, S. (2014). Capacidad captadora de radicales libres del aceite

esencial y extractos etanólicos de yacón ( smallanthus free radical scavenging capacity of

essential oil and ethanolic extracts of yacón ( Smallanthus sonchifolius Poepp . & Endl )

H . Robinson ., 13(2), 9–23.

Mesa, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez, J., Trujillo, S., & Rojano, B. (2010). Antioxidant

activity and total phenols content from some species of Calophyllum genus. Revista

Cubana de Plantas Medicinales, 15(2), 13–26.

Miranda, M., & Hall, M. (2012). Estudio de la composición química de la especie *Commelia*

*erecta* L., procedente de Ecuador.

<http://revistas.ulvr.edu.ec/index.php/yachana/article/view/173/133>

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for

estimating antioxidant activity.

Montes de Oca Márquez, C., Hernández Delgado, C. T., Orozco Martínez, J., García Bores, A.

M., Ávila Acevedo, J. G., Ortiz-Melo, M. T., Peñalosa Castro, I., López Moreno, G., &

Serrano Parrales, R. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de dalea carthagenensis

(JACQ.) J. F. Macbr. Revista Fitotecnia Mexicana, 40(2), 161–168.

Muñoz, A., González, M., & Stashenko, E. (2019). Volatile Fractions and Essential Oils of the

Leaves and Branches of Dalea carthagenensis (Jacq.) J.F. Macbr. from Northern Region

- of Colombia. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 22(3), 774–788.  
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2019.1623720>
- Muñoz, A., Stashenko, E., & Reyes, J. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. [https://www.researchgate.net/publication/335336287\\_Composicion\\_y\\_capacidad\\_antiox idante\\_de\\_especies\\_aromaticas\\_y\\_medicinales\\_con\\_alto\\_contenido\\_de\\_TIMOL\\_Y\\_CARVACROL](https://www.researchgate.net/publication/335336287_Composicion_y_capacidad_antiox_idante_de_especies_aromaticas_y_medicinales_con_alto_contenido_de_TIMOL_Y_CARVACROL)
- Muñoz, G. C., Velázquez, M. E., Samaniego, J., Severino, E., Palacios, I., & Guillermo, C. (2014). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Anconcito. 120.
- Noriega, P. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales.
- Noriega, P., Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Ankuash, E., & Manfredini, S. (2019). Chemical Composition and Biological Activity of Five Rain Forest. *Molecules*, 24, 1–12.
- Noriega, P., Mosquera, T., Paredes, E., Parra, M., Zappia, M., Herrera, M., Villegas, A., & Osorio, E. (2018). Antimicrobial and antioxidant bioautography activity of bark essential oil from *ocotea quixos* (lam.) kosterm. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 31(2), 163–168. <https://doi.org/10.1556/1006.2018.31.2.11>
- Noriega, P., & Taco, A. (2018). La flora medicinal de los parques del distrito metropolitano de Quito.
- Olmsted, S., Zagurs, R., & Winter, L. (2002, April 12). Surface proteins of *Streptococcus pyogenes*. 2002.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). OMS | Medicina tradicional: definiciones.

Organización Mundial de La Salud.; World Health Organization.

Ortega, M., Peralta, M., Mariel, A., & Cabrera, J. (2011). Prenylated flavanones with anti-tyrosinase activity from *Dalea boliviana*. *Journal of Natural Products*, 74(2), 158–162. <https://doi.org/10.1021/np1004664>

Ossa-Tabares, J., Llanos, C., & García, A. (2020). Evaluación de las características fisicoquímicas y de la actividad antimicrobiana contra *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC®6919 del aceite de árbol de té (Tea tree oil) Evaluation. *Biomédica Revista Del Instituto Nacional de Salud*, 40(4), 1–27.

Panizo, M., & Reviákina, V. (2001). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562001000200011](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011)

Peralta, M., Santi, M., Cabrera, J., & Ortega, M. (2019). *Dalea* Genus, Chemistry, and Bioactivity Studies. In *Studies in Natural Products Chemistry* (1st ed., Vol. 62). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64185-4.00008-3>

Peredo, L., García, P., & López, M. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción.

Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*, 6(FEB), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00076>

Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>

Piñeros, L., & González, F. (2019). New species of *dalea* (leguminosae: Papilionoideae) from dry inter-andean valleys of southern Colombia and a key to identify the species of the genus in the country. *Caldasia*, 41(1), 215–223. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v41n1.75852>

- Prieto, A., De Ocampo, A., Fernández, A., & Pérez, M. (2008). El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v8n1/1405-888X-tip-8-01-38.pdf>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Quintero, A., Gonzalez, N., & Stashenko, E. (2004). Aceite esencial de las hojas de *Hyptis umbrosa* Salzm, extraído por diferentes técnicas. April 2017.
- Quizphe, A., Uphoff, E., Encalada, L., Andrade, D., & Francoise, B. (2013). Aplicación de la estrategia de Atención Integral de Enfermedades Prevalentes de la Infancia en Ecuador. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662013000200002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662013000200002)
- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 42, 263–268.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., & Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medicinal Research Reviews*, 23(4), 519–534. <https://doi.org/10.1002/med.10033>
- Rendón, S. (2016). Actividad antioxidante in vivo de licopeno del tomate, papaya y guayaba rosa. [http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1769/1/Actividad\\_antioxidante\\_licopeno\\_preencion\\_cancer\\_colorrecta.pdf](http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1769/1/Actividad_antioxidante_licopeno_preencion_cancer_colorrecta.pdf)
- Rodríguez, O., Andrade, W., & Diaz, F. (2015). Actividad antioxidante de extractos de hojas de *Bocconia frutescens* L . ( Papaveraceae ) Antioxidant activity of extracts from leaves of Bocconia. *Journal of Technology*, 14, 21–36.
- Rossi, D., Guerrini, A., Maietti, S., Bruni, R., Paganetto, G., Poli, F., Scalvenzi, L., Radice, M.,

- Saro, K., & Sacchetti, G. (2011). Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? *Food Chemistry*, 126(3), 837–848. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.042>
- Ruiz, C., Díaz, C., & Rojas, R. (2015). Composición Química De Aceites Esenciales De 10 Plantas Aromáticas Peruanas. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 81(2), 81–94. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v81i2.10>
- Sahadulla, M. (2018). Infections of the Respiratory System. In *Concise Handbook of Infectious Diseases* (pp. 65–65). Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. [https://doi.org/10.5005/jp/books/14120\\_12](https://doi.org/10.5005/jp/books/14120_12)
- Salehi, B., Upadhyay, S., Orhan, I. E., Jugran, A. K., Jayaweera, S. L. D., Dias, D. A., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., Cho, W. C., & Sharifi-Rad, J. (2019, November 1). Therapeutic potential of  $\alpha$ -and  $\beta$ -pinene: A miracle gift of nature. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110738>
- San Miguel, A., & Martin, F. (2009). Importancia de las especies reactivas al oxígeno (radicales libres) y los antioxidantes en clínica. *Gaceta Médica de Bilbao*, 106(3), 106–113. [https://doi.org/10.1016/s0304-4858\(09\)74661-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4858(09)74661-x)
- Sánchez, E., Castillo, S., & García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación En Plantas de Importancia Médica*, 77–100. <https://doi.org/10.3926/oms.334>
- Santi, M., Peralta, M., Mendoza, C., Cabrera, J., & Ortega, M. (2017). Chemical and bioactivity of flavanones obtained from roots of *Dalea pazensis* Rusby. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.058>
- Silva, A., Lopes, P., Azevedo, Alviano, C. & Alviano, D. (2012). Biological Activities of a-

