

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL DE LA PLANTA MEDICINAL
Scutellaria incarnata Vent.

GLENDIA VERÓNICA ORDÓÑEZ MUÑOZ
SOALLIN KATHERINE PINEDA MUÑOZ

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
CENTRO DE ESTUDIOS EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA (CEMPA)
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
(Q.C.B) DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2013

CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL DE LA PLANTA MEDICINAL
Scutellaria incarnata Vent.

GLENDIA VERÓNICA ORDOÑEZ MUÑOZ
SOALLIN KATHERINE PINEDA MUÑOZ

Trabajo de grado, para optar al título de Bióloga.

Director:

Mg. Luis Reinel Vásquez Arteaga

Co-Director:

Dr. Fabio Cabezas

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, NATURALES Y DE LA EDUCACION
PROGRAMA DE BIOLOGIA
CENTRO DE ESTUDIOS EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA (CEMPA)
DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
(Q.C.B) DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYAN
2013

Nota de Aceptación

Director _____
Luis Reinel Vásquez Arteaga MSc.

Jurado _____
Sandra Rivas MSc.

Jurado _____
Geovanny Varona MSc.

Popayán, 12 de agosto del 2013

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres Carlos Fernando Pineda Bernal y Wilman Niza Muñoz Meneses por su amor, apoyo, valores inculcados y por su valioso esfuerzo en ayudarme a ser una profesional.

A mis hermanos Jhoan Sebastián Pineda Muñoz y Ashlee Dayana Pineda Muñoz, por su amor, compañía, y por esas sonrisas diarias que siempre necesité para seguir adelante.

A Uriel Alberto Manquillo Zúñiga por su gran amor hacia mí, por ser parte de mi vida, de mis sueños, y por brindarme la fortaleza que en ocasiones necesité para persistir en mi carrera.

SOALLIN KATHERINE PINEDA MUÑOZ

Este trabajo está dedicado a mis padres, Jaime Ordoñez Zambrano y Dilma Leonor Muñoz, por su cariño, confianza, apoyo incondicional y por su esfuerzo por ayudarme durante toda mi formación personal y profesional.

A mi hermano Yolian Ordoñez por estar siempre presente, acompañándome para poderme realizar, a mis primos por su alegría y a mi tía Romayra que ahora descansa en el cielo.

A mi abuelita Gerardina Muñoz que se encuentra en el cielo, por su hermoso ejemplo de vida, valores inculcados y por su gran amor.

A mi princesa hermosa Helena Bravo, por ser mi motivación, inspiración y felicidad. Por haber fomentado en mí, el deseo de ser cada vez mejor y el anhelo de triunfo en la vida.

A Jorge Armando Bravo por regalarme cada día una sonrisa, por tomar mi mano a lo largo del camino y hacerme feliz, por enseñarme que el cielo siempre es azul y por ser mi sueño, lo que más quiero.

GLENDIA VERÓNICA ORDÓÑEZ MUÑOZ

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarnos siempre en nuestra carrera y por ser la luz que guía nuestro camino.

A la Universidad Del Cauca por todas las oportunidades académicas que nos brindó.

A nuestro director Mg. Luis Reinel Vásquez Arteaga por habernos guiado y colaborado siempre de manera incondicional en el desarrollo de nuestro trabajo de grado.

Al grupo de investigación Q.C.B química de compuestos Bioactivos, del departamento de Química, FACNED, por habernos asistido en todo lo referente a equipos, reactivos y en especial al Dr. Fabio Cabezas por su confianza.

Al químico Manuel Mera, por su ayuda, conocimiento compartido, por su tiempo y en especial por su valiosa amistad.

Al grupo de investigación CEMPA centro de estudios en microbiología y parasitología, FCS, departamento de medicina interna, en especial a la profesora Fabiola Gonzales y a la Dra. Gloria Ávila por su colaboración y en general por habernos abierto las puertas del grupo para trabajar en nuestro proyecto y por habernos brindado todos los implementos necesarios para llevarlo a buen término.

Al laboratorio unificado de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad del Cauca, a todos las personas que laboran en este espacio, en especial a su coordinadora la Dr. Julieta Montero.

A los laboratoristas: María Fernanda Bravo. Laboratorio de inmunología y microbiología de la FCS. A Jhon Carlos Meléndez. Laboratorio del programa Biología, de la FACNED. A Orlando Vergara. Laboratorio de ciencias fisiológicas de la FCS.

A todos los docentes del programa de Biología, en especial a los docentes: el MSc. Silvio Carvajal, por brindarnos las asesorías en la parte estadística de nuestro trabajo y al docente Giovanni Varona, por su apoyo, aporte académico y colaboración en el desarrollo de nuestro trabajo de grado.

A nuestros amigos y compañeros del programa de biología en especial a Aldair Rosero, Derly Imbachi, Felipe Polanco, Natalia Insuasti, Jeison Perafán, Carlos Valencia y Angélica Salazar por su invaluable amistad durante el transcurso de nuestra carrera.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PROBLEMÁTICA.....	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. MARCO TEÓRICO	16
4.1.GENERALIDADES: Scutellaria	16
4.1.2 Distribución.	16
3.1.4Scutellaria.	17
3.1.5 <i>Scutellaria incarnata</i> Vent.....	17
3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	17
3.3 EXTRACCION ETANÓLICA TOTAL.....	18
3.4 BACTERIAS	18
3.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> :	18
3.4.2 <i>Escherichia coli</i> :	19
3.5 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN.....	20
3.6 METODO DE DIFUSIÓN EN DISCO	20
3.7 ENSAYO DE TOXICIDAD MEDIANTE LA PRUEBA DE LETALIDAD DE <i>Artemia franciscana (salina)</i>	21
3.7.1 Conceptos generales	21
5. ANTECEDENTES.....	22
6. OBJETIVOS.....	29
5.1 OBJETIVO GENERAL	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
7. MARCO METODOLÓGICO	30
6.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA	30
6.2 RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO PREVIO DE MATERIA PRIMA.	30

6.3 EXTRACCIÓN ETANÓLICA TOTAL.....	31
6.3.1 Extracción Soxhlet.....	31
6.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO	31
6.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	33
6.5.1 Tratamientos para bioensayos	33
6.5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	33
6.5.3 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE <i>Artemia</i> <i>fransiscana</i>	36
6.6 DISEÑO EXPERIMENTAL	37
8. RESULTADOS	38
8.1EXTRACCIÓN ETANÓLICA TOTAL.....	38
8.2TAMIZAJE FITOQUÍMICO	38
8.3DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	41
8.3.1PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	41
8.3.2PRUEBA DE MICRODILUCIÓN: Determinación de la concentración mínima inhibitoria.	44
8.4 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE <i>Artemia franciscana</i>	49
9. DISCUSIÓN	52
10. CONCLUSIONES.....	77
11. RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Pruebas para identificar los núcleos de metabolitos secundarios presentes en el ET.....	32
Tabla 2. Tamizaje fitoquímico del (ET) de la planta de <i>S. incarnata</i>	38
Tabla 3. Resultados de tamizaje fitoquímico.....	39
Tabla 4. Porcentaje de inhibición relativa (%) de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	41
Tabla 5. Diámetro (mm) de los halos de inhibición de la bacteria <i>E. coli</i>	42
Tabla 6. Diámetro (mm) de los halos de inhibición de la bacteria <i>S. aureus</i>	42
Tabla 7. Halo de inhibición de crecimiento de la bacteria <i>E. coli</i>	42
Tabla 8. Halo de inhibición de crecimiento de la bacteria <i>S. aureus</i>	43
Tabla 9. Halo de inhibición de crecimiento de las bacterias <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	43
Tabla 10. Resultados del lector ELISA para la bacteria <i>E. coli</i>	45
Tabla 11. Resultados del lector ELISA para la bacteria <i>S. aureus</i>	45
Tabla 12. Absorbancia (nm) de los tratamientos del ET para <i>E. coli</i>	46
Tabla 13. Absorbancia (nm) de los tratamientos del ET para <i>S. aureus</i>	47
Tabla 14. Absorbancia (nm) de las bacterias <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	49
Tabla 15. Natalidad y mortalidad de <i>Artemia franciscana</i> (<i>salina</i>).....	50
Tabla 16. Mortalidad de <i>Artemia franciscana</i> (# individuos).....	50

TABLA DE FIGURAS

Figura 1	Tallo, hojas y inflorescencia de <i>S. incarnata</i> Vent.....	17
Figura 2	Lugar de muestreo y colecta del material vegetal.....	30
Figura 3	Incubadora y Material vegetal.....	31
Figura 4	Sistema de extracción Soxhlet y Rotaevaporador.....	31
Figura 5	Especies <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	34
Figura 6	Lector ELISA y micropozo.....	36
Figura 7	Montaje para sistema de eclosión de huevos y tratamientos.....	36
Figura 8	Extracto etanólico total (ET).....	38
Figura 9	Halos de inhibición de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	41
Figura 10	Asociación del halo de inhibición de crecimiento con la concentración del extracto ET.....	44
Figura 11	Resiembra de <i>S. aureus</i> y <i>E.coli</i>	46
Figura 12	Asociación de la absorbancia (nm) con la concentración del ET de la bacteria <i>E. coli</i>	47
Figura 13	Asociación de la absorbancia (nm) con la concentración del ET de la bacteria <i>S. aureus</i>	48
Figura 14	Larva de crustáceo <i>Artemia franciscana (salina)</i>	49
Figura 15	Asociación del índice de Mortalidad con la concentración del ET.....	51
Figura 16	CL50 del ET.de <i>S.incarnata</i>	51
Figura 17	Glucósidos o cardiotónicos.....	54
Figura 18	Tipos fundamentales de flavonoides.....	55
Figura 19	Estructura de la cumarina y de su derivado 7-CH.....	56
Figura 20	Estructura química de un Tanino.....	57
Figura 21	Estructura básica de una Saponina.....	58
Figura 22	Estructura química de un Triterpeno.....	58

RESUMEN

La especie *Scutellaria incarnata*, es una planta medicinal utilizada por la población Paéz, para el tratamiento de diferentes dolencias. Es por ello que esta investigación partió del interés de poder determinar los metabolitos secundarios presentes en esta planta y evaluar su posible actividad antibacteriana y toxica.

Para ello se realizó la extracción etanólica total de la planta por el método Soxleth, en el cual se obtuvo 250 mL de extracto y después de haberlo sometido a secado en el rotaevaporador un peso total seco de 1.26 g, con un porcentaje de rendimiento que corresponde al 81%. A continuación, se determinó a partir del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico Total (ET), que los flavonoides, cumarinas volátiles, taninos, saponinas, triterpenos y cardiotónicos están presentes en la planta

La actividad antibacteriana del ET frente a bacterias Gram + (*Staphylococcus aureus*) y Gram – (*Escherichia coli*) fueron evaluadas a partir de la prueba de difusión en disco donde se obtuvo que el ET de *S. incarnata* es positivo ya que el valor del PIR (Porcentaje de inhibición relativa) generado por las tres concentraciones frente ambas bacterias fueron mayor al 25%. Sumado a lo anterior, por el método de microdilución se evidencio que las bacterias son sensibles frente a las concentraciones empleadas del ET, estableciéndose para *S. aureus* una CMI de 1024ppm y para *E. coli* se estima sea mayor a la utilizada en la prueba y que corresponde a 1024 ppm.

Finalmente, en el ensayo de toxicidad con *Artemia franciscana*, se obtuvo que la concentración letal 50 (LC₅₀) es 7.5 ppm.

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas en la medicina tradicional, ha dado lugar al descubrimiento de diferentes componentes que pueden considerarse fármacos, por lo cual el reconocimiento y estudio de las especies existentes, nos brindan la posibilidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural (Osorio, 2009)

Teniendo en cuenta que hoy por hoy existe una tendencia al incremento de resistencia de los microorganismos a los fármacos existentes, se hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, para poder combatir estos problemas de resistencia bacteriana, combatir infecciones y superar los efectos secundarios de algunos agentes disponibles en la actualidad (Sánchez , 2011)

Las plantas medicinales son utilizadas como principal recurso terapéutico de la medicina tradicional Paéz, uno de los pueblos indígenas más importantes de nuestro país(Sanabria, 2001). El pueblo Páez está ubicado en la vertiente oriental de la cordillera central, región sur de los Andes colombianos, en la zona de Tierradentro, comprendida entre los departamentos de Huila y Cauca, aunque también existen asentamientos en la zona norte del Cauca, el sur del Valle y los departamentos de Putumayo y Caquetá.

Para Colombia, desde el punto de vista de esta comunidad, las plantas del genero *Scutellaria*, conocidas comúnmente por ellos como alegrías, deben su nombre a que son antidepresivas y restituyen la alegría de vivir (González, 2005). Asimismo, las Scutellarias están muy extendidas en Europa, Estados Unidos y Asia oriental donde son conocidas usualmente como gorros (Shang et al., 2010a).

Los estudios muestran que las Scutellarias y sus principios activos poseen amplias acciones farmacológicas, como antitumoral y anti-angiogéico(Himeji *et al.*, 2007; Li-Weber, 2009), antitrombóticos, citotóxicos, propiedades antiespasmódicas,

antioxidantes (Gao *et al.*, 1999; Schinella *et al.*, 2002), hepatoprotector (Lin, Shieh, and Yen, 1997), anticonvulsivo (Wang, Liao, and Chen, 2000; Zhang *et al.*, 2009), antiinflamatorio (Kim *et al.*, 1999), actividades antibacterianas (Sato *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2004) y antivirales.

Estudios fitoquímicos han revelado que los aceites esenciales, flavonoides, taninos, iridoides, ligninas, compuestos fenólicos, diterpenos y triterpenos están presentes en diferentes partes de las plantas. (Duke, 1990; Ezer, Akcos, and Rodriguez, 1998; Graham *et al.*, 2000; Hui *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Skaltsa *et al.*, 2000; Stojakowska and Kisiel, 1999; Yaghmai, 1988; Zargari, 1810; Zargari, 1990).

La especie *S. incarnata*, es una planta medicinal, fuente de numerosos beneficios. Por pertenecer a la familia Lamiaceae tiene un futuro promisorio en el campo de la medicina herbal y farmacéutica, ya que como se ha demostrado en algunos estudios sobre diferentes géneros de esta familia, éstas tienen características antimicrobianas, antifúngicas y terapéuticas.

Aunado a esto, teniendo en cuenta que las evidencias actuales sugieren que *S. incarnata* tiene un gran potencial terapéutico, la ausencia de estudios relacionados con la caracterización cualitativa, además de bioensayos que corroboren principios activos de la planta y por tanto, la escasa información disponible de *S. incarnata*, se propone realizar la extracción etanólica total, el tamizaje químico y asimismo, la evaluación de la actividad antibacteriana y ensayos de toxicidad en *A. franciscana*.

2. PROBLEMÁTICA

La mayor parte de la industria farmacéutica es altamente dependiente de las poblaciones silvestres de plantas para el suministro de materias primas para la subsecuente extracción de importantes compuestos medicinales.

El género *Scutellaria* con cerca de 300 especies a nivel mundial, se extiende en regiones templadas y en montañas tropicales (Bazzaz *et al.*, 2011a). Es además, una planta de crecimiento silvestre y de amplia distribución en la meseta de Popayán y en sus alrededores.

El uso de *S. incarnata* en la medicina tradicional, el conocimiento popular, además de las propiedades medicinales evidenciadas en este género, sugiere que esta planta posee un gran potencial curativo frente a enfermedades causadas por microorganismos. Asimismo, el hecho de pertenecer a la familia Lamiaceae le confiere un futuro prometedor en el campo de la medicina herbal y farmacéutica. Por lo demás, estudios sobre su descripción botánica, ecología y origen de sus propiedades fitoquímicas hasta el momento no se han reportado. Teniendo en cuenta lo anterior, esta investigación partió del interés de poder determinar los metabolitos secundarios presentes en esta planta y evaluar su posible actividad antibacteriana y toxica.

De acuerdo a lo planteado anteriormente, se construyen preguntas de investigación tales como:

- ¿Cuáles son los principales componentes fitoquímicos de *S. incarnata*?
- ¿El extracto etanólico total de *S. incarnata* posee actividad antibacteriana y cierto grado de toxicidad?

3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas ha habido un resurgimiento del interés en el estudio y uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud y en el reconocimiento de la importancia de las plantas medicinales en el sistema de salud (Hoareau and DaSilva, 1999; Lewington, 1993; Mendelsohn and Balick, 1995). Las tendencias recientes en la investigación de plantas medicinales muestran que los estudios etnobotánicos continúan y que hay un aumento apreciable en la actividad de investigación en el ámbito de la bioactividad de productos naturales (Nirmal Joshee, 2001). Este aspecto ha dado lugar a un aumento repentino de la demanda de las hierbas medicinales, seguido de un crecimiento tardío en la conciencia internacional acerca de la fuente de disminución de las plantas medicinales del mundo (Bodeker, 2003).

