

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:

Evaluación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides presentes en las
flores de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell

AUTOR:

MARÍA ALEJANDRA DE LA CRUZ MORA

NATHALIA JAZMIN ULLOA CURIZACA

TUTOR:

PACO FERNANDO NORIEGA RIVERA

Quito, febrero del 2020

Quito, febrero del 2020

Cesión de derechos de autor

Nosotros, María Alejandra De la Cruz Mora y Natalia Jazmin Ulloa Curizaca, con documento de identificación N° 1003233689 y 1722367586, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides presentes en las flores 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 condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hacemos entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

María Alejandra De la Cruz Mora

CI: 1003233689

Nathalia Jazmín Ulloa Curizaca

CI: 1722367586

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Evaluación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides presentes en las flores de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, realizado por María Alejandra De la Cruz Mora y Natalia Jazmín Ulloa Curizaca, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero del 2020



.....

Paco Fernando Noriega Rivera

CI: 0602421323

Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Politécnica Salesiana por financiar este proyecto investigativo y brindarnos los conocimientos para su ejecución.

A nuestro profesor Paco Noriega, por darnos la oportunidad de trabajar con él en este proyecto, por toda la paciencia, tiempo, y los invaluable conocimientos que nos ha dejado en el transcurso de la investigación y de todo nuestro camino universitario.

A los laboratorios Ciencias de la Vida y sus analistas, por toda su colaboración y asesoría con los equipos, materiales y metodologías necesarias para realizar este trabajo.

A la Dra. Marbel Torres y Dr. Rachid Seqqat, docentes del Laboratorio de Inmunología de la Universidad de las Fuerzas Armadas por brindarnos su conocimiento y apoyo en la investigación realizada en el área de Biotecnología Animal

A los docentes, Daniel Acurio y Christian Larenas por su apoyo y a lo largo de la carrera y a todos los profesores que nos han forjado en el transcurso de la carrera de Biotecnología con sus experiencias, conocimientos y saberes.

Índice

Introducción	1
Capítulo 1	6
Marco conceptual	6
1.1 Información ecológica del género <i>Dalea</i>	6
1.2. Descripción botánica de <i>Dalea coerulea</i> (L.f) Shinz & Thell.....	7
1.2.1 Estudios químicos del género <i>Dalea</i>	8
1.3 Flavonoides.....	8
1.3.1 Métodos de caracterización.....	11
1.4 Métodos de obtención de extractos de flores.....	13
1.4.1 Extracción Mecánica.....	14
1.4.2 Destilación	15
1.4.3 Extracción con Solventes	15
1.4.4 Nuevas tecnologías de extracción	16
1.5 Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana.....	17
1.5.1 Contacto Directo	18
1.5.2 Fase de vapor	20
1.6 Infecciones respiratorias en humanos.....	20
1.6.1 Microorganismos asociados.....	22
1.7 Métodos de evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiinflamatoria	24
Capítulo 2	27
Marco Metodológico	27

2.1. Localización y material vegetal	27
2.2. Elaboración de extractos.....	27
2.2.1. Obtención del extracto hidroalcohólico	27
2.2.1. Liofilización.....	28
2.3. Fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu	29
2.3.1. Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu	29
2.3.2. Preparación de la curva de calibración	29
2.3.3 Preparación de la muestra	30
2.3.4 Lectura de soluciones.....	31
2.3.5 Análisis estadístico.....	31
2.4. Flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio.....	32
2.4.1 Preparación de la curva de calibración	32
2.4.2. Preparación de la muestra	33
2.4.3. Lectura de soluciones.....	34
2.4.4 Análisis estadístico.....	34
2.5. Identificación de flavonoides por espectrometría de masas	35
2.5.1. Preparación del extracto.....	35
2.5.2. Técnica cromatográfica TLC	35
2.5.3. Espectrometría de masas.....	36
2.6. Actividad antimicrobiana	36
2.6.1 Reactivación de cepas bacterianas	37

2.6.2 Preparación de las concentraciones de los extractos liofilizados de <i>Dalea coerulea</i> , terpineol y clotrimazol	38
2.6.3. Estandarización del inóculo bacteriano	38
2.6.4. Inoculación en placas multipocillo	39
2.6.5 Preparación y adición del colorante de 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)....	41
2.6.6 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria MIC	41
2.7. Actividad anti-inflamatoria <i>in vivo</i>	41
2.7.1. Animales de experimentación:.....	42
2.7.2. Preparación de las soluciones	43
2.7.3. Edema plantar inducido por carragenina	43
2.7.4 Análisis estadístico.....	44
Capítulo 3	45
Resultados y discusión	45
3.1. Rendimiento del extracto hidroalcohólico liofilizado	45
3.2. Cuantificación de fenoles totales	46
3.3. Cuantificación de flavonoides totales.....	48
3.4. Identificación de flavonoides por espectrometría de masas	51
3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria MIC	53
3.6. Determinación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	60
Conclusiones	67
Referencias	69
Anexos	84

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades de los flavonoides	2
Tabla 2. Descripción y efectos farmacológicos de flavonoides	10
Tabla 3. Técnicas de separación e identificación de flavonoides	12
Tabla 4. Extractos hidroalcohólicos	28
Tabla 5. Curva de calibración del ácido gálico para fenoles totales	30
Tabla 6. Preparación de las soluciones de los extractos para fenoles totales.....	31
Tabla 7. Curva de calibración de Quercetina para flavonoides totales	33
Tabla 8. Preparación de las soluciones de los extractos para flavonoides totales.....	33
Tabla 9. Condiciones de crecimiento de microorganismos.....	37
Tabla 10. Volúmenes de inóculo y TTC en las placas multipocillos para cada bacteria.....	40
Tabla 11. Grupos de experimentación de ratones Balb/C y controles	42
Tabla 12. Categorización de tratamientos por Kruskal Wallis.....	46
Tabla 13. Categorización de tratamientos por análisis Tukey ($P \leq 0,05$) al 5 % para Flavonoides totales.	49
Tabla 14. Interpretación de valores de MIC en $\mu\text{g/mL}$	54
Tabla 15. MIC de extractos etanólicos en $\mu\text{g/mL}$ de <i>Dalea coerulea</i> y controles para <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae subsp.</i> <i>pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	55
Tabla 16. MIC de indicadores de control para <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> , <i>Haemophilus. influenzae</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	59
Tabla 17. Porcentajes de inflamación para cada tratamiento a los 300 minutos.....	61
Tabla 18. Categorización de tratamientos por análisis Tukey ($p \leq 0,05$) al 5 %, para el área bajo la curva	64

Índice de figuras

Figura 1. Flores de <i>Dalea coerulea</i> (L.f) Shinz & Thell Quito- Ecuador	8
Figura 2. Clasificación de los métodos de extracción de compuestos	14
Figura 3. Distribución de las soluciones D1, D2, terpineol, clotrimazol, dimetilsulfóxido y control en la placa multipocillos por filas del 1 al 10 y columnas desde A hasta H.....	40
Figura 4. Contenido del extracto de flores de <i>Dalea coerulea</i> después de la liofilización.....	45
Figura 5. Gráfico de barras de tratamientos para extracción de Fenoles	47
Figura 6. Gráfico de barras de tratamientos para extracción de Flavonoides totales.....	49
Figura 7. Cantidad de fenoles y flavonoides expresados en mg/g según el tipo de extracto hidroalcohólico.....	51
Figura 8. Bandas obtenidas mediante cromatografía capa fina para identificación de flavonoides	52
Figura 9. Comparaciones de MIC de cada compuesto para los microorganismos en estudio .	56
Figura 10. Comparación de tratamientos según el porcentaje de inhibición para cada medición	61
Figura 12. Curvas de porcentajes de inflamación durante el ensayo	63
Figura 11. Área de los trapecios formados durante todo el ensayo para el tratamiento 7.....	62
Figura 13. Gráfico de barras para tratamientos según al área bajo la curva	65

Índice de anexos

Anexo 1. Flores secas de Dalea coerulea	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 2. Elaboración de extractos a partir de las flores de Dalea coerulea	85
Anexo 3. Resultados del programa estadístico InfoStat.....	88
Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria de los microorganismos evaluados mediante microdilución	90
Anexo 5. Método de edema plantar inducido por carragenina en ratones Balb/C.....	93
Anexo 6. Ficha de información de cada microorganismo.....	96

Resumen

La presente investigación tuvo como finalidad el comprobar el uso tradicional de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, que es usada como una planta útil en enfermedades del sistema respiratorio. Debido a que se usan las flores como parte medicinal, en estas se determinó su composición química cualitativa y cuantitativa, en donde las moléculas más representativas resultaron ser los flavonoides.

La composición más alta tanto de compuestos poli fenólicos, como de flavonoides totales, se encontraron en el extracto obtenido con etanol al 50 %, con los siguientes valores: fenoles totales 15,56 mg/g y flavonoides totales 11,73 mg/g. Mediante espectrometría de masas se determinó la presencia de malvidina.

Para validar el uso ancestral se investigó la actividad antimicrobiana en los extractos, en microorganismos responsables de infecciones del sistema respiratorio con los siguientes resultados de Mínima Concentración Inhibitoria: *Haemophilus influenzae* ATCC 10211TM con MIC 328,947 µg/mL; *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 29213TM con MIC 367,647 µg/mL; *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615TM con MIC 367,647 µg/mL; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027TM con MIC 416,666 µg/mL y *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031TM con MIC 1666,66 µg/mL. Adicionalmente se determinó el potencial antiinflamatorio, mediante la técnica del edema plantar inducido por carragenina, en animales de laboratorio, con dosis de: 200, 100, 50 y 25 mg/kg del extracto liofilizado D2 (obtenido con etanol al 50 %), el mejor resultado se produjo a los 300 minutos aplicando una dosis 200 mg/kg, con un 46,49 % de inflamación.

Palabras clave: *Dalea coerulea*, flavonoides, CMI, espectrometría de masas.

Abstract

The purpose of this research was to verify the traditional uses of *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, which is used as a useful plant in diseases of the respiratory system. The flowers are used as a medicinal part, so their qualitative and quantitative chemical composition was determined, where the most representative molecules were the flavonoids.

The highest composition of polyphenolic compounds and total flavonoids was found in the extract got with 50% ethanol, with the following values: total phenols 15,56 mg/g and total flavonoids 11,73 mg/g. The presence of malvidin was determined by mass spectrometry.

To guarantee the ancestral use, the antimicrobial activity in the extracts was investigated in several microorganisms that cause respiratory system infections with the following results of Minimum Inhibitory Concentration: *Haemophilus influenzae* ATCC 10211_{TM} MIC 328,947 µg/mL; *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 29213_{TM} MIC 367,647 µg/mL; *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615_{TM} MIC 367,647 µg/mL; *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027_{TM} MIC 416,666 µg/mL y *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031_{TM} MIC 1666,66 µg/mL. Additionally, the anti-inflammatory potential was determined, using the methodology of plantar edema induced by carrageenan, in laboratory animals, with doses of: 200, 100, 50 and 25 mg/kg of lyophilized extract D2 (got with 50% ethanol), The best result was at 300 minutes by applying a dose of 200 mg/kg, with a 46,49% of inflammation.

Key words: *Dalea coerulea*, flavonoids, MIC, mass spectrometry.

Introducción

En los Andes ecuatorianos, el uso de plantas con fines terapéuticos es una práctica ancestral que se desarrolla hasta la actualidad (Villacís, 2017), estos saberes se han transmitido de generación en generación de forma oral (Ruiz, Venegas, Valdiviezo, Ocaña, & Tadeo, 2018), este método de conservación del conocimiento se ha perdido debido a la urbanización de las comunidades indígenas (Matos, 2014). La fitoterapia constituye la principal alternativa para prevenir, tratar o curar varias enfermedades (Avila, Garcia, Sepulveda, & Godinez, 2016), se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de las medicinas farmacéuticas (Gallegos, 2016).

La experiencia popular atribuye las propiedades a las plantas medicinales constituyendo un problema ya que no siempre se han podido demostrar (Martinez, Hung, Hernández, & Audivert, 2016), debido a la escasa investigación científica realizada en plantas endémicas del Ecuador (Ayala, 2015), por lo que no se cuenta con la caracterización físico-química de los compuestos bioactivos de la especie *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell, conocida comúnmente como Iso de Quito, planta medicinal usada para tratar enfermedades del sistema respiratorio (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía, & Balslev, 2008), generalmente por la cultura Kichwa de la Sierra (Noriega & Taco, 2018). Estas enfermedades son altamente contagiosas y endémicas en cualquier época del año y de distribución mundial, afecta del 80 al 90 % de las personas (Pérez, Rojas, Cabrera, & Grajales, 2015).

El extracto hidroalcohólico provenientes del género *Dalea*, presenta un alto contenido de flavonoides (Montes-de-Oca-Márquez, y otros, 2017), el interés en estos pigmentos se ha intensificado gracias a sus posibles efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antimicrobianos como se representa en la Tabla 1 (Pabon, Rodriguez, & Hernandez, 2017).

Por lo anterior mencionado, en este trabajo se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué tan efectiva es la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides presentes en las flores de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell?.

Tabla 1.

Propiedades de los flavonoides

Propiedades	Flavonoide	Referencias
Antimicrobiano	Quercetina, baicalina	(Martinez J. , 2018)
Antibacterial	Crisina, rutina	(Quispe & Cahuana, 2019)
Antiviral	Crisoeriol	(Macedo, Gaspar, & Goretti, 2016)
Antiinflamatorio	Herperidina,luteolina, quercetina	(Borja & Yumisaca, 2018)
Analgésico	Herperidina	(Picho, 2018)
Anticancerígeno	Quercetina	(Cordova, 2017)

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Durante los últimos años en el Ecuador la investigación científica ha tenido un alto índice de crecimiento, sin embargo, no se ha podido realizar investigaciones exhaustivas que abarquen los ámbitos de desarrollo científico e innovación del país (Ayala, 2015), principalmente en el área de etnobotánica y fitofarmacéutica del Ecuador (Villacís, 2017). Las investigaciones que se han venido realizando acerca de las plantas medicinales y etnobotánica en el Ecuador, son principalmente desarrolladas en la región central andina y en la Amazonía (Zambrano, Buenaño, Mancera, & Jiménez, 2015).

Los estudios etnobotánicos contribuyen al conocimiento de la flora útil de las diferentes regiones (Golinelli, Vega, & Villa, 2015) incentivando al empleo de drogas vegetales para tratar enfermedades (Gallegos, 2016), principalmente las infecciones respiratorias inferiores (Serrano, Barcenilla, Limòn, Pujol, & Gudiol, 2016), que constituyen la causa más frecuente de consulta en la práctica clínica diaria (Alarcón, Caballero, Cantón, & Oliver, 2016).

Actualmente, el auge y diagnóstico de nuevas enfermedades y el limitado acceso a medicamentos, contribuye al retorno del uso de plantas medicinales y de productos fitoterapéuticos (Ruiz, Venegas, Valdiviezo, Ocaña, & Tadeo, 2018). Gracias a su biodiversidad y aprovechamiento del conocimiento de cientos de años, se ha generado medicamentos a base de productos naturales (Pabón, Rodríguez, & Hernández, 2017), constituyendo un modo de tratamiento accesible y económicamente factible (Bussman & Sharon, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que el 80 % de la población mundial utiliza la medicina natural para tratar diversas dolencias (Ríos, Alanís, & Favela, 2016). En el artículo “Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global” (Alós, 2015), se destaca la importancia de encontrar una alternativa natural, para controlar estas enfermedades que son las más frecuentes en la población y que permitirá disminuir la resistencia a antibióticos (Gallegos, 2016).

En los Andes Ecuatorianos, se encuentran plantas endémicas que tradicionalmente se usan para tratar la tos y problemas respiratorios como *Dalea coerulea* (L. f.) Schinz & Thell, no se encuentra evidencia científica que respalde dichas propiedades medicinales (Noriega & Taco, 2018), por lo cual es importante caracterizar los compuestos bioactivos que posee la planta, para garantizar su potencial y efectividad (Mercado & Vessuri, 2015).

Por lo anterior, el presente trabajo busca aportar conocimiento a la investigación de las plantas endémicas del Ecuador evitando la pérdida de los saberes ancestrales de las diversas culturas, promoviendo su conservación y uso como una alternativa natural para tratar enfermedades del sistema respiratorio.

Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación es evaluar la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides presentes en las flores de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell; para el cumplimiento del mismo se obtuvo un extracto hidroalcohólico de las flores de la especie *Dalea coerulea* a concentraciones de 20 %, 50 %, 90 %; se caracterizó los flavonoides mediante cromatografía de capa fina de alta resolución (HPTLC), espectroscopia UV/VIS y espectrometría de masas; se evaluó la actividad antimicrobiana contra 5 cepas bacterianas

causantes de las infecciones respiratorias más comunes mediante el método de micro dilución y finalmente se evaluó la actividad antiinflamatoria de los flavonoides presentes en los extractos hidroalcohólicos. Planteándose la siguiente hipótesis: los flavonoides presentes en las flores de *Dalea coerulea* (L.f.) Schinz & Thell le otorgan la capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1 Información ecológica del género *Dalea*

Las plantas son parte esencial de la biodiversidad del mundo, y es un recurso vital para el bienestar humano, varias plantas silvestres tienen gran importancia tanto económica, cultural y potencial constituyendo una fuente de alimento y una base para la medicina, las mismas están expuestas al peligro por diversos factores como: el exceso de recolección, práctica de agricultura y la silvicultura insostenible, las urbanizaciones, la contaminación, introducción de especies exóticas invasoras y el cambio climático (Mercado & Vessuri, 2015).

Las especies del género *Dalea* son localmente dominantes en distintas biomasas secas, lo cual aporta un valor ecológico importante para la conservación, mantenimiento de la artropofauna local, la restauración y preservación de la capa vegetal de estos ecosistemas, además el género *Dalea* cuenta con numerosas especies, pero éstas no se comportan como malezas o como invasoras (Piñeros & González, 2019). Se encuentran distribuidas en bosques secos a subxerofíticos, frecuente a orilla del camino, riberas de ríos, en suelos arenosos y pedregosos (Arango & González, 1994).

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

La clasificación botánica de *Dalea coerulea* (L.f) Shinz & Thell es:

Reino:	Plantae
División:	Tracheophyta
Superclase:	Angiospermae
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Género :	<i>Dalea</i>
Epíteto específico:	coerulea
Autor del epíteto específico:	(L.f.) Shinz & Thell.
Nombre científico:	<i>Dalea coerulea</i> (L.f.) Shinz & Thell. (Herbario JBB en línea, 2016)

La planta *Dalea coerulea* (L.f) Shinz & Thell se describe botánicamente como:

Flor	Inflorescencia en amento de color, perfecta, completa, cigomorfa, con cinco pétalos formando quilla, estandarte y alas, de color violeta, estambres monadelfos, ovario ínfero, como se muestra en la Figura 1.
Fruto	Baya
Raíz	Fasciculada, leñosa, perenne
Hoja	Compuesta, opositipinada, borde entero, peciolada, uninervia
Tallo	Aéreo, cilíndrico erguido, de consistencia leñosa

Hábito de crecimiento Arbusto que puede llegar a medir hasta 2 m (Oleas, Ríos, Peña, & Bustamante, 2016).



1.2.1 Estudios químicos del género *Dalea*

La composición química en las distintas estructuras vegetales, del género *Dalea*, se determina en respuesta a diversos factores como: características genotípicas de la especie, fenología, factores bióticos y abióticos, así como condiciones geográficas, realizando un perfil fitoquímico mediante pruebas cualitativas para identificación de fenoles (Peralta, Santi, Agnese, Cabrera, & Ortega, 2015), determinándose de esta manera que posee aceites esenciales, glucósidos, alcaloides, terpenos, flavonoides, flavonas, chalconas, cumarinas, esteroides, saponinas, taninos y triterpenos (Del Gaudio, Mendoza, Cabrera, Peralta, & Ortega, 2016).

1.3 Flavonoides

Son compuestos fenólicos presentes en la naturaleza, de bajo peso molecular, presenta una estructura difenilpiranos, conformada por dos anillos de fenilos, unidos a través de un anillo de pirano (Martínez, González, Culebras, & Tuñón, 2012); lo que genera las distintas clases de flavonoides, de las cuales se reconocen 7 según los grupos funcionales que posean: las flavonas, las antocianinas, los flavonoles, los flavandioles, los taninos condensados, las chalconas y

las auronas; se han identificado alrededor de 9 000 flavonoides (Cartaya & Reynaldo, 2001). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación de las diferentes partes de la estructura química (Perez & Fraga, 2018).