- Pinene and  $\beta$ -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305–6316.  
<https://doi.org/10.3390/molecules17066305>
- Somogyi, T., Alfaro, W., Herrera, M., & Herrera, J. (1998). Infecciones del tracto respiratorio: etiología bacteriana y viral en una población pediátrica.  
[https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461998000100001](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461998000100001)
- Suárez, K. (2015). Estudio de los recursos fitoterapéuticos ancestrales para su conservación y aprovechamiento sostenible.  
[http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/11806/1/Suarez Rosales%2C Karen Stephanie- tesis.pdf](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/11806/1/Suarez%20Rosales%20Karen%20Stephanie-tesis.pdf)
- Torrenegra, M., Granados, C., Osorio, M., & León, G. (2015). Comparación de la hidro-destilación asistida por radiación de microondas (MWHD) con hidro-destilación convencional (HD) en la extracción de aceite esencial de *Minthostachys mollis*. *Informacion Tecnologica*, 26(1), 117–122. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000100013>
- Velasco, R., Villada, H., & Carrera, J. (2007). Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Informacion Tecnologica*, 18(1), 53–66. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642007000100009>
- Veloz, J. (2018). Evaluación de la composición química y actividad biológica del aceite esencial proveniente de las hojas de *Piper barbatumkunth* (cordoncillo).  
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16382/1/UPS-QT13502.pdf>
- Villa, N., Pacheco, Y., Rubio, E., Zarate, J., Lozoya, E., & Cruz, R. (2017). Chemical profile, nutraceutical and anti-phytobacterial properties of the essential oil from *Dalea foliolosa* (Fabaceae). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(9), 724–728.  
<https://doi.org/10.9755/ejfa.2017.v29.i9.99>

Zepeda, C. (2002). Bacteriología Clínica de *Haemophilus Influenzae*.

Zuza, D., Silva, W., & Chaves, G. (2017). An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 8, Issue OCT). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01927>

## Anexos

Anexo 1. Estructura botánica de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz&Thell



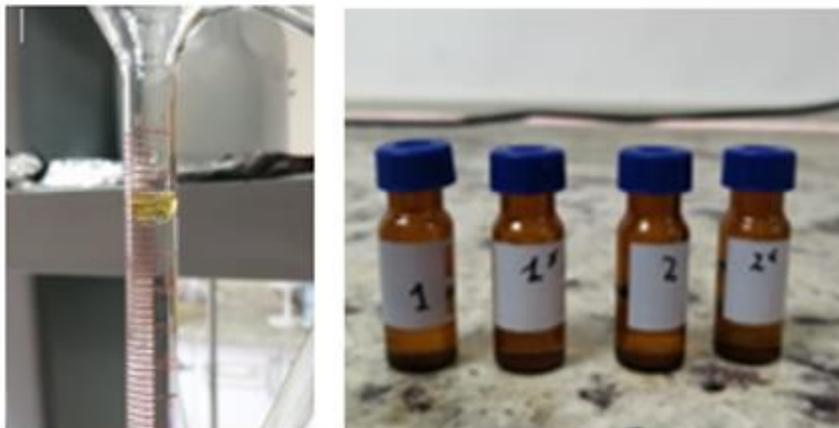
Elaborado por: Las autoras, 2020

Anexo 2. Secado y pesado del material vegetal del de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell.



Elaborado por: Las autoras, 2020

Anexo 3. Obtención del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz&Thell



Elaborado por: Las autoras, 2020

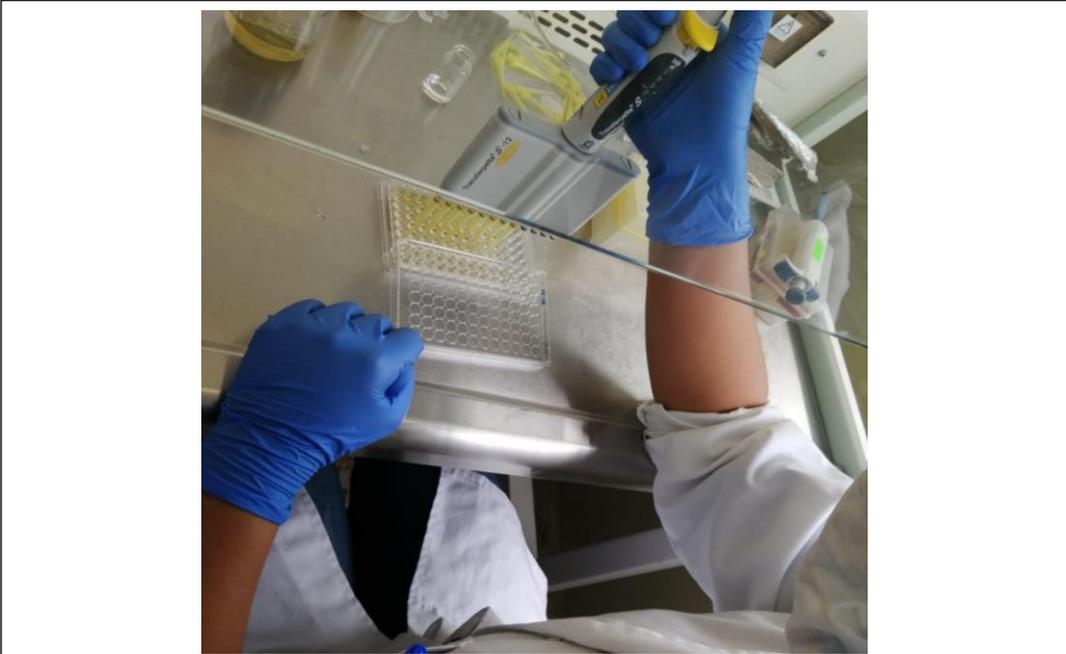
Anexo 4. Medición de la densidad del aceite esencial de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz&Thell



Anexo 5. Activación de cepas bacterianas y de levaduras



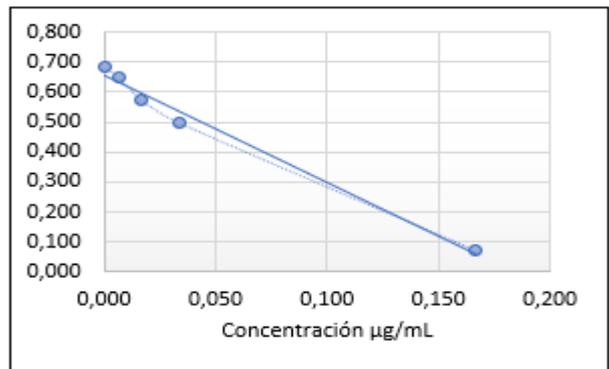
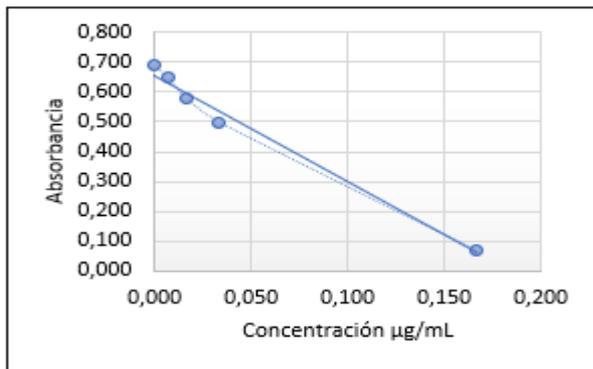
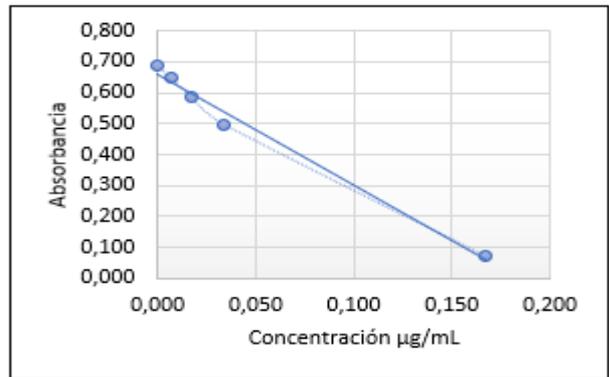
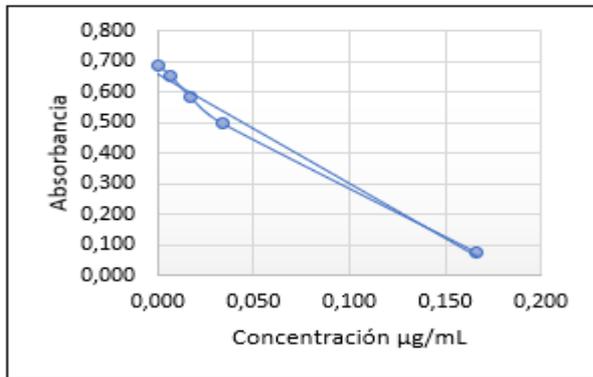
Anexo 6. Aplicación del método de microdilución en caldo