Últimamente, se han realizado muchas investigaciones encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales. Desde siempre, la contaminación microbiológica ha representado un riesgo para la salud debido a la resistencia de algunos microorganismos a los antibióticos convencionales y a los conservantes sintéticos utilizados en la industria alimentaria, que en numerosos informes son considerados como responsables de ser cancerígenos y teratogénicos por su toxicidad residual. Por esta razón, la tendencia al uso de antimicrobianos y conservantes naturales ha aumentado, llegándose a constituir como una alternativa promisorio como fuente de sustancias con actividad antimicrobiana.

En la actualidad surge la necesidad de desarrollar estrategias de investigación eficaces seleccionando especies vegetales usadas en los sistemas etnomédicos lo cual incrementa la posibilidad de encontrar actividad biológica en comparación con la selección al azar de las plantas. Es así como se debe relacionar la etnobotánica de un área, debido a su importancia cultural y el estudio acreditado de la ciencia, lo que resulta en un fuerte método para obtener un conocimiento íntegro acerca del uso sostenible de las plantas.

De esta manera, atendiendo el uso medicinal que se le da a *S. incarnata* por parte de la comunidad Paéz, se hace necesario el estudio de sus componentes y consecuentemente la evaluación biológica de sus extractos. Añadido a esto, se tiene que al integrar la información de las diferentes fuentes bibliográficas sobre especies pertenecientes al género *Scutellaria*, se encuentra un potencial fuerte en el campo farmacológico, que necesita fortalecerse con especies silvestres de nuestro país.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES: *Scutellaria*

Numerosas especies de *Scutellaria* han sido utilizadas en muchos sistemas de medicina tradicional y es bien conocido entre las tribus nativas americanas como emenagogo fuerte y como una hierba medicinal. Más de 60 flavonoides han sido identificados a partir de diferentes fuentes. Los componentes flavonoides principales que contribuyen a la bioactividad han sido reportados como: baicalina, baicaleína, wogonina, wogonoside, apigenina y crisina. Wogonina (presente en las raíces), baicaleína y baicalina (presente en la planta completa) (Nirmal Joshee, 2001).

Las especies de *Scutellaria* han sido ampliamente utilizadas en los sistemas médicos tradicionales de China, Corea, India, Japón, muchos países de Europa y América del Norte. La especie más utilizada es *S. baicalensis* o casquete Baical. Otras especies importantes son: *S. lateriflora*, *S. barbata* y *S. havanensis*(Song, 1981).

4.1.1 Usos: Ornamentales. Potencialmente como medicamentos o hierbas aromáticas de uso industrial en el campo de los alimentos (condimentos), productos de higiene y perfumería. Utilizadas en la medicina popular y farmacológica.

4.1.2 Distribución.

Cosmopolita, especialmente abundantes en la región Mediterránea y hacia el este en Asia central. Para Colombia, en el Departamento del Cauca se tiene registro de los municipios de Cajibío, Popayán, el Tambo, Piendamó, la Sierra y Totoró entre los 1300 y 1920 msnm. Fuente: Herbario CAUP, Universidad del Cauca.

3.1.4 *Scutellaria*.

Es un género con cerca de 350 especies alrededor del mundo, se extiende en regiones templadas y en montañas tropicales. La mayoría son plantas herbáceas anuales o perennes de 5 cm a 1 metro de altura, algunos son subarbustos, otros son acuáticos. Tienen tallos con cuatro hojas encontradas. El género es fácilmente reconocible por la típica protección del cáliz que ha propiciado su nombre.

3.1.5 *Scutellaria incarnata* Vent.



Figura 1. Fotografía A y B: tallo y hojas, C: inflorescencia de *Scutellaria incarnata* Vent. Fuente las autoras.

Hierba con hojas opuestas, inflorescencias en pequeñas cimas en la axila en forma de verticilo, corola con pétalos soldados, la mayoría de veces bilabiada. No se tiene información estructural y morfológica confiable, y por tanto no se han realizado estudios biotecnológicos sobre esta especie. Pero se toma en cuenta los compuestos medicinales que componen el género, y se remite a una elevada importancia a nivel farmacéutico (Duke, 1990; Ezer, Akcos, and Rodriguez, 1998; Graham *et al.*, 2000; Hui *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Skaltsa *et al.*, 2000; Stojakowska and Kisiel, 1999; Yaghmai, 1988; Zargari, 1990).

3.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El tamizaje fitoquímico o “screening” es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, y de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje químico consiste en la extracción de la planta con

solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del “screening” farmacológico si es posible. La cantidad de material vegetal necesario para hacer las pruebas varía de 5 g a 200 g (Sharapin, 2000).

3.3 EXTRACCION ETANÓLICA TOTAL

La extracción se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible. La extracción con el equipo Soxhlet, resulta en la obtención de principios activos de los tejidos vegetales. Lo que hace el extractor Soxhlet es realizar un sinfín de extracciones de manera automática, con el mismo solvente que se evapora y condensa llegando siempre de manera pura al material (Núñez, 2008).

3.4 BACTERIAS

3.4.1 *Staphylococcus aureus*:

S. aureus es un miembro de la familia Micrococcaceae, que bajo el análisis microscópico, aparecen como cocos Gram positivos en racimos. (Lowy, 1998). *S. aureus* es un patógeno importante relacionado con un gran número de infecciones humanas como bacteriemias, infecciones de heridas, piel y tejidos blandos, etc. (López-Brea and Domingo, 2003). Los seres humanos sin embargo, son un reservorio natural de *S. aureus*. Un 30 y 50 % de los adultos sanos son colonizados, con un 10 a 20 % de colonización persistente (Casewell and Hill, 1986; Noble, Valkenburg, and Wolters, 1967). Asimismo, las personas colonizadas con *S. aureus* están en mayor riesgo de infecciones posteriores (Wenzel and Perl, 1995)

Además de la distribución ubicua de esta bacteria en el ambiente y en las superficies corporales, existe una variedad de condiciones predisponentes para la enfermedad estafilocócica que favorecen la incidencia de estas infecciones: Entre

éstas se pueden mencionar lesiones de la piel, infecciones virales, sobre todo del tracto respiratorio, defectos de la función de los leucocitos, inmunodeficiencia humoral, presencia de cuerpos extraños (catéteres, sondas, suturas, etc.), tratamiento con antibióticos al cual el estafilococo es resistente, así como varios trastornos asociados con una disminución de la resistencia natural a las infecciones (diabetes mellitus, alcoholismo, neoplasias, desnutrición, uremia, mucoviscidosis, etc.) (Zepeda, 1978).

3.4.2 *Escherichia coli*:

E. coli es una bacteria perteneciente a la familia enterobacteriaceae que bajo el análisis microscópico, aparece como un bacilo corto, recto, Gram negativo (Sussman, 1997). Las cepas patógenas intestinales de *E. coli* rara vez se encuentran en la flora fecal de personas sanas y, en cambio, parecen ser los agentes patógenos en esencia obligados, causando la gastroenteritis o colitis cuando se ingiere en cantidades considerables. Infecciones extraintestinales (EIS), debido a *E. coli* son comunes en todos los grupos de edad y puede afectar casi cualquier órgano o sitio anatómico. La bacteriemia puede acompañar una infección en cualquiera de estos sitios. Una enfermedad grave y la muerte puede ocurrir en huéspedes sanos, pero los resultados adversos son mucho más propensos a la enfermedad comórbida y disminución de las defensas (Russo and Johnson, 2000).

E. coli es la causa más frecuente de ITU adquirida en forma extra hospitalaria e intrahospitalaria (Juan, 1994). A pesar de que la infección urinaria (ITU) es fácilmente manejada por el huésped normal, puede causar problemas en pacientes inmunosuprimidos, requiriendo de esta manera la búsqueda de antimicrobianos en dosis bactericidas y no solo bacteriostáticas que aseguren tratamientos efectivos (Horna Quintana, Silva Diaz, and Vicente Taboada, 2005)

3.5 MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) definida como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (Horna Quintana, Silva Diaz, and Vicente Taboada, 2005) y la concentración mínima inhibitoria (MIC) (Ramírez, Stella, and Marín Castaño, 2009). Estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Ramírez, Stella, and Marín Castaño, 2009).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación (Wilkinson, 2006). La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales permitiendo diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Langfield *et al.*, 2004). Además, confirma resistencias inusuales y da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Andrews, 2001).

3.6 METODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

El antibiograma por la técnica de difusión en agar basado en las investigaciones de Kirby-Bauer y colaboradores, es uno de los métodos que el comité nacional de estándares para laboratorios clínicos (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos (Cantón *et al.*, 2000). El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (Ramírez and Castaño, 2009). El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria

para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Hacek, Dressel, and Peterson, 1999).

3.7 ENSAYO DE TOXICIDAD MEDIANTE LA PRUEBA DE LETALIDAD DE *Artemia franciscana* (salina)

3.7.1 Conceptos generales

Del griego *Artemia* que significa óptima conservación. Género de crustáceos braquiópodos del orden anostráceos, de pequeño tamaño llegando a alcanzar 10-15 mm en etapa adulta, y desprovistos de caparazón. Viven en las aguas salobres del litoral o del interior. *A. franciscana* posee el atributo de que sus huevos pueden resistir el permanecer deshidratados durante años. Para medir la toxicidad de una planta o extracto se recurre con frecuencia a la prueba de *A. franciscana*, debido su sensibilidad a gran variedad de sustancias. Además, también se utiliza como método de comprobación de actividad para algunos pesticidas, anestésicos, micotoxinas y toxinas de dinoflagelados (<http://biblioteca.portalpez.com/la-artemia-salina-vp15740.html>)

La actividad observada en el test de *A. franciscana* se expresa como toxicidad a los camarones (LC50), es decir la dosis que mata al 50% de los camarones. No es un ensayo específico sino de toxicidad general, aunque sirve también para el análisis de actividad de muchos pesticidas. Se considera como citotóxico cuando la LC50 =1000-2000 ppm (para extractos crudos) y <200ppm (para compuestos o sustancias puras) (Técnicas de comprobación de actividad terapéutica en plantas medicinales)

5. ANTECEDENTES

Las especies del género *Scutellaria* son poco conocidas, en tanto sus características, propiedades y descripciones son generales. En la labor investigativa se han encontrado trabajos que revelan compuestos bioquímicos del género, notificando aspectos medicinales que puede ofrecer la planta, encontrándose algunos trabajos en Asia y Estados Unidos de especies como: *S. baicalensis*, *S. integrifolia*, *S. orientalis*, *S. bartata* y *S. lateriflora*.

Entre los estudios relacionados con la especie *S. incarnata*, se encontró uno enfocado en la caracterización micromorfológica, estructural y molecular de las reservas de semilla (Tobar, 2010). Otro estudio estuvo relacionado con los Colibríes asociados a esta planta en la reserva forestal protectora tarpeya del municipio de Iquira Huila (Ortiz, 2012). Además, se encontró otro orientado en el análisis fitoquímico preliminar y cromatografía en capa delgada de dos especies de alegría (*S. incarnata* y *Scutellaria coccinea*) (Herreno, Pombo, and Mejia, 2001). Sin embargo, no se registran datos o artículos científicos relacionados con las propiedades de sus extractos.

De esta forma, se está extendiendo el conocimiento de algunas especies pertenecientes a este género, en las que los flavonoides han demostrado ser uno de los principales componentes que contribuyen a la bioactividad (Boyle *et al.*, 2011). Los extractos y compuestos, principalmente flavonoides presentes en toda la planta, han mostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, ansiolíticas, neuroprotectoras, antitrombóticas, anticancerígenas, antimicrobianas y antivirales (Delange *et al.*, 2012).

Estudios fitoquímicos han revelado que los aceites esenciales, flavonoides, taninos, iridoides, ligninas, compuestos fenólicos, diterpenos y triterpenos están presentes en diferentes partes de las plantas. (Duke, 1990; Ezer, Akcos, and Rodriguez, 1998; Graham *et al.*, 2000; Hui *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2001; Skaltsa *et al.*, 2000; Stojakowska and Kisiel, 1999; Yaghmai, 1988; Zargari, 1810; Zargari, 1990). Más de 295 compuestos han sido aislados, entre ellos los flavonoides y diterpenos. Actualmente, compuestos monómeros o partes activas han sido

seleccionados para la actividad farmacológica de *Scutellaria* *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, la revisión de literatura etnofarmacológica, fitoquímica y farmacológica indican que los extractos y compuestos monoméricos de *Scutellaria* tienen un gran potencial para curar el cáncer, la hepatitis, el VIH-1, etc. (Shang *et al.*, 2010b).

Los flavonoides constituyen los metabolitos más comunes y estudiados en el género *Scutellaria*. Los flavonoides contenidos en la raíz de *S. baicalensis* son conocidos por presentar amplias acciones farmacológicas y diversas actividades fisiológicas (Himeji *et al.*, 2007). En *S. baicalensis* Georgi, según (Gao *et al.*, 1999), la baicaleína, baicalina, wogonina y wogonoside son los cuatro principales flavonoides en la raíz, cumpliendo actividades antioxidantes. A partir de este estudio se encontró que la baicaleína y la baicalina debido a su fuerte acción eliminadora de radicales libres podrían ser utilizados para curar lesiones neurológicas. Estos resultados fueron demostrados en un estudio relacionado con el daño celular neuronal inducida por el peróxido de hidrógeno en células HS-SY5Y, evidenciándose los efectos protectores de los flavonoides (baicaleína y la baicalina) procedentes de *S. baicalensis* Georgi en el daño oxidativo de las células neuronales (Gao, Huang, and Xu, 2001).

Sumado a lo anterior, se han observado efectos inhibitorios de la baicaleína y baicalina sobre la expansión de los virus humanos. De esta manera, según (Baylor *et al.*, 1992), la baicaleína produjo inhibición dependiente de la concentración en la replicación del HTLV-I o virus de la leucemia humana tipo 1, en células T y B productivamente infectadas. Además, según (Wu, Akatsu, and Okada, 1995) la baicalina podría inducir selectivamente la apoptosis de las células CEM-VIH (células linfoides T, dianas del VIH) que tienen una alta capacidad de liberación de virus, y así estimular la proliferación de células CEM-VIH que tienen una capacidad relativamente baja de producción de VIH.

Según (Huang *et al.*, 2010), la wogonina obtenida a partir del extracto crudo de *S. Baicalensis* tiene efecto citotóxico sobre células de leucemia mielógena humana (HL-60). De este modo se encontró que en las células tratadas con wogonina inducen a la apoptosis, fragmentación del ADN y aumento de la actividad de la caspasa-3. Además, el tratamiento de las células HL-60 con wogonina conduce a la

inhibición de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT), a la proteína asociada a la telomerasa humana1 (hTP1) y la expresión del ARNm del gen c-myc.

Entre otras acciones de los flavonoides se ha reportado efecto protector de la baicaleína sobre la lesión de células renales. según (Yokozawa *et al.*, 1999), además, según (Lee *et al.*, 2003), la wogonina, aislada de la raíz de *S. baicalensis* Georgi, presenta una fuerte acción neuroprotectora, es así como se ha demostrado la actividad antiinflamatoria en varios tipos de células incluyendo macrófagos. Asimismo, se ha informado que la baicalina, baicaleína, wogonina muestran efectos contra el cáncer en líneas celulares de hepatoma humano (Chen *et al.*, 2002; Matsuzaki *et al.*, 1996; Okita *et al.*, 1993;Yano *et al.*, 1994).

Según (Parajuli *et al.*, 2009), los extractos ensayados de hojas de *S. angulosa*, *S. integrifolia*, *S. ocmulgee* y *S. scandens* seleccionados de trece especies del genero *Scutellaria* tienen una fuerte actividad contra el cáncer después de analizar sus extractos de hoja, tallo y raíz y de los niveles de flavonoides biológicamente activos comunes: apigenina, baicaleína, baicalina, crisina, scutellarina y wogonina. De esta manera, a través del ensayo de MTT, citometría de flujo de la apoptosis y basado en el análisis del ciclo celular se determinaron los efectos específicos sobre la proliferación celular, apoptosis y progresión del ciclo celular del Glioma maligno, carcinoma de mama y células de cáncer de próstata. Como resultado se obtuvo que los extractos y flavonoides individuales inhibieron la proliferación de las células de glioma maligno y carcinoma de mama sin afectar las células primarias o no malignas. De este modo, los flavonoides exhiben diferentes mecanismos de actividad anti-tumoral así como interacciones positivas, induciendo la apoptosis y la detención del ciclo celular en G1/G2. Este estudio proporciona la base para futuros estudios mecanicistas en el tratamiento adyuvante de los tumores malignos que utilizan extractos de especies del genero *Scutellaria*.

Los flavonoides también se han encontrado en *S. barbata*(Wang, Wang, and Xiao) donde cumple una acción antitumoral (Sonoda *et al.*, 2004), antioxidante y anticancerígeno (Cai *et al.*, 2004). Una actividad similar se ha encontrado en *Scutellaria litwinowii* donde según(Bazzaz *et al.*, 2011b) los flavonoides cumplen

una actividad antioxidante y según (Tayarani-Najarani *et al.*, 2012) la wogonina y con mayor proporción la neobaicaleina generan apoptosis en células HeLa lo que sugiere que la neobaicaleina podría ser uno de los compuestos potenciales del extracto crudo de *S. litwinowii* eficaz en la prevención y/o tratamiento del cáncer. Sumado a lo anterior los flavonoides presentes en *S. rehderiana* según (Su *et al.*, 2000) cumplen también una acción antioxidante.