Los flavonoides contienen en su estructura química grupos hidroxilos fenólicos que presentan propiedades de quelación del hierro y metales de transición, lo que les otorga la capacidad antioxidante, presentando efectos terapéuticos frente a diversas enfermedades que hoy en día son muy comunes dentro de la sociedad (Fajardo, Arroyo, & Ramírez, 2016). Sus propiedades anti-radicales libres se dirigen por los radicales hidroxilos y superóxidos y pueden modificar la síntesis de eicosanoides obteniendo respuestas anti-prostanoide y anti-inflamatoria, ayudan a prevenir la agregación plaquetaria y protege a las lipoproteínas de baja densidad de la oxidación como se describe en la Tabla 2 (Dirar, y otros, 2019).

Estos compuestos los podemos encontrar en plantas, frutas, vegetales, zumos, vino; otorga beneficios para la salud humana, ya que el organismo no puede producir sustancias químicas protectoras (Vega, De León, & Reyes, 2017), generando un gran interés ya que varios estudios han demostrado una correlación inversa entre el consumo diario de los flavonoides y una menor incidencia de mortalidad de cáncer y enfermedades cardiovasculares (Henry, y otros, 2016).

Tabla 2.

Descripción y efectos farmacológicos de flavonoides

Subgrupo	Flavonoide	Efectos	Referencias
Flavonoles: Se encuentran en pigmentos amarillos de hojas y flores	Crisina, rutina, quercetina	Antibacterial, antimicrobiano, anticancerígeno	(Quispe & Cahuana, 2019) (Martinez J. , 2018)
Flavonas: Otorga color amarillo a pétalos y frutos	Luteolina, tangeritina, apigenina, crisoeriol	Antiinflamatorio, antiviral	(Borja & Yumisaca, 2018) (Macedo, Gaspar, & Goretti, 2016)
Flavanonas: Son incoloros o ligeramente amarillos, concentración alta en cítricos	Hesperidina, naringenina, eriodictiol	Antiinflamatorio, analgésico	(Borja & Yumisaca, 2018) (Picho, 2018)
Isoflavonoides: Son coloreados, defiende a las plantas de patógenos	Isoflavan Isoflavona Isoflavanona Isoflav-3-ene Isoflavanol	Reducción de cardiopatía coronaria	(Cordova, 2017)

Elaborado por: Las Autoras, 2019

1.3.1 Métodos de caracterización

Los flavonoides poseen un gran número de grupos hidroxilos o azúcares que son solubles en solventes: etanol, metanol, butanol, acetona, dimetilsulfóxido, agua, mientras que las isoflavonas y flavanonas tienden a ser más solubles en solventes como: ésteres y cloroformo (Toro, y otros, 2017).

Para la separación e identificación de los flavonoides que se encuentran presentes en los extractos se pueden utilizar diferentes técnicas de cromatografía, como se muestran en la Tabla 3 (García , y otros, 2015). La técnica más empleada para la separación e identificación de flavonoides es cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Tenorio, 2016), presenta homogeneidad de las muestras, es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular (Hûbschmann, 2015).

Tabla 3.

Técnicas de separación e identificación de flavonoides

Introducción de muestras	Ionización del método	Tipo de adsorbentes	Descripción	Referencias
Cromatografía de papel (CP)	Ionización de electrones	AlCl ₃ , Complejo Difenil-ácido bórico-etanoamina, ácido sulfanílico diasotado.	Se detectan al cambiar de color al someterse a amoníaco, se visualiza en luz ultravioleta a 366nm.	(Peralta, Santi, Agnese, Cabrera, & Ortega, 2015) (Tenorio, 2016)
Cromatografía de capa fina (CCF)	Ionización química	Celulosa, sílica gel, poliamida	Aisla flavonoides puros en pequeña escala.	(Hurtado, Jurado, Ramos, & Calixto, 2015)
Cromatografía de columna (CC)	Ionización química	Sílica gel, poliamida, celulosa, sephadex	Se eluye secuencialmente compuestos individuales con solventes apropiados	(García , y otros, 2015)
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	Ionización de electrones Ionización química	Separación de flavonoides glicosilados	Separación, determinación cuantitativa e identificación de flavonoides, captados a 280nm.	(Tenorio, 2016)

Elaborado por: Las Autoras, 2019

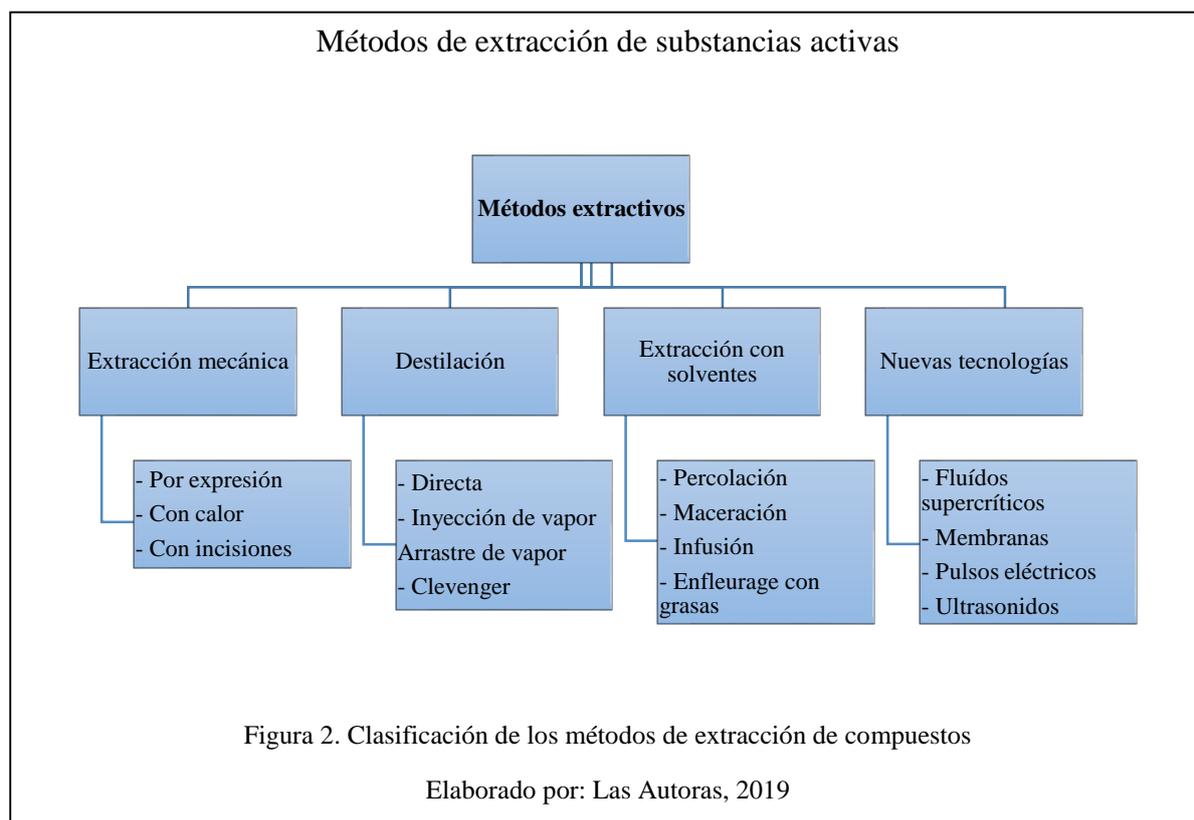
Para el estudio de los efectos biológicos de un compuesto o sustancia química, se utiliza la espectroscopia UV-VIS, es una de las herramientas más utilizadas debido a su bajo costo, facilidad y rapidez, ya que se basa en la interacción de la radiación con la materia, específicamente en la absorción de la radiación Uv y/o visible por parte de las moléculas que forman parte del compuesto (Maldonado, Casañas, Martínez, & San Martín, 2018), se trabaja en un rango de longitud de onda de 200 a 800 nm que permite emplear la técnica en diversas áreas como: concentración de una solución, actividad enzimática, cuantificación de proteínas, evaluación de viabilidad celular (Azevedo, Gama, Lima, Barbosa, & Ugulino, 2010).

La espectrometría de masas se basa en el movimiento de partículas cargadas en una celda de confinamiento, permite la separación, identificación y cuantificación de moléculas de acuerdo a la relación que existe entre masa y carga en diferentes estados de materia después de su ionización iónico (Dávalos, Romero, Sánchez, Chávez, & Valderrama-Negrón, 2017). Esta técnica permite el análisis de proteínas celulares y metabolitos, identificación y cuantificación sistemática de pequeñas moléculas, caracteriza las moléculas que componen una mezcla (Fernández, Vela, & Ibarra, 2009).

1.4 Métodos de obtención de extractos de flores

En los extractos vegetales se encuentran las sustancias activas de una planta, el método consiste en transferir estos compuestos de la planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol en diferentes proporciones (ANFACO, 2011); se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen como se muestra en la Figura 2 (Kuklinski, 2003).

Los compuestos sintetizados por las células de las plantas, llamados metabolitos secundarios, poseen propiedades como antimicrobianos, insecticidas, antioxidantes; las técnicas de extracción permiten obtenerlos y concentrarlos para su uso en diferentes aplicaciones tanto industriales como medicinales (Meneses, Soto, Espinosa, & Ramírez, 2008).



1.4.1 Extracción Mecánica

La técnica se basa en aplicar presión sobre la droga adicionando solventes hasta obtener una sustancia acuosa, donde los principios activos de interés se encuentran disueltos y se realiza cortes por donde caen los fluidos de la planta (Navas, 2009).

1.4.2 Destilación

Se basa en la diferente volatilidad de los principios activos de la planta, la ebullición selectiva y la condensación permite la separación de los componentes más volátiles (López, y otros, 2016).

1.4.3 Extracción con Solventes

Los principios activos de la planta se separan al ponerse en contacto con un solvente solo o en mezcla, debido que para utilizar un solvente se debe determinar su selectividad, estabilidad, inercia química, temperatura de ebullición, seguridad de manipulación y la capacidad de absorber sustancias acuosas o liposolubles, los más utilizados son el agua y alcoholes como metanol y etanol en diferentes proporciones de acuerdo a la polaridad de los compuestos de interés (Fan, Han, Gu, & Chen, 2008).

Los extractos hidroalcohólicos obtenidos de la extracción de una planta o parte de ella, utilizando como solvente alcohol y agua presentan sedimento, color y aroma característicos de la planta (Guntero, Longo, Ciparicci, Martini, & Andreatta, 2015).

Métodos de extracción continuos:

Los métodos de extracción continuos son aquellos que se agrega el solvente a la planta en diferentes porciones, cada solvente saturado con sustancias disueltas se coloca de manera transita continua, a la vez que sustituye una porción de solvente nuevo, éste va recirculando y actúa sobre la planta en una sola dirección como la percolación, en la cual la mezcla hidroalcohólica atraviesa la droga pulverizada en un solo sentido, y de esta manera la droga cede todos sus componentes solubles (Gutiérrez, Saá, & Vinueza, 2017).

Métodos de extracción discontinuos:

Los métodos de extracción discontinuos son aquellos en el cual el solvente es agregado a la planta una sola vez y en la cantidad completa, la extracción termina cuando existe equilibrio entre las sustancias disueltas en la planta y en el solvente (Rangel, Flores, Cadena, Morales, & Trejo, 2018). A continuación, se detallan algunas técnicas de extracción discontinuas:

- La maceración se realiza a temperatura ambiente, evitando la luz, se humedece el material vegetal triturado en un solvente hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles (Picho, 2018).
- En una infusión, se vierte el agua a 100 °C sobre la planta colocada en un recipiente hermético evitando que los principios activos se evaporen (Kuklinski, 2003)
- La digestión se utiliza en partes leñosas de la planta o que requieren un calor prolongado, donde sus principios activos son de difícil extracción (Rangel, Flores, Cadena, Morales, & Trejo, 2018).
- En la decocción se mezcla la droga vegetal más el solvente y se somete a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo por un período variable (Picho, 2018).

1.4.4 Nuevas tecnologías de extracción

Fluidos supercríticos:

Es una técnica empleada en la separación de sustancias liposolubles, que permite la modificación del disolvente de los fluidos en estado supercrítico, la selectividad se genera en función de las condiciones de presión y temperatura; siendo una buena alternativa para la

extracción y desintegración de aceites vegetales, ya que no deja impurezas en los extractos (Hurtado, Ibáñez, & Cifuentes, 2016).

Ultrasonidos

La técnica emplea sonidos de alta frecuencia con el fin de extraer compuestos de interés que se encuentren en el material vegetal, las partículas sólidas y líquidas vibran ante la acción ultrasónica, de tal manera que el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al disolvente; es una tecnología económica y con bajos requerimientos instrumentales que permite la deshidratación ultrasónica del material al extraer el agua más rápidamente (Flores, 2017).

1.5 Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana

Las metodologías para el diagnóstico de enfermedades se basan en el aislamiento de bacterias, levaduras y hongos filamentosos en medios de cultivos específicos para cada a microorganismo; el aislamiento de virus utilizando técnicas de cultivo celular, y la detección de anticuerpos mediante inmunofluorescencia directa o enzimo-inmunoensayo (Vila, y otros, 2016).

La actividad antimicrobiana se determina mediante la concentración mínima inhibitoria (MIC), la eficacia antimicrobiana y la evaluación de espectro antimicrobiano; se basa en agregar un volumen conocido del extracto o aceite esencial de la planta en estudio diluido en un tubo o caja Petri donde se encuentre el medio adecuado para el microorganismo e inocular el microorganismo a investigar (Reyes, Palou, & López, 2014).

La desventaja que presentan los métodos de evaluación antimicrobiana es la dificultad de comparar los resultados obtenidos en cada investigación, dificultando así determinar la efectividad de los extractos o aceites esenciales como agentes antimicrobianos, ya que la incubación prolongada causa la evaporación o descomposición de componentes químicos de interés, al igual que factores como el origen del extracto, medio de cultivo utilizado, temperatura, pH, fase de crecimiento del microorganismo, volumen del inóculo, tiempo de incubación, entre otros (Balouiri, Sadiki, & Koraichi, 2016).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la menor concentración requerida del extracto o aceite esencial con la capacidad de inhibir el crecimiento del microorganismo o la concentración mínima letal que lo elimine o reduzca en un 99,9 %, los métodos mayormente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana, son por contacto directo y fase de vapor (Reyes, Palou, & López, 2014).

1.5.1 Contacto Directo

Estos métodos se emplean cuando los microorganismos están en contacto constante con los extractos y aceites esenciales a evaluar (Perez, y otros, 2011).

Dilución en agar

Permite determinar si el extracto es eficaz para inhibir el crecimiento de varios microorganismos a la vez, generalmente aeróbicos o microaerofílicos, no se evalúa la turbidez o absorbancia, por lo que es utilizada con materiales no translúcidos; la principal ventaja es la facilidad de detectar contaminación y consiste en la preparación de diluciones que se añaden a

los agares, se inoculan los microorganismos y se incuba a temperatura y tiempo adecuado (Perez, y otros, 2011).

Dilución y micro-dilución en caldo

Este método permite estimar la concentración del agente antimicrobiano en un caldo de cultivo, mide cuantitativamente la actividad antimicrobiana *in vitro*, la técnica se realiza en tubos o pocillos con caldos de cultivos que contienen una dilución seriada del extracto o aceite esencial, se inocula en número definido de microorganismos y se incuba, la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo (Balouiri, Sadiki, & Koraichi, 2016).

Estos métodos son los más adecuados para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la concentración más baja que impida el crecimiento visible del microorganismo, es expresada en $\mu\text{g/mL}$ o mg/L y se utiliza generalmente en estudios con bacterias (Reyes, Palou, & López, 2014).

Difusión en agar

Es la técnica más utilizada para evaluar microorganismos aerobios, existen dos métodos de evaluación: en el primero, el agar solidificado se inocula con el microorganismo, se impregna un papel filtro con una dilución del extracto y se coloca en la superficie del agar; mientras que en el segundo método se perfora el agar solidificado e inoculado y se vierte la solución con el extracto o aceite esencial en los orificios (Reyes, Palou, & López, 2014).

La difusión del extracto en el agar inhibe el crecimiento bacteriano, formando zonas de inhibición e incrementando el diámetro al colocar el extracto de mayor concentración, de tal manera que éste método hace que sea menos confiable debido a la volatilidad de algunos componentes durante la incubación (Alarcón, y otros, 2016).

1.5.2 Fase de vapor

La técnica produce vapores de los extractos o aceites esenciales que simulan una atmósfera a una determinada temperatura creando un microambiente para cada solución (Nedorostova, Kloucek, Kokoska, Stolcova, & Pulkrabek, 2009). Los principales métodos utilizados son: caja Petri invertida, que consiste en colocar los agares inoculados en forma separada de los extractos que se impregnan en papel filtro, colocan en la tapa de la caja Petri, se invierte y se espera la volatilización de los componentes del extracto en dirección al microorganismo de prueba; y la técnica que utiliza cámaras de plástico con tapa hermética, en el interior se coloca una cantidad de extracto y sobre una rejilla se coloca agares inoculados, los vapores generados por el extracto entran en contacto con los microorganismo produciendo zonas de inhibición (Reyes, Palou, & López, 2014).

1.6 Infecciones respiratorias en humanos

Las infecciones respiratorias son las responsables de la tasa de prevalencia más alta, según la Organización mundial de la salud, son la causa más frecuente de mortalidad en todo el mundo, afectando alrededor del 20 % de la población, por lo que se las considera un problema de salud pública constituyendo el mayor porcentaje de atención médica en los centros de salud, por lo que su diagnóstico precoz es primordial (Serrano, Barcenilla, Limòn, Pujol, & Gudiol, 2016).

Según el Banco Mundial, en el Ecuador la tasa de mortalidad a causa de enfermedades relacionadas al sistema respiratorio es del 5,12 por cada 1 000 habitantes (Benites, 2018).

Cuando un microorganismo se presenta en las circunstancias adecuadas y los factores del huésped lo permiten, se produce una infección, siendo las más comunes causadas por bacterias en el tracto respiratorio, los estudios de este tipo de microorganismos varían de acuerdo al tipo de infección, cuadro clínico y grupo etario (Benites, 2018).

Las infecciones respiratorias se pueden dividir en 3 grupos de acuerdo a la parte del sistema respiratorio que afectan:

- Vías respiratorias altas: rinitis, faringitis, amigdalitis, faringoamigdalitis, otitis media, sinusitis (Vila, y otros, 2016).
- Vías respiratorias intermedias: laringitis y epiglotitis (Plotnikova, y otros, 2019).
- Vías respiratorias bajas: bronquitis, bronquiolitis, neumonía adquirida e intrahospitalaria. (Vila, y otros, 2016).

En la actualidad la principal razón para un diagnóstico etiológico de estas enfermedades es el uso masivo de antibióticos dando lugar a un aumento constante en la resistencia a los mismos, se conoce que más del 95 % de cepas de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, *Klebsiella pneumoniae* presenta un 84 % de resistencia a cefotaxima, existe una alta resistencia a la ampicilina de *Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis* (Alós, 2015) y en los últimos años se determinó que algunas cepas de *Klebsiella pneumoniae* han mostrado resistencia a carbapenémicos (Marston, Dixon, Knisely, Palmore, & Fauci, 2016).

Continuamente se descubren nuevos mecanismos de resistencia bacteriana, dando lugar a un incremento de mortalidad y morbilidad, ocasionando preocupación en las instituciones gubernamentales, ya que las mismas, son las encargadas de garantizar el bienestar de la salud de su población (García, Castillo, & Salazar, 2014), por lo cual se ha buscado alternativas naturales que nos permitan combatir con eficacia las enfermedades más comunes en la población (Gallegos, 2016).