Elaborado por: Las autoras, 2020

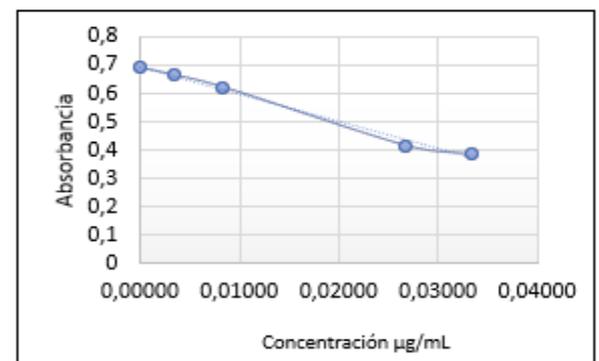
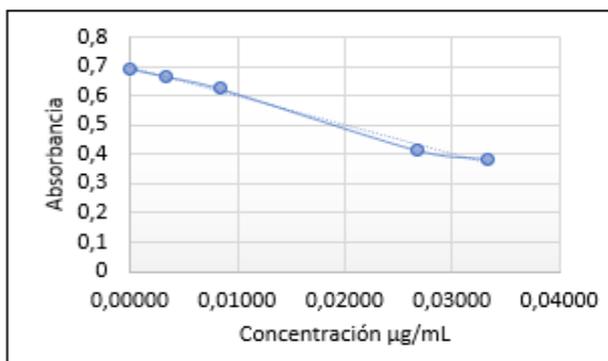
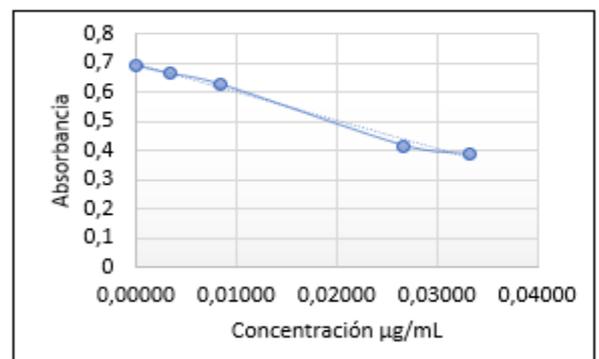
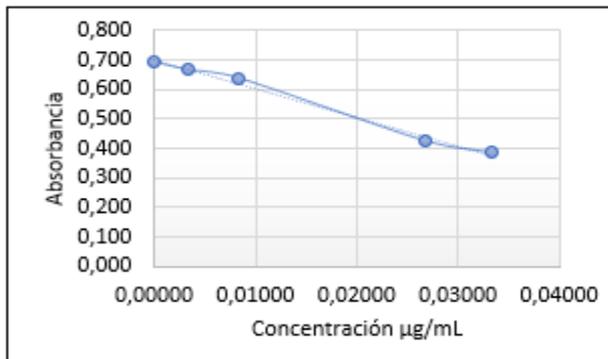
Anexo 7. Curvas de actividad antioxidante-Absorbancia vs Concentración-DPPH.

*Dalea coerulea (L.f.) Schinz & Thell*



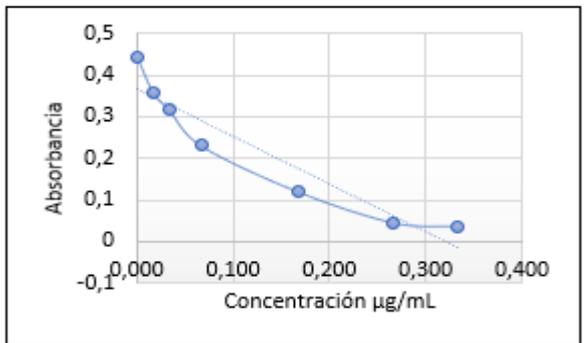
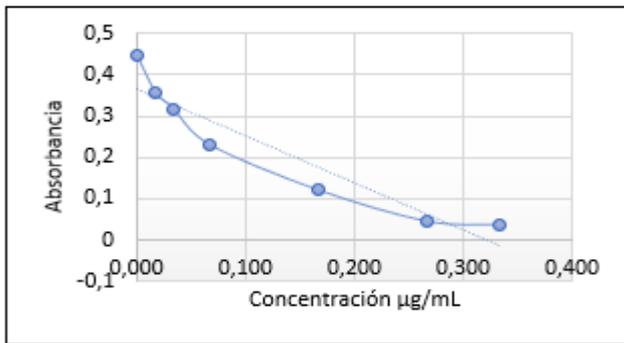
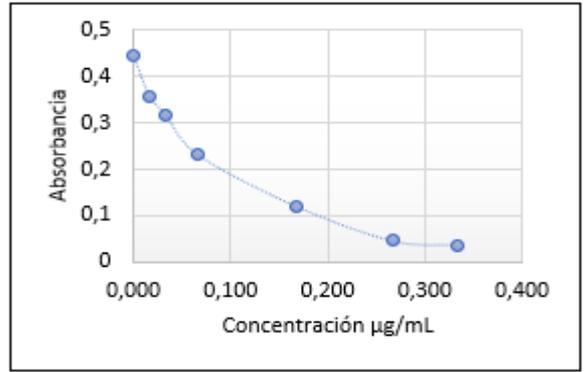
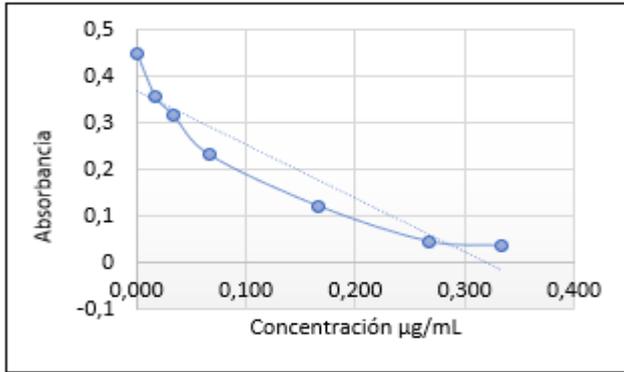
Elaborado por: Las autoras, 2020

Hidrobutilanol (BHA)