Por su parte, se ratifica que los flavonoides de *S. lateriflora* según (Zhang *et al.*, 2009) poseen una actividad anticonvulsivante y ansiolítica según (Bergeron *et al.*, 2005). Además en otras especies como *S. rivularis* la presencia de flavonoides como baicaleina, baicalina y wogonina se han demostrado además de su actividad antiinflamatoria (Lin and Shieh, 1996).

Se han encontrado además, flavonoides en otras especies como *S. galericulata* (Popova, Pakaln, and Litvinenko, 1975), también cinco nuevos flavonoides en *S. amoena* (Zhou and Yang, 2000); cuatro nuevas flavanonas y una nueva flavona a partir de la raíz de *S. indica* L (Miyachi *et al.*, 1987); dos nuevas flavonas y ocho conocidos flavonoides en *S. alpina* L (Kikuchi *et al.*, 1991) y flavonoides en general en *S. havanensis* Jacq (Marrero Delange *et al.*, 2012), sin embargo no se encontraron estudios relacionados con su actividad farmacológica.

Otros componentes químicos también han sido investigados, incluyendo especies *S. rivularis* (Chou, 1978; Tomimori, Imoto, and Miyachi, 1990), *Scutellaria decolorar* (Tomimori *et al.*, 1985; Tomimori *et al.*, 1986), *S. indica* (Chou and Lee, 1986; Miyachi *et al.*, 1987; Miyachi *et al.*, 1989) y *S. scandens* (Miyachi, 1988). Además, el posible uso de cultivos de células vegetales para la biotransformación de componentes naturales específicos se ha demostrado (Berlin, 1988; Sarin, 2005; Vanisree *et al.*, 2004; Verpoorte, van der Heijden, and Memelink, 2000).

Las evidencias actuales sugieren que en las alegrías colombianas hay flavonas similares a la baicaleína, baicalina y wogonina de la *S. baicalensis*, una de las escutelarias mejor estudiada y comercializada del mundo. Las flores de las especies colombianas son tomadas en infusión como antigripales, lo cual es congruente para las actividades antiretrovirales, y antivirales de la baicaleina, y

como ella también se usa como sedativa y antidepresiva, hay coincidencia con los usos de las especies colombianas.

Las actividades específicas de las flavonas citadas en *S. baicalensis* indican su potencial como antioxidantes, hepatoprotectoras, inhibidoras de las reacciones autoinmunes desencadenadas por superantígenos como *S. aureus*, y contra desórdenes de comportamiento compulsivos (González, 2005)

S. baicalensis se ha utilizado tradicionalmente en el tratamiento de muchos tipos de enfermedades, incluyendo enfermedades infecciosas. Además, estudios realizados han revelado actividad antimicrobiana de sus extractos (Seong, 2004). *S. baicalensis*, es activo contra una amplia gama de bacterias, incluyendo *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, Estreptococos, *E. coli*, neumococos (Chang and But, 1986; Huang and Williams, 1999), *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Corynebacterium diphtheria* (Tan and Vanitha, 2004).

Extracciones realizadas en serie con hexano, diclorometano, metanol y agua, respectivamente mostraron actividades antimicrobianas a través del método de difusión en disco. El extracto de metanol a partir de *S. baicalensis* revelo o alta actividad antimicrobiana contra MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina), Gm-bacterias (bacterias genéticamente modificadas) y *Candida albicans* (Seong, 2004).

En adición, en otro trabajo científico, se informó que el 10% del extracto acuoso de *S. baicalensis* posee propiedades antimicóticas contra patógenos tales como *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans*, *Geotrichum candidum* y *Rhodotorula rubra*. Aunado a esto, el extracto mencionado tuvo mayor actividad frente a *C. albicans* entre 56 plantas ampliamente utilizadas en la medicina china (Blaszczyk, Krzyzanowska, and Lamer-Zarawska, 2000).

En el extracto etanólico de *S. baicalensis* se encontró la capacidad de mejorar la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro antibióticos (penicilina G, gentamicina, ciprofloxacino, ceftriaxona) frente a MRSA (Yang *et al.*, 2005). Por otro lado,

componentes aislados como la Baicaleína en *S. baicalensis* mostró inhibición de crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* y *C. albicans*, con una concentración mínima inhibitoria (CIM) de 0,112g/l, y 0,264g/l, respectivamente (Zhou *et al.*, 1997).

Un extracto acuoso y metanólico de las raíces de *S. baicalensis*, 200 ug/ml, produjo una inhibición significativa (>90%) ($p < 0,01$) de la actividad de la proteasa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (hiv-1 proteasa) (Lam *et al.*, 2000). Un extracto acuoso caliente de las raíces inhibió el crecimiento de *Alcaligenes calcoaceticus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* en concentraciones de 200.0-400.0 g/ml, pero no fue activo *in vitro* frente a *E. coli* a concentraciones de hasta 1600,0 g/ml (Franzblau *et al.*, 1998). Un extracto acuoso caliente de las raíces, inhibió el crecimiento de *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides melaninogenicus* y *Streptococcus sanguis*, a una CIM de 0.25-1.0 g/ml (Tsao and Yin, 2001).

En un estudio, los MICs y MBCs de los extractos de *S. litwinowii* fueron evaluados. Los resultados indicaron que el extracto metanólico y el de acetato de etilo, tienen mayor actividad contra los microorganismos ensayados en comparación con el de diclorometano. Las CIMs variaron de 6,25 a 100 mg/ml, dependiendo de la susceptibilidad del microorganismo de ensayo (*C. albicans*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. cereus* y *S. aureus*). Con los resultados obtenidos en este estudio se indicó que las bacterias Gram-positiva son más sensibles a los extractos que las Bacterias Gram-negativas y levaduras (Bazzaz *et al.*, 2011a).

Extractos metanólicos de las partes flor/fruto y raíz, de *S. elliptica*, presento actividad contra una cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 resistente a oxacilina, resultando tres de estos extractos activos con valores de MIC de 500 µg/mL y uno de ellos de 250 µg/mL (Perez 2010).

En lo que respecta, *S. barbata*, flavonoides como la apigenina y luteolina mostraron actividad antibacteriana contra MRSA, con unas CIM de 3,9 a 15,6 y 62,5 a 125 g/ml, respectivamente. Además, la flavona total de *S. barbata* puede

mejorar la membrana celular de las células huésped y evitar infección por virus de parainfluenza tipo 1 (PIV-1) (ShanShan *et al.*, 2009).

Un estudio realizado en *S. albida* mostró efectos altamente tóxicos del linalool, un químico aislado de la planta, contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Excepto para *E. coli*, las otras 3 bacterias demostraron ser más sensibles a linalool que a la estreptomina. Además de su actividad antibacteriana, estudios de han mostrado actividad frente a hongos patógenos de plantas (Tan and Vanitha, 2004). Además, a partir del análisis de la actividad del aceite esencial de las partes aéreas frente a cuatro bacterias y dos levaduras se encontró que fue moderadamente activo contra todos los microorganismos ensayados (Skaltsa *et al.*, 2000).

La actividad antibacteriana del aceite de *Scutellaria grossa* Wall exBenth, se determinó contra 10 cepas bacterianas mediante la medición de las zonas inhibitoras del crecimiento. El aceite mostró actividad antibacteriana significativa frente a bacterias Gram-positivas, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*, y el proceso de Gram-negativo, *K. pneumoniae* y *Salmonella enterica*. Una CIM de $31.25 \mu\text{L mL}^{-1}$ se observó contra *E. faecalis* (Pant *et al.*, 2012).

Las evidencias actuales apoyan la aplicación y el aprovechamiento para el desarrollo de nuevos estudios, como el propuesto en el presente informe. De esta manera se contribuirá con el conocimiento de la especie, dando un posible valor agregado y proporcionando a la comunidad académica y científica una visión más detallada al tener en cuenta que el género *Scutellaria* tiene propiedades medicinales. Adicionalmente, los resultados obtenidos se convertirán en un fundamento científico, el cual soportaría el uso tradicional de *S. incarnata* por las comunidades Paeces particularmente.

6. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad biológica del extracto etanólico total de la planta medicinal *S. incarnata* Vent.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar extracción etanólica total y el tamizaje fitoquímico de la planta medicinal *Scutellaria incarnata* Vent.
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico total de *Scutellaria incarnata* Vent. en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* como modelos biológicos procariotas.
- Evaluar la toxicidad del extracto de la planta mediante el ensayo de letalidad con *Artemia. Franciscana (salina)* como modelo biológico eucariota.

7. MARCO METODOLÓGICO

6.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La especie *S. incarnata* se colectó en el municipio de Cajibío, al norte de la capital del departamento del Cauca ($2^{\circ}38'01,17''N$ y $76^{\circ}38'00,32''W$), a una altura aproximada de 1706m.s.n.m y temperatura promedio de $19^{\circ}C$. Su clima predominante es frío.



Figura 2. A. y B. Lugar de muestreo y colecta del material vegetal. Sendero ecológico “Bosque natural los Higueros” Municipio de Cajibío, Depto del Cauca.

6.2 RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO PREVIO DE MATERIA PRIMA.

El muestreo se hizo por conveniencia, es decir, recolectando las hojas sanas de plantas en buen estado fisiológico, que no presentaron deterioro significativo, ya sea por hongos o insectos, en el momento de la colecta. Posteriormente se hace el lavado con agua destilada y secado del material vegetal en la incubadora a $35^{\circ}C$ en el laboratorio. Después de secar el material se tritura y se empaca en bolsas ziploc herméticas.

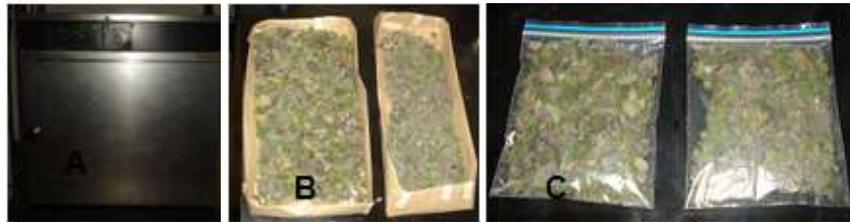


Figura 3.A.Incubadora B. Material aéreo de la planta C. Material vegetal seco en bolsas “ziploc” para evitar contaminación.

6.3 EXTRACCIÓN ETANÓLICA TOTAL

6.3.1 Extracción Soxhlet

El procedimiento de extracción se realizó en un equipo Soxhlet, figura 4A, tomando 20g de las hojas trituradas y secas de *S. incarnata*. Culminada la extracción se dejó enfriar el extracto etanólico total (ET) a temperatura ambiente y se filtró a través de un papel filtro Whatman, con el propósito de eliminar restos de sólidos procedentes del material vegetal. El ET se llevó a sequedad en un equipo rotaevaporador, figura 4B, se almacenó en un recipiente ámbar y se conservó en refrigeración a 4°C.

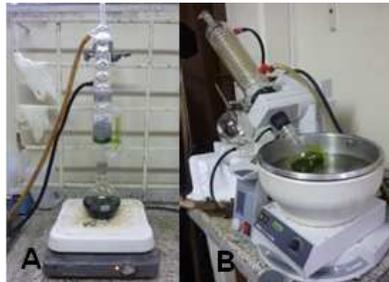


Figura 4. A. Sistema de extracción Soxhlet. B. Rotaevaporador. Montaje de rotaevaporación del ET de *S. incarnata*.

6.4 TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Las pruebas para la determinación de los metabolitos secundarios se realizaron siguiendo la metodología clásica, por reacciones en tubo y análisis de TLC, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Pruebas para identificar los núcleos de metabolitos secundarios presentes en el extracto total, según la literatura clásica.

METABOLITO	ENSAYO (Reacción en tubo y/o análisis por TLC)	METABOLITO	ENSAYO (Reacción en tubo y/o análisis por TLC)
ALCALOIDES	<ul style="list-style-type: none"> • Dragendorff* • Mayer • Wagner 	TANINOS	<ul style="list-style-type: none"> • Ensayo con cloruro férrico • Solución de gelatina • Solución de gelatina y sal • Solución salina
CARDIOTÓNICOS (Ensayo por TLC con revelador de SbCl ₃)	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de Baljet* • Reactivo de Kedde* • Reactivo de Raymond-Marthoud* • Reactivo de Keller-Kiliani • Reactivo de Liebermann-Burchard • Reactivo de Salkowski 	SAPONINAS	Formación de espuma y análisis por TLC con reactivo vainillina-ácido sulfúrico
CUMARINAS VOLÁTILES	<p>Volátiles en papel impregnado con NaOH (observación UV)</p> <p>TLC: Tolueno/Éter 1.1, saturado con ácido acético 10%</p>	TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES	<ul style="list-style-type: none"> • Liebermann-Burchard • Salkowski • TLC: benceno/acetato de etilo (86/14)
FLAVONOIDES	Ensayo con Mg y HCl Análisis por TLC	DERIVADOS ANTRACÉNICOS LIBRES	Reacción Bomtraeger TLC

*: Análisis por TLC

6.5 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

6.5.1 Tratamientos para bioensayos

Se determinaron las concentraciones para los tratamientos correspondientes a 10, 100 y 1000 ppm (partes por millón), tanto para la prueba de difusión en disco como para la prueba de toxicidad, y en el caso de la prueba de microdilución se utilizó un rango que incluyó las anteriores concentraciones, tomando 10 valores. En los tratamientos se empleó etanol al 96% como diluyente

6.5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

El procedimiento se realizó de acuerdo al Instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI), ante el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS) en la norma de métodos de dilución para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana para bacterias; Norma aprobada en el 2005. Las pruebas de la actividad antibacteriana se realizaron en el laboratorio unificado de la Facultad de ciencias de la salud, departamento de medicina interna de la Universidad del Cauca.

6.5.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO: pruebas de actividad antibacteriana (prueba de difusión en disco y prueba de microdilución).

La preparación del inóculo se realizó en el laboratorio de microbiología de la facultad de ciencias de la salud de la Universidad del Cauca, se preparó una suspensión de bacterias a partir de un cultivo de 24 horas de cepas bacterianas ATCC como controles para identificación rápida, concentración mínima de inhibidores en antibióticos y paneles de susceptibilidad de los mismos. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* 25923 (figura 5, A) de las cuales se tomó con un isópo estéril de 2 a 3 colonias y se transfirió a un tubo que contenía solución salina al 0.9%. Estas suspensiones bacterianas se ajustaron a una concentración de 0.5 McFarland (1×10^8 UFC/ml) utilizando el Densimat (figura 5, B



Figura 5. A. Especies *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 255923. B. Densimat ajustado al 0.5 McFarland.

6.5.2.2 PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

Con las suspensiones bacterianas ajustadas en la escala 0.5 McFarland, se procedió a realizar la siembra masiva de las bacterias en las cajas de Petri que contenían medio Müller Hinton para ambas bacterias. Se colocaron en cada caja de Petri sensidiscos de papel Whatman impregnados de las tres concentraciones (10, 100 y 1000 ppm) de tratamientos, un control positivo y antibiótico (Gentamicina) como control negativo, esto con un total de cinco tratamientos para cada bacteria por caja de Petri. Se hicieron 5 repeticiones por tratamiento. Posteriormente se incubaron a una temperatura de 37°C, por 24 horas, tiempo en el cual se realizó la primera medición de los halos de inhibición.

De acuerdo al diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano, según la NCCLS se categorizó la cepa utilizada, en este caso *E coli* y *S. aureus* en función de la sensibilidad frente al extracto etanólico total (ET) de *S. incarnata* Vent, cada una como cepa sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R).

Finalmente se calculó el porcentaje de inhibición relativo de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición relativa} = \frac{\text{D. halo del extracto} - \text{D. halo del control}(+)}{\text{D. halo del control}(-) - \text{D. halo del control}(+)} \times 100$$

Dónde: Diámetro del Control Positivo: Disco sin antibiótico.

Diámetro del Control Negativo (para ambas cepas): Gentamicina.

6.5.2.3 PRUEBA DE MICRODILUCIÓN: Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Con las suspensiones bacterianas ajustadas en la escala 0.5 McFarland, se procedió a extraer 250µl con una micropipeta y se depositaron en un tubo de cultivo que contenía 5ml agua destilada estéril con el fin de obtener una dilución 1:20, y se mantuvo en agitación constante para mantener la suspensión y así la concentración final de bacterias en cada pozo fue de $5 \cdot 10^5$ UFC/ml.

El procedimiento de microdilución se realizó en microplacas de ELISA de 96 pozos, primero se agregaron 100µL del medio de cultivo infusión cerebro corazón en todos los micropozos, luego al primer pozo se le adiciono 100µL del antibiótico gentamicina, y a continuación se adiciono al segundo pozo 100µL del tratamiento con la mayor concentración del extracto la cual fue de 2048 ppm, quedando una concentración final de 1024 ppm, de este pozo se tomaron 100µL que se depositaron en el siguiente pozo, y se continuo así hasta el onceavo pozo del cual se tomaron 100µL y se descartaron realizando de esta manera diluciones 1:2 en cada pozo. Finalmente el pozo número 12 se empleó como control positivo conteniendo medio de cultivo y agua destilada estéril.