1.6.1 Microorganismos asociados

En la neumonía adquirida se han reportado que los principales microorganismos asociados son: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *M.catarrhalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y otras enterobacterias (Solórzano & Miranda, 1998). En pacientes hospitalizados, la neumonía es de fácil transmisión debido a que su sistema inmunológico se encuentra comprometido, se puede propagar por medio de las personas dentro del hospital o puede ser asociada a ventilación mecánica, *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae* y las bacterias Gram negativas aerobias: *Pseudomona aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*, son una causa común de enfermedades pulmonares bacterianas en los hospitales, presentándose en personas de cualquier edad (Vila, y otros, 2016).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, causa una amplia variedad de enfermedades desde infecciones cutáneas, osteomielitis, sepsis, enfermedades de riesgo potencial como neumonía, ya que cuenta con componentes estructurales como: cápsula, peptidoglucanos, ácido teicoico, poteína A; enzimas como: coagulasa, hialuronidasa,

fibrinolisisina, lipasas, endonucleasas, lactamasas; y toxinas como: citotoxinas, enterotoxinas y superantígeno TSST-1; que son factores de virulencia que permiten al microorganismo resistir a las defensas del hospedero (Tong, Davis, Eichenberger, Holland, & Fowler, 2015). En la práctica clínica, las infecciones por *Staphylococcus aureus* son un problema común, siendo el microorganismo aislado con mayor frecuencia en patología humana (Togneri, Podestá, Pérez, & Santiso, 2017).

La enfermedad invasiva por *Streptococcus* del grupo A, produce patologías frecuentes en niños, principalmete *Streptococcus pyogenes*, también conocido como *Streptococcus* B-hemolítico, es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo que afecta en forma asintomática a la orofaringe y la piel; causa síndromes clínicos como: amigdalitis, faringoamigdalitis, escarlatina, abscesos subcutáneos, neumonía con derrame pleural, infección osteoarticular, mastoiditis aguda, adenitis cervical, sepsis, fascitis necrotizante, bacteriemia; generalmente los síntomas son odinofagia, afectación cutánea, dificultad respiratoria y artralgias (Suárez, y otros, 2019).

Las infecciones por *Pseudomonas* son producidas por varios tipos de bacterias, especialmente *Pseudomona aeruginosa*, que es un microorganismo aerobio, con motilidad unipolar y Gram negativo; presenta un alto impacto en las infecciones intrahospitalarias, causando dolencias como: endocarditis, neumonía, infección del tracto urinario, sepsis grave, e infecciones de la piel, ojos y oídos (Marrero, García, & Rodríguez, 2018). Se caracteriza por poseer la capacidad de desarrollar una resistencia intrínseca a casi todos los antimicrobianos disponibles, a través de la selección de mutaciones constituyendo una frecuente causa de infección con una importante morbilidad y mortalidad (Bodí & Garnacho, 2007).

Los microorganismos productores de beta-lactamasa de espectro extendido más frecuentes son los bacilos Gram negativos, en su mayoría pertenecen a la familia de Enterobacteriaceae como *Klebsiella pneumoniae* (Marrero, García, & Rodríguez, 2018). Es una especie de alta relevancia en el área clínica debido a que es la principal causa de las enfermedades oportunistas como: sepsis, infecciones del tracto urinario y tejidos blandos; provoca alrededor del 1 % de neumonías bacterianas y se caracteriza por tener enzimas codificadas genéticamente como las carbapenemasas, que son codificadas por el gen *bla-KPC* que es el responsable de que estas bacterias tengan la capacidad de transmitir la información genética con otras especies otorgando resistencia a varios antibióticos, principalmente carbapenémicos (Montúfar, y otros, 2016).

Las infecciones respiratorias crónicas y de exacerbación periódica en pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, son causadas generalmente por *Haemophilus influenzae*, es un cocobacilo Gram negativo no móvil, que puede presentar cápsula polisacárida con seis serotipos distintos; es capaz de provocar enfermedades invasoras como meningitis, neumonía, sepsis (Jurado, Martínez, & Cano, 2017) y comúnmente coloniza la faringe, especialmente las cepas no encapsuladas y las capsuladas tipo no b, afecta con mayor fuerza al tracto respiratorio superior de lactantes y niños pequeños (Gentile, y otros, 2017).

1.7 Métodos de evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria

La inflamación es un mecanismo fisiopatológico que puede generar una respuesta a diversos daños mecánicos e infecciones microbianas, que puede afectar el bienestar de las personas, una respuesta inflamatoria puede conducir desde una infección hasta generar un cáncer; por lo cual la actividad antiinflamatoria genera un gran interés en la investigación, principalmente en las industrias farmacéuticas (Alonso-Geli, Alonso-Moreno, Falcón, Lucambio, & Castro, 2015).

En la evaluación de nuevos compuestos antiinflamatorios se utilizan modelos de experimentación en animales para poder extrapolar resultados y evaluar el efecto del compuesto en humanos dependiendo de la técnica experimental empleada (El-desoky, Abdel, Ahmed, El-Beltagi, & Hattori, 2018). Las técnicas que permiten evaluar de manera confiable las propiedades antiinflamatorias de diversos compuestos, se clasifican en:

- Modelos de inflamación aguda: se caracterizan por la presencia de vasodilatación, acentuada permeabilidad, infiltración de neutrófilos y edema. Estas técnicas incluyen edema plantar, edema auricular (Jiang, y otros, 2020).
- Modelos de inflamación crónica: se provoca un daño de las células con la simultánea destrucción y cura del tejido dañado, durante lo cual, se activa la ciclooxigenasa para la producción de prostaglandinas causando dolor, edema y fiebre. Se utilizan las técnicas de granulomas inducidos por disco de algodón y artritis por adyuvante y carragenina (Hocker, Stokes, Powell, & Huxtable, 2017).
- Técnicas específicas como la Técnica de Edwards, Técnica de Sedwick (Zamora, Molina, Mena, & Nodal, 2017).

La determinación de métodos de evaluación *in vivo* de la actividad antiinflamatoria en animales se realiza en función de la forma de aplicación, agente irritante utilizado y duración del proceso inducido, que constituyen los parámetros para la elección del método de evaluación adecuado en cada investigación (Núñez, y otros, 2018)

Los métodos que provocan una irritación tóxica, aguda o subcrónica se utilizan para el estudio de sustancias activas en procesos inflamatorios de piel y mucosas, la administración oral o parenteral se realiza en el estudio de agentes de efecto sistémico, independientemente del agente irritante (Castañeda, y otros, 2002). La duración del proceso determina la utilidad del extracto o agente antiinflamatorio, ya que en algunos procesos agudos se cuantifica el edema inducido en horas o minutos. Otros procesos inducen una inflamación, donde se pueden valorar otros parámetros, como enzimas inducidas, o mediadores liberados (Zamora, Molina, Mena, & Nodal, 2017).

El porcentaje de inflamación se determina en base al grupo control que no va a ser tratado, al cual se le administra solamente el agente irritante produciendo un 100 % de inflamación y el grupo experimental al cual se administra el compuesto antiinflamatorio de interés a evaluar, se debe comparar el resultado con una sustancia o fármaco de referencia (Núñez, y otros, 2018).

Capítulo 2

Marco Metodológico

2.1. Localización y material vegetal

Las flores de *Dalea coerulea* fueron recolectadas en la Ruta Ecológica “El Chaquiñán”, ubicado en la parroquia Cumbayá de la ciudad de Quito, con las siguientes coordenadas geográficas: Latitud: -0.1898214, Longitud: -78,3932257, Altitud 2340 m.s.n.m. (Holguín, 2009).

El estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana., Sede Quito, Campus El Girón.

2.2. Elaboración de extractos

2.2.1. Obtención del extracto hidroalcohólico

Para extraer la solución hidroalcohólica se utilizó la técnica descrita por (Guntero, Longo, Ciparicci, Martini, & Andreatta (2015), donde el material vegetal recolectado se secó en la estufa marca *Memmert* SM 200, a 40 °C por 48 horas, se pulverizó con un molino y se pasó por un tamiz de 850 µm para obtener una muestra de tamaño homogéneo. Se prepararon concentraciones al 20, 50 y 90 % de etanol absoluto en agua destilada.

Se pesó 1g de la muestra vegetal y se mezcló con 100 mL de cada solvente. Para reducir el tiempo de extracción y aumentar el rendimiento se utilizó el método de extracción asistida por ultrasonido, se llevaron las soluciones al ultrasonido por 20 minutos en el baño ultrasónico

marca *Fisher Scientific* FS60 y se filtraron utilizando filtros de jeringa *Whatman* 0,45 μm y 13 mm para eliminar impurezas del extracto, y se almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente, se obtuvo tres tipos de extractos hidroalcohólicos detallados en la Tabla 4.

Tabla 4.

Extractos hidroalcohólicos

Extracto	Solvente	
	% Etanol	% agua destilada
Extracto D1	20	80
Extracto D2	50	50
Extracto D3	90	10

Elaborado por: Las Autoras, 2019

2.2.1. Liofilización

Se eliminó el etanol de los extractos utilizando un rotavapor marca *IKA*- Bs1HB10- RV10, a 40 °C, con un tiempo de 30 minutos por cada 100 mL de extracto a 50 RPM y 500 mbar (González, y otros, 2016). Para el proceso de liofilización se tomó la metodología de la investigación realizada por Mosquera, Ayala, & Serna (2019), con ligeras modificaciones, se congelaron los extractos líquidos libres de etanol a -80 °C en un ultracongelador marca *Thermo scientific* REVCO- RLE 500 y se colocaron en el equipo liofilizador marca *Martin Christ*, Alpha 1- 4LSC plus, a las siguientes condiciones: secado principal, -39 °C y 0,144 mbar por 48 horas y secado final, -50 °C y 0,039 mbar por 22 horas. Los extractos liofilizados se conservaron en un armario congelador a -20 °C en recipientes herméticos.

Se calculó el rendimiento del extracto con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{gramos de extracto liofilizado}}{\text{gramos de material vegetal}} \times 100$$

Fuente: (Baser & Buchbauer, 2016)

2.3. Fenoles totales por el método colorimétrico de Folin Ciocalteu

Los fenoles totales se cuantificaron según la metodología propuesta por Noriega, Sola, Barukcic, García, & Osorio (2015).

2.3.1. Preparación del reactivo de Folin Ciocalteu

Se disolvieron 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0,200 g de ácido fosmolíbico y 5 mL de ácido fosfórico al 85 % en 75 mL de agua destilada. Se reflujo la solución por 2 horas y se completó con 100 mL de agua destilada (Cortez, Falcán, Pirovani, & Piagentini, 2018).

2.3.2. Preparación de la curva de calibración

Para la curva de calibración se preparó soluciones de ácido gálico con una pureza de 99,5 %, en las siguientes concentraciones:

- A. 100 ppm: 1 mg de ácido gálico + 10 mL de etanol al 96 %
- B. 250 ppm: 2 mg de ácido gálico + 10 mL de etanol al 96 %
- C. 500 ppm: 5 mg de ácido gálico + 10 mL de etanol al 96 %
- D. 1000 ppm: 10 mg de ácido gálico + 10 mL de etanol al 96 %
- E. 2000 ppm: 20 mg de ácido gálico + 10 mL de etanol al 96 %

Para cada una de las concentraciones de ácido gálico, se tomó 0,050 mL y se preparó las siguientes soluciones:

Tabla 5.

Curva de calibración del ácido gálico para fenoles totales

Concentración ácido gálico	Ácido gálico	Agua destilada	Reactivo de Folin	Carbonato de sodio al 20 %
0 ppm	0 mL	4 mL	0,250 mL	0,750 mL
100 ppm	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL
250 ppm	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL
500 ppm	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL
1000 ppm	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL
2000 ppm	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL

Elaborado por: Las Autoras, 2019

2.3.3 Preparación de la muestra

Se utilizaron los extractos hidroalcohólicos de *Dalea coerulea* detallados en la Tabla 4, para preparar las siguientes soluciones:

Tabla 6.

Preparación de las soluciones de los extractos para fenoles totales

Extracto hidroalcohólico		Agua destilada	Reactivo de Folin	Carbonato de sodio al 20 %
Blanco	0 mL	4 mL	0,250 mL	0,750 mL
D1	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL
D2	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL
D3	0,050 mL	3,950 mL	0,250 mL	0,750 mL

Elaborado por: Las Autoras, 2019

2.3.4 Lectura de soluciones

Las soluciones preparadas para la curva de calibración y las muestras se dejaron reposar en la oscuridad por 2 horas y luego se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro marca UV-VIS, modelo Jasco V-730 a 765 nm, se registró el valor de las absorbancias, para las lecturas se realizaron cuatro repeticiones. Se usó como blanco alcohol al 96 %.

2.3.5 Análisis estadístico

La cuantificación de fenoles totales se calculó a través de la ecuación obtenida por regresión lineal de la curva de calibración (Urías, Basilio, Muy-Rangel, y Niño-Medina, 2016) y se reportan los resultados en mg de equivalentes de ácido gálico por g de muestra. Para el análisis de resultados se trabajó con el programa estadístico *InfoStat* versión 2019. Se evaluaron los resultados con la prueba de normalidad de Shapiro & Wilks y un valor de nivel de significancia de 0,05. Se empleó la prueba de Kruskal Wallis con categorización por comparación, los tratamientos se manejaron con 4 repeticiones donde:

T1: Tratamiento con etanol al 20 % D1.

T2: Tratamiento con etanol al 50 % D2.

T3: Tratamiento con etanol al 90 % D3.

2.4. Flavonoides totales por el método de cloruro de aluminio

La cuantificación de flavonoides totales se realizó según el procedimiento establecido por Souza, y otros (2018), donde el método colorimétrico forma complejos de ácidos con el grupo cetona en C-4 y el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonoides.

2.4.1 Preparación de la curva de calibración

Para la curva de calibración se utilizó Quercetina con una pureza de 95 %, detallada en la ficha técnica del reactivo, se preparó una solución madre de 1000 ppm, se colocó 10 mg en un balón volumétrico y se aforó a 10 mL con etanol al 96 %. A partir de esta solución madre se prepararon cuatro soluciones de Quercetina de 100, 200, 500 y 700 ppm. Posteriormente, se prepararon las siguientes soluciones:

Tabla 7.

Curva de calibración de Quercetina para flavonoides totales

Concentración Quercetina	Quercetina	Agua destilada	Etanol 96 %	Acetato de Potasio 1M	Cloruro de Aluminio 1 %
0 ppm	0 mL	2,800 mL	2 mL	0,100 mL	0,100 mL
100 ppm	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL
200 ppm	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL
500 ppm	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL
700ppm	0,5 mL	2,8 mL	1,500 mL	0,100 mL	0,100 mL

Elaborado por: Las Autoras, 2019

2.4.2. Preparación de la muestra

Se utilizaron los extractos hidroalcohólicos de *Dalea coerulea* detallados en la Tabla 4 y se prepararon las siguientes soluciones:

Tabla 8.

Preparación de las soluciones de los extractos para flavonoides totales

Extracto hidroalcohólico	Agua destilada	Etanol 96 %	Acetato de Potasio 1 M	Cloruro de Aluminio 1 %
Blanco	0 mL	2,800 mL	2 mL	0,100 mL
D1	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL
D2	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL
D3	0,500 mL	2,800 mL	1,500 mL	0,100 mL

Elaborado por: Las Autoras, 2019

2.4.3. Lectura de soluciones

Las soluciones preparadas para la curva de calibración y las muestras se dejaron reposar en la oscuridad por 30 minutos y luego se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro a 405 nm, se registró el valor de las absorbancias con cuatro repeticiones. Se usó como blanco etanol al 96 %.

2.4.4 Análisis estadístico

La concentración de flavonoides totales se determinó mediante la ecuación generada por la regresión lineal de la curva patrón (Barrón-Yáñez, García-Mateos, Soto-Hernández, y Colinas-León, 2011), obtenida de las absorbancias registradas de las soluciones de Quercetina y se reportan los resultados en mg de equivalentes de Quercetina por g de muestra vegetal utilizando el programa estadístico *InfoStat* versión 2019. Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro & Wilks con un valor de nivel de significancia de 0,05. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) y un análisis de separación de medias de Tukey al 5 % (0,05), con 4 repeticiones para los tratamientos donde:

T1: Tratamiento con etanol al 20 % D1.

T2: Tratamiento con etanol al 50 % D2.

T3: Tratamiento con etanol al 90 % D3.

2.5. Identificación de flavonoides por espectrometría de masas

2.5.1. Preparación del extracto

Se pesó 1 g de la droga vegetal seca, se añadió 10 mL de metanol y se sometió a ultrasonido por 20 minutos en el baño ultrasónico y se filtró utilizando filtros de jeringa 0,45 µm y 13 mm en un frasco ámbar, para eliminar impurezas del extracto. Se tomó 5 mL del extracto y se añadió 5 mL de ácido clorhídrico 2M, se reflujo la solución por 1 hora en Baño María para eliminar azúcares presentes en el extracto (Soto, 2015).

2.5.2. Técnica cromatográfica TLC

Previamente se preparó la fase móvil: benceno 40 mL, etil acetato 10 mL y ácido fórmico 5 mL, se colocó en la cámara cromatográfica y se dejó saturar por 2 horas (Hübschmann, 2015). Con el equipo *Linomat-5 Camag*, se sembró 30 µL del extracto en placas de sílica gel marca *Merck* (L X W 10cm x 10cm, GF 254), se colocó la placa en la cámara cromatográfica con 55 mL de la fase móvil y se dejó que la solución recorra 9 cm por la placa (Sherma & Fried, 2003).

Se sacó la placa cromatográfica, se secó con secador industrial a temperatura media por 10 minutos. Los componentes separados se visualizaron mediante una lámpara UV marca *Camag UV Cabinet*, para detectar y calcular los valores R_f (referencia frontal) de los compuestos activos (Tenorio, 2016), mediante la siguiente fórmula:

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

2.5.3. Espectrometría de masas

Los compuestos separados por TLC fueron extraídos empleando metanol como solvente, disueltos y aforados con una solución de ácido acético al 0,1 % en metanol, con la finalidad de formar un ion $[M]^{+1}$, la solución fue inyectada directamente en el espectrómetro de masas marca *Thermo Fisher*, modelo Orbitrap extractive plus A0793, la verificación de la estructura del compuesto se basó de manera preponderante en la identificación del ion molecular $[M]^{+1}$ (Toribio, Moyano, Puignou, & Galceran, 2002).

2.6. Actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de micro-dilución en pocillos propuesto por Villareal, y otros (2017), este método permite evaluar la sensibilidad de los microorganismos al obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en $\mu\text{g/mL}$.

Las cepas usadas fueron 2 bacterias Gram positivas: *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615_{TM} y *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC 29213_{TM}; y 3 bacterias Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* ATCC 10031_{TM}, *Haemophilus influenzae* ATCC 10211_{TM} y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 9027_{TM}. El número ATCC se seleccionó de acuerdo al historial de investigación y la ficha de información de cada microorganismo (Anexo 6).

Se utilizó terpineol con una pureza de 96 %, como control natural por su connotada actividad antimicrobiana, el antibiótico clotrimazol en tabletas de 100 mg, fue empleado como patrón sintético de comparación y como blanco negativo se utilizó DMSO (dimetilsulfóxido).

2.6.1 Reactivación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se reactivaron según el manual Técnico de Información Microbiológicos, Kwik Stik (2011), en cajas Petri con estriado simple, en las condiciones descritas a continuación:

Tabla 9.

Condiciones de crecimiento de microorganismos

Microorganismo	Medio de cultivo	T°	Tiempo horas	Atmósfera
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 TM	Agar Sangre Cordero Caldo Mueller- Hinton	35 °C	24-72	aerobia
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i> ATCC 29213 TM	Agar/Caldo Mueller- Hinton	35 °C	24- 48	aerobia
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i> ATCC 10031 TM	Tripticasa Soya Agar/caldo	35 °C	24- 48	aerobia
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 10211 TM	Agar chocolate Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón)	35 °C	24-48	5 % CO ₂
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 9027 TM	Tripticasa Soya Agar/caldo	35 °C	24- 48	aerobia

Elaborado por: Las Autoras, 2019

2.6.2 Preparación de las concentraciones de los extractos liofilizados de *Dalea coerulea*, terpineol y clotrimazol

Los extractos liofilizados D1, D2 y el clotrimazol se evaluaron al 5 %, para lo cual se pesaron 500 mg de cada compuesto y se diluyó en 10 mL de DMSO. El terpineol se preparó al 20 %, tomando 2 mL más 8 mL de DMSO. Las soluciones se prepararon en viales ámbar, se llevaron al ultrasonido por 10 minutos para homogenizar las soluciones y se filtraron con filtros de jeringa 0,45 µm y 13 mm.

2.6.3. Estandarización del inóculo bacteriano

Se tomó una asada de una unidad formadora de colonia de la placa de agar con cada microorganismo previamente sembrado, con la ayuda de un asa de siembra se colocaron en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo de cultivo específico para cada microorganismo y se dejó incubar, en las condiciones descritas en la Tabla 9.