Elaborado por: Las autoras, 2020

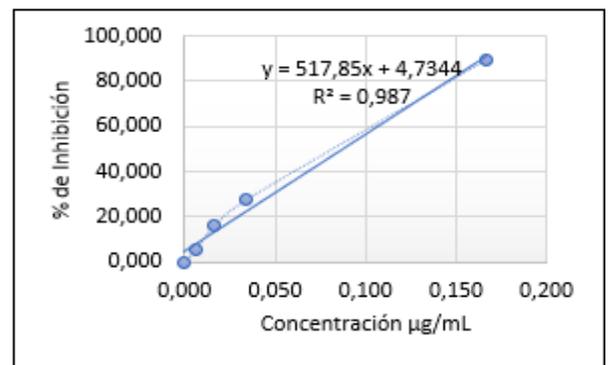
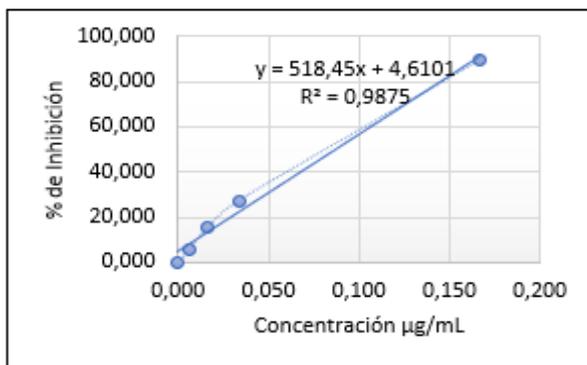
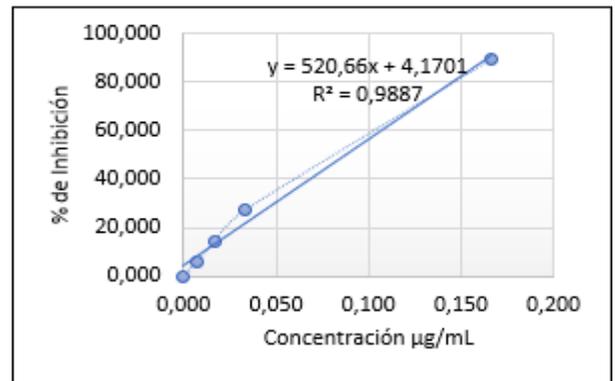
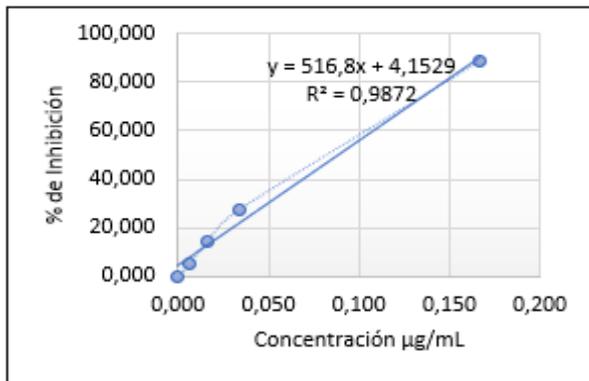
*Thymus vulgaris*



Elaborado por: Las autoras, 2020

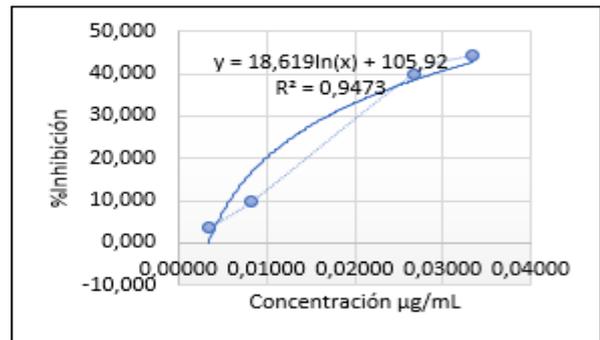
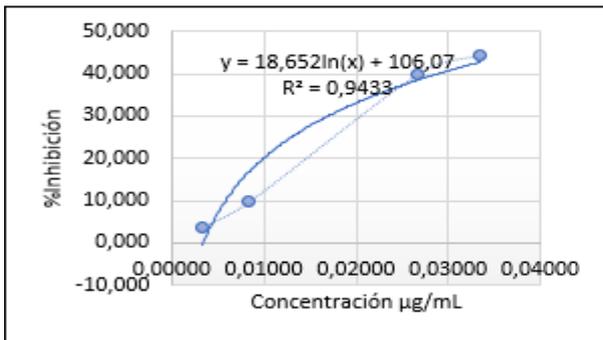
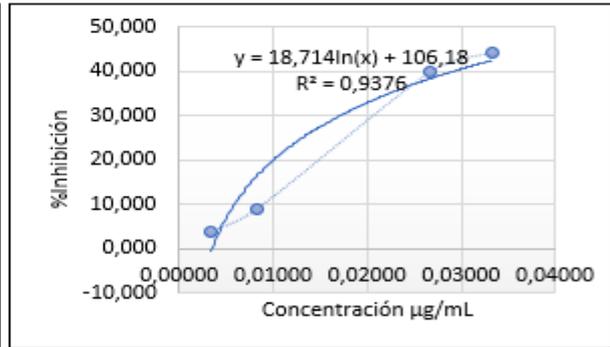
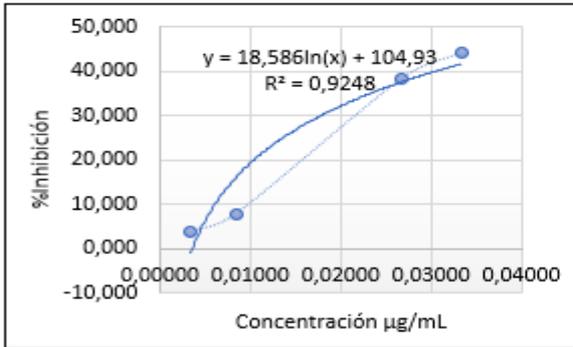
Anexo 8. Curvas de actividad antioxidante- % Inhibición vs Concentración.DPPH

*Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell.



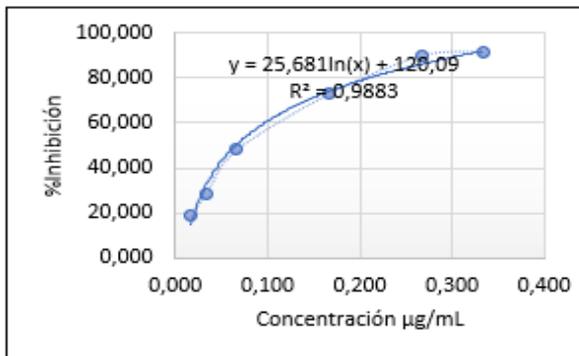
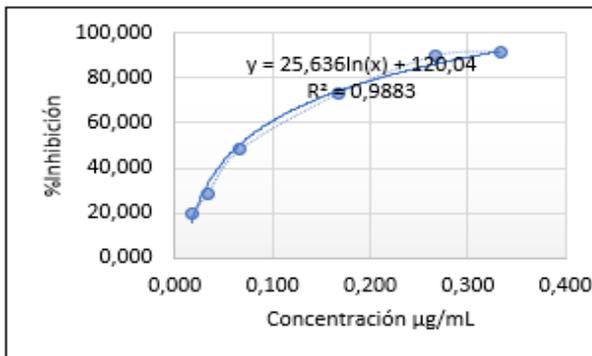
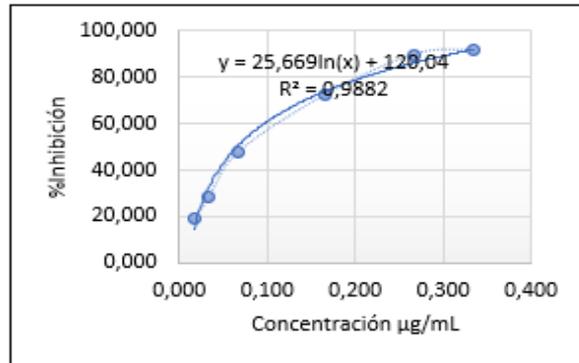
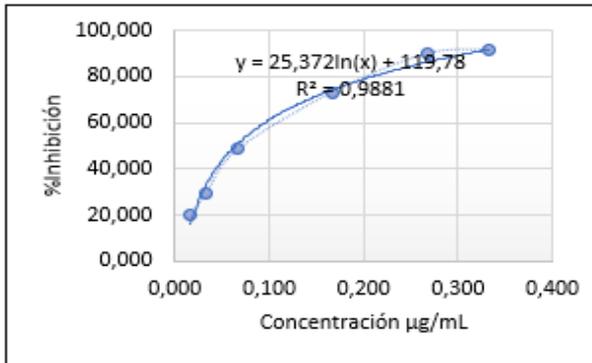
Elaborado por: Las autoras, 2020