Cada pozo tenía un volumen final de 100µL. Las concentraciones del extracto (tratamiento) estuvieron dentro de un rango de 1000 y 10 ppm. Por último se inoculan 10µL de la suspensión bacteriana en cada pozo (Ver figura 6, B.). Se hicieron 5 repeticiones para cada tratamiento. Finalmente, para evitar la deshidratación del contenido de cada uno de los pozos se sellaron con papel "vinipel" garantizando un buen cierre. Seguido a esto las microplacas de ELISA se incubaron a 37°C por 24 horas.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM). Se realizó la lectura a 620 nanómetros (nm) en el lector ELISA RaitoMicroplate Reader RT-2100C (Ver figura 6, A.), que es una medida de absorbancia cuyas unidades son densidades ópticas (DO).

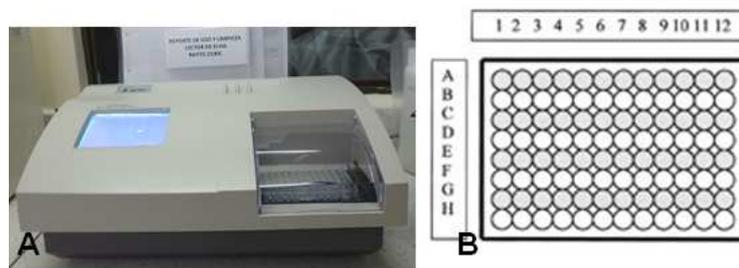


Figura 6.A. ELISA RaitoMicroplate Reader RT-2100C. **B.** Micropozo (letras mayúsculas indican repeticiones, y números indican los tratamientos)

6.5.3 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE *Artemia franciscana*.

Se colocaron a eclosionar huevos de *A. franciscana* (guardados previamente en el refrigerador), en medio de agua de mar artificial (20 gramos de sal marina en 50mL de agua), con oxigenación y luz artificial constante a temperatura ambiente por 48 horas. Ver Figura 7A.

Una vez verificado la eclosión de los huevos, se procedió a preparar los tratamientos correspondientes a 1000, 500, 100, 50, 10 ppm del extracto y agua de mar artificial como blanco. A continuación, se depositaron 10 mL de cada tratamiento en 5 viales de vidrio y se agregaron aproximadamente 30 larvas de *A. franciscana* en cada Vial. Se hicieron 5 repeticiones para cada tratamiento como se observa en la figura 7B. Al cabo de 24 horas se procedió a hacer la lectura de mortalidad en cada uno de los viales.

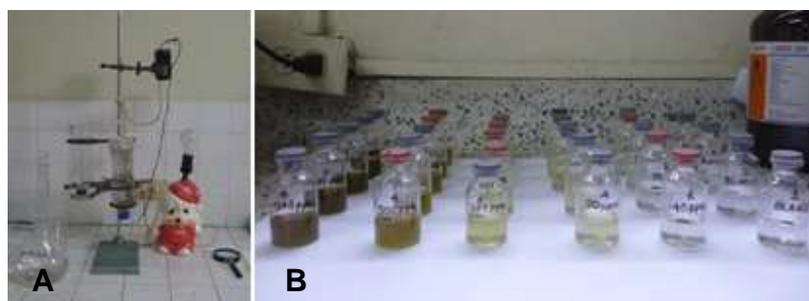


Figura 7. A. Montaje para sistema de eclosión de huevos. B. Tratamientos

6.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó el análisis cualitativo tanto del tamizaje fitoquímico como de la extracción etanólica total de la planta medicinal *S. incarnata* Vent.

Para el análisis estadístico se utilizó el Software SPSS.15. Se efectuó una estadística descriptiva de los datos. A continuación se realizó un análisis inferencial de acuerdo a la distribución de los datos, así:

Los datos de halo de inhibición, absorbancia, índice de mortalidad, se sometieron a pruebas de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk y prueba de Kolgomorov-Smirnoff), Homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene).

En la prueba de difusión en disco, las variables halo de inhibición y concentración de extracto etanólico se compararon mediante pruebas no paramétricas (Kruskall Wallis y U-Mann-Whitney). Para hallar la asociación entre estas dos variables se empleó la prueba de Spearman y complementada con un análisis de regresión de ajuste lineal.

En la prueba de microdilución, los datos de absorbancia y concentración de extracto etanólico se compararon mediante pruebas paramétricas (ANOVA y prueba de T3 Dunnett). Para identificar la asociación de las variables se utilizó la prueba de Pearson y complementada con un análisis de regresión de ajuste lineal.

En el ensayo de toxicidad, los datos de índice de mortalidad y concentración del extracto etanólico total (ET) se compararon mediante pruebas paramétricas (ANOVA y prueba de T3 Dunnett). Para identificar la asociación de las variables se utilizó la prueba de Pearson y complementada con un análisis de regresión de ajuste lineal.

El análisis de los datos se realizó con un intervalo de confianza del 95% o probabilidad de error de 5% ($p \leq 0.05$)

8. RESULTADOS

8.1EXTRACCIÓN ETANÓLICA TOTAL

Se realizó la extracción etanólica total por un tiempo de 24 horas, en la cual se obtuvo aproximadamente 250 mL de extracto y después de haberlo sometido a secado en el rota evaporador se adquirió un peso total seco de 1.26 g de ET.



Figura 8. Extracto etanólico total (ET).

8.2TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total (ET) de la parte aérea de la planta de *S. incarnata*.

Grupo de compuestos	Extracto etanólico total
Alcaloides	(-)
Cardiotónicos	(+)
Cumarinas Volátiles	(+)
Flavonoides	(+)
Taninos	(+)
Saponinas	(+)
Triterpenos y/o Esteroides	(+)
Derivados Antrasénicos Libres	(-)

*Prueba positiva (+)

Prueba negativa (-)

Tabla 3. Resultados de tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total (ET) de la planta *S. incarnata*.

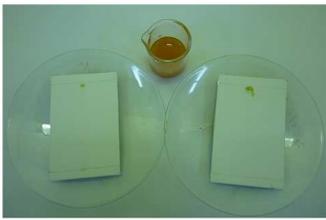
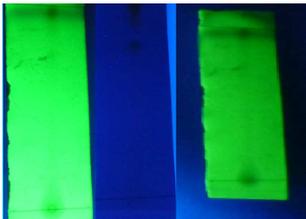
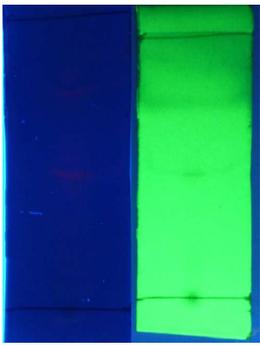
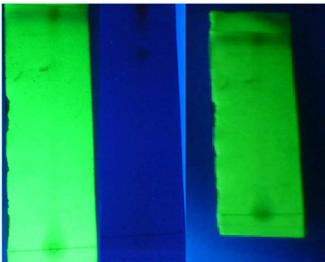
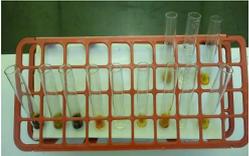
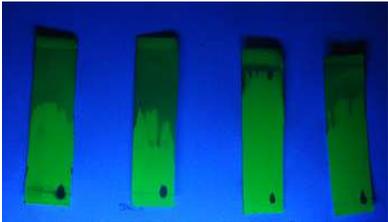
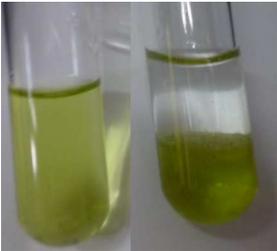
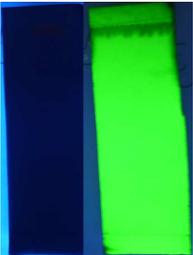
Grupo de constituyente químico	TAMIZAJE FITOQUÍMICO		Resultado
	Reacción en tubo	Análisis por TLC (Cromatografía de capa delgada) y cromatogramas en luz UV 264 nm y 365 nm.	
Alcaloides			Negativo (-)
Flavonoides			Positivo (+)
Cumarinas			Positivo (+)
Taninos		No Aplica.	Positivo (+)

Tabla 3. Continuación.

Grupo de constituyente químico	TAMIZAJE FITOQUÍMICO		Resultado
	Reacción en tubo	Análisis por TLC (Cromatografía de capa delgada) y cromatogramas en luz UV 264 nm y/o 365 nm.	
Saponinas			Positivo (+)
Triterpenos y/o Esteroides			Positivo (+)
Cardiotónicos			Positivo (+)
Derivados antrasénicos			Negativo (-)

*Prueba positiva (+)
Prueba negativa (-)

A partir de la metodología clásica empleando ET seco de *S. incarnata*, se obtuvieron de manera cualitativa resultados de la mayoría de grupos de constituyentes químicos presentes en la planta, tales como los que se muestran en la tabla 2 y tabla 3.

8.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

8.3.1 PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO

En el desarrollo de la prueba de difusión en disco para las dos bacterias *S. aureus* y *E. coli* se obtuvieron resultados de halo de inhibición semejantes de cada bacteria que difieren de manera poco representativa entre las mismas (figura 14). Así, se obtuvo de acuerdo al NCLCS que las bacterias son resistentes (R), en función a la sensibilidad frente a las concentraciones empleadas del extracto etanólico total (ET), comparado con el antibiótico utilizado Gentamicina.

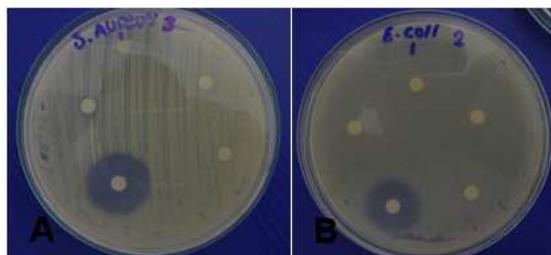


Figura 9. Halos de inhibición. A. *S. aureus*. B. *E. coli*.

Tabla 4. Porcentaje de inhibición relativa (%) de las bacterias *S. aureus* y *E. coli*.

Concentraciones del ET (ppm)					
1000	100	10	1000	100	10
<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
Porcentaje de inhibición relativa (PIR)					
29.41	27.73	25.21	30.39	28.43	28.43

En la tabla 4 se observa el porcentaje de inhibición relativa respecto a la inhibición del antibiótico Gentamicina para ambas bacterias.

Tabla 5. Tamaño en milímetros (mm) de los halos de inhibición de la bacteria *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>															
Tratamientos	1000 ppm			100 ppm			10 ppm			Control Positivo			Control negativo		
Tiempo (horas)	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Medida del halo de inhibición (mm)															
Repetición 1	7	7	7	6	6	6	6	6	6	0	0	0	22	22	22
Repetición 2	7	7	7	6	6	6	6	6	6	0	0	0	20	20	20
Repetición 3	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	0	20	20	20
Repetición 4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	0	0	0	21	21	21
Repetición 5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	19	19	19

Tabla 6. Tamaño en milímetros (mm) de los halos de inhibición de la bacteria *S. aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>															
Tratamientos	1000 ppm			100 ppm			10 ppm			Control positivo			Control negativo		
Tiempo (horas)	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Medida del halo de inhibición (mm)															
Repetición 1	7	7	7	6	6	6	6	6	6	0	0	0	25	25	25
Repetición 2	7	7	7	6	6	6	6	6	6	0	0	0	24	24	24
Repetición 3	7	7	7	7	7	7	6	6	6	0	0	0	23	23	23
Repetición 4	7	7	7	7	7	7	6	6	6	0	0	0	24	24	24
Repetición 5	7	7	7	7	7	7	6	6	6	0	0	0	23	23	23

Las tablas 5 y 6 muestran el diámetro de los halos de inhibición de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* respectivamente, registrados en cada uno de los tratamientos con el ET y sus respectivas repeticiones en diferentes tiempos.

Tabla 7. Halo de inhibición de crecimiento de la bacteria *E. coli* para los diferentes tratamientos del ET.

Concentración ET(ppm)	Halo de inhibición de crecimiento
	Diámetro mm
	Media ± D.E
Control negativo	20,40 ± 0,14
1000	6,20 ± 0,83 ^a
100	5,80 ± 0,44 ^a
10	5,80 ± 0,44 ^a
Control positivo	0,00 ± 0,00

D.E: Desviación estándar; mm: milímetros; ppm: partes por millón; ET: extracto etanólico total
^ap < 0,05, prueba de U Mann-Whitney, comparado con el control positivo y control negativo

Las concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm utilizadas en la prueba de difusión en disco para la bacteria *E. coli* fueron estadísticamente significativas (p < 0,05) con respecto a los controles, tanto positivo como negativo señalados en la tabla 7.

Tabla 8. Halo de inhibición de crecimiento de la bacteria *S. aureus* para los diferentes tratamientos del ET.

Concentración ET(ppm)	Halo de inhibición de crecimiento	
	Diámetro mm	
	Media ± D.E	
Control negativo	23,80 ± 0,83	
1000	7,00 ± 0,00 ^a	
100	6,60 ± 0,54 ^a	
10	6,00 ± 0,00 ^{ab}	
Control positivo	0,00 ± 0,00	

D.E: Desviación estándar; mm: milímetros; ppm: partes por millón; ET: extracto etanólico total

^ap < 0,05, prueba de U Mann-Whitney, comparado con el control positivo y control negativo

^bp < 0,05, prueba de U Mann-Whitney, comparado con 1000 y 100 ppm.

La tabla 8 presenta el análisis estadístico de los datos del halo de inhibición de crecimiento de la *S. aureus*. Se observa que a la concentración de 10 ppm hay un diámetro del halo significativamente menor en comparación con las concentraciones 1000 y 100 ppm. Asimismo, los halos de inhibición de las concentraciones del ET utilizadas difieren significativamente de los controles negativo y positivo.

Tabla 9. Halo de inhibición de crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* en las concentraciones del ET.

Concentración ET (ppm)	Halo de inhibición de crecimiento (diámetro mm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	ρ^a
	Media ± D.E	Media ± D.E	
Control negativo	20,40 ± 0,14	23,80 ± 0,83	0,008*
1000	6,20 ± 0,83	7,00 ± 0,00	0,053
100	5,80 ± 0,44	6,60 ± 0,54	0,042*
10	5,80 ± 0,44	6,00 ± 0,00	0,317
Control positivo	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,000

D.E: Desviación estándar

^aPrueba estadística de Kruskal – Wallis

* Prueba de U. Mann – Whitney

En la tabla 9, se presentan los resultados de la prueba difusión en disco de las bacterias objeto de estudio. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el halo de inhibición de crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* en los tratamientos 100ppm ($p < 0,05$, $5,80 \pm 0,44$ y $6,60 \pm 0,54$, respectivamente) y control negativo ($p < 0,05$, $20,40 \pm 1,14$ y $23,80 \pm 0,83$)

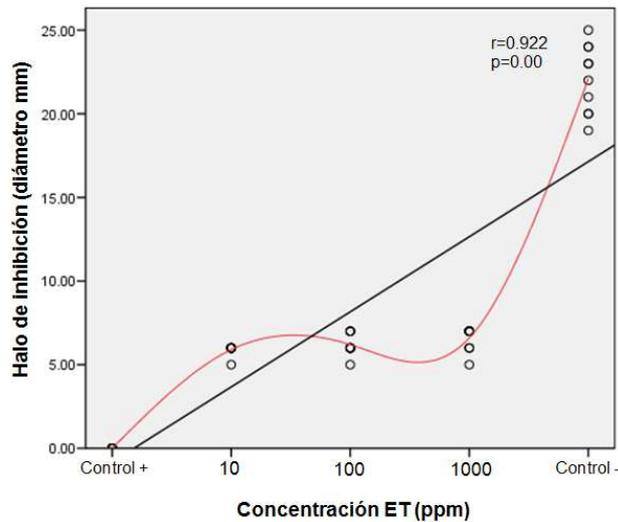


Figura 10. Asociación del halo de inhibición de crecimiento con la concentración del extracto ET.

La curva de regresión lineal muestra la asociación positiva significativa de la concentración del ET y el halo de inhibición de crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. Se observa que la concentración del ET afecta en un 92% el halo de inhibición de crecimiento de dichas bacterias.

8.3.2 PRUEBA DE MICRODILUCIÓN: Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

La prueba de microdilución arrojó resultados de absorbancia o turbidez que fue registrada y promediada por el lector ELISA a una longitud de onda de 260 nm para cada bacteria y sus correspondientes repeticiones.

Tabla 10. Resultados del lector ELISA para la bacteria *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>												
	C-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+
A	0.001	0.031	0.151	0.151	0.148	0.169	0.196	0.121	0.250	0.152	0.245	*
B	0.002	0.091	0.161	0.111	0.134	0.220	0.257	0.268	0.249	0.169	0.209	*
C	0.004	0.109	0.152	0.164	0.164	0.097	0.248	0.209	0.102	0.218	0.213	*
D	0.002	0.080	0.141	0.174	0.151	0.228	0.177	0.290	0.166	0.223	0.279	*
E	0.004	0.081	0.145	0.168	0.127	0.220	0.232	0.309	0.209	0.292	0.320	*

*valores mayores a 3500(mayor grado de turbidez o concentración).