Luego de 24 horas, se confirmó el crecimiento bacteriano, se centrifugó el inóculo en el equipo *Hermle Z400*, por 30 minutos a 3000 rpm quedando la bacteria sedimentada, se eliminó el sobrenadante y se añadió 5 mL de solución fisiológica estéril al 0,9 % y se mezcló por 3 minutos en vórtex. La estandarización del inóculo se basó en la técnica descrita por Carlone & Pompei (2013), ajustando la turbidez del inóculo con el espectrofotómetro a una densidad óptica entre 0,08 a 0,11 y longitud de onda de 625 nm que corresponde a $1 - 2 \times 10^8$ UFC de bacterias por mL de suspensión, para lo cual se añadió progresivamente solución fisiológica estéril al 0,9 % hasta llegar al parámetro.

2.6.4. Inoculación en placas multipocillo

Se utilizó una microplaca estéril VWR para cultivo celular de 96 pocillos para cada microorganismo a evaluar. En la parte superior horizontal de la fila A, se colocaron 180 μL del caldo de cultivo correspondiente a cada microorganismo como se describe en la Tabla 9, con una micro pipeta multicanal S8, de la misma manera en los pocillos restantes desde la fila de la B hasta la H se puso 100 μL del caldo de cultivo. En la parte superior horizontal de la fila A se adicionó 20 μL de las soluciones preparadas al 5 % de los extractos liofilizados D1, D2 y del clotrimazol y la solución al 20 % de terpineol, para obtener un volumen de 200 μL , como se muestra en la Figura 3.

Con ayuda de la micro pipeta multicanal, en la fila A, se mezcló el medio de cultivo con los extractos o los controles, respectivamente, hasta obtener una solución homogénea y se tomó 100 μL de la fila A a la fila B, este paso se realiza consecutivamente hasta llegar a la fila H, de la cual se tomó 100 μL y se desechó, este paso se realiza para disminuir sucesivamente la concentración a la mitad en cada pocillo.

Posteriormente, se colocó un volumen específico del inóculo de las bacterias preparado anteriormente a una concentración de 10^8 UFC/mL, como se detalla en la Tabla 10. Se sellaron las placas con parafilm, se envolvieron en papel aluminio y se llevaron a incubación con agitación a 50 rpm por 24 horas en las condiciones correspondientes de cada microorganismo detallado en la Tabla 9. La evaluación de los extractos se realizó por triplicado y en condiciones de esterilidad.

Tabla 10.

Volúmenes de inóculo y TTC en las placas multipocillos para cada bacteria

Microorganismo	Medio de cultivo (μL)	Inóculo (μL)	TTC (μL)	Volumen final
<i>Streptococcus pyogenes</i>	100	40	30	170
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>subsp. aureus</i>	100	40	30	170
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i>	100	30	20	150
<i>Haemophilus influenzae</i>	100	50	40	190
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	100	30	20	150

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Filas y columnas en placa multipocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	Control positivo (medio de cultivo más inóculo)
B	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	
C	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	
D	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	
E	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	
F	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	
G	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	
H	D1	D1	D1	D2	D2	D2	TER	CLO	DMSO	

Figura 3. Distribución de las soluciones D1, D2, terpineol, clotrimazol, dimetilsulfóxido y control en la placa multipocillos por filas del 1 al 10 y columnas desde A hasta H.

2.6.5 Preparación y adición del colorante de 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)

El colorante TTC con una pureza del 99 %, se preparó a una concentración del 1 % un día antes del ensayo, para lo cual se colocó 100 mg en 10 mL de agua destilada estéril en un frasco ámbar, se conservó en refrigeración debido a la sensibilidad del compuesto a la luz y el calor.

Posterior al tiempo de incubación (24 horas) de las placas multipocillo, se adicionó un volumen determinado del colorante TTC a cada pocillo de acuerdo al microorganismo evaluado, como se detalla en la Tabla 10 y se incubaron las placas a las condiciones correspondientes para cada microorganismo por 10 minutos.

2.6.6 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria MIC

Transcurrido el último periodo de incubación, se observó que los pocillos tomaron una coloración entre amarillo y rojo (Anexo 6), producto de la reacción redox del TTC que indica la respiración celular. Debido a la coloración del extracto utilizado, la MIC se determinó de forma cualitativa, mediante la coloración en cada pocillo y se expresó en µg/mL.

2.7. Actividad anti-inflamatoria *in vivo*

Para evaluar la actividad anti-inflamatoria *in vivo* del extracto liofilizado D2, se utilizó la metodología Edema plantar inducido por carragenina, propuesta por González, Ospina, & Rincón (2011).

2.7.1. Animales de experimentación:

Se emplearon 21 ratones albinos Balb/C machos de 11 semanas, suministrados por el Laboratorio de Inmunología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, y mantenidos en un ambiente controlado (temperatura $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad $70 \pm 5\%$, ciclos de luz de 12 horas). Se formó 7 grupos con 3 ratones en cada uno, para evaluar la actividad antiinflamatoria de 4 dosis del extracto liofilizado D2: 200; 100; 50 y 25 mg/kg, de acuerdo al peso de cada ratón y los controles respectivos, representados en la Tabla 11.

Tabla 11.

Grupos de experimentación de ratones Balb/C y controles

Grupos	Compuesto	Dosis	Concentración	Concentración	
		mg/kg	mg/mL	% p/v	
Grupo 1	Control	N/A	N/A	N/A	
Grupo 2	Control negativo	CMC	100	10	0,5
Grupo 3	Control positivo	Diclofenaco sódico	100	10	1
Grupo 4	Dosis 4	D2	25	1,250	0,125
Grupo 5	Dosis 3	D2	50	2,500	0,250
Grupo 6	Dosis 2	D2	100	5	100
Grupo 7	Dosis 1	D2	200	10	200

Elaborado por: Las Autoras, 2019

2.7.2. Preparación de las soluciones

Se utilizó como vehículo una solución al 0,5 % de carboximetilcelulosa (CMC) diluida en suero fisiológico 0,9 %. De acuerdo a las dosis establecidas: 200; 100; 50 y 25 mg/kg, se prepararon soluciones de administración oral para el extracto liofilizado D2, en concentraciones de: 1; 0,5; 0,25 y 0,125 %, respectivamente y diclofenaco sódico al 1 %, como se detalla en la Tabla 11. Como agente irritante se utilizó carragenina *Ceamlacta* 2018, a una concentración del 1 % en solución fisiológica inyectable estéril.

2.7.3. Edema plantar inducido por carragenina

Se midió el área de la pata derecha del ratón antes de la aplicación de los tratamientos con un calibrador digital, se registró como punto de partida. Se administraron las soluciones del extracto liofilizado D2, control negativo y control positivo a cada grupo de ratones, respectivamente, por vía oral a través de una sonda de alimentación veterinaria. Al grupo blanco no se le administró ninguna solución.

Transcurridos 30 minutos, se inmovilizó al animal de experimentación, se desinfectó la zona de punción y se administró 0,1 mL de carragenina al 1 % por vía subcutánea, en la aponeurosis plantar de la pata derecha de cada rata.

Se realizaron 4 mediciones posteriores a la basal en los grupos, la primera medición fue a los 30 min de haber administrado la carragenina, la segunda medición fue a los 90 min, la tercera medición fue a los 180 min y la cuarta medición a los 300 min de la administración. Se calculó el porcentaje de inflamación utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inflamación} = \frac{At - Ao}{Ao} \times 100$$

Dónde:

A_t = área de la pata inflamada a un tiempo x

A_0 = área normal (antes de la aplicación de la carragenina)

2.7.4 Análisis estadístico

En el análisis de resultados, se compararon los porcentajes de inflamación de las dosis 200; 100; 50 y 25 mg/kg del extracto liofilizado D2 y los grupos control mediante el programa estadístico InfoStat versión 2019. Se evaluaron los resultados con la prueba de normalidad de Shapiro & Wilks y un valor de nivel de significancia de 0,05. Se aplicó la técnica del área bajo la curva según la metodología escrita por Guillén, y otros (2018), con algunas variaciones. Se realizó un análisis de varianza ANOVA con Diseño Completamente Aleatorizado (DCA) y separación de medias de Tukey al 5 % (0,05), los tratamientos se realizaron con 3 repeticiones donde:

T1: Tratamiento control.

T2: Tratamiento con 100 mg/kg de CMC.

T3: Tratamiento con 100 mg/kg de diclofenaco sódico.

T4: Tratamiento con 25 mg/kg del extracto liofilizado D2.

T5: Tratamiento con 50 mg/kg del extracto liofilizado D2.

T6: Tratamiento con 100 mg/kg del extracto liofilizado D2.

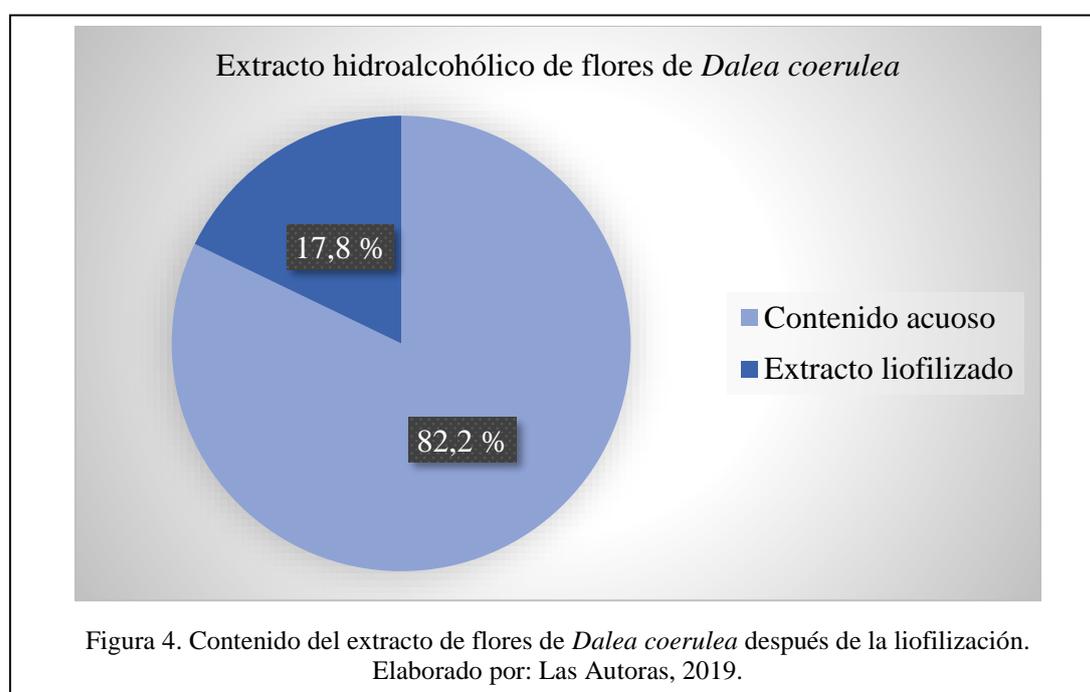
T7: Tratamiento con 200 mg/kg del extracto liofilizado D2.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Rendimiento del extracto hidroalcohólico liofilizado

Se determinó un rendimiento del $17,820 \pm 1,800$ % equivalente a 1,780 g de extracto liofilizado por cada 10 g de flores de *Dalea coerulea* como se muestra en la Figura 4, tomando en cuenta que se utilizó material vegetal seco y solvente etanólico al 20, 50 y 90 %. El proceso de liofilización permite conservar la composición química del material vegetal gracias al uso de bajas temperaturas a condiciones de vacío (Surco-Laos, Tipiana, Torres, Valle, & Panay, 2017), el porcentaje de rendimiento varía de acuerdo a la parte de la planta utilizada, el rendimiento es más alto cuando se utiliza extractos etanólicos usando toda la planta (Vásquez, Castro, & Ramos, 2017).



3.2. Cuantificación de fenoles totales

Para determinar el contenido de fenoles totales en flores de *Dalea coerulea* mediante el método colorimétrico Folin Ciocalteu para los extractos asignados como: D1, D2 y D3 explicados en la sección 2, se estableció tres tratamientos: T1, T2 y T3, respectivamente. En la prueba de normalidad, se obtuvo un p-valor menor a 0,05 para todos los tratamientos, lo que indica que los datos no son paramétricos. Se aplicó la prueba de Kruskal Wallis obteniendo un p-valor de 0,0002 (Anexo 5) siendo menor a un p-valor de 0,05; demostrando que los tratamientos no presentan la misma cantidad de fenoles, diferenciándose en dos categorías como se representan en la Tabla 12.

Tabla 12.

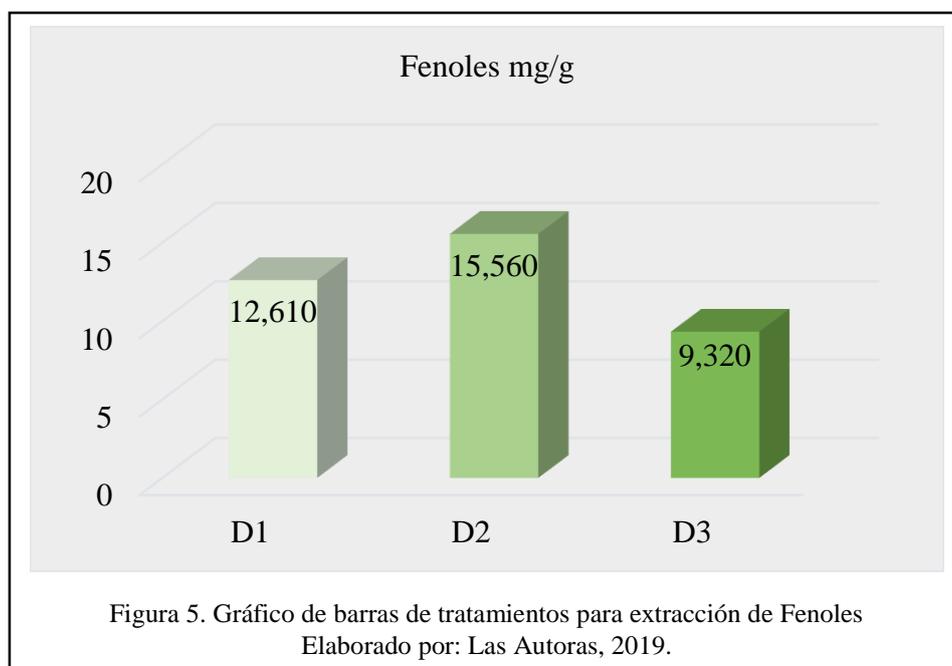
Categorización de tratamientos por Kruskal Wallis

Extracto	Tratamiento	Medias	Desv. estándar	Categoría
D2	T2	15,560	0,470	A
D1	T1	12,610	0,620	A B
D3	T3	9,320	1,210	B

Elaborado por: Las Autoras, 2019.

En la Tabla 12 se presentan los valores con la prueba de Kruskal Wallis, en la cual los tratamientos se encuentran separados por medias y categorías, A y B, expresados en mg/g, dando como mejor tratamiento a la categoría A correspondiente a D2 y D1, el mismo que se descarta debido a que comparte categoría con D3. El tratamiento 1 (D1) representa el etanol al 20 %, usado para extraer los compuestos.

En la Figura 5 se representa gráficamente la cantidad de fenoles con las medias presentadas en la prueba Kruskal Wallis y considerando la desviación estándar, donde se evidencia al tratamiento 2 (D2) como el mejor.



En cuanto a los resultados el solvente etanólico al 50 % extrajo un total de 15,560 mg/g para fenoles totales en flores de *Dalea coerulea*, sin embargo, el tratamiento 1 (D1) usando el solvente al 20 % tiene una media de 12,610 mg/g, por lo que podría considerarse como una segunda opción.

En un estudio realizado con especies del genero *Dalea*, propuesto por Peralta, Del Gaudio, Cabrera, & Ortega (2009), usa como material vegetal las raíces de; *Dalea Leporin*, *Dalea boliviana* y *Dalea elegans*, donde obtuvo valores de fenoles de $17,200 \pm 0,200$; 48 ± 2 y $55,260 \pm 0,060$ respectivamente, mismos que partieron de usar etanol y fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto, dato que podemos comparar entre *Dalea leporin* y *Dalea coerulea* ya que presentan similar contenido de fenoles.

Lara-Cortés, y otros, (2014), en su estudio evalúa los compuestos fenólicos asociados a las coloraciones de las flores donde usa plantas del género *Dahlia* empleando un extracto alcohólico de 40 % v/v de etanol, donde hace énfasis que las flores de este género que presentan color morado o púrpura contienen una mayor cantidad de fenoles, mismo color que presenta *Dalea coerulea*.

Otro estudio propuesto por Montes-de-Oca-Márquez, y otros (2017), logro determinar la composición química de flores y tallos de *Dalea carthagenensis*, donde hace énfasis en la presencia de compuestos fenólicos en ambos extractos, además también señalo la presencia de taninos y saponinas usando extractos alcohólicos. Además, menciona que las plantas de la familia Fabaceae reportan altos contenidos de compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides, debido a que fijan el nitrógeno atmosférico, lo cual permite la producción de estos metabolitos, familia a la cual pertenece *Dalea coerulea*.

3.3. Cuantificación de flavonoides totales

Para determinar el contenido de flavonoides totales en flores de *Dalea coerulea* se empleó el método de Cloruro de Aluminio, usando 3 concentraciones del solvente para los extractos D1, D2 y D3, donde el análisis de varianza dio un p-valor de 0,0001 (Anexo 5) siendo menor a un p-valor de 0,05 dando una diferencia significativa, por lo que los tratamientos presentan diferencias y se aplica un análisis de separación de medias Tukey ($P \leq 0,05$) al 5 % para evaluar el mejor tratamiento presentado en la Tabla 13.

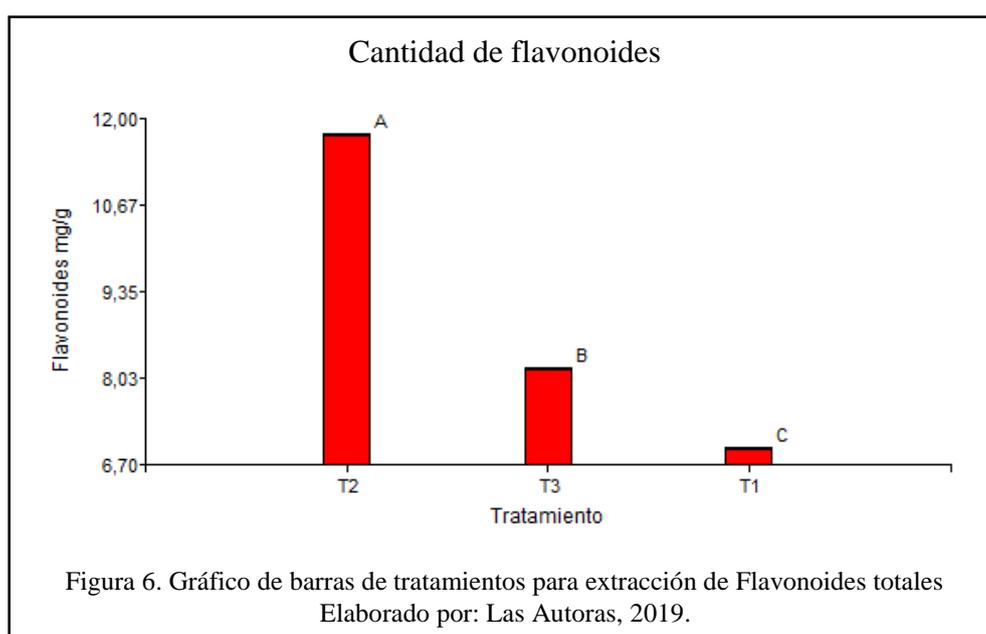
Tabla 13.

Categorización de tratamientos por análisis Tukey ($P \leq 0,05$) al 5 % para Flavonoides totales.

Extracto	Tratamiento	Medias	Error experimental	Categoría
D2	T2	11,730	0,030	A
D3	T3	8,150	0,030	B
D1	T1	6,940	0,030	C

Elaborado por: Las Autoras, 2019.

Como vemos en la prueba de Tukey expresada en la Tabla 13, arroja como mejor tratamiento para extracción de flavonoides totales el tratamiento 2, el cual representa el solvente etanólico usado al 50 %, dando un valor de 11,730 mg/g con un valor de error experimental de $\pm 0,030$. De igual manera en la Figura 6 se observa el gráfico de barras que se obtuvo del programa estadístico para los tratamientos donde se observa claramente la diferencia entre los tratamientos.