### Hidroxitilanol (BHA)



Elaborado por: Las autoras, 2020

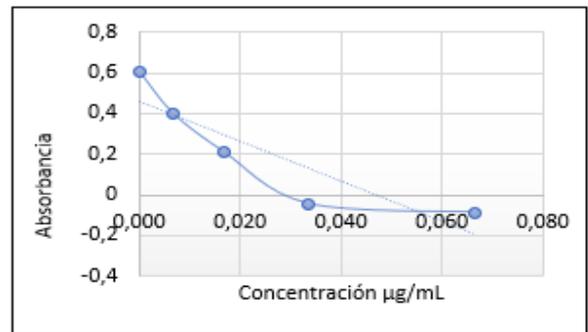
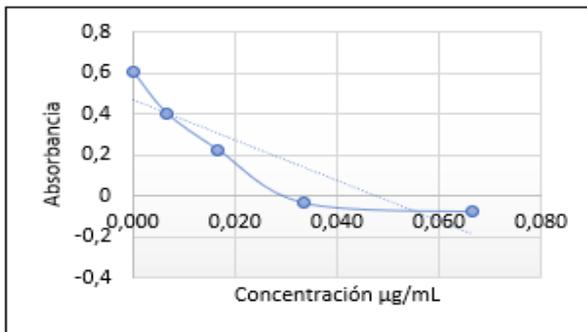
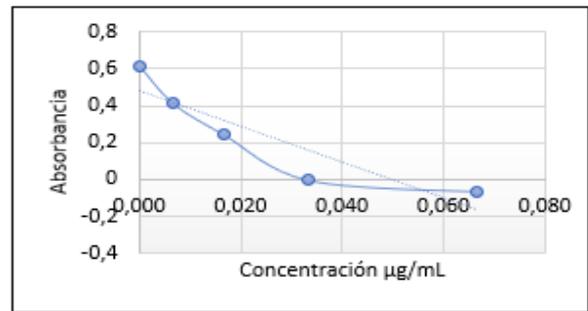
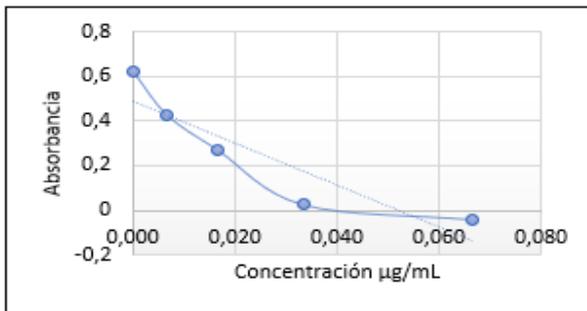
### *Thymus vulgaris*



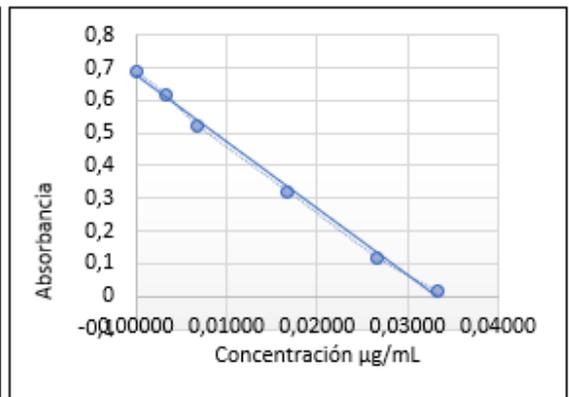
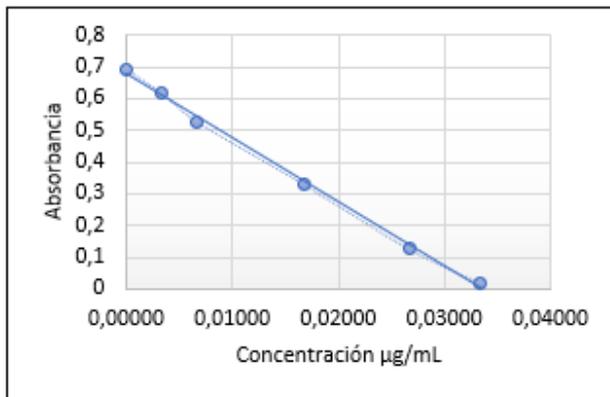
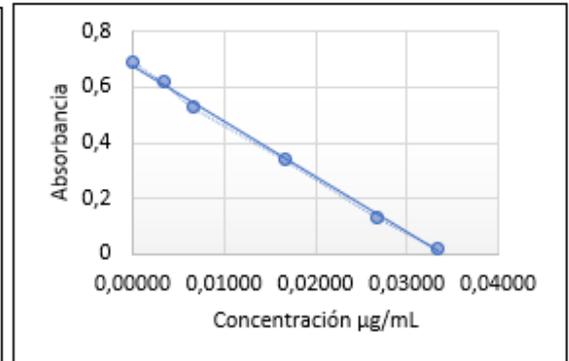
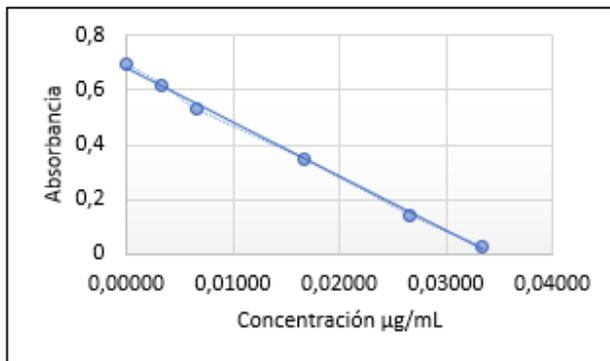
Elaborado por: Las autoras, 2020

Anexo 9. Curvas de actividad antioxidante método ABTS. Absorbancia vs Concentración.