C+: Control Positivo. C-: Control negativo.

Tabla 11. Resultados del lector ELISA para la bacteria *S. aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>												
	C-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	C+
A	0.005	0.070	0.118	0.131	0.126	0.256	0.244	0.328	0.240	0.293	0.326	*
B	0.009	0.082	0.184	0.127	0.224	0.284	0.294	0.295	0.289	0.313	0.359	*
C	0.008	0.114	0.178	0.148	0.207	0.312	0.257	0.238	0.295	0.278	0.314	*
D	0.013	0.106	0.131	0.156	0.230	0.271	0.293	0.329	0.316	0.316	0.358	*
E	0.009	0.086	0.198	0.178	0.228	0.287	0.318	0.302	0.332	0.302	0.294	*

*valores mayores a 3500(mayor grado de turbidez o concentración).

C+: Control Positivo. C-: Control negativo.

Las tablas 10 y 11 indican los valores de absorbancia de las bacterias *E.coli* y *S. aureus* respectivamente, registrados después de 24 horas, en cada uno de los tratamientos con el extracto ET y las repeticiones correspondientes.

Se obtuvieron valores muy pequeños de longitud de onda, en los tratamientos 1 y 2(1024 y 512 ppm) con respecto a los demás tratamientos.

Teniendo en cuenta que las concentraciones más altas fueron visiblemente similares comparadas con el control negativo, se procedió a hacer una resiembra en cuatro cajas de Petri con medio Mueller Hinton de los tratamientos 1 y 2, para cada bacteria. Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas y se observó que para el caso de *S. aureus*, no hubo crecimiento bacteriano para la concentración de 1024 ppm por lo que se estableció esta como la CMI y para *E. coli*, debido a que se evidencio crecimiento inclusive a la máxima concentración se estima que la CMI es mayor a la utilizada en la prueba y que corresponde a 1024 ppm.



Figura 11. Resiembra de los tratamientos empleados en microdilución.
A. *S. aureus*. B. *E. coli*.

Tabla 12. Absorbancia (nm) de los diferentes tratamientos del ET para la bacteria *E. coli*.

Concentración ET(ppm)	Absorbancia (nm)
	Media \pm D.E
Control negativo	0,00 \pm 0,00
1024	0,07 \pm 0,02
512	0,15 \pm 0,01
256	0,15 \pm 0,02
128	0,14 \pm 0,01
64	0,18 \pm 0,05
32	0,22 \pm 0,03 ^a
16	0,23 \pm 0,07
8	0,19 \pm 0,06
4	0,21 \pm 0,05
2	0,25 \pm 0,04 ^a
Control positivo	3,5 \pm 0,00 ^{ab}

D.E: Desviación estándar; nm: nanómetros; ppm: partes por millón; ET: extracto etanólico total

^ap < 0,05, prueba de T3 Dunnet, comparado con la concentración 2048 ppm

^bp < 0,05, prueba de T3 Dunnet, comparado con la concentración 1024 ppm

La tabla 12 indica el análisis estadístico de las absorbancias (nm) en cada una de las concentraciones del ET, en las cuales se registran diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar el tratamiento de 1024 ppm con 32, 2 ppm y control positivo, de igual manera, al comparar el tratamiento de 512 ppm con el control positivo. Los tratamientos no difieren significativamente del control negativo.

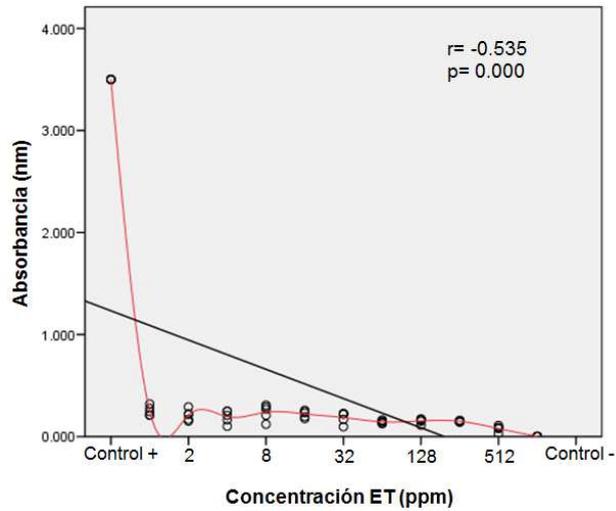


Figura 12. Asociación de la absorbancia (nm) con la concentración del ET de la bacteria *E. coli*.

En la gráfica se muestra la asociación negativa significativa de la Concentración del ET y la absorbancia (nm) de la bacteria *E. coli*. Se observa que la concentración del ET afecta en un 53% la absorbancia de *E. coli*.

Tabla 13. Absorbancia (nm) de los diferentes tratamientos del ET para *S. aureus*.

Concentración ET(ppm)	Absorbancia (nm)
	Media \pm D.E
Control negativo	0,00 \pm 0,00
1024	0,09 \pm 0,00 ^a
512	0,16 \pm 0,15 ^a
256	0,14 \pm 0,01 ^a
128	0,20 \pm 0,01
64	0,28 \pm 0,01
32	0,28 \pm 0,01
16	0,29 \pm 0,01
8	0,29 \pm 0,01
4	0,30 \pm 0,00
2	0,33 \pm 0,01
Control positivo	2,10 \pm 0,85

D.E: Desviación estándar; nm: nanómetros; ppm: partes por millón; ET: extracto etanólico total
^ap < 0,05, prueba de T3 Dunnet, comparado con las demás concentraciones del ET (tratamientos)

La tabla 13 muestra las absorbancias (nm) en cada una de las concentraciones del ET, en las cuales se registran diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar los tratamientos de 1024, 512 y 256 ppm con las concentraciones de 64, 32, 16, 8, 4 y 2 ppm correspondientes. Los tratamientos no difieren significativamente del control negativo.

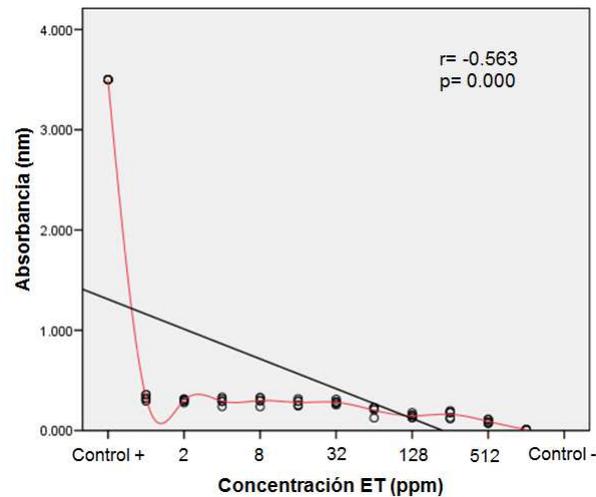


Figura 13. Asociación de la absorbancia (nm) con la concentración del ET de la bacteria *S. aureus*.

En la gráfica de curva de regresión lineal, se muestra la asociación negativa significativa de la Concentración del ET de la planta y la absorbancia (nm) de la bacteria *S. aureus*. Se observa que la concentración del ET afecta en un 56% la absorbancia de *S. aureus*.

Tabla 14. Absorbancia (nm) de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* en las concentraciones del ET.

Concentración ET (ppm)	Absorbancia (nm)		ρ^a
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Media \pm D.E	Media \pm D.E	
Control negativo	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	
1024	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	
512	0,15 \pm 0,01	0,16 \pm 0,03	
256	0,15 \pm 0,02	0,14 \pm 0,02	
128	0,14 \pm 0,01	0,20 \pm 0,04	
64	0,19 \pm 0,05	0,28 \pm 0,02	p>0,05
32	0,22 \pm 0,03	0,28 \pm 0,03	
16	0,24 \pm 0,08	0,30 \pm 0,04	
8	0,19 \pm 0,06	0,29 \pm 0,03	
4	0,21 \pm 0,05	0,30 \pm 0,01	
2	0,25 \pm 0,05	0,33 \pm 0,03	
Control positivo	3,50 \pm 0,00	2,10 \pm 1,91	

^ap>0,05 prueba estadística T3 Dunnet.

La tabla 14 registra la absorbancia (nm) de *E. coli* y *S. aureus*, con respecto a las concentraciones del ET, mostrando que no hay diferencia significativa (p>0,05) cuando se comparan los resultados obtenidos de Absorbancia (nm) para cada uno de los tratamientos entre las dos cepas bacterianas utilizadas.

8.4 EVALUACIÓN DE TOXICIDAD MEDIANTE EL ENSAYO DE *Artemia franciscana*.



Figura 14. Larva de crustáceo *Artemia franciscana* (salina).

Tabla 15. Natalidad y mortalidad de las larvas del crustáceo, *Artemia franciscana*.

<i>Artemia franciscana</i>												
Tratamientos	1000ppm		500ppm		100ppm		50ppm		10ppm		Blanco	
Natalidad/ Mortalidad	Ind. Vivos	Ind. Muertos										
Total de individuos por prueba. 30 Larvas de <i>A. franciscana</i> (n=30)												
Repetición												
1	0	30	0	30	0	30	5	25	5	25	30	0
2	0	30	0	30	0	30	5	25	8	22	30	0
3	0	30	0	30	0	30	1	29	12	18	30	0
4	0	30	0	30	0	30	6	24	8	22	30	0
5	0	30	0	30	0	30	2	28	12	18	30	0

Ind: Individuos; ppm: parte por millón.

En la tabla 15 se registran los resultados de la natalidad y mortalidad de *A. franciscana* en relación con las concentraciones del extracto etanólico total (ET), con respecto al número total de individuos. Se pudo observar que los tratamientos letales fueron las concentraciones más altas (1000, 500 y 100 ppm) y que la LC₅₀ es menor a 10ppm.

Tabla 16. Mortalidad de *A. Franciscana* (*salina*) (# individuos).

Concentración del ET (ppm)	Mortalidad de <i>A. franciscana</i> (# individuos)
	Media ± D.E
Blanco	0,00 ± 0,00
1000	30,0 ± 0,00 ^a
500	30,0 ± 0,00 ^a
100	30,0 ± 0,00 ^a
50	26,2 ± 2,16
10	21,0 ± 3,00

^{*} ppm: partes por millón; D.E: desviación estándar; #: número.

^ap<0,05 prueba estadística T3 Dunnet

La tabla 16 indica el número de individuos muertos en relación a las diferentes concentraciones del ET, en donde hay diferencia significativa de las tres mayores tratamientos (1000, 500 y 100 ppm) al comparar los valores con el blanco empleado en la prueba, es decir que en dichas concentraciones hubo una mortalidad del 100% de los individuos en sus correspondientes repeticiones.

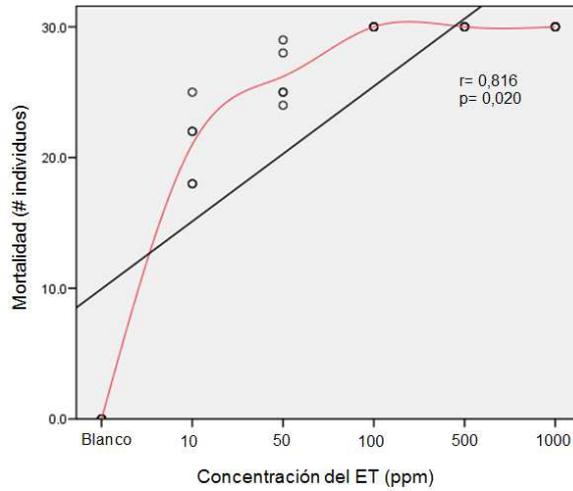


Figura 15. Asociación del índice de mortalidad (# individuos muertos) con la concentración del ET.

La curva de regresión lineal muestra la asociación positiva significativa de la Concentración del ET y la mortalidad de individuos de *A. franciscana (salina)*. Se observa que la concentración del ET afecta en un 81% la variable mortalidad.

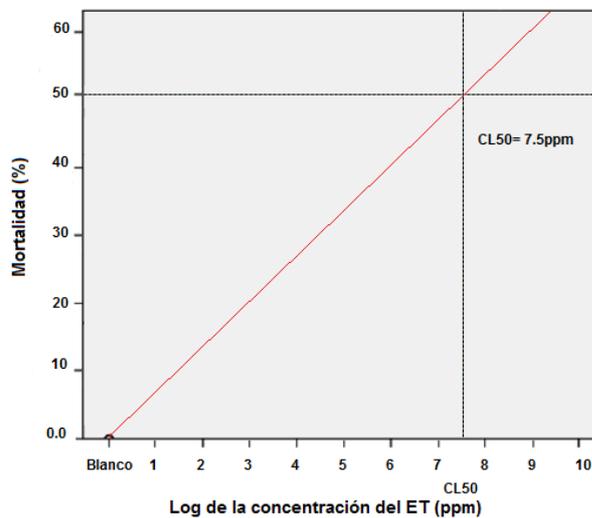


Figura 16. Concentración letal 50 (CL50) del ET.de *S.incarnata* en relacion al porcentaje de mortalidad de *A. franciscana*.

9. DISCUSIÓN

Dado que las plantas son una fuente importante de medicinas y desempeñan un papel clave en el mundo de la salud (Constabel, 1990), se debe esclarecer, que la mayor parte de las plantas medicinales son plantas silvestres, como es el caso de la especie *S. incarnata*, cuya propagación tiene un cierto grado de dificultad, debido a que se localizan en suelo de bosques, que brindan en cierto modo probabilidades de expansión de la misma, pero que al mismo tiempo las hace dependientes del bosque para su correcto desarrollo. La disminución de bosques en gran medida es debido a factores medioambientales y antrópicos que exponen a cierto grado de peligro de extinción a las plantas que se dan en este tipo de hábitats o microclimas, como es el caso de *Scutellaria*, un género perenne, herbáceo de la familia Lamiaceae (Paton, 1990; Cole *et al*, 2007), en el cual la especie *S. incarnata*, forma parte.

Lo anterior suscita un proceso de prevención para evitar la vulnerabilidad de este género, al resaltar que sus especies y en particular la especie *S. incarnata*, es fuente de numerosos beneficios de acuerdo a los usos como planta medicinal dados por la comunidad Paéz.

De manera desafortunada la generalidad que se emplea, es que la única forma de adquirir discernimiento legítimo es la ciencia, y se tiene la tendencia a descalificar otro tipo de vías para obtener dicho conocimiento, como por ejemplo las cosmovisiones de las comunidades locales, en este caso en mención, la cultura Paéz, que cuenta con un amplio espectro de información acerca del uso y manejo de ciertas plantas con propiedades medicinales, que han sido corroboradas en ciertos casos por trabajos de experimentación y actividad científica, en lo que se confirma dicha inquisición derivada en un manejo eficiente de la naturaleza.

La gran diversidad de plantas correspondidas con la heterogeneidad de los grupos humanos, se debe fortalecer y al mismo tiempo promover su arraigo cultural, en el cual se complementan para alivianar enfermedades o buscar las posibles curas a dichas dolencias.

Es así, como se debe relacionar la etnobotánica de un área, debido a su importancia cultural y al estudio acreditable de la ciencia, lo que resulta en un fuerte método para obtener un conocimiento íntegro acerca de un uso sostenible de la planta, de esta manera se discute con la comunidad Paéz acerca de los usos de *S. incarnata*, por su actividad antidepresiva, asimismo, utilizan esta planta para realizar infusiones, que alivian ciertas dolencias del grupo indígena. Además, a partir de fuentes de información no confirmadas se tiene que esta planta igualmente posee beneficios como sedantes, neurotónicos, antiestrés, antidepresivos, antipsicóticos y descongestionantes del sistema nervioso.

La anterior información se corroboró en el presente trabajo, el cual indica de manera general los principales grupos de constituyentes químicos de *S. incarnata*, gracias a la metodología clásica del tamizaje fitoquímico, de igual manera, se realizaron pruebas biológicas para confirmar posibles propiedades farmacológicas.

En lo que respecta al extracto etanólico total (ET) de *S. incarnata*, se obtuvo un rendimiento del 0,81% el cual representa el peso obtenido en seco de 1,26 g. El ET de *S. incarnata* mostró tener una muy buena solubilidad en solventes polares como DMSO (Dimetilsulfóxido) y etanol, lo que hace inferir presencia de sustancias de mediana y alta polaridad.

El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico total, reporta grupos de componentes químicos como: cardiotónicos, cumarinas volátiles, flavonoides, taninos, saponinas y triterpenos y/o esteroides como se observa en la tabla 2 y tabla 3, mediante reacciones en tubo y comprobando el resultado de la prueba, mediante análisis en cromatografía de capa delgada (TCL) utilizando como adsorbente gel de sílica 60 F254 (cromatofolios) y como fase móvil, las diferentes soluciones para cada prueba de identificación; observados los cromatogramas en luz UV de 254 y 365 nm, según la reacción para cada metabolito.