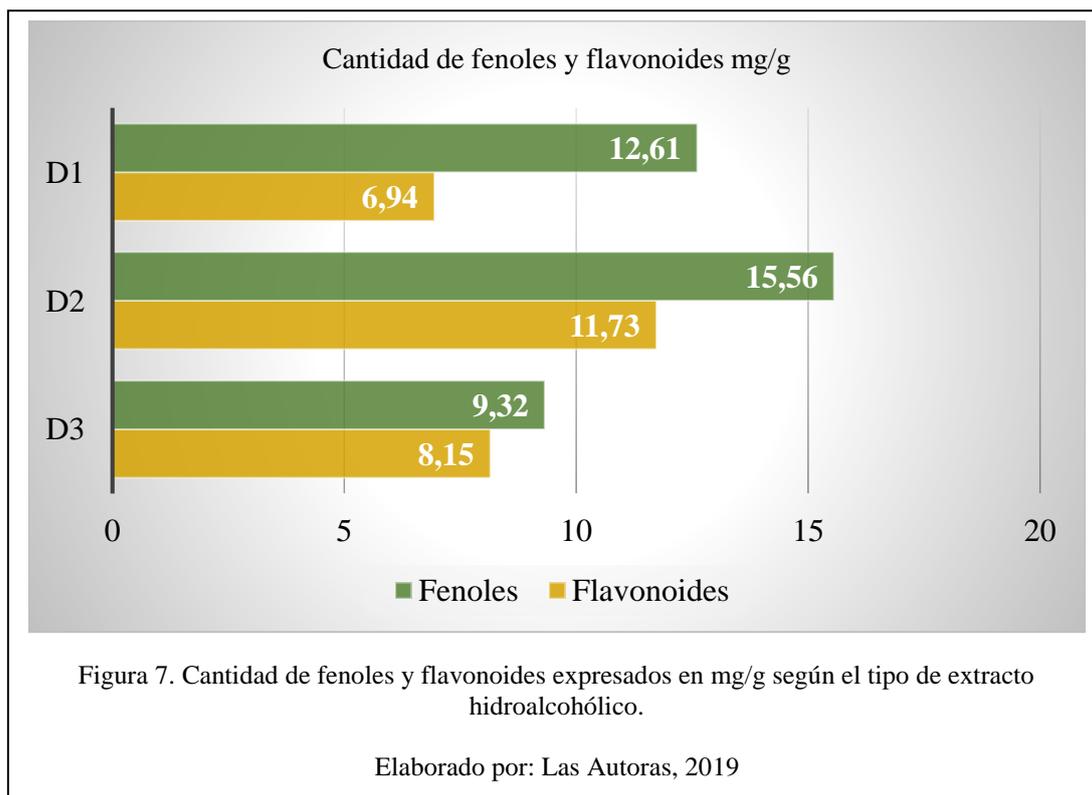


Peralta, Cabrera, & Pérez (2013) mencionan que los flavonoides tienen una distribución un tanto limitada en familias botánicas destacándose Leguminosas, Moraceas y Asteraceas, encontrando en las Leguminosas el género *Dalea*.

El tamizaje fitoquímico de extracto de hojas y flores de Iso realizado por Castro & Abdo (2013), denota una evidencia de flavonoides al realizarse extractos alcohólicos y acuosos en hojas y flores aplicando el ensayo de Shinoda y una alta evidencia de flavonoides con el ensayo de Antocianidina con extractos alcohólicos.

En cuanto al contenido de flavonoides en el estudio presentado por Peralta, Del Gaudio, Cabrera, & Ortega (2009), usando 3 diferentes especies del genero *Dalea*, siendo estas; *Dalea Leporina* con un contenido de flavonoides de $9,100 \pm 0,200$; *Dalea boliviana* $42,100 \pm 0,700$ y *Dalea elegans* con $46,900 \pm 0,500$; usando etanol al 70 % como solvente de extracción, se encuentra una relación cercana con *Dalea coerulea* que tiene un 11,730 mg/g, datos que se asemejan con *Dalea Leporina*.

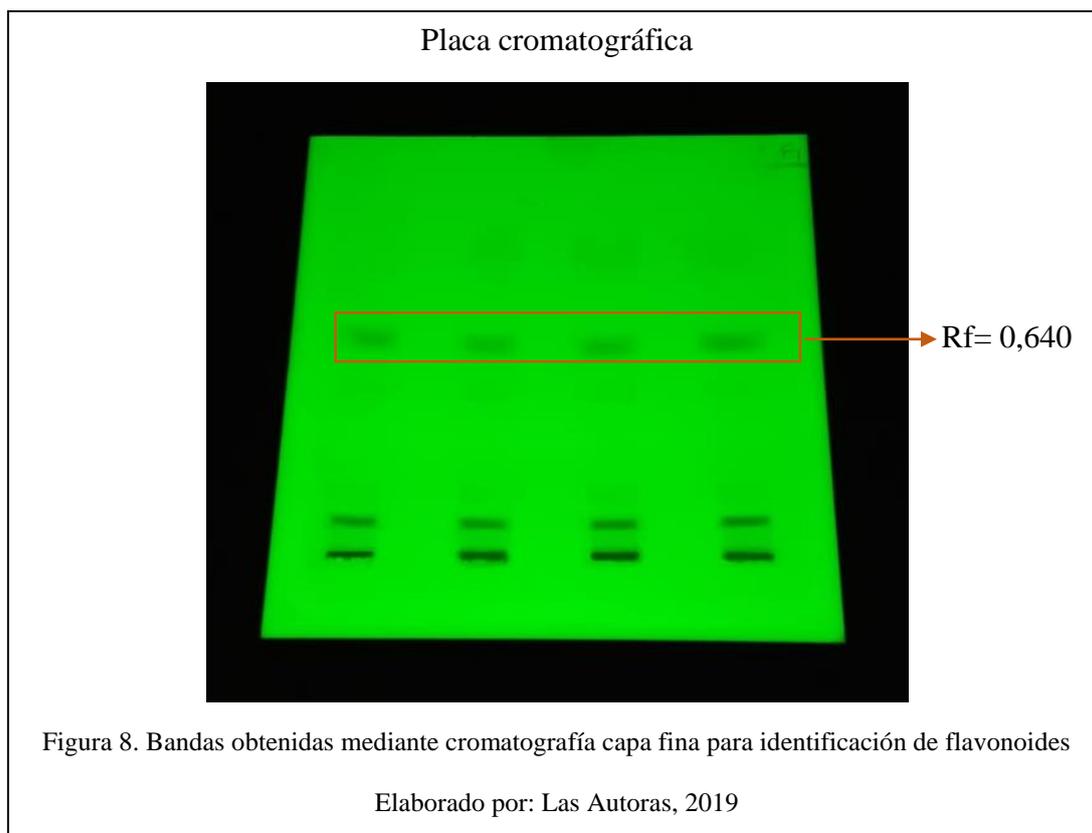
Las concentraciones de flavonoides obtenidas, son menores a las concentraciones de fenoles como se observa en la Figura 7, ya que los flavonoides forman parte de los compuestos fenólicos en las plantas (Martín, 2018). En cuanto a estos resultados, en la literatura existen diversos estudios sobre la concentración de compuestos fenólicos y presencia de flavonoides en vegetales y en todos los casos el contenido es muy variable, ya que puede depender del vegetal estudiado y el método de extracción, puesto a que las metodologías utilizadas para la extracción de este tipo de compuestos no son homogéneas y esto repercute en los valores de concentración de compuestos fenólicos y flavonoides que se reportan.



3.4. Identificación de flavonoides por espectrometría de masas

En las placas cromatográficas se evidenció la presencia de bandas oscuras como se muestra en la Figura 8, reveladas por luz UV, lo cual nos confirma la presencia de flavonoides (Markham, 1982), se obtuvo 4 bandas y se calculó el valor Rf para cada una. Los resultados arrojados por el espectrómetro de masas para fracción Rf analizada revelan los iones moleculares para compuestos de naturaleza flavonoica (Toribio, Moyano, Puignou, & Galceran, 2002).

Se logró identificar al flavonoide malvidina con Rf = 0,64; cuyo peso molecular es 331,300 m/z, la molécula pertenece a la subclase de las antocianinas y en el reino vegetal es el compuesto más abundante dentro de esta familia química, responsable de las tonalidades azules que podemos apreciar en muchas flores y frutos alrededor del planeta (Del Carpio, Serrano, & Giusti, 2009)



A continuación, se detallan la información del espectro de masas:

Ion molecular $[M]^{1+} = 332,330 \text{ m/z}$

Ion secundario $[M]^{1+} = 304,300 \text{ m/z}$

Ion secundario $[M]^{1+} = 258,280 \text{ m/z}$

El estudio realizado por Gopu, Kothandapani, & Halady (2015) atribuyen a la molécula de malvidina propiedades antimicrobianas, esta molécula se une a la actividad inhibitoria de detección de quórum ocasionando una inhibición de acoplamiento de los mismos. La presencia de malvidina otorga propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y cardiovasculares, como

lo afirma Bognar, y otros (2013), la molécula antagoniza la activación de NF-k (proteínas que controlan respuestas inmunitarias e inflamatorias), lo que podría explicar sus beneficios.

Camacho & Honorio (2017), se identificó una mezcla compleja de carácter terpenoide y 4 flavanonas: glabranin, 7-O-metilglabranin, 6-C-metilglabranin y 5,7-dihidroxi-6-prenilflavanona en el extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby y según Peralta, Cabrera, & Pérez (2013), el compuesto 4-hydroxyflaflone fue identificado como un compuesto propio del género *Dalea*.

Peralta, Santi, Agnese, Cabrera, & Ortega (2015), analizaron las estructuras químicas presentes en *Dalea elegans*, a través de técnicas espectroscópicas, evidenciando dos flavonoides: β' ,4'-dihidroxi-5'-(1',1'-dimetilalil)-8-prenilpinocenbrin (8PP) y 8 prenilpinocenbrin.

3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria MIC

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria, se presenta la técnica de micro dilución la cual permite la determinación de concentraciones muy bajas de los diferentes extractos etanólicos de *Dalea coerulea* con denominación D1, D2 y D3, sin embargo, para este ensayo se excluye el tratamiento D3 puesto a que presentó la menor cantidad de fenoles y flavonoides. En cuanto a los valores, estos están expresados en $\mu\text{g/mL}$, los mismos que son revelados con ayuda de colorantes como TTC (Mahon, Lehman, & Manuselis, 2014).

En cuanto a la interpretación de la concentración mínima inhibitoria, Baser & Buchbauer (2016), manejan diferentes valores expresados en unidades de $\mu\text{g/mL}$, donde indican intervalos cada uno con una denominación interpretativa, sin embargo ha sido necesario aumentar una

categoría más por valores obtenidos en la investigación, mismos que son explicados en la Tabla 14.

Tabla 14.

Interpretación de valores de MIC en $\mu\text{g/mL}$.

MIC	Código	$\mu\text{g/mL}$
Muy fuerte	MF	< 500
Fuerte	F	> 500 MIC < 1 000
Moderada	M	1 000 < MIC < 5 000
Débil	D	5 000 < MIC < 20 000
Ausente	A	> 20 000

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Es importante mencionar que para determinar la inhibición del extracto hidroalcohólico de flores de *Dalea coerulea* frente a las bacterias de estudio, una vez obtenido el extracto, este fue pasado por un rotavapor para eliminar el etanol, y llevarlo a una liofilización, proceso explicado en la sección 2. Por lo que es importante mencionar que los extractos hidroalcohólicos liofilizados van a tener un mejor rendimiento y poder de acción frente a; *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*; por lo que habrá una mínima pérdida de los compuestos de las flores, como constituyentes volátiles y compuestos que pueden llegar a perderse en el secado u operaciones del proceso, asegurando que el extracto tenga una mayor actividad inhibitoria que aplicando un extracto cotidiano (Ocaña, 2013). En la Tabla 15 se observan los diferentes valores de inhibición obtenidos frente a las bacterias de estudio.

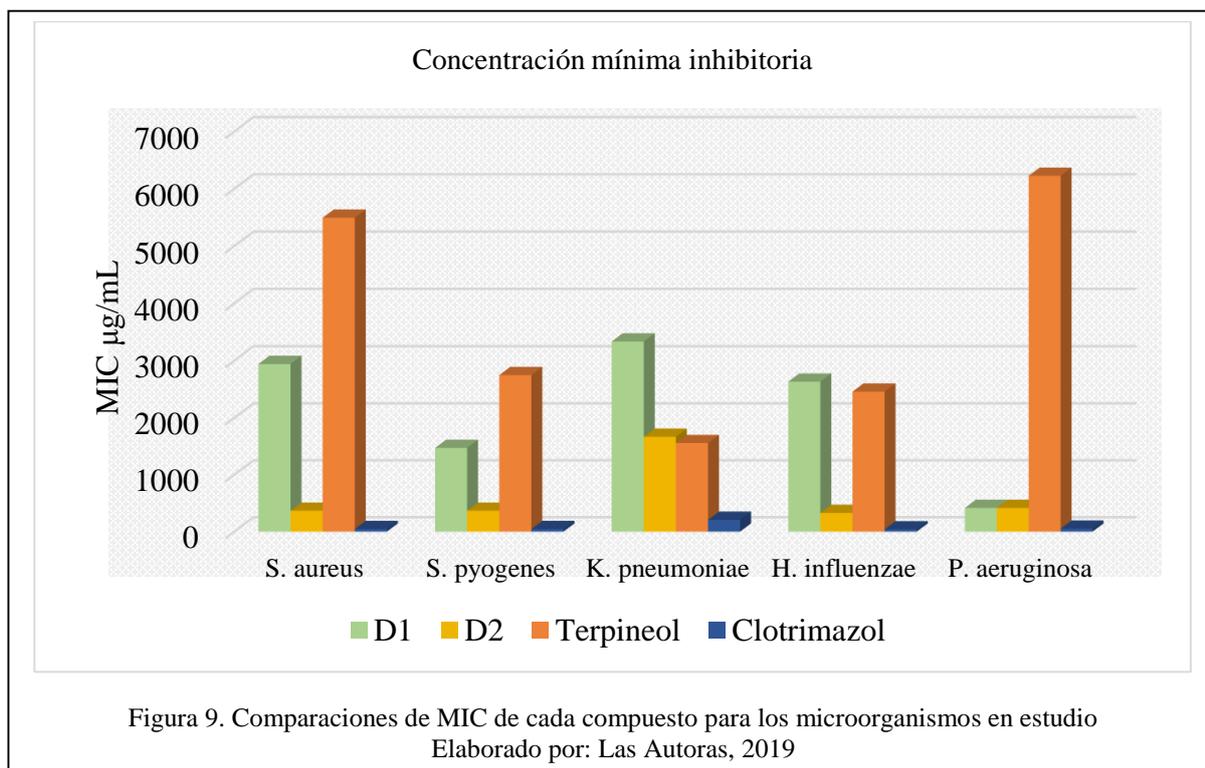
Tabla 15.

MIC de extractos etanólicos en µg/mL de *Dalea coerulea* y controles para, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomona aeruginosa*.

Bacterias de estudio	Extracto de <i>Dalea coerulea</i> al 5 %			
	MIC (µg/mL)			
	D1	C	D2	C
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	2 941,176	M	367,647	MF
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1 470,588	M	367,647	MF
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	3 333,333	M	1 666,660	M
<i>Haemophilus influenzae</i>	2 631,578	M	328,947	MF
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	416,666	MF	416,666	MF

Nota: (C) Código de inhibición; (MF) Muy fuerte; (F) Fuerte; (M) Moderado; (D1) Tratamiento con 20 % de solvente; (D2) Tratamiento con 50 % de solvente.
Elaborado por: Las Autoras, 2019

Como vemos en la Tabla 15, el tratamiento D2 al 5 % (etanol al 50 %, liofilizado) dio una inhibición muy fuerte (MF) para las 4 bacterias de estudio, contrario a *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* donde la inhibición fue moderada. Por otro lado, en el tratamiento D1 al 5 % (etanol al 20 %, liofilizado) presenta inhibiciones moderadas, pero en *Pseudomona aeruginosa*, presenta una inhibición muy fuerte siendo comparable con el tratamiento D2 para esta bacteria. Las comparaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias para cada bacteria, se representan en la Figura 9.



Referente a este estudio, Castro & Abdo (2013), en su investigación con *Dalea mutisii* Kunth conocida también por el nombre de Iso, menciona que sus flores son las protagonistas para tratar problemas de tos e indigestión, ya que presenta abundantes flavonoides y terpenos. Además, en su estudio maneja extractos alcohólicos de flores y hojas, donde recalca que el aumento de la concentración aumenta su acción antioxidante debido a la oxidación de catecol a benzoquinona por polifenoloxidasas, menciona también, que las acciones de los extractos tienen actividad a 10 000 µg/mL, 1 000 µg/mL y en ciertos casos hasta 100 µg/mL.

En el estudio de Montes-de-Oca-Márquez, y otros (2017), al usar especies del mismo género como; *Dalea thyrsoiflora*, *Dalea elegans*, *Dalea purpurea* y *Dalea caerulea*, indica que en su composición química se encuentran terpenos, flavonoides, flavanonas, taninos, chalconas y cumarinas importantes para lograr una inhibición en algunos microorganismos afectando su estabilidad.

En cuanto a los resultados obtenidos para el caso de *Streptococcus pyogenes* obtuvo un MIC de 367,647 µg/mL siendo una inhibición muy fuerte usando el solvente al 50 % para extraer los compuestos de flores de *Dalea coerulea*, sin embargo, para tratamiento D1 vemos que obtuvo un MIC de 1 470,588 µg/mL por lo que el mejor tratamiento para lograr una inhibición de esta bacteria es trabajar con el extracto obtenido con etanol al 50 %. En cuanto a la acción de esta bacteria en personas, se sabe que es la causante de faringoamigdalitis aguda y su importancia radica en que esta bacteria deja secuelas no supurativas como glomerulonefritis y fiebre reumática (Rivera, 1998).

Para *Haemophilus influenzae* se observa una similitud en cuanto a valores de inhibición con la bacteria antes descrita, ya que se obtuvo un MIC de 328,947 µg/mL dando una inhibición muy fuerte usando el tratamiento D2, diferente al tratamiento D1 donde el MIC fue de 2 631,578 µg/mL, dando mejores resultados al aplicar una extracción con solvente hidroalcohólico al 50 %, por su parte, Rivera (1998), describe que esta bacilo es exclusivamente un patógeno humano y se encuentra entre un 3 y 5 % en niños.

Para el caso de ambas bacterias en estudio, no se han reportado ensayos donde se use extractos hidroalcohólico con *Dalea coerulea* y ninguna especie del género *Dalea*, por lo que generar estos resultados es importante para poder realizar prácticas *in vivo*.

En cuando a los resultados en *Staphylococcus aureus subsp. aureus* vemos una inhibición clara en el tratamiento D2 dando un valor de 367,647 µg/mL siendo una inhibición muy fuerte y en el tratamiento D1 encontramos un valor de 2 941,176 µg/mL con inhibición moderada, Castro & Abdo (2013), mencionan que, esta bacteria tiene una inhibición parcial a partir de 1 000

µg/mL usando extracto de flores y un valor de 6 538 µg/mL usando extracto de hojas, debido a que las flores cuentan con más flavonoides y terpenos, en relación a los valores se denota una diferencia con este estudio, esto puede deberse a que los extractos hidroalcohólicos de *Dalea coerulea* han pasado por un proceso de liofilización lo cual permitió una inhibición de mayor rango en comparación con el estudio de Castro & Abdo (2013), además se debe considerar factores como el tipo de extracción, solvente, entre otros.

Montes-de-Oca-Márquez (2017), menciona que las propiedades y la composición química que aporta el género *Dalea* tienen un potencial como antimicrobiano, un ejemplo es *Dalea carthagenensis*, donde se obtuvo un extracto de tallo y flores a partir de hexano y extracto acetónico para flores mostrando mayor inhibición para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* con valores de 125 y 250 µg/mL respectivamente, datos similares a los obtenidos en este estudio, ya que *Staphylococcus aureus subsp. aureus* logró un MIC de 367,647 µg/mL y *Pseudomona aeruginosa* una MIC de 416,666 µg/mL. Además, menciona que se ha visto un caso similar para *Dalea scandens* donde el extracto se realizó con acetato de etilo mostrando actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y de igual manera para *Dalea versicolor* y *Dalea spinosa*, ya que inhiben a esta bacteria gracias a la presencia de compuestos fenólicos que estas plantas poseen.