*Dalea coerulea (L.f.) Schinz & Thell*

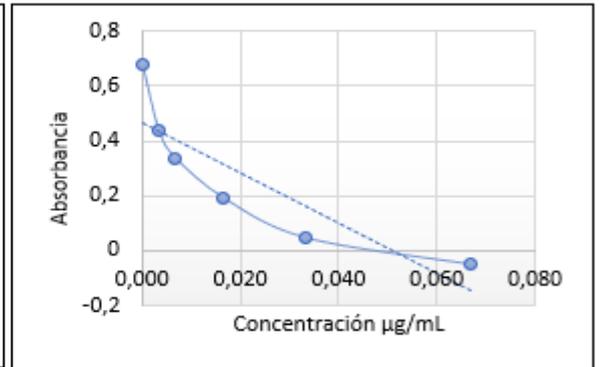
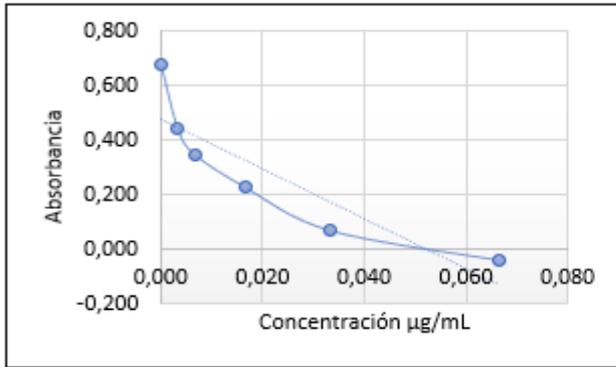
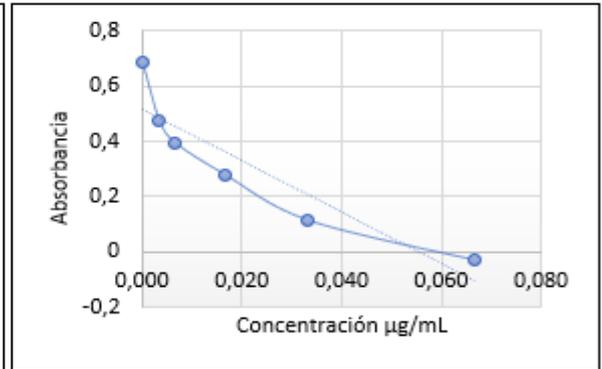
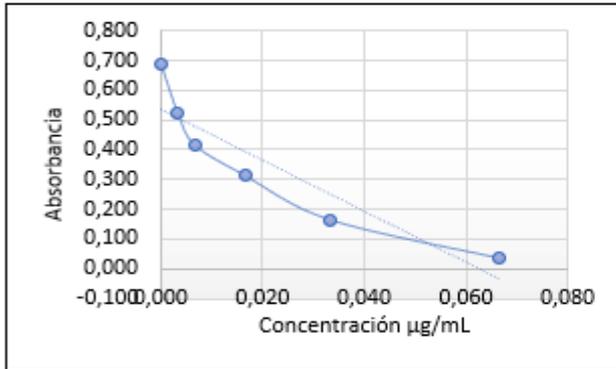


Hidroxitubutilanisol (BHA)



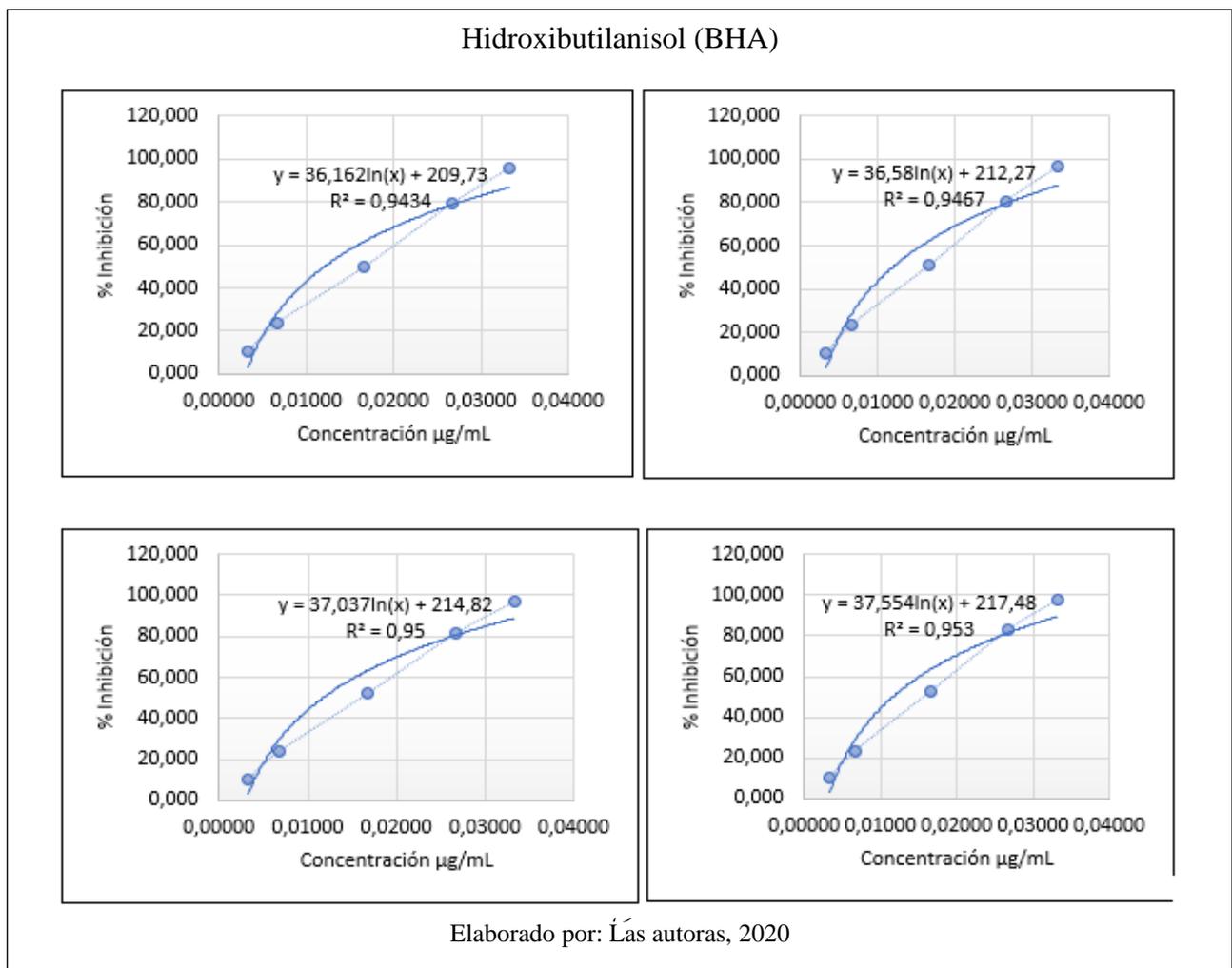
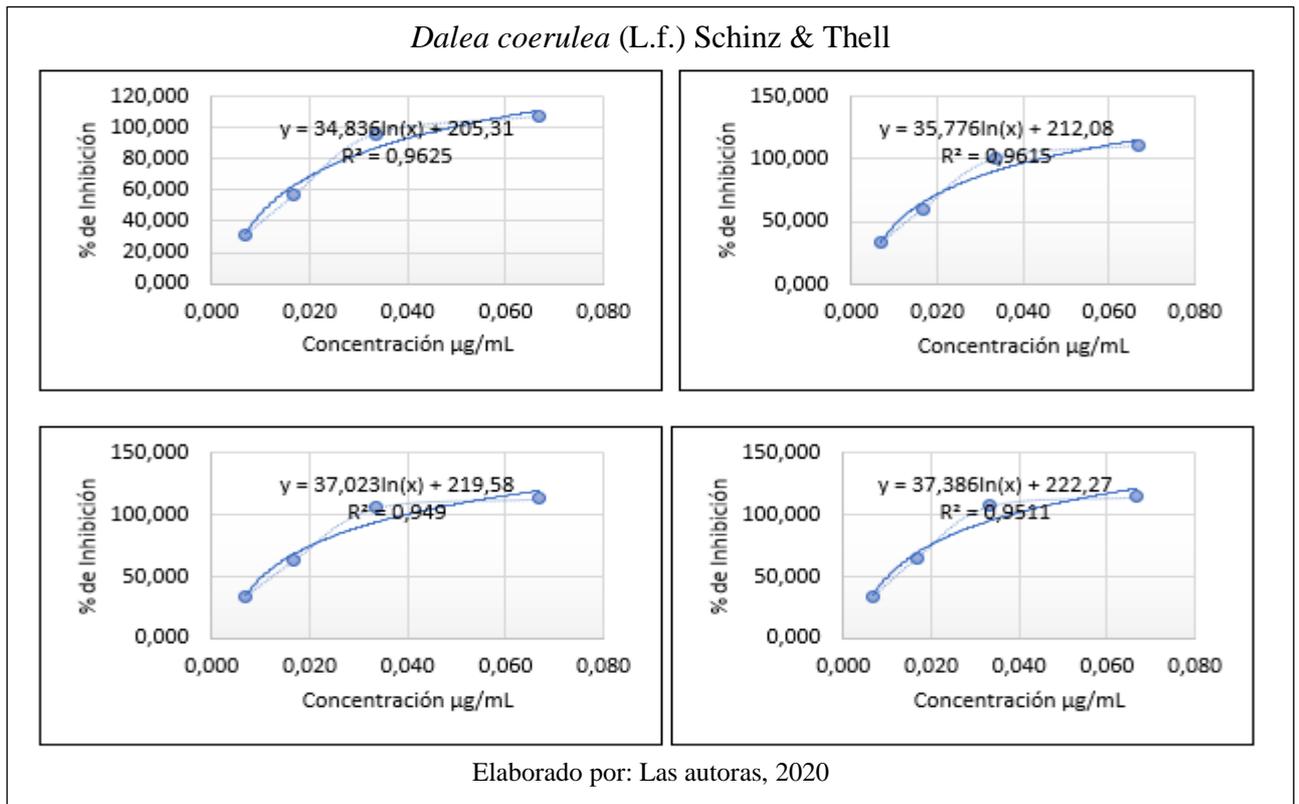
Elaborado por: Las autoras, 2020