Los cardiotónicos son sustancias que producen mejoría del trabajo cardíaco con menor consumo de oxígeno y el mismo gasto de energía, haciendo que el corazón insuficiente recupere la fuerza de contracción, o inotropismo positivo, y la eficiencia mecánica. Entonces, según lo anterior los glucósidos cardiotónicos

ejercen su acción farmacológica a través de tres períodos o etapas progresivas: disminuyendo la frecuencia cardiaca y aumentando la fuerza de contracción sistólica; desarrollando una exagerada actividad vagal con alteración de la conducción; y, en tercer lugar, aumentando importantemente la excitabilidad del corazón con escape de la acción vagal y producción de arritmias graves a dosis progresivamente altas (Bernardo, 1984.)

Estos glucósidos que se encuentran en diversas plantas potencian la fuerza de contracción del corazón (ver figura 16) (Tamargo, 1971).

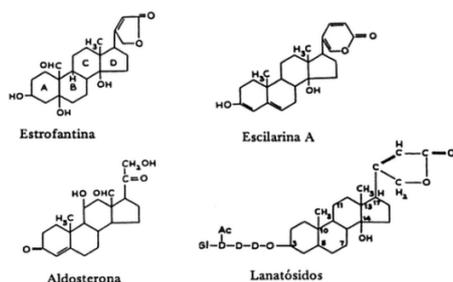


Figura 17. Glucósidos o cardiotónicos provenientes del reino vegetal (Defillo M Bernardo A.).

No se han reportado en el género *Scutellaria*, sin embargo en nuestro estudio se confirmó su presencia, a partir de la reacción en tubo, con el reactivo de Baljet evidenciándose una coloración naranja; con el reactivo de Raymond-Marthoud formación leve rojiza y con el reactivo de Lieberman-Burchard se evidenció un color rojo oscuro-verde. Mediante el análisis por TLC con los sistemas de solventes cromatográficos correspondientes se confirmó la presencia de cardiotónicos a luz UV de 365 nm lo que indica un posible factor farmacológico de la planta (ver tabla 3).

Ahora bien, los flavonoides son compuestos generalmente amarillos, que se encuentran en los jugos celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas, en forma de glucósidos de diversos azúcares (glucosa, galactosa, ramnosa o una pentosa) y cuyo aglucones son derivados del grupo del núcleo fundamental de la fenilbenzopirona (ver figura 17). Estos compuestos son metabolitos secundarios

de las plantas, cuyo papel fisiológico en ellas, no se conoce bien. Muchos de ellos se han utilizado como colorantes naturales, otros tienen caracteres vitamínicos y múltiples actividades terapéuticas. Hay cuatro tipos fundamentales de flavonoides, que derivan de los cuatro núcleos siguientes: flavona, isoflavona, flavonol y flavanona (Yufer, 2007)

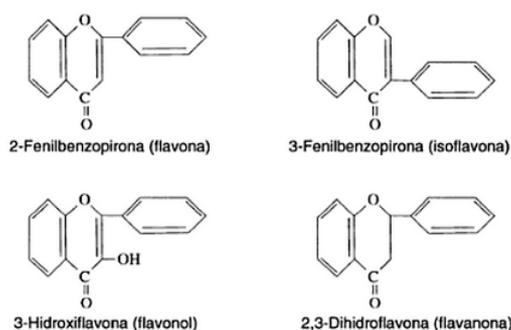


Figura 18. Tipos fundamentales de flavonoides, que derivan de los cuatro núcleos siguientes: flavona, isoflavona, flavonol y flavanona (Primo Yúfera Eduardo)

Los compuestos fenólicos de las especies pertenecientes al género *Scutellaria* incluyen glicósidos, fenilpropanoides, chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas, biflavonas y lignoflavonas (Malikov and Yuldashev, 2002).

A partir de la reacción en tubo del extracto etanólico total seco (ET) se observó un cambio de coloración de verde a marrón, lo que confirma presencia de flavonoides, además por TLC a UV de 254nm se observó fluorescencias azules sobre un fondo amarillo y a 365nm fluorescencia azul verdosa. Con revelado químico a partir del reactivo citrobórico se observó pequeñas bandas azules a UV de 365nm (ver tabla 3).

Teniendo en cuenta la presencia de flavonoides en *S. incarnata* se alude una posible acción antitumoral, hepatoprotectora, antioxidante, anti-inflamatoria, anti-mutagénica, neuroprotectora y ansiolítica, acciones que han sido confirmadas en *S. baicalensis*, *S. barbata* y *S. laterifolia* (Shang *et al.*, 2010a). Además se presume una acción antimicrobiana, ratificada en *S. barbata* (ShanShan *et al.*, 2009) y antifúngica, confirmada en *S. baicalensis* (Zhou *et al.*, 1997). Asimismo, respuestas analgésicas a las señales de dolor, producto de los flavonoides presentes en el extracto acuoso de *S. agrestis* (Barroncas de oliveira, 2011).

En *S. baicalensis* más de 60 flavonoides han sido identificados a partir de diferentes fuentes. Los componentes flavonoides principales que contribuyen a la bioactividad han sido reportados como: baicalina, baicaleína, wogonina, wogonoside, apigenina y crisina (Boyle *et al.*, 2011).

Según (González, 2005), las evidencias actuales sugieren que en las alegrías colombianas hay flavonas similares a la baicaleína, baicalina y wogonina de la *S. baicalensis*. La ventaja de las especies colombianas frente a la *S. baicalensis* está en que en nuestras especies los efectos farmacológicos se logran con hojas y flores, mientras que en ella la parte medicinal usada es la raíz, lo que supone una pronta declinación de las reservas silvestres y cultivadas, pues el tiempo requerido de crecimiento antes de la cosecha supera los tres años.

Entre tanto, las cumarinas son productos naturales pertenecientes a compuestos derivados de la benzo- α -pirona (ver figura 18)(López-Brea and Domingo, 2003). En los seres humanos el principal metabolito tipo cumarina es la 7-hidroxycumarina (7-HC), que se encuentra en el plasma como el glucorónido principal. Esta cumarina y otros compuestos relacionados presentan actividades biológicas de importancia terapéutica, entre las cuales se destaca su capacidad para reducir el tamaño de tumores, por lo que se usa en fármacos anticáncer(Reija Otero, 2007)

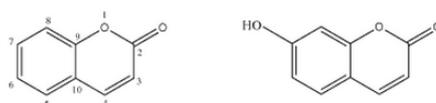


Figura 19. Estructura de la cumarina y de su derivado 7-CH (Reija Otero, 2007)

En el género *Scutellaria* las cumarinas se han podido encontrar en especies como *S. havanensis* Jacq(Marrero Delange *et al.*, 2012) y *S. lateriflora*, en la cual cumple una función neuroprotectora, citotóxica y activadora de la proteína quinasa C (Li *et al.*, 2009). En *S. incarnata* a partir de la reacción en tubo se confirmó la presencia de cumarinas evidenciado por fluorescencia cereza a 254nm y azul-verdosa a 365nm. A partir de la reacción por TLC sin tratamiento químico, a UV de 365nm se observó fluorescencia azul intensa, lo cual se confirmó posteriormente con tratamiento químico a partir del reactivo KOH (ver tabla 3). La presencia de

cumarinas en *S. incarnata* alude una posible acción antiinflamatoria, antitrombótica, vasodilatadora y antiviral (López-Brea and Domingo, 2003).

Los taninos constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados en función de que puedan ser o no hidrolizados (ver figura 27). Presentes en extractos vegetales y son capaces de combinarse con proteínas de la piel animal evitando su putrefacción (López-Brea and Domingo, 2003). En el género *Scutellaria* se han podido encontrar taninos en especies como *S. havanensis* Jacq(Marrero Delange *et al.*, 2012), en la raíz de *S. baicalensis* (Fu *et al.*, 2008), *S. lateriflora*(Felter and Lloyd, 1898),y *S. agrestis*(Oliveira, Mendonça, and Meira, 2013), sin embargo no se han reportado estudios de su actividad farmacológica.

A partir de la reacción en tubo se confirmó la presencia de taninos condensados debido a la coloración verde expuesta. Este resultado fue corroborado a partir de la solución gelatina y gelatina/sal donde la aparición de precipitado fue evidenciada (ver tabla 3). La presencia de taninos en *S. incarnata* sugiere una acción biológica representada en posibles propiedades astringentes (cicatrizante, antiinflamatorio y antihemorrágico), vasoconstrictoras, antidiarreicas, antisépticas (por vía interna), hemostáticas, antitóxicas, antimicrobianas, antifúngicas(Bruneton, 1991), antioxidante, antiviral y anticancerígeno (Sánchez Perera *et al.*, 2008)

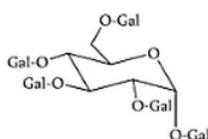


Figura 20.Estructura química de un Tanino.

En este orden de ideas, también se encontraron componentes tales como las saponinas, que son glucósidos que se caracterizan por la producción de espuma en solución acuosa y sabor amargo (ver figura 20) (Vioque, 2000). Las saponinas están relacionadas con diversas actividades biológicas como antimicrobianas, antitumorales, citotóxicas, ictiotóxicas, molusquicidas, antihelmínticos, espermicidas, antiinflamatorias, antihepatotóxicas(Okazaki *et al.*, 2007),

insecticida, expectorante, diurética, cardiovascular, anti-úlceras, analgésica, antipirética, sedante, hemolítica y antimicótica (Martínez, 2001). Además, conviene decir que, el significado nutricional de las saponinas en humanos es el resultado en gran medida de la acción hipocolesterolémica y pueden ser útiles en el control de enfermedades cardiovasculares en el hombre (Muzquiz, 2000)

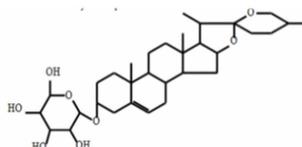


Figura 21. Estructura básica de una Saponina.

La presencia de saponinas a partir de la reacción en tubo fue confirmada después de una agitación vigorosa permaneciendo la formación de espuma estable durante por lo menos 30 min. A partir del análisis por TLC mediante el reactivo Vainillina-Ácido sulfúrico se evidenció una coloración azul y mediante el reactivo tricloruro de antimonio coloración roja que confirman presencia de saponinas. A pesar de que la presencia de saponinas fue mediana (2 cm de altura) (ver tabla 3) a partir de la reacción en tubo, se presume una posible actividad biológica que debe ser evaluada. Estos resultados están apoyados en estudios llevados a cabo en *S. havanensis* Jacq donde reportan la presencia de saponinas (Marrero Delange *et al.*, 2012).

Los metabolitos secundarios triterpenos (triterpenoide) (ver figura 21) son compuestos procedentes de la ciclación del escualeno. Poseen una estructura policíclica, normalmente pentacíclica (Bruneton, 1991).

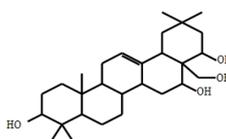


Figura 22. Estructura química de un Triterpeno.

Los triterpenos han sido reportados en el género *Scutellaria*. Estos componentes mejoran la presión sanguínea y aumentan lípidos sanguíneos, también tienen un

efecto equilibrante en el cuerpo, especialmente en el sistema inmune y circulatorio. Según (Zhu and Liu, 1993) se han reportado ácido triterpenoide tipo oleanano, ácido scutellárico en *S. barbata* y ácido ursólico de las hojas de *S. strigillosa*(Miyachi *et al.*, 2006). Asimismo se han encontrado en especies como *S. baicalensis* Georgi(Chirikova, Olennikov, and Tankhaeva, 2010), *S. barbata*(Dai *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010; Wang, Wang, and Xiao, 2012), *S. galericulata*(Cole *et al.*, 1990), *S. alpina* L(Miyachi *et al.*, 1994) y *S. sieberia* Benth(Çalış *etal.*, 1993). De esta manera la presencia de triterpenoides en el género *Scutellaria* han mostrado efectos farmacológicos relevantes sobre los sistemas nervioso y cardiovascular (Marrero Delange *et al.*, 2012).

La presencia de triterpenoides y/o esteroides en *S. incarnata* fue confirmada mediante la reacción en tubo a partir de la reacción de Liebermann-Burchard y Salkowski, donde se evidencio cambio de coloración a verde-marrón oscuro. A partir del análisis por TLC a través del revelador Liebermann-Burchard se corroboró la presencia de triterpenos y/o esteroides evidenciado mediante fluorescencias color rosa y violeta a UV de 254nm (ver tabla 3).

Por otra parte resulta importante contrastar y señalar que en el tamizaje fitoquímico se encontró que *S. incarnata* no presenta alcaloides ni derivados antracénicos, debido a resultados negativos de las pruebas tanto de reacción en tubo, como del análisis por cromatografía de capa delgada (TLC), (ver tabla 3) en discrepancia con *S. flavescens* en la cual once alcaloides fueron aislados por cromatografía en columna usando gel de sílice y óxido de aluminio en 2002 (Ma *et al.*, 2002) y en *S. havanensis* Jacq(Marrero Delange *et al.*, 2012).

Los resultados arrojados apoyan el uso tradicional que se le está dando a la planta ya que la presencia de flavonoides justificaría el uso como antidepresivo y antiestrés, además como antiespasmódico característico de los terpenos también presentes. Adicional a esto el uso como sedante y antiinflamatorio se podría explicar tanto por los flavonoides presentes como por las saponinas. Luego, el uso como antiinflamatorio también se podría explicar por las cumarinas y taninos presentes. Enfatizando, la bioactividad reportada por la etnobotánica colombiana Paéz para esta especie, podría fundamentarse no solo en los diferentes

mecanismos ejercidos por los compuestos (flavonoides, taninos cumarinas, terpenos y saponinas), sino además por efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios que pudieron evidenciarse en la planta. De esta manera también se sugieren posibles propiedades terapéuticas del ET de *S. incarnata* que deben ser evaluados, principalmente las propiedades anticancerígenas, antioxidantes, neuroprotectoras, hepatoprotectoras, antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, sedantes, antiespasmódicas, antidepresivas y ansiolíticas.

Esto lleva a inferir que debido a las diferencias presentes en las especies integrantes del Género *Scutellaria* con respecto a sus componentes fitoquímicos, hay un cierto grado de variabilidad y particularidad en tanto sus propiedades químicas y farmacológicas, las cuales se deben estudiar más a fondo y contrastar con las especies registradas a nivel mundial (Dai *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2011; Raccuglia *et al.*, 2010), debido a que *S. incarnata* es la especie colombiana que menos estudios relacionados con dichos temas se han realizado, y, al contrastar con otros estudios como los mencionados anteriormente, se debe tener en cuenta que hay una relación entre los grupos de componentes químicos presentes en la planta *S. incarnata* y la actividad biológica de la misma.

Según (Ducki *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996) en los últimos años, más de treinta flavonoides, más de diez diterpenoides tipo neo-clerodano, ácidos triterpénicos y glucósidos de esterol, entre otros, se han aislado en el género *Scutellaria*, algunos de los cuales presentan actividades biológicas interesantes y representativas. Luego, diversos componentes monoméricos han sido identificados y seleccionados para su actividad tanto *in vivo* como *in vitro*. Atendiendo a las consideraciones anteriores se establece una correspondencia de elevado carácter científico entre los componentes químicos presentes en *S. incarnata* y su actividad biológica.

Basándose en los resultados obtenidos a partir de las pruebas de difusión en disco y microdilución; se puede inferir que cada bacteria de manera particular presenta una resistencia individual para su supervivencia y propagación, frente al antibiótico utilizado gentamicina así como a las diferentes concentraciones del ET de *S. incarnata*. Dentro de este marco de ideas es preciso tener en cuenta que la

resistencia bacteriana como característica propia de una especie, es finalmente debida al uso indiscriminado e irracional de los fármacos existentes y consecuentemente a la presión evolutiva ejercida por el uso terapéutico que ha favorecido el incremento de cepas resistentes, representando un problema de salud a nivel mundial y que ha generado últimamente una amplia morbilidad y mortalidad sin mencionar el costo por estancia hospitalaria y complicaciones (Pérez-Cano and Robles-Contreras, 2004).

De esta manera considerando los resultados de la PIR para cada una de las bacterias se infiere que para ambas cepas bacterianas hubo un PIR a mayor concentración que corresponde a 1000 ppm. De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta el criterio que se siguió para seleccionar si el extracto genera una actividad positiva según (Cytel, 1995) respecto al control químico (Rivero López et al., 1997), se tiene que el ET de *S. incarnata* es positivo ya que el valor de PIR para las 3 concentraciones y ambas bacterias fue igual o mayor al 25%.

Sin embargo, a partir del análisis estadístico de los resultados obtenidos de halo de inhibición, para la bacteria *E. coli*, frente a los diferentes concentraciones del ET de *S. incarnata* 1000, 100 y 10 ppm; los resultados fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$) con respecto a los controles, tanto positivo como negativo señalados en la tabla 5 y 7. Las diferencias estadísticas integran lo anteriormente nombrado, ya que los controles son los límites máximo y mínimo del halo de inhibición que se formó en ambas bacterias, lo que sugiere que las medianas de los halos de inhibición de cada una de las concentraciones del extracto son diferentes con respecto al antibiótico gentamicina y frente al control positivo.