Así mismo Castro & Abdo (2013), al trabajar con *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa*, reportan valores de inhibición a 1 000 µg/mL, a diferencia de esta investigación donde para *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* obtuvo una inhibición moderada de 3 333,330 µg/mL y para el tratamiento D2 un MIC de 1 666,660 µg/mL, siendo el mejor tratamiento el D2. En el caso de *Pseudomona aeruginosa* ambos tratamientos presentan una inhibición muy fuerte con valores de 416,666 µg/mL.

Las investigaciones con la planta en estudio son escasas, por lo que los datos reportados en esta investigación son de utilidad ya que las concentraciones mínimas inhibitorias, en su mayoría dan una inhibición fuerte. De igual manera se manejaron indicadores de control como, Terpineol al 20 % siendo el control positivo y Clotrimazol al 5 % como antibiótico, mismos presentados en la Tabla 16.

Tabla 16.

MIC de indicadores de control para, *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomona aeruginosa*.

Bacterias de estudio	Indicadores de control			
	MIC (µg/mL)			
	Terpineol 20 %	C	Clotrimazol 5 %	C
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	5 494,118	D	< 45,956	MF
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2 747,059	M	< 45,956	MF
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	1 556,667	M	208,333	MF
<i>Haemophilus influenzae</i>	2 451,895	M	< 41,118	MF
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	6 226,667	D	< 52,083	MF

Elaborado por: Las Autoras, 2019

En cuanto a la acción del Terpineol; Carson, Hammer, & Riley (2006); aseguran un efecto inhibitorio frente a diferentes bacterias, el mecanismo de acción de este compuesto está dado por la interacción que realiza con la membrana, lo cual causa una perturbación de la integridad y funciones vitales de la bacteria.

3.6. Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*, se aplicó la metodología de Edema plantar inducido por carragenina en ratones machos de 11 semanas, aplicando dosis de: 200; 100; 50 y 25 mg/kg del extracto liofilizado D2. Para este ensayo no se utilizaron los extractos D1 y D3 debido a que presentaron baja concentración de fenoles, flavonoides y escasa actividad antimicrobiana para el caso del extracto D1.

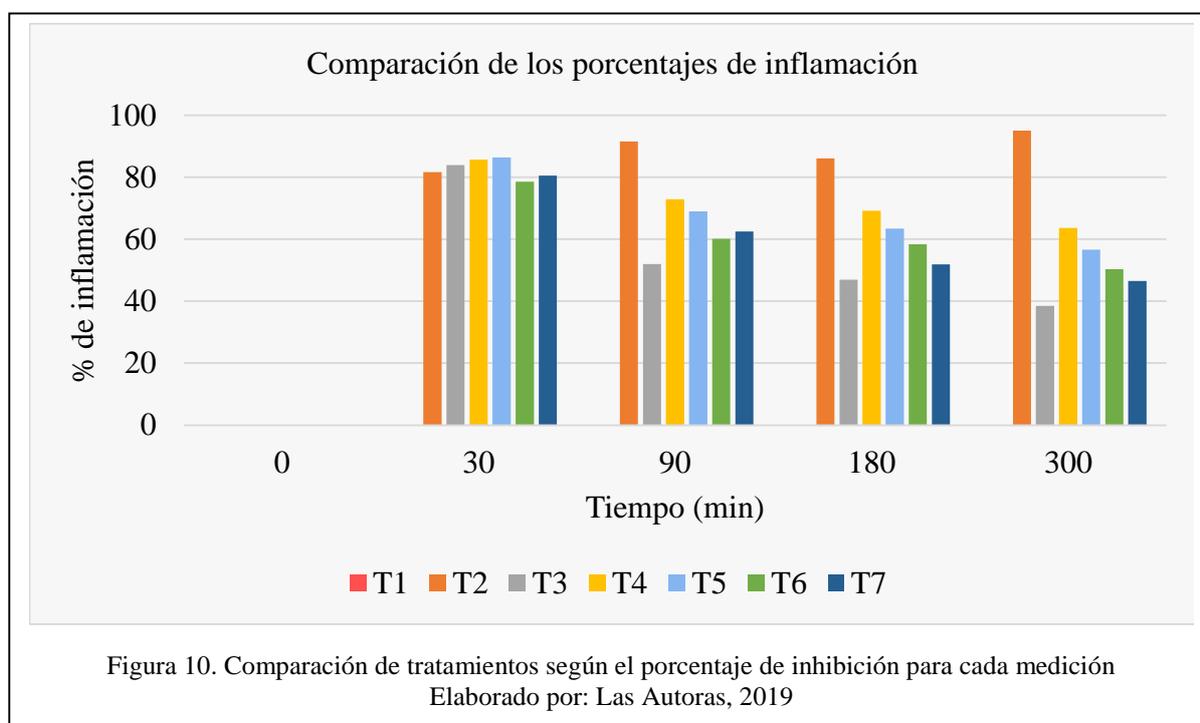
Para cada tratamiento, se calcularon las medias de los porcentajes de inflamación a los 0, 30, 90, 180 y 300 minutos, representados en la Tabla 17. A los 300 minutos el mejor tratamiento, con menor porcentaje de inflamación es el control positivo, seguido por el tratamiento 7, que corresponde a una dosis de 200 mg/kg. En la Figura 10 se comparan los porcentajes de inhibición de la inflamación de todos los tratamientos en cada medición.

Tabla 17.

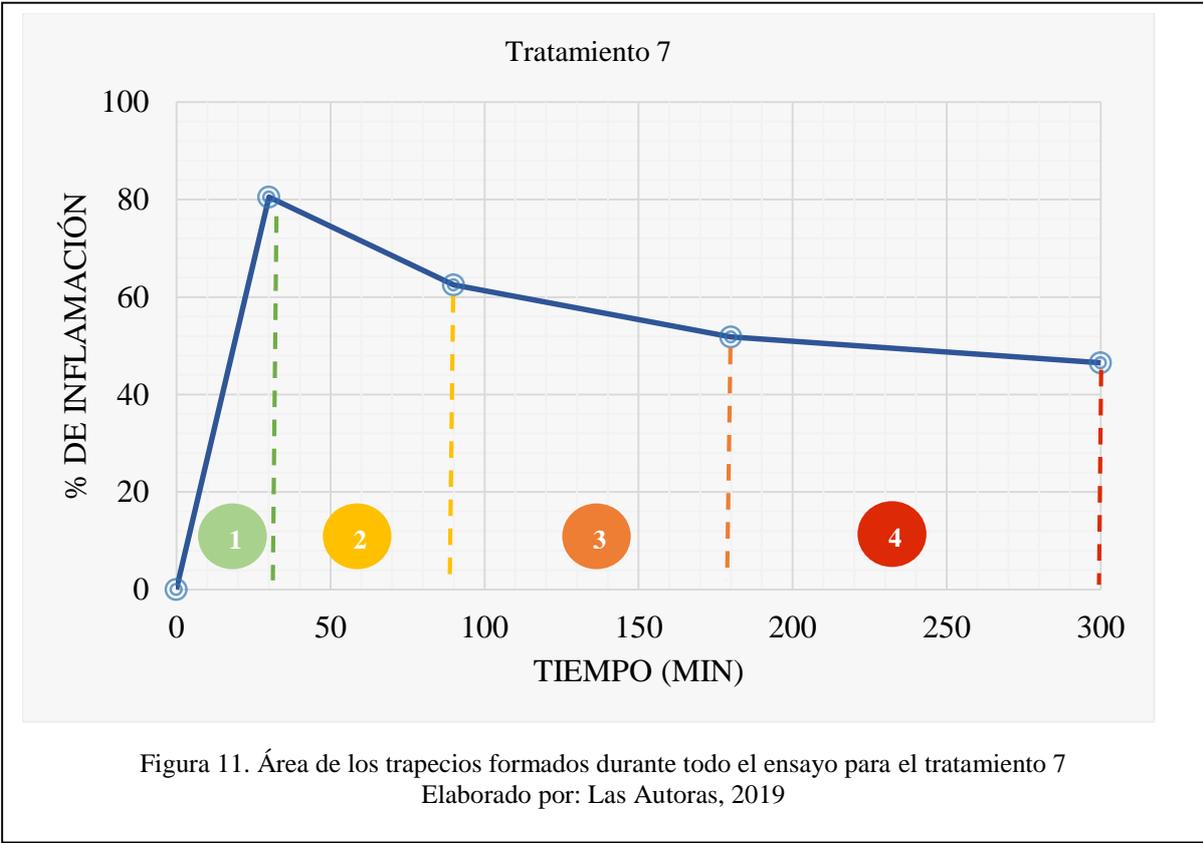
Porcentajes de inflamación para cada tratamiento a los 300 minutos

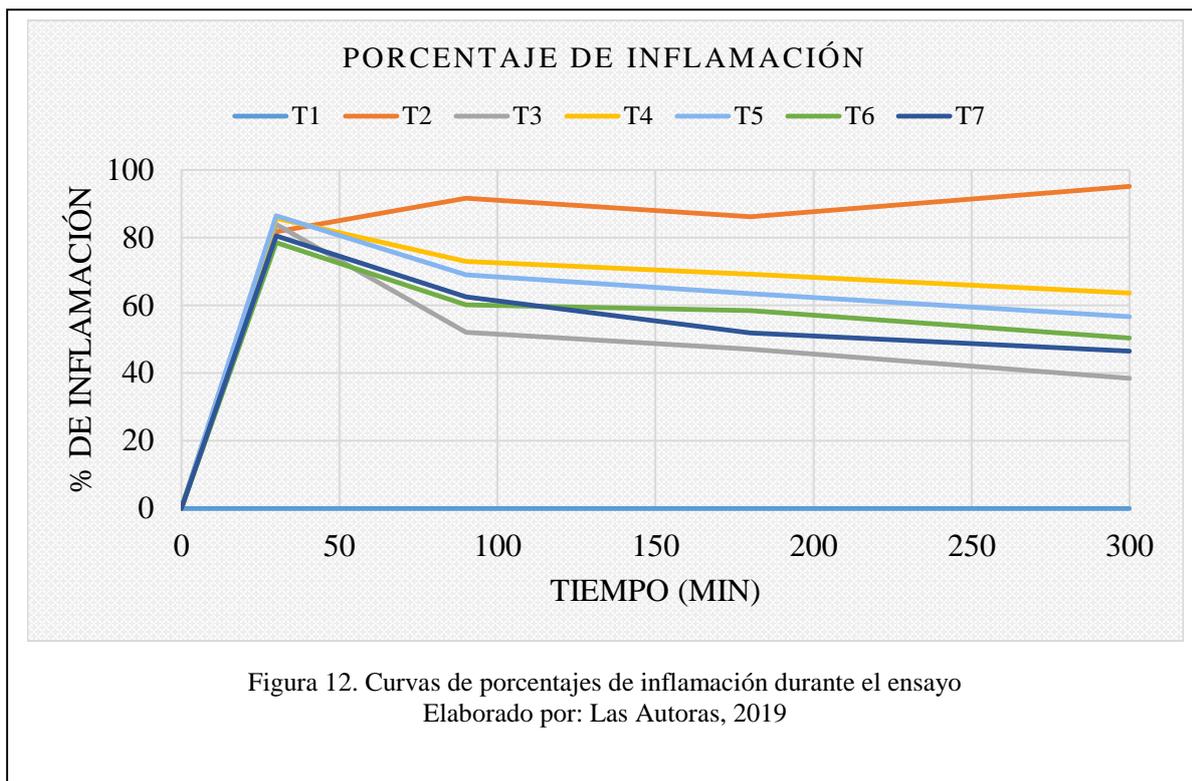
Compuesto	Tratamiento	Medias % inflamación			
		30 min	90 min	180 min	300 min
Control	T1	0	0	0	0
Control positivo	T3	83,900	52,010	47,000	38,480
Extracto 200 mg/kg	T7	80,510	62,480	51,850	46,490
Extracto 100 mg/kg	T6	78,550	60,100	58,430	50,340
Extracto 50 mg/kg	T5	86,400	68,990	63,430	56,600
Extracto 25 mg/kg	T4	85,670	72,900	69,200	63,650
Control negativo	T2	81,71	91,59	86,11	95,11

Elaborado por: Las Autoras, 2019



Los tratamientos no se pueden evaluar de manera independiente para cada medición, por lo que se analizaron a lo largo del ensayo, incluyendo todas las mediciones en los tiempos establecidos. Para cada tratamiento, se calcularon las áreas de los trapecios formados en cada medición como se observa en la Figura 11, se evaluaron mediante la técnica del área bajo la curva de acuerdo a los porcentajes de inflamación para cada tratamiento, como se representa en la Figura 12.





En la prueba de normalidad de las áreas, se obtuvo un p-valor mayor a 0,05 para todos los tratamientos, lo que indica que los datos son paramétricos. En el análisis de varianza se obtuvo un p-valor de de 0,0001 (Anexo 5), al ser menor a un p-valor de 0,05 se obtiene una diferencia significativa de los tratamientos y se aplica un análisis de separación de medias utilizando la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) al 5 %. Los tratamientos evaluados según el área bajo la curva se presentan en la Tabla 18, donde a menor área, menor porcentaje de inhibición a lo largo del ensayo.

Tabla 18.

Categorización de tratamientos por análisis Tukey ($p \leq 0,05$) al 5 %, para el área bajo la curva

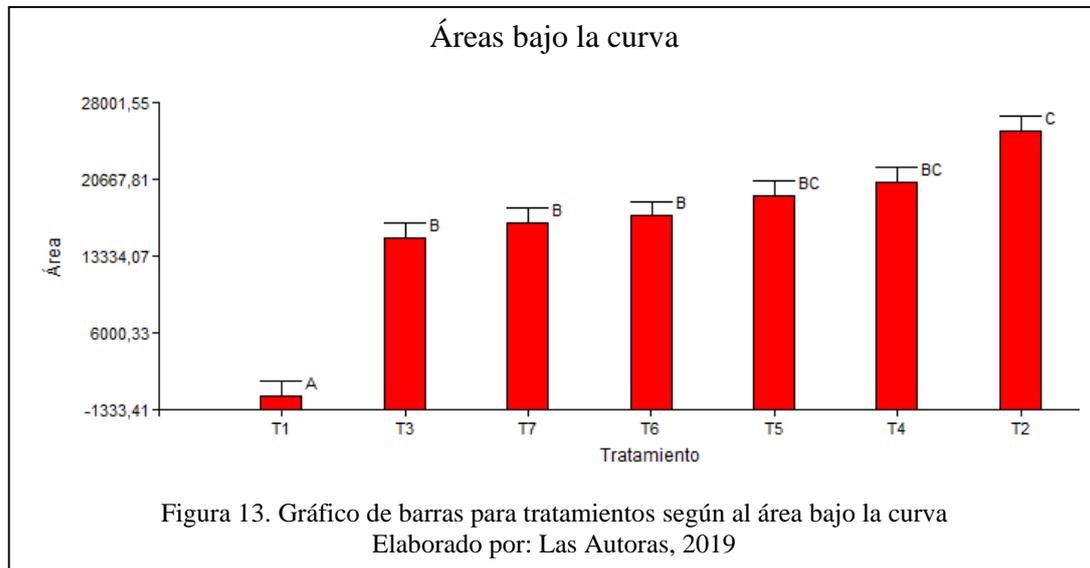
Compuesto	Tratamiento	Medias	Error experimental	Categoría
Control	T1	0,000	1 373,720	A
Control positivo	T3	15 069,170	1 373,720	B
Extracto 200 mg/kg	T7	16 542,400	1 373,720	B
Extracto 100 mg/kg	T6	17 197,960	1 373,720	B
Extracto 50 mg/kg	T5	19 117,890	1 373,720	B C
Extracto 25 mg/kg	T4	20 407,910	1 373,720	B C
Control negativo	T2	25 294,420	1 373,720	D

Elaborado por: Las Autoras, 2019

El tratamiento control (T1) se encuentra en la categoría A debido a que a este grupo de individuos no se les indujo el edema plantar con carragenina, obteniéndose un área bajo la curva de 0. Los tratamientos T3, T7 y T6 se consideran como los más adecuados ya que se encuentran en la categoría B y no comparten categoría con otros tratamientos.

El tratamiento con menor área bajo la curva es el T7, obteniéndose un valor de 1 6542,400 unidades, lo que indica que es el tratamiento que menor porcentaje de inflamación presentó a lo largo del ensayo, con un valor final de 38,480 % a los 300 minutos de aplicada la carragenina. El tratamiento T6 no presenta diferencia significativa con el tratamiento T3, el cual es el grupo control positivo tratado con diclofenaco sódico; para ambos tratamientos se aplicó una dosis de 100 mg/kg, lo que indica que el tratamiento 2 con el extracto liofilizado D2 tiene una eficacia

para tratar la inflamación similar a la del diclofenaco sódico. La diferencia de los tratamientos se observa en el gráfico de barras de la Figura 13, que se obtuvo del programa estadístico.



Los tratamientos T4 y T5, a pesar de tener un porcentaje de inflamación menor al tratamiento T3 control positivo, se pueden considerar como una alternativa ya que, luego de 300 minutos de inducir el edema plantar, el porcentaje de inflamación fue de 63,650 y 56,600 %, respectivamente, como se presenta en la Tabla 17.

En el estudio de Camacho & Honorio (2017), se evaluó la actividad antiinflamatoria mediante la técnica de edema plantar inducido por carragenina, del extracto etanólico de *Dalea isidori* Barneby, en el cual se identificó los flavonoides: quercetina y rutina que poseen propiedades antiinflamatorias, se evidenció que la dosis de 250 mg/kg de extracto tiene el mayor efecto antiinflamatorio, datos similares obtenidos en este estudio, donde el tratamiento 7 con una dosis de 200 mg/kg presentó el menor porcentaje de inflamación.

El mismo método de evaluación de la actividad antiinflamatoria se utilizó en la investigación realizada por Ara, y otros (2010), donde se evaluó el extracto metanólico de la corteza seca de *Adenantha pavonina* L, que pertenece a la misma familia que *Dalea coerulea*, Fabaceae y sus flores son de color púrpura. Se aplicó una dosis del extracto de 400 mg/kg que exhibió un porcentaje de inhibición de la inflamación de 33,110 % a la tercera hora de estudio que fue similar al control con diclofenaco sódico, este resultado es inferior comparado con el obtenido en este estudio, ya que para el tratamiento 7 a las 3 horas, se obtuvo un porcentaje de inhibición de 48,150 %, tomando en cuenta que se aplicó una dosis de 200 mg/kg.

En la literatura científica no se encuentran investigaciones relacionadas con la actividad antiinflamatoria de *Dalea coerulea*, por lo cual los resultados obtenidos en este ensayo son relevantes ya que la actividad de las diferentes concentraciones del extracto liofilizado son similares a la actividad del diclofenaco sódico, que se utiliza con mayor frecuencia en modelos de experimentación animal, ya que es un antiinflamatorio no esteroideo que disminuye la inflamación aguda y crónica al inhibir la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano (Tood & Sorkin, 1988)

Conclusiones

La extracción de principios activos con el solvente etanol al 50 % y ultrasonido permite obtener la mayor cantidad de fenoles (15,560 mg/g) y flavonoides (11,730 mg/g), que es confirmado en el análisis estadístico. De igual manera en este extracto la actividad biológica antimicrobiana y antiinflamatoria resultó ser la más elevada.

Empleando un espectrómetro de masas de alta resolución fue posible determinar la naturaleza química de uno de los flavonoides que resulto ser la molécula conocida como malvidina. Dicho compuesto es uno de los más abundantes en la naturaleza, en flores y frutos de coloración azulada, que coincide con las características en las flores de *Dalea coerulea*. Además de ya contar con muchos estudios de actividad antiinflamatoria y antimicrobiana.

La evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) en el extracto hidroalcohólico D2 al 5 %, obtenido con etanol al 50 % y liofilizado, demuestra ser efectiva con una valoración de muy fuerte y fuerte para todas las bacterias empleadas en esta investigación. Lo que pone en evidencia su gran actividad contra patógenos comunes en diversas enfermedades del sistema respiratorio.

Dado que uno de los síntomas más comunes en las enfermedades respiratorias, es la inflamación de mucosas y tejidos, en la investigación se evaluó su actividad antiinflamatoria mediante la metodología de edema plantar inducido por carragenina. El resultado con uno de los extractos, evidenció un 46,490 % de inflamación que fue equiparable al del control positivo (diclofenaco sódico)

Todos los ensayos tanto de composición química, como de actividad biológica nos llevan a concluir que el uso ancestral para el “Iso”, pudo ser confirmado mediante los estudios detallados en el presente trabajo. Queda abierta la posibilidad de profundizar el estudio en la especie, con la finalidad que la misma pueda ser usada de forma seguro en diversos tratamientos y productos de fitoterapia.