*Thymus vulgaris*

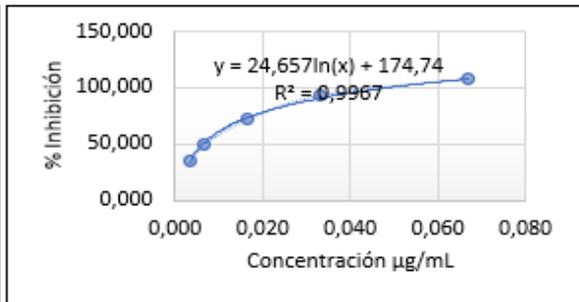
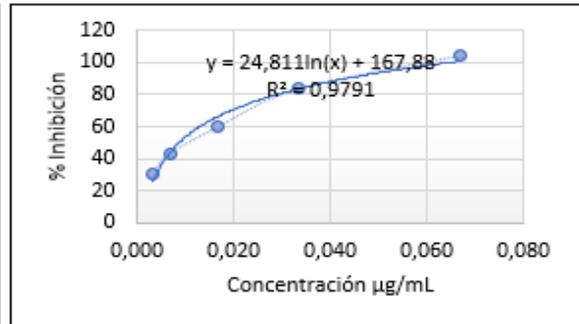
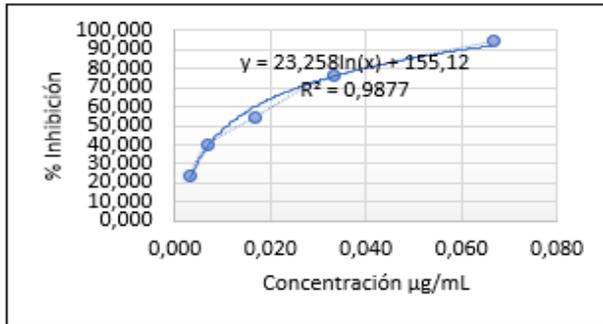


Elaborado por: Las autoras, 2020

Anexo 10. Curvas de actividad antioxidante método ABTS. % Inhibición vs Concentración.



*Thymus vulgaris*



Elaborado por: Las autoras, 2020

Anexo 11. Prueba para los métodos DPPH y ABTS.

Prueba no paramétrica de Tukey para el método DPPH

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
IC50 DPPH (mg/mL)	6	0,06	0,01	0,74	0,0230

Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Cálculo exacto de probabilidades

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)
Muestra	IC50 DPPH (mg/mL)	Dalea coerulea (L.f.)	Schi.. Thymus vulgaris	3	3	0,07	0,05	1,0E-03	1,0E-03	15,00	0,1000

Elaborado por: Las autoras, 2020

Prueba no paramétrica de Tukey para el método ABTS

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
IC50 ABTS (mg/mL)	6	0,01	2,2E-03	0,94	0,6852

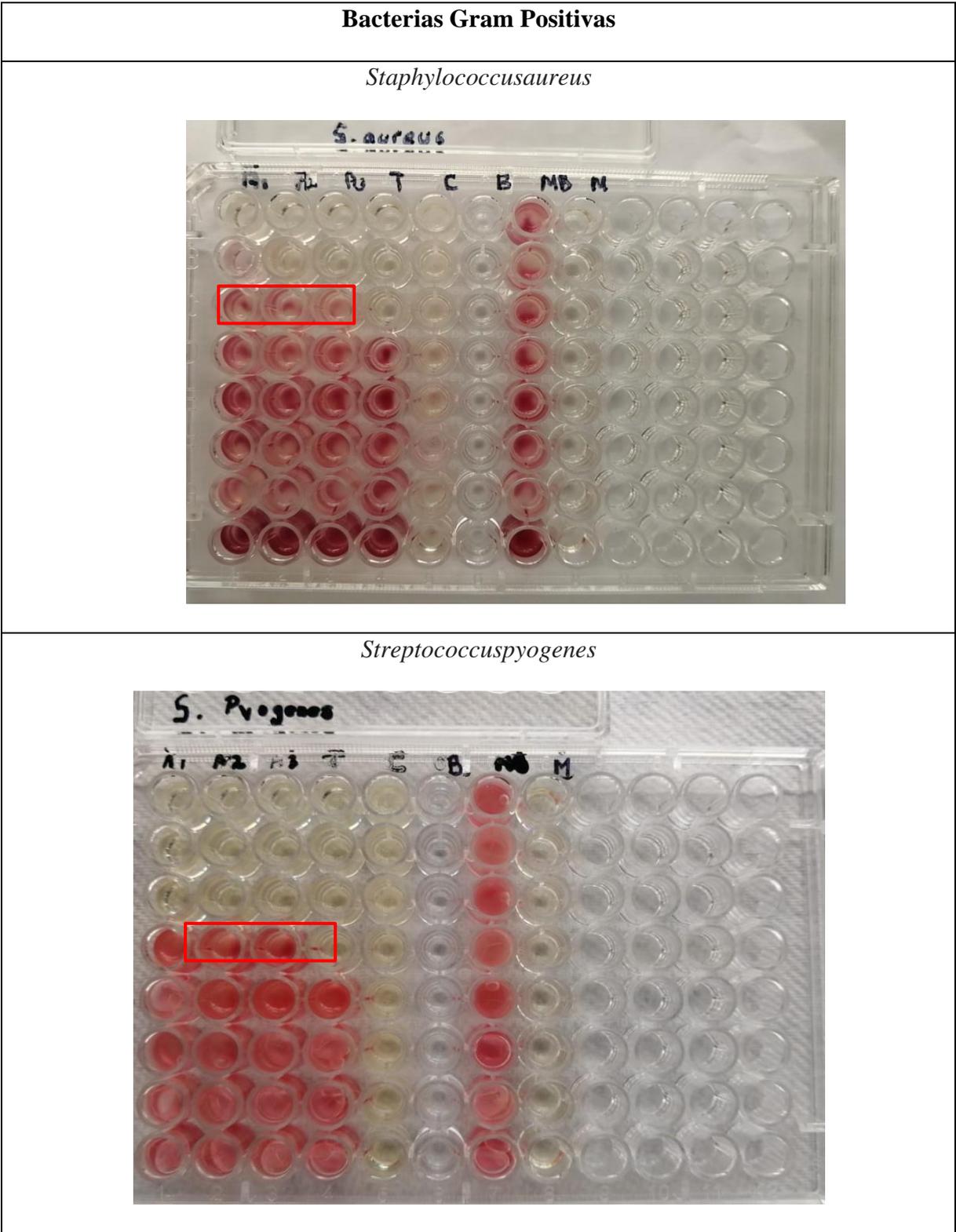
Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Cálculo exacto de probabilidades