Aunado a esto, en la estadística descriptiva al contrastar cómo se comportan las diferentes concentraciones del extracto (1000, 100 y 10ppm), en cuanto a su capacidad de inhibición, indicadas en la tabla 7, se obtuvieron medias y desviaciones estándar de las concentraciones de 1000 ppm ($6,20 \pm 0,83$), 100 ppm ($5,80 \pm 0,44$) y 10 ppm ($5,80 \pm 0,44$), que indicaron la no diferencia significativa entre dichos tratamientos $P > 0,05$, lo que significa que las medianas de los halos de inhibición fueron iguales en las 3 concentraciones y por tanto los

resultados de halo de inhibición no son dependientes en este caso de la concentración del ET.

Prosiguiendo con el tema, para la bacteria *S. aureus* se observa que los resultados de los halos de inhibición obtenidos a partir de las concentraciones del ET utilizados, difieren significativamente de los controles negativo y positivo (ver tabla 6 y 8), lo que indica que medianas de los halos de inhibición son diferentes. Asimismo, al comparar cómo se comportan las diferentes concentraciones del extracto (1000, 100 y 10ppm), en cuanto a su capacidad de inhibición, se obtiene que a la concentración 10 ppm hay un diámetro del halo de inhibición significativamente menor en comparación con las concentraciones 1000 y 100 ppm, lo que revela que a una mayor concentración se genera un mayor halo de inhibición. En síntesis se tiene que para *S. aureus* los tratamientos que inhibieron el mayor índice de crecimiento fueron 1000 ppm y 100 ppm, además del control negativo Gentamicina comercial.

Lo anterior indicaría que por la prueba de difusión a pesar de que el ET de *S. incarnata* genera una actividad positiva según (Cytel, 1995) respecto al control químico (Rivero, 1997), para ambas bacterias, según el NCCLS las cepas bacterianas han de considerarse resistentes ya que el halo de inhibición fue menor a 12mm, esto considerando en relación al antibiótico gentamicina. Lo anteriormente mencionado nos lleva a deducir que aunque se pudo observar que los halos de la bacteria *S. aureus* fueron un poco más grandes en comparación con los halos producidos por *E. coli*, lo que significa que *S. aureus* fue sólo un poco más sensible que *E. coli*, también se considera como bacteria resistente para los tratamientos a excepción del control negativo (Gentamicina).

Por la prueba de difusión en disco se deduce que no se puede considerar el ET de *S. incarnata* como un posible candidato para antibiótico debido a las diferencias significativas con relación a la Gentamicina. En seguida, al comparar con otros estudios se concluye que los resultados obtenidos no se asemejan a los obtenidos en otras especies del genero *Scutellaria* como es el caso de *S. baicalensis* donde a través del método de difusión en disco el extracto metanólico revelo una alta actividad antibacteriana contra MRSA (Seong, 2004), opuesto al resultado del ET

de *S. incarnata*, que a pesar de ser positivo logró un porcentaje de inhibición relativo bajo.

Al evaluar la hipótesis de igualdad del comportamiento de ambas bacterias objeto de estudio y el halo de inhibición, con base a los datos descriptivos, como se observa en la tabla 9, se muestra diferencias estadísticamente significativas en el halo de inhibición de crecimiento en los tratamientos 100ppm ($p < 0,05$, $5,80 \pm 0,44$ y $6,60 \pm 0,54$, respectivamente) y control negativo ($p < 0,05$, $20,40 \pm 1,14$ y $23,80 \pm 0,83$).

Lo mencionado apunta que los resultados de los halos de inhibición con el tratamiento a 100ppm y el antibiótico gentamicina al comparar ambas bacterias fueron diferentes lo que sustenta el hecho de que *S. aureus* como bacteria Gram positiva es más sensible que *E. coli* como Gram negativa, lo cual se puede explicar teniendo en cuenta la constitución de la pared celular, donde las bacterias Gram negativas representan una barrera difícil de vencer frente a los antibióticos, variando en las diferentes especies, sin embargo en las bacterias Gram positivas la pared no es una barrera que impide la penetración de los antibióticos (Jackson, Machado, and Hamilton, 1998) en nuestro caso la Gentamicina comercial. Además, este resultado corrobora otro estudio donde según (Bazzaz *et al.*, 2011a) los resultados de actividad antibacteriana de los extractos de *S. litwinowii*, muestran que las bacterias Gram-positiva son más sensibles a los extractos que las Bacterias Gram-negativas y levaduras.

Al respecto conviene decir en el caso de la actividad antibacteriana evaluada, que los resultados obtenidos a partir del extracto etanólico total (ET) frente *S. aureus* y *E. coli* se pueden explicar de acuerdo a la naturaleza de su clasificación como bacterias Gram positiva y Gram negativa respectivamente. De manera general según (Madigan, Martinko, and Parker, 2003), en la pared celular bacteriana existe una capa rígida de peptidoglicano o mureina, responsable de la resistencia, la cual es muy similar entre bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas. Estas a su vez están formadas por finas láminas compuestas por dos derivados de azúcares, N-acetilglucosamina (NAG) y ácido N-acetilmurámico (NAM). No obstante, existen diferencias en la organización y composición de la pared celular que explica la disimilitud entre estos dos grupos de cepas bacterianas y por tanto

la eficiencia en la respuesta ante sustancias extrañas atendiendo a la exposición de las mismas como antibióticos, así como también extractos de plantas de variadas concentraciones.

En este orden de ideas, *S. aureus* como bacteria Gram positiva esta constituida según (Lowy, 1998) por una pared celular cuyas cadenas de peptidoglicano que corresponden al 50% en peso, se entrecruzan por unidades pepticas y por puentes de pentaglicina. Acidos teicoicos como el ribitol, están presentes unidos covalentemente al peptidoglicano y aportan carga negativa a la superficie celular lo que puede servir para el trasiego de iones a través de la pared. Acidos lipoteicoicos tambien estan presentes, debido a ello estas células son muy sensibles a la acción de la lisozima y penicilina ya que inhibe la formación de la pared celular (Brock, 1978).

Dentro de este marco, se considera la estructura de la pared de *E. coli* como bacteria Gram Negativa y donde el peptidoglicano constituye sólo alrededor del 10% de la pared. El peptidoglicano está conectado entre unidades peptídicas pero sin puentes de pentaglicina como en Gram positivas. Al peptidoglicano se enlazan covalentemente lipoproteínas que también se unen a la membrana externa, de manera que el peptidoglicano tiene un fuerte enlace con la membrana externa, además los lipopolisacáridos aqui presentes le confieren carga negativa (Brock, 1978), siendo responsables tambien de la patogenesis de las bacterias gram negativas(Rojas Campos, 1995).

De acuerdo a la figura 10, la asociación, y la curva de regresión lineal se tiene una correlación significativa positiva ($r=0,92$), de la concentración del ET y el halo de inhibición de crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. De esta manera se observa que a mayor concentración mayor es el halo de inhibición y que la concentración del ET afecta en un 92% el halo de inhibición de crecimiento de dichas bacterias.

Con el objetivo de ratificar lo anterior se realizó la prueba de microdilución para así evaluar bajo otros parámetros la actividad antibacteriana del ET de *S. incarnata* respecto a las bacterias *E. coli* y *S. aureus*. Para el caso, se empleó un espectro

más amplio de las concentraciones con el fin de hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Respecto a *E. coli*, la tabla 12 enseña los resultados estadísticos de las absorbancias (nm) en relación con cada una de las concentraciones del ET, en las cuales se registran diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar el tratamiento de 1024 ppm con 32, 2 ppm y control positivo, de igual manera, al comparar el tratamiento de 512 ppm con el control positivo.

Ahora bien, al comparar los resultados de absorbancia de las concentraciones del ET en relación al antibiótico Gentamicina se encontró que las concentraciones no difieren significativamente en relación con el control negativo cuya absorbancia es cero. Lo anterior indica que las medias de las diferentes concentraciones del extracto fueron similares a las de la Gentamicina y que por tanto hubo una alta inhibición del crecimiento bacteriano.

En la figura 12 la asociación de la absorbancia (nm) con la concentración del ET en la bacteria *E. coli* resulta en una correlación negativa significativa, representada por la curva de regresión lineal, lo que significa que a mayor concentración la absorbancia disminuye hasta el punto de ser nula en el control negativo Gentamicina. Añadido a lo anterior y relacionado a este resultado se tiene que las concentraciones del ET afectan en un 53% la absorbancia de *E. coli*, (Ver figura 12).

Para *S. aureus*, la tabla 13 muestra las absorbancias (nm) en cada una de las concentraciones del ET, en las cuales se registran diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar los tratamientos de 1024, 512 y 256 ppm con las concentraciones de 64, 32, 16, 8 ,4 y 2 ppm correspondientes. Lo anterior sugiere que las medias de absorbancia para las concentraciones más altas son diferentes en relación con las concentraciones más bajas.

También al comparar cada una de las concentraciones del ET con el control positivo se obtuvieron diferencias significativas. En seguida, al comparar las concentraciones del ET de *S. incarnata* respecto a la gentamicina, no hubo

diferencia significativa ($P > 0,05$) lo cual es un resultado muy positivo ya que esto indica que las medias de absorbancia se comportan de manera similar principalmente las concentraciones mayores 1024 y 512ppm en relación con el antibiótico antes mencionado y que por tanto el ET si generó inhibición en el crecimiento bacteriano de manera eficaz. Lo anterior se sustenta en la resiembra efectuada de los tratamientos 1024 y 512 ppm basados en el supuesto de que visiblemente no había turbidez evidente y que al compararlo con el control negativo gentamicina eran perceptiblemente similares. Después de 24 horas no se evidencio crecimiento bacteriano para la concentración 1024ppm por lo que se determinó esta como la CMI.

En la figura 13 se observa la asociación de la absorbancia (nm) con la concentración del ET. De esta manera se observa una correlación negativa significativa, en la cual las concentraciones del ET afecta en un 56% la absorbancia de dicha bacteria. Lo mencionado significa que la densidad óptica disminuye a medida que la concentración del ET aumenta. Este porcentaje se dilucida teniendo en cuenta que al evaluar la hipótesis de igualdad de las absorbancias obtenidas a partir de las diferentes concentraciones del extracto se obtuvieron en su mayoría resultados nos significativo, lo que indica que la absorbancia no depende totalmente de la concentración del ET, y que se deben considerar con posterioridad otros aspectos tales como el fraccionamiento del extracto.

En cuanto a la correlación, la tabla 14 registra la absorbancia (nm) de *E. coli* y *S. aureus*, con respecto a las concentraciones del ET, mostrando que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) cuando se confrontan los resultados de absorbancia en relación con los tratamientos al comparar la susceptibilidad bacteriana entre sí. Esto propone que las medias de absorbancia son básicamente iguales y que por tanto ambas bacterias fueron inhibidas por las diferentes concentraciones del extracto ET de *S. incarnata* de manera similar.

De esta manera se afirma que la prueba de Microdilución para hallar la sensibilidad de los microorganismos a los ET de plantas es mucho más efectiva que la prueba de difusión en disco, esto evidenciado en las desigualdades de los

resultados de nuestro trabajo investigativo. Como se comentó con anterioridad, a partir de la prueba de difusión en disco para ambas cepas bacterianas se logró un PIR, que se puede considerar positivo, sin embargo los resultados arrojados no se asemejan a los obtenidos por el método de microdilución.

Este hecho se puede explicar considerando que los discos de papel filtro Whatman, retienen las moléculas del extracto en el mismo a pesar de que este haya sido previamente disuelto en el solvente orgánico utilizado etanol, lo que conlleva a la inapropiada difusión del extracto al medio, dando lugar a resultados inusuales de supuesta resistencia bacteriana. Según (Ramírez, Stella, and Marín Castaño, 2009), la composición del papel filtro Whatman se compone de celulosa (uniones b-(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, y por tanto haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica. Este hecho interviene directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, lo que fundamenta los resultados de resistencia inusuales de las bacterias ensayadas en relación al ET de *S. incarnata*.

De esta manera se ha podido establecer a partir de la prueba de microdilución que el ET de *S. incarnata* posee una muy buena actividad antibacteriana con respecto a los modelos procariontes propuestos, *S. aureus* como Gram positiva y *E. coli* como Gram negativa, lo cual se puede dilucidar por los grupos de constituyentes químicos presentes en *S. incarnata*. Como se mencionó con anterioridad compuestos tales como los flavonoides, cumarinas, taninos, saponinas, glucósidos cardiotónicos y triterpenos y/o esteroides están presentes en *S. incarnata*.

Según (Boyle *et al.*, 2011) en el género *Scutellaria* los flavonoides han demostrado ser uno de los principales componentes que contribuyen a la bioactividad entre ellas manifestando propiedades antimicrobianas (Delange *et al.*, 2012), lo que podría explicar la actividad antibacteriana evidenciada por el ET de *S. incarnata*. Al contrastar con otros estudios donde la actividad antibacteriana de plantas del género *Scutellaria* han sido evaluadas se encontró que en *S. barbata* los flavonoides presentes en toda la planta según (ShanShan *et al.*, 2009) cumplen

una actividad antimicrobiana. Igualmente, en otros estudios para *S. baicalensis* se encontró resultados en los cuales según (González, 2005), las reacciones autoinmunes desencadenadas por superantígenos como *S. aureus* han sido inhibidas de manera eficaz debido a los flavonoides presentes. Además, para la misma especie según (Sato *et al.*, 2000) los flavonoides (apigenina y luteolina) aislados del ET son considerados como componentes activos contra *S. aureus* resistente a la meticilina. De esta manera, según (Domingo y López Brea, 2003), los flavonoides pueden actuar formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas solubles y extracelulares, inactivándolas y consecuentemente anulando su función.

Relacionado con lo anterior, la actividad antibacteriana presente se puede explicar también a los otros metabolitos presentes tales como los taninos los cuales según (Tejerina, Farfán, and Cuevas, 2007), se caracterizan por generar toxicidad fisiológica causando daño a componentes subcelulares (membranas o enzimas) por ejemplo, en el caso de bacterias, de esta manera según (Sánchez Perera *et al.*, 2008) su mecanismo de acción puede estar relacionado con su capacidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula, formar complejos con la pared celular, etc.

Por otro lado, según (Domingo y López Brea, 2003), las cumarinas poseen propiedades antimicrobianas, donde el mecanismo de acción antimicrobiano parece ser por interacción con el DNA eucariota. Sumado a lo anterior los terpenoides según (Cowan, 1999), podrían contribuir a la acción antimicrobiana sin embargo, el mecanismo de acción de los terpenos no está también del todo dilucidado, pero se especula que estarían involucrados en la disrupción de la membrana. Finalmente las saponinas cumplen un papel fundamental en la actividad antimicrobiana a partir de extractos de diferentes plantas, (Sánchez *et al.*, 2008; Okazaki *et al.*, 2007), donde se cree actúan afectando la permeabilidad celular.

Atendiendo estas consideraciones y a saber que según (González, 2005) que en las Alegrías Colombianas hay flavonas similares a la baicaleína, baicalina y wogonina de la *S. baicalensis* recomienda guiar el fraccionamiento del extracto

y de esta manera obtener los componentes activos que pueda tener la planta y así evaluar y posiblemente mejorar los resultados en relación a la actividad antibacteriana

Al comparar los resultados obtenidos de CMI del ET de *S. incarnata* para *S. aureus* de 1024ppm y *E. coli* > 1024ppm, con relación a otros resultados de CMI frente a estas bacterias para especies botánicas pertenecientes al género *Scutellaria* se observa que respecto a *S. aureus*, el ET de *S. incarnata* mejora la actividad ya que en el caso de *S. baicalensis* el extracto acuoso alcanza una CMI entre 20×10^7 y 40×10^7 ppm, en *S. litwinowii* el extracto alcanza una CMI de 100000ppm (Bazzaz *et al.*, 2011a) y en *S. barbata* la apigenina alcanza una CMI entre 3900 y 15600ppm y para la luteolina una CMI de 62500 y 125000ppm (ShanShan *et al.*, 2009). Con respecto a *E. coli*, se observa que en *S. litwinowii* el extracto logra una CMI de 6250ppm (Bazzaz *et al.*, 2011a) se cree superior a nuestro resultado que considera una CMI > 1024ppm, además en el caso de *S. baicalensis* el extracto acuoso fue inactivo obteniendo una CMI solo hasta 160×10^7 ppm o 1600g/ml (Franzblau *et al.*, 1998).

Para *S. aureus* se considera por tanto un efecto bacteriostático a la concentración 1023ppm, ya que una vez el extracto empezó actuar sobre el medio con las bacterias se cree este impidió su reproducción, evidenciado esto al observar que las absorbancias se mantuvieron entre 0.08 y 0,1. Luego, en el control positivo hubo un crecimiento bacteriano normal evidenciándose en la absorbancia obtenida superior a 3.5.

De esta manera se concluye que los extractos etanólicos de *S. incarnata* se asemejan a los extractos etanólicos de *S. baicalensis* los cuales según (Yang *et al.*, 2005), podrían mejorar la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro antibióticos en nuestro caso la gentamicina, frente a *S. aureus*. De esta manera nuestros resultados a partir de la prueba de microdilución se suman conjuntamente también a otros resultados en especies como *S. baicalensis*, donde la actividad antimicrobiana de los extractos ha sido confirmada contra una amplia gama de bacterias, incluida *E. coli* (Chang and But, 1986; Huang and Williams, 1999).