Referencias

- Alarcón, L., Peña, A., Velasco, J., Usubillaga, A., Contreras, B., Ramírez, D., & Rojas, L. (2016). CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL OF ESPELETIA SCHULTZII WEDD (ASTERACEAE) FROM STATE TRUJILLO – VENEZUELA. *Academia*, 15(35), 69-84.
- Alarcón, T., Caballero, E., Cantón, R., & Oliver, A. (2016). Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. *Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 3-61.
- Alonso-Geli, Y., Alonso-Moreno, Y., Falcón, J., Lucambio, L., & Castro, M. (2015). Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. *Revista Cubana de Química*, 27(2).
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 33(10), 692-699. doi:DOI: 10.1016/j.eimc.2014.10.004
- ANFACO. (2011). *Obtención y aplicación de extractos naturales*. Obtenido de Asociación Nacional de Fabricantes de Conservas de Pescados y Mariscos y Centro Técnico Nacional de Conservación de Productos de la Pesca: <http://www.anfaco.es/fotos/biblioteca/docs/congresos/transferencia2011.pdf>
- Ara, A., Arifuzzaman, M., Ghosh, C., Hashem, M., Ahmad, M., Bachar, S., . . . Sarker, S. (2010). Actividad antiinflamatoria de *Adenantha pavonina* L., Fabaceae, en animales

- de experimentación. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(6), 929-932.
doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000039>
- Arango , A., & González, G. (1994). Flavanonas preniladas de *Dalea coerulea*. *Revista Colombiana de Química*, 23(2), 1-7.
- ATCC. (2019). *Credible leads to incredible*. Obtenido de https://www.atcc.org/en/Documents/Learning_Center/Product_Sheets_Online.aspx
- Avila, M., Garcia, S., Sepulveda, A., & Godinez, M. (2016). Plantas medicinales en dos poblados del municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México. *Polibotanica*(42).
- Ayala, E. (2015). La investigación científica en las universidades ecuatorianas. *Anales. Revista de la Universidad de Cuenca*, 61-72.
- Azevedo, J., Gama, A., Lima, E., Barbosa, S., & Ugulino, M. (2010). Análisis de cribado de vinos utilizando un analizador de flujo por lotes, espectroscopía UV-VIS y quimiometría. *Química Nova*, 33(2), 351-357.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Koraichi, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 71-79.
- Baser, K., & Buchbauer, G. (2016). *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. New York: Taylor & Francis Group.
- Benites, E. (2018). Alerta a las infecciones respiratorias agudas. *El Universo*.
- Bodí, M., & Garnacho, J. (2007). Pseudomonas aeruginosa: tratamiento combinado frente a monoterapia. *Medicina Intensiva*, 31(2).

- Bognar, E., Sarszegi, Z., Szabo, A., Debreceni, B., Kalman, N., Tucsek, Z., . . . Gallyas, F. (June de 2013). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects in RAW264.7 Macrophages of Malvidin, a Major Red Wine Polyphenol. *PLOS*, 8(6), 1-10.
- Borja , D., & Yumisaca, Y. (2018). Determinación de la actividad antiinflamatoria de los flavonoides del extracto de la hoja de yuca (*Manihot esculenta*). *Repositorio UCE*.
- Bussman, R., & Sharon, D. (2015). *Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía*. Trujillo: GRAFICART.
- Camacho, M., & Honorio, C. (2017). *Evaluación del efecto antiinflamatorio en ratas albinas según el modelo edema plantar y efecto analgésico en ratones albinos según el modelo tail flick del extracto etanólico de Dalea isidori Barneby "Yerbechil"*. Obtenido de Universidad Nacional Mayor de San Marcos: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/6410>
- Carlone, N., & Pompei, R. (2013). *Microbiología Farmacéutica*. Napoli: EdiSES.
- Carson, C., Hammer, K., & Riley, T. (2006). *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), 50-62. doi:<https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). FLAVONOIDES: CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES. *Cultivos tropicales*, 22(2), 5-14.
- Castañeda, C., Manrique, M., Ibáñez, V., Gamarra, C., Galan, L., & Quispe, H. (2002). Evaluación del Efecto Antiinflamatorio del Extracto Acuoso de las Semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, Chocho), en Animales de Experimentación. *USMP*, 2(1).
- Castro, G., & Abdo, S. (2013). *Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico de las Hojas y Flores de Iso (Dalea mutisii)*. Obtenido de Facultad de

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2555/1/56T00322.pdf>

- Cordova, L. (2017). Métodos para separar, identificar y caracterizar una mezcla binaria constituida por los flavonoides naringenina y quercetina. *UTMACH*.
- Cortez, J., Falcán, M., Pirovani, M., & Piagentini, A. (2018). Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu. *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 19(2).
- Dávalos, J., Romero, V., Sánchez, J., Chávez, J., & Valderrama-Negrón, A. (2017). Caracterización, mediante espectrometría de masas de alta resolución MALDI/FT-ICR, de taninos hidrolizables de la tara (*Caesalpinia spinosa*). *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 83(1).
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador. Herbario QCAde la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & HerbarioAAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus*. Quito & Aarhus.
- Del Carpio, C., Serrano, C., & Giusti, M. (2009). Caracterización de las antocianinas de los frutos de *Berberis boliviana* Lechler. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 75(1).
- Del Gaudio, M., Mendoza, S., Cabrera, J., Peralta, M., & Ortega, M. (2016). *EXTRACTOS BIOACTIVOS DE ESPECIES DE DALEA: EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTI-TIROSINASA Y ANTIFÚNGICA*. Obtenido de Universidad Nacional de Córdoba: https://www.researchgate.net/profile/Daniela_Santi/publication/308874874_EXTRACTOS_BIOACTIVOS_DE_ESPECIES_DE_DALEA_EVALUACION_DE_ACTIVIDAD_ANTI-TIROSINASA_Y_ANTIFUNGICA/links/57f3d39d08ae8da3ce537840/EXT

- Dirar, A., Alsaadi, D., Wada, M., Mohamed, M., Watanabe, T., & Devkota, H. (2019). Effects of extraction solvents on total phenolic and flavonoid contents and biological activities of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 261-267.
- El-desoky, A., Abdel, R., Ahmed, O., El-Beltagi, H., & Hattori, M. (March de 2018). Anti-inflammatory and antioxidant activities of naringin isolated from *Carissa carandas* L.: In vitro and in vivo evidence. *Phytomedicine*, 42(15), 126-134.
- Fajardo, A., Arroyo, A., & Ramírez, J. (2016). Extraction of total flavonoids of the outer peel of red onion (*Allium Cepa*). *UGCiencia*, 22, 19-126.
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z., & Chen, D. (2008). Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM). *Food Science and Technology*, 41(1), 155-160.
- Fernández, C., Vela, M., & Ibarra, I. (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría. *Acta Pediátrica de México*, 30(5).
- Flores, E. (2017). Antioxidant Extraction from Elderberries (*Sambucus nigra* L. Subsp. peruviana) with Ultrasound, Microwave, Enzymes, and Maceration to obtain Functional Juices. *Información tecnológica*, 28(1). doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642017000100012>
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4), 1-10.

- García , J., Escalona, J., Do Carvalho, M., Rojas, J., Machado, R., & De la Vega, J. (2015). Aislamiento y caracterización de metabolitos de hojas de *Croton linearis* Jacq. *Revista Cubana de Química*, 27(3).
- García, T., Castillo, A., & Salazar, D. (Marzo de 2014). Mecanismos de resistencia a betalactámicos en bacterias gramnegativas. *Rev Cubana Salud Pública*, 40(1), 129-135.
- Gentile, A., Martínez, A., Juárez, M., Lución, M., Burgo, C., Della, M., . . . Turco, M. (2017). Meningitis por *Haemophilus influenzae* b: ¿estamos ante una reemergencia? 24 años de experiencia en un hospital pediátrico. *Argentina Pediátrica*, 115(3), 227-233.
- Golinelli, S., Vega, K., & Villa , J. (2015). Ciencia ciudadana, saberes originarios y biodiversidad aplicada en la economía social del conocimiento. *Buen Conocer – FLOK Society*, 2.
- González, J., Cuéllar, A., Nossin, E., Monan, M., Francois, F., Sylvius, L., & Verdeau, F. (2016). DETERMINACIÓN POR CLAR-UV-IEE-EM/EM DE FLAVONOIDES PRESENTES EN LOS PÉTALOS DE LAS FLORES DE TALIPARITI ELATUM S.W (FRYXELL). *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 2(2).
- González, M., Ospina, L., & Rincón, J. (2011). ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* Y *Physalis peruviana* EN LOS MODELOS EDEMA AURICULAR POR TPA EDEMA PLANTAR POR CARRAGENINA Y ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO. *Biosalud*, 10(1), 9-18.
- Gopu, V., Kothandapani, S., & Halady, P. (February de 2015). Quorum quenching activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and its anthocyanin malvidin against *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 79, 61-69.

- Guillén, D., Hernández, R., Andrade, M., López, V., Alia, I., & Juárez, P. (2018). Eficacia de seis fungicidas sobre *Mycosphaerella citri* en naranja 'Valencia' en el estado mexicano de Morelos. *Centro Agrícola*, 45(1), 5-12.
- Guntero, V., Longo, M., Ciparicci, S., Martini, R., & Andreatta, A. (2015). COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES A PARTIR DE RESIDUOS DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA . *Congreso Argentino de Ingeniería Química*.
- Gutiérrez, N., Saá, I., & Vinueza, A. (2017). Design and construction of a prototype for the continuous extraction of Sacha Inchi seed oil with a cold pressing process. *Enfoque UTE*, 8(2). doi:<http://dx.doi.org/10.29019/enfoqueute.v8n2.153>
- Henry, Y., Salomón, S., Acosta, J., Romero, A., López, M., & Mercado, J. (2016). Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de *Annona muricata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3).
- Herbario JBB en línea. (2016). *Jardín Botánico de Bogotá José Celestino Mutis*. Obtenido de <http://coleccion.jbb.gov.co/herbario/especimen/1719>
- Hocker, A., Stokes, J., Powell, F., & Huxtable, A. (January de 2017). The impact of inflammation on respiratory plasticity. *Experimental Neurology*, 287, 243-253.
- Holguín, F. (2009). Comparación de la diversidad de aves en zonas densamente pobladas y menos pobladas de la ciclovia El Chaquiñán, en el valle de Cumbayá. *Universidad San Francisco de Quito*.
- Hübschmann, H. (2015). *Handbook of GC-MS: Fundamentals and Applications* (3 ed.). India: Wiley- VCH.
- Hurtado, A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2016). Estudio de la composición de polifenoles en aceites obtenidos a partir de semillas de mora (*Rubus glaucus*) y maracuyá (*Passiflora*

- edulis*) mediante extracción con fluidos supercríticos. *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación*.
- Hurtado, P., Jurado, B., Ramos, E., & Calixto, M. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico estandarizado de hojas de *Juglans Neotropica* Diels (nogal peruano). *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 81(3).
- Jiang, X., Yu, M., Zhu, T., Lou, L., Chen, X., Li, Q., . . . Sun, R. (March de 2020). Kcnq1ot1/miR-381-3p/ETS2 Axis Regulates Inflammation in Mouse Models of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Molecular Therapy*, 19(6), 179-189.
- Jurado, P., Martínez, E., & Cano, R. (2017). Resultados de la vigilancia epidemiológica de la enfermedad invasora por *Haemophilus influenzae* en España en el período 2014-2016. *Boletín epidemiológico semanal*, 25(6), 73-84.
- Kuklinski, K. (2003). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.
- Lara-Cortés, E., Martín-Belloso, O., Osorio-Díaz, P., Barrera-Necha, L., Sánchez-López, J., & Bautista-Baños, S. (2014). Actividad antioxidante, composición nutrimental y funcional de flores comestibles de *Dalia*. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 20(1), 101-116. doi:<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2013.07.024>
- López, S., Jerez, M., García, J., Jiménez, M., Ávila, N., Sánchez, E., . . . Camacho, M. (2016). Use of tree extracts to exoparasites control in turkeys (*Meleagris gallopavo*). *Acta Universitaria*, 26(6).
- Macedo, E., Gaspar, J., & Goretti, M. (2016). Quimiodiversidade e Propriedades Biofarmacológicas de Espécies de Senna Nativas do Nordeste do Brasil. *Revista Virtual de Química*, 8(1).

- Mahon, C., Lehman, D., & Manuselis, G. (2014). *Diagnostic Microbiology. Fifth Edition.* Missouri: Elsevier.
- Maldonado, J., Casañas, R., Martínez, I., & San Martín, E. (2018). La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. *Latin American Journal of Physics Education, 12*(2).
- Markham, K. (1982). Techniques of Flavonoid Identification. *Academia Press*, 113.
- Marrero, R., García, M., & Rodríguez, O. (2018). Infección por *Pseudomona aeruginosa* en un paciente quemado. *Revista Progaleno, 1*, 67-72.
- Marston, H., Dixon, D., Knisely, M., Palmore, T., & Fauci, A. (20 de Septiembre de 2016). Resistencia antimicrobiana. *JAMA, 316*(11).
- Martín, D. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Agropecuaria, 9*(1), 82-99. doi:<https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Martinez, B., Hung, B., Hernández, E., & Audivert, Y. (2016). CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE ZUELANIA SP. *Revista Cubana de Química, 18*(3), 258-268.
- Martinez, J. (2018). Síntesis, caracterización fisicoquímica, determinaciones biológicas (in vitro) y estudios teóricos de complejos de Cu(II) y VO(IV) con ligandos antioxidantes y/o antimicrobianos. *Repositorio UNLP*.
- Martínez, S., González, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2012). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria, XVII*(6), 271-278.
- Matos, E. (2014). Problemática jurídica en torno a la pérdida del conocimiento tradicional. *Revista de Derecho, 1-18*.

- Meneses, J., Soto, R., Espinosa, T., & Ramírez, M. (2008). OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES DE FLOR DE MANZANILLA (*Matricaria recutita* L.). *Agrociencias*, 42, 425-433.
- Mercado, A., & Vessuri, H. (2015). El conocimiento científico y tecnológico en el aprovechamiento de los recursos naturales. *FEDAEPS*.
- Microbiologics. (2011). Technical Information Bulletin. *EE.UU: Retail Catalog*.
- Montes-de-Oca-Márquez, C., Hernández-Delgado, C., Orozco-Martínez, J., García-Bores, A., Ávila-Acevedo, J., Ortiz-Melo, M., . . . Serrano-Parrales, R. (2017). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE *Dalea carthagenensis* (JACQ.) J. F. MACBR. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2), 161-168.
- Montúfar, F., Mesa, M., Aguilar, C., Saldarriaga, C., Quiroga, A., Builes, C., . . . Hernández, C. (2016). Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia. *Infectio*, 20(1), 17-24.
- Mosquera, E., Ayala, A., & Serna, L. (2019). Ultrasonido y Deshidratación Osmótica como Pretratamientos a la Liofilización de Melón (*Cucumis melo* L.). *Información tecnológica*, 30(3).
- Navas, P. (2009). Composición química del aceite virgen obtenido por extracción mecánica de algunas variedades de uva (*Vitis vinifera* L.) con énfasis en los componentes minoritarios. *Archivos latinoamericanos de Nutrición*, 2.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., Stolcova, M., & Pulkrabek, J. (February de 2009). Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. *Food Control*, 20(2), 157-160.

- Noriega, P., & Taco, A. (2018). *LA FLORA MEDICINAL DE LOS PARQUES DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO*. Quito: Abya-Yala.
- Noriega, P., Sola, M., Barukcic, A., García, K., & Osorio, E. (2015). Cosmetic Antioxidant Potential of Extracts from Species of the *Cinchona Pubescens* (Vahl). *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2(14).
- Núñez, D., Balboa, N., Alvear, M., Ceron, A., Abarzua, K., & Vasconcellos, A. (2018). Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Chilean Propolis on Histological Sections of Mouse Ears. *International Journal of Morphology*, 36(1). doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022018000100189>
- Ocaña, E. (2013). *Obtención de uva liofilizada*. Obtenido de Universidad Central del Ecuador: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1401/1/T-UCE-0008-%2006.pdf>
- Oleas, N., Ríos, B., Peña, P., & Bustamante, M. (2016). *Plantas de las quebradas de Quito: Guía práctica de Identificación de Plantas de Ribera*. Quito: Universidad Tecnológica Indoamérica, Secretaría del Ambiente del DMQ, Fodo Ambiental del DMQ y FONAG.
- Pabon, L., Rodriguez, M., & Hernandez, P. (2017). Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Blacpma*, 16(6), 529-546.
- Pabón, L., Rodríguez, M., & Hernández, P. (2017). Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Blacpma*, 16(6), 529-546.
- Peralta, M., Cabrera, J., & Pérez, C. (2013). Flavonoides prenilados como potenciales componentes de medicamentos. *IMBIV-CONICET-Farmacognosia*, 28(64), 39-44.

- Peralta, M., Del Gaudio, M., Cabrera, J., & Ortega, M. (2009). *Búsqueda de drogas antioxidantes a partir de especies de Dalea*. Obtenido de Argetina: Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba:
- https://www.researchgate.net/publication/283324729_BUSQUEDA_DE_DROGAS_ANTIOXIDANTES_A_PARTIR_DE_ESPECIES_DE_Dalea
- Peralta, M., Santi, M., Agnese, A., Cabrera, J., & Ortega, M. (2015). Fla-vanoids from *Dalea elegans*: chemical reassignment and deter-mination of kinetics parameters related to their anti-tyrosinase activity. *Phytochemistry*(10), 260-267.
- Perez, A., Rojas, J., Rodriguez, J., Doncel, A., Arrieta, I., Arrieta, J., . . . Chamorro, L. (2011). EVALUATION OF METHODS FOR MEASURING THE INHIBITORY ACTIVITY OF NATIVE PLANT EXTRACTS ON SUCRE DEPARTMENT OF BACTERIA AND YEAST PATHOGENS. *Colombiana Ciencia Animal*.
- Perez, F., & Fraga, C. (2018). Research trends in flavonoids and health. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 107-112.
- Pérez, G., Rojas, T., Cabrera, D., & Grajales, C. (2015). Panorama epidemiológico de la tos ferina. *Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 164-170.
- Picho, K. (2018). ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RAÍZ VALLEA STIPULARIS L.F. “Chuillur” EN RATONES. *Norbert Wiener*.
- Piñeros, L., & González, F. (2019). Nueva especie de *Dalea* (Leguminosae: Papilionoideae) de matorrales interandinos secos del sur de Colombia y clave para identificación de las especies del género en el país. *Botánica*, 41(1), 215-223.

- Plotnikova, M., Klotchenko, S., Lebedev, K., Lozhkov, A., Taraskin, A., Gyulikhandanova, N., . . . Vasin, A. (November de 2019). Antibody microarray immunoassay for screening and differential diagnosis of upper respiratory tract viral pathogens. *Journal of Immunological Methods*, 1-10.
- Quispe, Y., & Cahuana, R. (2019). Estudio de la actividad antidepresiva de los extractos etanólico, flavonoídico y fracciones mayoritarias flavonoídicas de *Viola tricolor* L. “pensamiento”, usando la prueba de nado forzado modificado. *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*.
- Rangel, J., Flores, S., Cadena, J., Morales, F., & Trejo, B. (2018). EXTRACTOS DE FRUTOS DE *Cucurbita foetidissima* (Kunth) INHIBEN EL CRECIMIENTO DE FITOPATÓGENOS DE INTERÉS AGRÍCOLA. *Agroproductividad*, 11(10), 107-115.
- Reyes, F., Palou, E., & López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental*, 68-78.
- Ríos, Á., Alanís, G., & Favela, S. (2016). Etnobotánica de los recursos vegetales, sus formas de uso y manejo, en Bustamante, Nuevo León. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8(44).
- Rivera, M. (1998). Estreptococo Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*). *Honduras Pediátrica*, 19(2), 47-50.
- Ruiz, S., Venegas, E., Valdiviezo, J., Ocaña, J., & Tadeo, M. (2018). Características farmacognósticas y cuantificación espectrofotométrica de antocianinas totales del fruto de *Prunus serotina* subsp. *capuli* (Cav.) McVaugh (Rosaceae) "capulí". *Arnaldoa*, 25(3).