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)
Muestra	IC50 ABTS (mg/mL)	Dalea coerulea (L.f.)	Schi.. Thymus vulgaris	3	3	0,01	0,01	1,0E-03	2,0E-03	14,50	0,2000

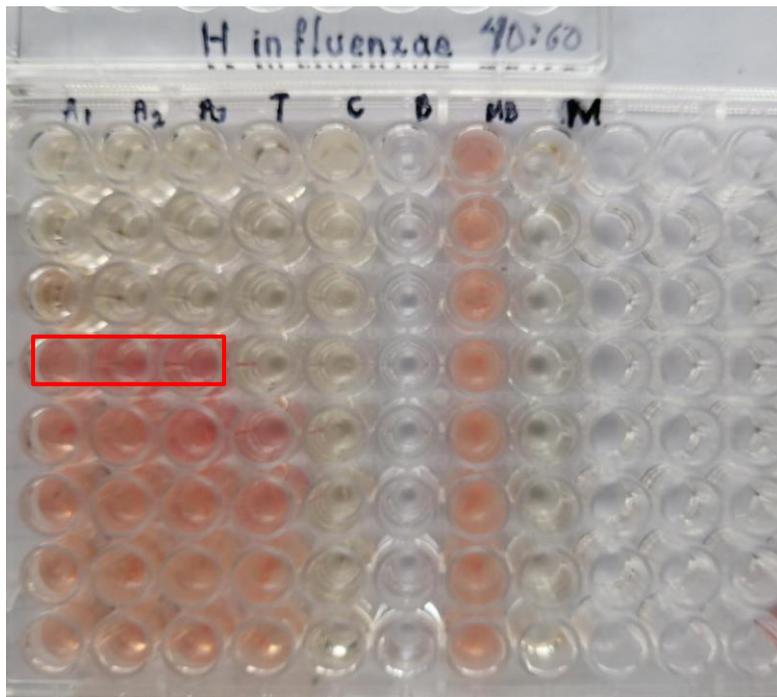
Elaborado por: Las autoras, 2020

Anexo 12. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las bacterias y levaduras para cada aceite esencial por el método de dilución o micro-dilución en caldo.

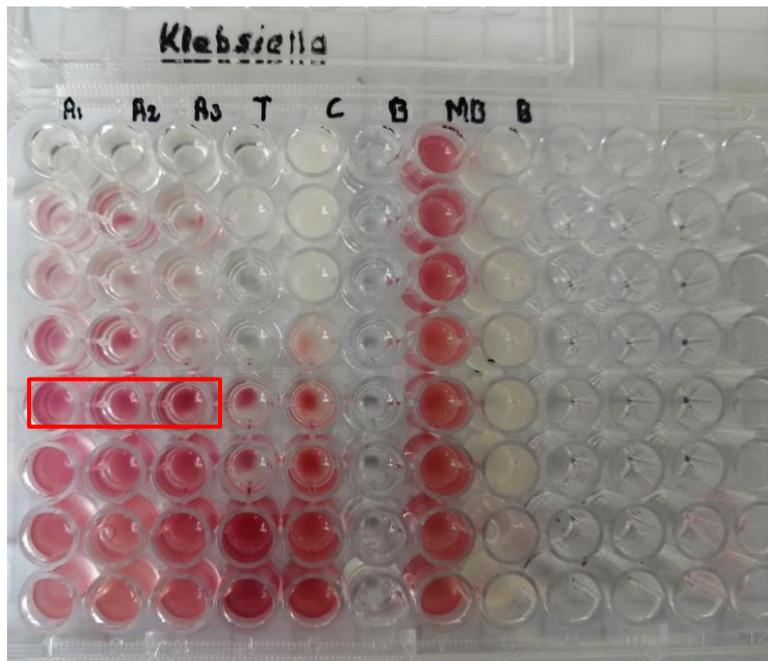


**Bacterias Gram Negativas**

*Haemophilus influenzae*

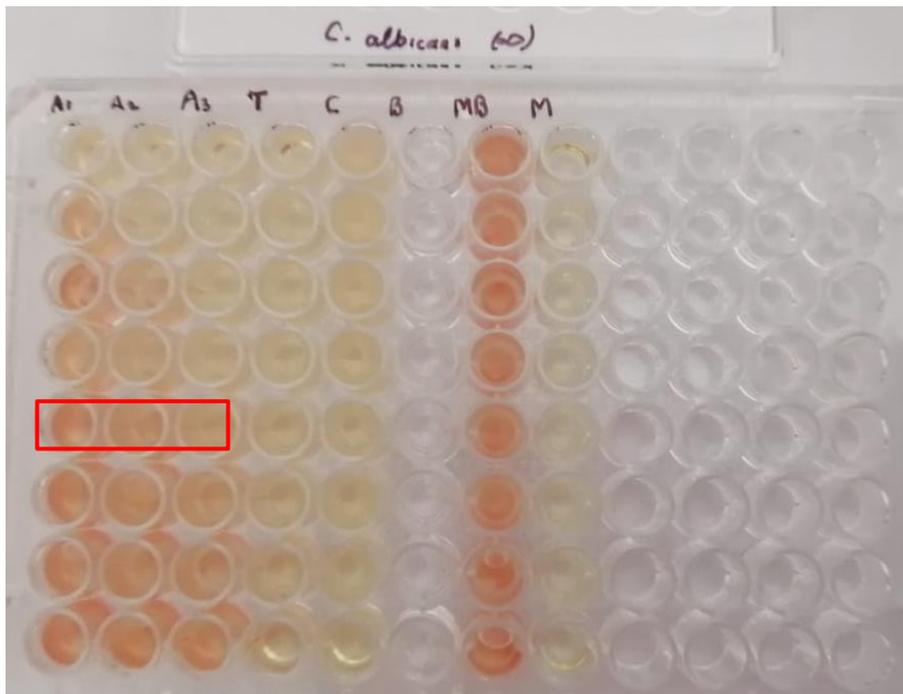


*Klebsiella pneumoniae*



## Levaduras

### *Candida albicans*



### *Candida tropicalis*