- Serrano, Barcenilla, Limòn, E., Pujol, M., & Gudiol, F. (2016). Prevalencia de infección relacionada con la asistencia sanitaria en centros sanitarios de cuidados prolongados de Cataluña. Programa de Vigilancia de la Infección Nosocomial en Cataluña (VINCat). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 35(8), 505-510. doi:<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.011>
- Sherma, J., & Fried, B. (2003). *Handbook of Thin-Layer Chromatography* (Vol. 89). New York: CRC Press.
- Solórzano, F., & Miranda, M. (1998). Resistencia de bacterias respiratorias yentéricas a antibióticos. *Salud Pública de México*, 40(6), 510-514.
- Soto, M. (2015). Phytochemical study and quantification of total flavonoids in the leaves of *Piper peltatum* L. and *Piper aduncum* L. from Amazonas region. In *Crescendo. Institucional*, 6(1), 33-43.
- Souza, L., Fonseca, F., Silva, J., Silva, A., Silva, J. R., & Martins, E. (2018). Actividad antioxidante y contenido de flavonoides de *Lippia origanoides* Kunth. *Revista Cubana de Plantas medicinales*, 23(8).
- Suárez, M., Sánchez, L., Navarro, M., Santos, M., Hernández, T., Cercenado, E., & Saavedra, J. (2019). Enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes*: cambios en la incidencia y factores pronósticos. *Anales de Pediatría*, 91(5), 286-295.
- Surco-Laos, F., Tipiana, R., Torres, Y., Valle, M., & Panay, J. (2017). Efectos de liofilización sobre composición química y capacidad antioxidante en pulpa de cuatro variedades de *Mangifera indica*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4).

- Tenorio, M. (2016). Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*). *Scientia Agropecuaria*, 7(4).
- Togneri, A., Podestá, L., Pérez, M., & Santiso, G. (2017). Estudio de las infecciones por *Staphylococcus aureus* en un hospital general de agudos (2002-2013). *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 24-31.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.09.006>
- Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T., & Fowler, V. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603-661.
- Tood, P., & Sorkin, E. (1988). Diclofenaco sódico. *Drugs*, 35(3), 244-285.
doi:<https://doi.org/10.2165/00003495-198835030-00004>
- Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2002). Multistep mass spectrometry of heterocyclic amines in a quadrupole ion trap mass analyser. *Journal of Mass Spectrometry*, 37, 812-828.
- Toro, D., Martínez, Y., Rodríguez, R., Pupo, G., Rosabal, O., & Olmo, C. (2017). Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1).
- Vásquez, M., Castro, A., & Ramos, N. (2017). Composición química, polifenoles y actividad antioxidante del extracto etanólico de *Gentianella dianthoides* (Kunth) Fabris. *Científica*, 14(2).

- Vega, A., De León, J., & Reyes, S. (2017). Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá. *La Serena*, 28(4).
- Vila, J., Zboromyrska, Y., Vergara, A., Cancho, I., García, E., Alvarez, M., . . . Marcos, M. (2016). Molecular diagnostic methods of respiratory infections. Has the scheme diagnosis changed? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(3), 40-46.
- Villacís, J. (2017). Etnobotánica y Sistemas Tradicionales de Salud en Ecuador. *Etnobiología*, 15(3), 77-88.
- Villareal, S., Moreno, S., Jaimez, D., Rojas-Fermín, L., Lucena, M., Díaz, L., . . . Carmona, J. (2017). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS CRUDOS DE PLANTAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA BIGNONIACEAE. *Acta Bioclinica*, 7(14), 205-222.
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N., & Jiménez, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Universidad y Salud*, 17(1), 97-111.
- Zamora, Z., Molina, V., Mena, L., & Nodal, C. (2017). Efecto anti-inflamatorio de la terapia combinada del D-002 y Lyprinol en un modelo de inflamación crónica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 48(1), 006-011.

Anexos

Anexo 1. Flores secas de *Dalea coerulea*



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Anexo 2. Elaboración de extractos a partir de las flores de *Dalea coerulea*

Extractos hidroalcohólicos



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Liofilización del extracto de *Dalea coerulea*



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Extracto hidroalcohólico liofilizado



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Anexo 3. Resultados del programa estadístico InfoStat

Cantidad de Fenoles

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Extracto	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
Fenoles mg/g	D1	4	12,61	0,47	12,62	2	9,85	0,0002
Fenoles mg/g	D2	4	15,56	0,62	15,57			
Fenoles mg/g	D3	4	9,32	1,21	9,20			

Trat. Ranks

D3	2,50	A
D1	6,50	A B
D2	10,50	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Cantidad de Flavonoides

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FLAVONOIDES mg/g	12	1.00	1.00	0.63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	49.56	2	24.78	7860.93	<0.0001
TRATAMIENTO	49.56	2	24.78	7860.93	<0.0001
Error	0.03	9	3.2E-03		
Total	49.59	11			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.11084

Error: 0.0032 gl: 9

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
T2	11.73	4	0.03	A
T3	8.15	4	0.03	B
T1	6.94	4	0.03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Elaborado por: Las Autoras, 2019

Actividad antiinflamatoria según la técnica del área bajo la curva

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Área	21	0,93	0,91	14,66

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1121260098,28	6	186876683,05	33,01	<0,0001
Tratamiento	1121260098,28	6	186876683,05	33,01	<0,0001
Error	79258713,65	14	5661336,69		
Total	1200518811,93	20			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6633,64110

Error: 5661336,6890 gl: 14

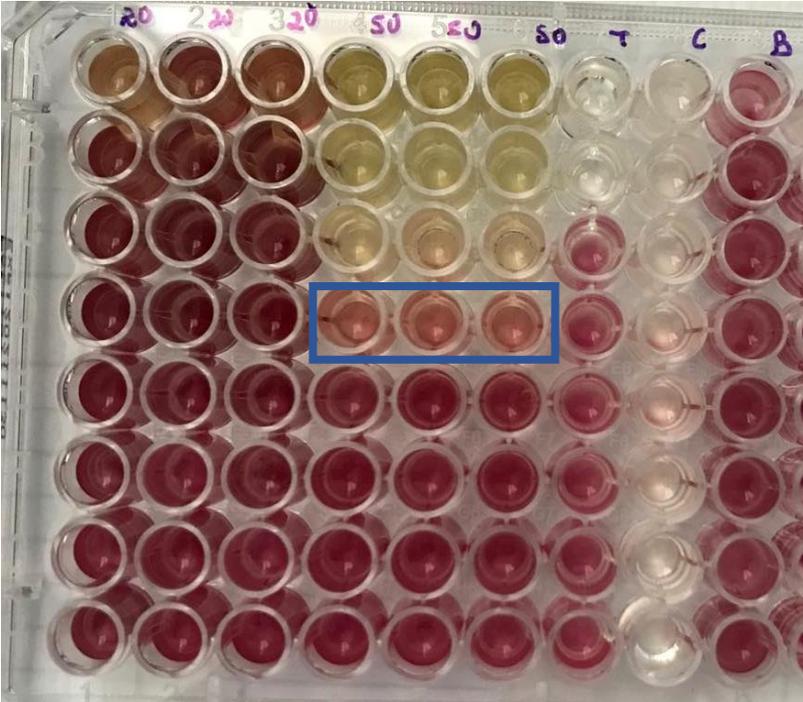
Tratamiento	Medias	n	E.E.
T1	-1,8E-12	3	1373,72 A
T3	15069,17	3	1373,72 B
T7	16542,40	3	1373,72 B
T6	17197,96	3	1373,72 B
T5	19117,89	3	1373,72 B C
T4	20407,91	3	1373,72 B C
T2	25294,42	3	1373,72 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Elaborado por: Las Autoras, 2019

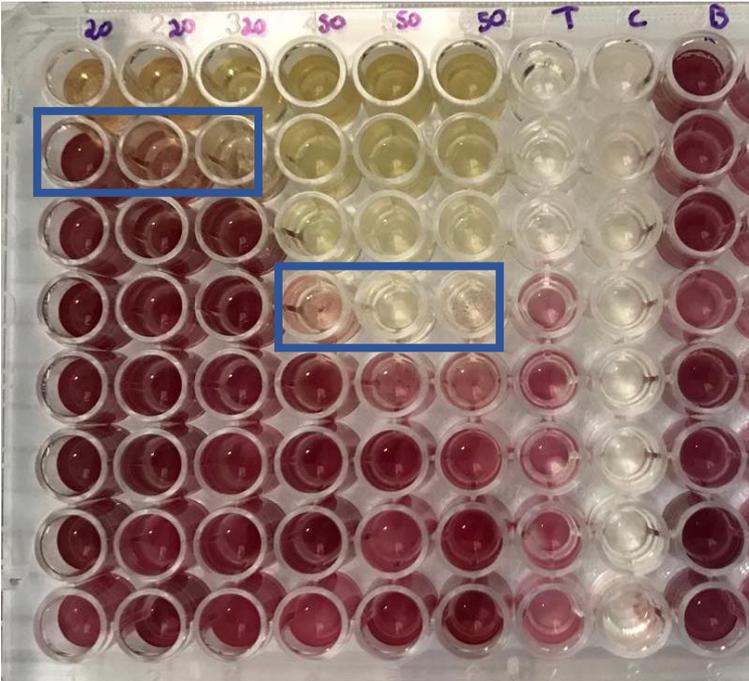
Anexo 4. Concentración mínima inhibitoria de los microorganismos evaluados mediante microdilución

Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC 29213™



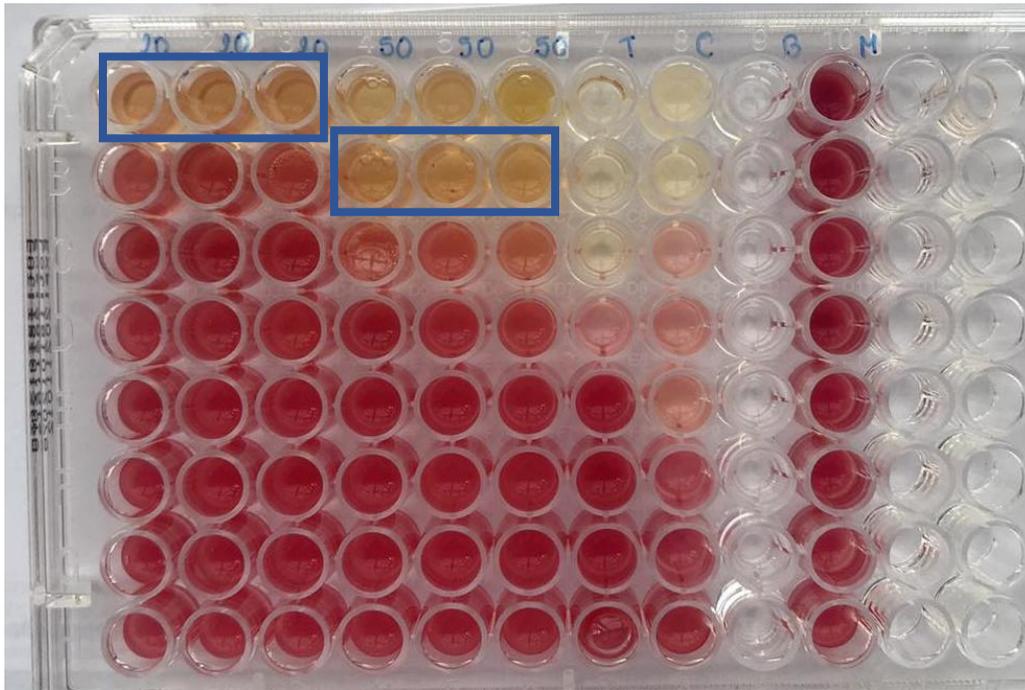
Elaborado por: Las Autoras, 2019

Streptococcus pyogenes ATCC 19615™



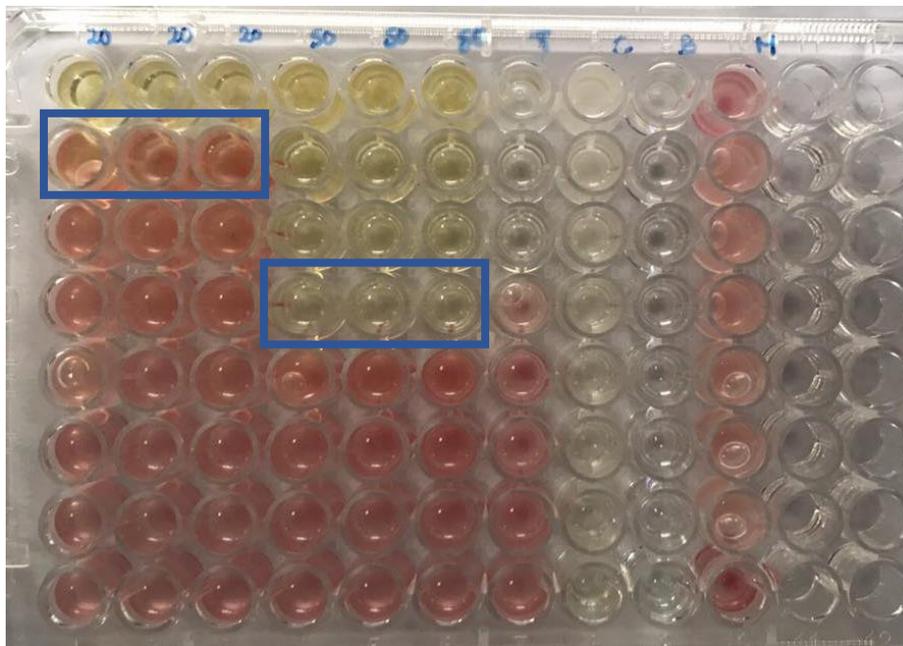
Elaborado por: Las Autoras, 2019

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumoniae* ATCC 10031™



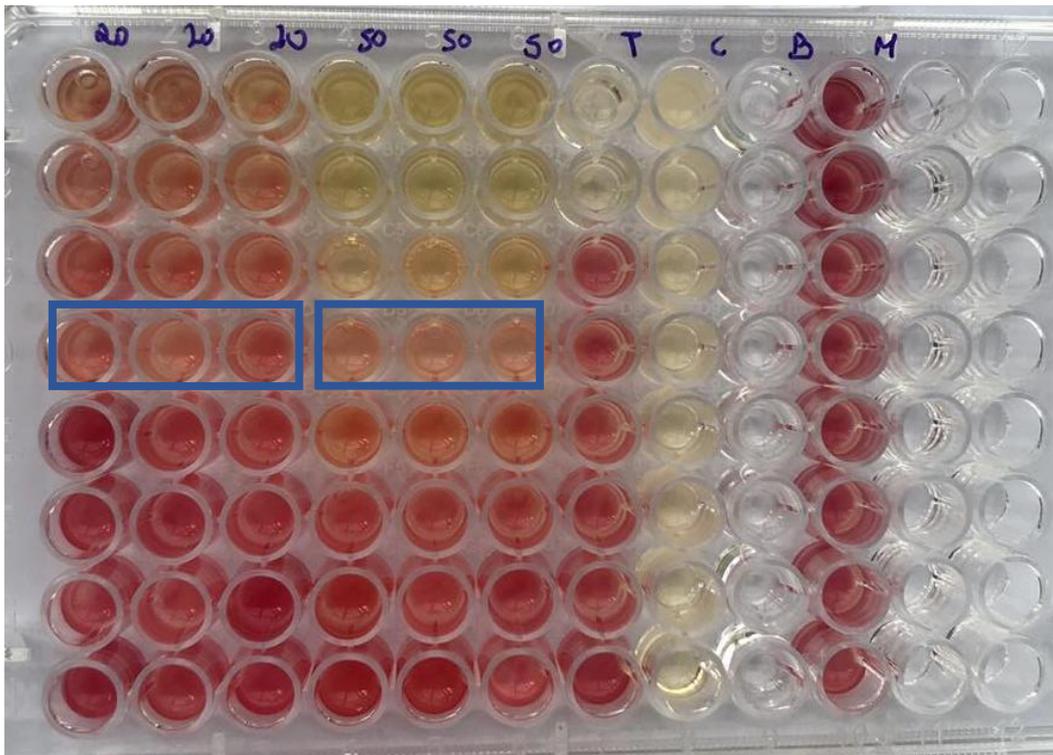
Elaborado por: Las Autoras, 2019

Haemophilus influenzae ATCC 10211™



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Pseudomona aeruginosa ATCC 9027™



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Anexo 5. Método de edema plantar inducido por carragenina en ratones Balb/C

Dosis del Extracto hidroalcohólico liofilizado D2



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Medición pata de ratón Balb/C



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Grupos de Ratones Balb/C



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Administración de la inyección de carragenina al 1 %



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Administración de las dosis de extracto D2



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Inflamación inducida por carragenina- pata derecha



Elaborado por: Las Autoras, 2019

Anexo 6. Ficha de información de cada microorganismo



Product Sheet

Streptococcus pyogenes (ATCC® 19615™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Streptococcus pyogenes* (ATCC® 19615™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Description

Designation: Bruno [CIP 104226]

Deposited Name: *Streptococcus pyogenes* Rosenbach

Antigenic Properties: Lancefield's group A

Product Description: Used in media testing; as a control strain for *Streptococcus* Group A; and in quality control for BBL, bioMérieux Vitek, IDS, and Micro-Media products.



Propagation

Medium

ATCC® Medium 44: Brain Heart Infusion Agar/Broth

ATCC® Medium 260: Trypticase soy agar/broth with defibrinated sheep blood

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: 5% CO₂

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #44 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #260 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours in an atmosphere of 5% CO₂.



Notes

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this



Product Sheet

Haemophilus influenzae (ATCC® 10211™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Haemophilus influenzae* (ATCC® 10211™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Description

Designation: AMC 36-A-1 [572]

Deposited Name: *Haemophilus influenzae* (Lehmann and Neumann) Winslow et al.

Antigenic Properties: Type b, Biotype I

Product Description: Used for media and susceptibility testing. This is a quality control strain for API NH, bioMerieux.



Propagation

Medium

ATCC® Medium 2167: Haemophilus Test Medium

ATCC® Medium 814: GC Agar/Broth Medium

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: 5% CO₂

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions or visit www.atcc.org for instructions.
2. Rehydrate the entire pellet with approximately 0.5 mL of #2167 broth. Aseptically transfer the entire contents to a 5-6 mL tube of #2167 broth. Additional test tubes can be inoculated by transferring 0.5 mL of the primary broth tube to these secondary broth tubes.
3. Use several drops of the primary broth tube to inoculate a #814 plate and/or #814 agar slant.
4. Incubate at 37°C for 24-48 hours in an atmosphere of 5% CO₂.



Notes

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this



Product Sheet

Staphylococcus aureus *subsp. aureus* (ATCC® 29213™)

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Staphylococcus aureus subsp. aureus* (ATCC® 29213™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Description

Designation: Wichita

Deposited Name: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach

Product Description: Quality control strain for API, BBL, bioMerieux Vitek, Micro-Media, MicroScan™, and Sensititre products. Standard strain for CLSI antimicrobial susceptibility testing.



Propagation

Medium

ATCC® Medium 18: Trypticase Soy Agar/Broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #18 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #18 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.



Notes

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate. This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org



Product Sheet

Pseudomonas aeruginosa (ATCC® 9027™)

Please read this FIRST

Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section

Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 9027™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Description

Designation: R. Hugh 813

Deposited Name: *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula

Product Description: Used in the assay of antimicrobial preservatives. Used in efficacy testing, media testing, and preparatory test control. A quality control strain for sterility testing. Produces rhamnolipid surfactant.



Propagation

Medium

ATCC® Medium 3: Nutrient agar or nutrient broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #3 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #3 agar slant and/or plate.
5. Incubate all tubes and plate at 37°C for 24 hours.



Notes

Both fluorescein and pyocyanin pigments are produced.

Purified genomic DNA of this strain is available as ATCC® 9027D-5™. This strain is available as Certified Reference Material ATCC® CRM-9027™.

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from



Product Sheet

***Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 10031™)**

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
2

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 10031™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.6597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor

Page 1 of 2



Description

Designation: PCI 602

Deposited Name: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (Schroeter) Trevisan

Product Description: Used in several antibiotic assays. Used for inhibition testing. Quality control strain for Sensititre products.



Propagation

Medium

ATCC® Medium 3: Nutrient agar or nutrient broth

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #3 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #3 agar slant and/or plate.
5. Incubate the tubes and plate at 37°C for 24 hours.



Notes

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 2

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org

(ATCC, 2019)