Si bien, la presencia de cepas bacterianas resistentes se confirmó por los resultados obtenidos de absorbancia, que a pesar de ser mínimos sugieren la presencia de bacterias resistentes seleccionadas por la acción del extracto. La anterior afirmación se puede dilucidar teniendo en cuenta la resistencia que de manera particular posee cada bacteria. Así, particularmente para *E. coli* el aumento de resistencia antibiótica se debe en algunos casos a una resistencia natural. No obstante en la actualidad, *E. coli* también presenta una resistencia adquirida que ha dado lugar a bacterias multiresistentes. De manera resumida la adquisición de diferentes mecanismos moleculares de resistencia de *E. coli* se explica mediante mutaciones puntuales a nivel cromosómico o transferencia horizontal de material genético entre especies relacionadas o diferentes, facilitada por algunos elementos genéticos tales como los plásmidos. (Lorente *et al.*, 2005).

De esta manera, los efectos de los mecanismos moleculares de resistencia más comunes en *E. coli*, y que podrían explicar la resistencia de algunas bacterias a la exposición del ET de *S. incarnata* implican la inactivación de la antibiótico, así las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad; bombas de salida donde las bacterias operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción; alteraciones de la permeabilidad en el cual el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo y finalmente alteraciones en el sitio blanco (Jackson, Machado *et al.* 1998). En *E. coli* y otras bacterias entéricas además, existe una proteína específica (PORINS) impide además, la entrada de antibióticos hidrófilos con un peso molecular de hasta 650 daltons (Jackson, Machado *et al.* 1998).

Específicamente la adquisición de diferentes mecanismos moleculares de resistencia de *S. aureus* se explica mediante el mecanismo de transferencia horizontal de genes y por mutaciones de tal manera que en presencia de un antibiótico determinado o de otros microbicidas se genera cualquier mutación que protege a la bacteria de la cualidad letal de dicho compuesto, lo que podría explicar posiblemente la sobrevivencia de algunas bacterias, en nuestro caso a la exposición del ET de *S. incarnata*, ya que estas sustancias representan una amenaza para su longevidad (Sanabria, 2008).

De esta manera, los efectos de los mecanismos moleculares de resistencia más comunes generados por *S. aureus* como bacteria Gram positiva se puede dilucidar por alteraciones del sitio de acción del antibiótico, lo que generalmente está relacionado con un cambio en la estructura terciaria del sitio donde los antibióticos ejercen su acción, siendo este el mecanismo de resistencia más importante para las bacterias Gram positivas o por el incremento de la concentración del antibiótico, en nuestro caso por el ET de *S. incarnata*, considerado como una sustancia competitiva, lo que confirma que a pesar de haberse inhibido el crecimiento bacteriano a mayor concentración del ET, la presencia de cepas bacterianas resistentes se confirmó por los resultados obtenidos de absorbancia que a pesar de ser mínimos sugieren la presencia de bacterias resistentes seleccionadas por la acción del extracto (Pérez-Cano and Robles-Contreras, 2004; Tafur, Torres, and Villegas, 2008).

Dentro de este contexto, las diferentes concentraciones de ET que se emplearon para las pruebas antibacterianas suscita una relación de las mismas con los efectos biológicos que pueda llegar a tener la planta debido a los grupos de constituyentes encontrados en el tamizaje fitoquímico, es así como al igual del empleo de un organismo procarionta, se trae a colación un organismo eucariota, en este caso en particular la larva del crustáceo braquiópodo *A. franciscana* (*salina*), gracias a la habilidad de sus huevos para soportar largos períodos de tiempo en condiciones desfavorables y/o condiciones extremas por lo cual la hacen un modelo invaluable en investigaciones biológicas como en el presente trabajo.

A este propósito, se menciona que los organismos como es el caso de *A. franciscana*, para lograr el equilibrio acuoso celular, deben mantener la osmolaridad del líquido extracelular dentro de un rango adecuado. Además deben mantener una concentración de solutos apropiada conservando algunas sustancias y eliminando otras.

Referido a esto, en los tratamientos establecidos en el desarrollo del ensayo de toxicidad, se conjetura que las larvas de *A. franciscana* intentan equilibrar la osmolaridad del líquido extracelular con la del agua artificial de mar, y de manera simultánea las larvas mantuvieron la osmolaridad del líquido extracelular la cual es

mucho menor que la del agua empleada como diluyente para las diferentes concentraciones del ET de *S. incarnata*.

Los efectos de dichos tratamientos que conllevaron a la letalidad de las larvas indican de manera general que las concentraciones de solutos elevadas debidas a las concentraciones del extracto, causaron posiblemente la desnaturalización de las proteínas de los organismos, explicado esto, por su mecanismo de osmoregulación (Purves, Hermitte, and Fernández, 2003).

De esta manera, las larvas de *A. franciscana* en agua de mar artificial diluida en diferentes concentraciones del extracto etanólico total de *S. incarnata*, se cree transportan iones en forma activa a su cuerpo para mantener la osmolaridad activa del líquido extracelular por encima de la del ambiente. En estas condiciones, invierte la dirección del transporte de moléculas del extracto a través de las membranas de las agallas. Debido al amplio rango de concentraciones empleadas en el desarrollo de la investigación y haciendo mayor hincapié al hacer referencia a las concentraciones altas del ET, esto causó la muerte en los crustáceos.

Para *A. franciscana* se obtuvo que la natalidad y mortalidad fue altamente afectada por las diferencias de concentraciones del extracto etanólico total (ET), en relación al número total de individuos. Los tratamientos letales fueron las concentraciones más altas (1000, 500 y 100 ppm) y la LC₅₀ determinada por el método de REED-MUENCH (Habel K, 1996) estableció que a la concentración 7.5ppm, el número de sobrevivientes es igual al número de muertes lo que sugiere una alta toxicidad del extracto y por tanto una actividad fisiológica o biológica en particular; indicador de toxicidad a nivel celular, que puede orientar investigaciones específicas futuras, en busca de nuevos compuestos bioactivos con el extracto ensayado.

En la tabla 15 y 16, se muestra el número de individuos muertos con respecto a las diferentes concentraciones del ET, presentan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) de los tres tratamientos más altos (1000, 500 y 100 ppm) al comparar los valores con el blanco empleado en la prueba, es decir que en dichas concentraciones hubo una mortalidad del 100% de los individuos en sus

correspondientes repeticiones. Aunque *A. franciscana* es un organismo resistente, se ve afectado por los metabolitos presentes en la *S. incarnata*.

La evaluación de la actividad biológica a partir del bioensayo con *A. franciscana* se basa en la premisa que los compuestos bioactivos son tóxicos a altas dosis y que la letalidad de un organismo simple puede ser utilizada para detectar y guiar el fraccionamiento de los extractos (Kanegusuku *et al.*, 2002)

Teniendo en cuenta que el ET de *S. incarnata* fue tóxico frente a las larvas de *A. franciscana* y activo en las bacterias ensayadas indica que sus extractos deberían ser mucho más investigados empleando otros bioensayos para la detección de propiedades farmacológicas más específicas y que los extractos pudieran ser separados para así aislar e identificar las sustancias vegetales bioactivas que luego se probarían con otros modelos.

Ahora bien, sabiendo que la actividad tóxica generada por las plantas se explica debido a los metabolitos secundarios que contiene, la toxicidad generada por el ET de *S. incarnata* se le atribuye a los terpenoides, taninos, saponinas y cumarinas presentes corroborados a partir del tamizaje fitoquímico.

Esto se dilucida considerando que entre las sustancias tóxicas volátiles más importantes se encuentran los terpenos (Poblete, Roffael, and Miertzsch, 2010), los cuales son capaces de alterar la permeabilidad de la membrana celular, en especial sobre mecanismos de transporte iónico (Abramov *et al.*, 2001). Adicionalmente resultados obtenidos de diferentes trabajos de investigación demuestran que los terpenoides de plantas como *Senecio grisebachii*, *Eupatorium adenophorum*, y especies del género *Ferula* ejercen una acción tóxica (Romero *et al.*, 2003). Si bien, algunos de estos compuestos han sido descritos de toxicidad baja. (Brook, McCarron, and Mueller, 1989).

Más aún, en lo que concierne a los taninos, estos compuestos conocidos como potentes inhibidores de enzimas hidrolíticas, se caracterizan por generar toxicidad fisiológica causando daño a componentes subcelulares (membranas o enzimas) por ejemplo, en el caso de bacterias (Tejerina, Farfán, and Cuevas, 2007). Aun

así, los taninos hidrolizables son los que mayor toxicidad encierran. Su mecanismo de acción puede estar relacionado con su capacidad para inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula, formar complejos con la pared celular, etc. (Sánchez Perera *et al.*, 2008).

Las saponinas o saponosidos por su parte son tóxicas, por lo cual se cree podrían estar involucradas en la actividad toxica del ET de *S. incarnata*. Desde el punto de vista biológico, las saponinas pueden tener efectos perjudiciales, actuando como antinutrientes o tóxicos; su alta capacidad tensoactiva altera las membranas celulares, y en el tubo digestivo no se absorben, por lo que su efecto produciría alteraciones de membranas, y posiblemente aumentaría su permeabilidad. Complementado a esto cualquier sustancia cuya acción facilite o estimule la penetración, el transporte o la accesibilidad de un compuesto tóxico, debe considerarse como un “casi sinergista”, éste es el caso de las saponinas que favorecen la penetración de otros productos tóxicos en las células (Pérez, Lannacone, and Tueros, 2008); En lo que respecta a las cumarinas estas pueden resultar tóxicas cuando son administradas en altas dosis (Marinoff *et al.*, 2005).

En concordancia con lo expuesto con anterioridad, hay que tener en cuenta que la actividad citotóxica reportada en la mayoría de las plantas se debe al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios por ejemplo como alcaloides y terpenos explicando así la toxicidad mostrada por diferentes fracciones en las plantas (Martínez *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2003). En *S. incarnata* se recuerda no se encontraron alcaloides caracterizados por ser altamente tóxicos, sin embargo se cree una acción sinérgica de los terpenoides, taninos, saponinas y cumarinas, los cuales habrían contribuido a la alta toxicidad del ET de *S. incarnata* a partir del bioensayo de *A. franciscana*.

En lo que respecta a los flavonoides presentes en *S. incarnata* se tiene que usualmente están libres de toxicidad (Pérez, 2003) o su toxicidad es despreciable (Martino, 2000) por lo que han recibido en los últimos años mucha atención como potenciales fármacos (Ojito Ramos *et al.*, 2012).

La curva de regresión lineal representada en la figura 15 se indica la asociación positiva significativa de la concentración del ET y la mortalidad de individuos de *A. franciscana*. De esta manera la concentración del ET afecta en un 81% la variable mortalidad de los individuos expuestos a los tratamientos.

Teniendo en cuenta que los ensayos biológicos expuestos en esta investigación son *in vivo*, se afirma de manera sostenible el uso de la planta medicinal *S. incarnata* como posible fármaco con respecto a los efectos que ofrecen sus múltiples grupos de constituyentes químicos encontrados en el tamizaje fitoquímico.

La acción combinada de varios metabolitos secundarios constituyentes de la planta medicinal *S. incarnata* producen efectos mayores y significativos con respecto a la actividad biológica en las bacterias *E. coli* y *S. aureus* y larvas de crustáceo *A. franciscana*, denotando una capacidad farmacológica importante en mayores concentraciones (ppm) del extracto etanólico total seco de la planta.

De esta manera se llega a un descubrimiento de elevada relevancia acerca de numerosos efectos biológicos que tiene la especie *S. incarnata*, al relacionarlos posiblemente con el sinergismo presente de sus componentes fitoquímicos y con la actividad antibacteriana que se obtuvo con las bacterias *E. coli* y *S. aureus* y la toxicidad que produjo en las larvas de *A. franciscana*, lo que afirma de manera inminente su potencial farmacológico, al haber una interacción química con los tejidos y las células de los organismos, tanto procariotas como eucariotas, ya que inhibió el crecimiento bacteriano de manera significativa y las concentraciones tóxicas del ET fueron las más altas.

En resumen, hay una relación, en cuanto a la actividad biológica de la planta, porque hay una expresión de las concentraciones altas del ET empleadas en el desarrollo de las pruebas, que describe los efectos nocivos tanto en procariotas (*E. coli* y *S. aureus*) y en eucariotas (*A. franciscana*) para los mismos tratamientos (concentraciones ppm), según los resultados obtenidos. En ambos casos se pudo confirmar que a mayor concentración mayor es el efecto biológico.

Sabiendo que el ET de *S. incarnata* a las concentraciones 1024 ppm y 512 ppm produjeron inhibición del crecimiento bacteriano y esta misma sustancia a estas mismas concentraciones produjo efectos tóxicos, entonces según (Mclaughlin, Rogers, and Anderson, 1998), la toxicidad medida como la mortalidad a un organismo simple en nuestro caso *A. franciscana* puede ser utilizado como criterio para guiar la separación o fraccionamiento y purificación del ET, lo que propone posteriormente la evaluación de la toxicidad del ET en animales experimentales y así establecer su seguridad para proponer su uso como agente antimicrobiano.

El empleo de organismos procariotas y eucariotas como modelos biológicos en los bioensayos propuestos son de alta confiabilidad con respecto a los resultados arrojados por las diferentes pruebas, de esta investigación. Debido a que existe una relación profunda entre uno y otro grupo de organismos, aunque haya amplias variaciones en el número de genes y de cromosomas, cada organismo aproximadamente contiene el mismo número de proteínas fundamentales. Lo cual indica que la relación hecha en el presente trabajo es totalmente válida y que en los procesos biológicos de dichos grupos de individuos existe una respuesta que es extrapolable, ante múltiples factores de exposición como el ET de la planta. Finalmente, lo anteriormente expuesto indica que los factores externos pueden manipularse en pro de la ciencia y que en este caso se pueden aplicar a temas como la farmacología.

10. CONCLUSIONES

A partir del tamizaje químico se obtuvo flavonoides, cumarinas volátiles, taninos, saponinas triterpenos y/o esteroides y cardiotónicos.

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, sustentan la continuidad del estudio de los diferentes extractos y fracciones de esta planta, para profundizar en el análisis de esos compuestos e iniciar la posible evaluación de sus efectos farmacológicos.

La prueba de Microdilución para hallar la sensibilidad de los microorganismos a los ET de plantas es mucho más efectiva que la prueba de difusión en disco, esto evidenciado en las desigualdades de los resultados de nuestro trabajo investigativo

A partir de la prueba de difusión en disco se estableció que el ET tuvo un efecto positivo ya que los PIR para ambas bacterias superaron el 25%.

En la prueba de difusión en disco para la bacteria *E. coli* las concentraciones de 1000, 100 y 10 ppm utilizadas fueron estadísticamente significativas con respecto a los controles, tanto positivo como negativo, lo que muestra resistencia de la bacteria frente a los tratamientos ensayados.

En la prueba de difusión en disco, en el halo de inhibición de crecimiento de *S. aureus* se observó que a la concentración de 10 ppm hay un diámetro significativamente menor en comparación con las concentraciones 100 y 1000 ppm. Asimismo, los halos de inhibición de las concentraciones del ET utilizadas difieren significativamente de los controles negativo y positivo, lo que muestra resistencia de la bacteria frente a los tratamientos ensayados.

En la prueba de difusión en disco al evaluar la hipótesis de igualdad del comportamiento de ambas bacterias objeto de estudio y el halo de inhibición se obtuvo diferencias estadísticamente significativas en el halo de inhibición de crecimiento en los tratamientos 100ppm y control negativo gentamicina, lo que

sustenta el hecho de que *S. aureus* como bacteria Gram positiva es más sensible que *E. coli* como Gram negativa

La curva de regresión lineal mostró una asociación positiva significativa de la concentración del ET y el halo de inhibición de crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* indicando, que la concentración del ET afecta en un 92% el halo de inhibición de crecimiento de dichas bacterias.

Por la prueba de microdilución para *E. coli*, no se registraron diferencias significativas ($p < 0,05$) al comparar los resultados de absorbancia con el control negativo lo que indico que las medias de absorbancia se comportan de manera similar y que por tanto el ET generó inhibición en el crecimiento bacteriano de manera eficaz.

La curva de regresión lineal mostro una asociación negativa significativa de la concentración del ET y la absorbancia (nm) de la bacteria *E. coli*, de tal manera que la concentración del ET afecta en un 53% la absorbancia de *E. coli*, lo que se explica teniendo en cuenta que las medias de las absorbancias básicamente se comportaron de manera similar a excepción de la concentración 1024 ppm con respecto a 32, 2 ppm y control positivo, de igual manera, al comparar el tratamiento de 512 ppm con el control positivo

Por la prueba de microdilución para *S. aureus*, al comparar las concentraciones del ET de *S. incarnata* respecto a la gentamicina, no hubo diferencia significativa ($P \geq 0,05$) lo que indico que las medias de absorbancia se comportan de manera similar principalmente las concentraciones mayores 1024 y 512ppm en relación con el antibiótico antes mencionado y que por tanto el ET generó inhibición en el crecimiento bacteriano de manera eficaz.

La curva de regresión lineal mostro una asociación negativa significativa de la concentración del ET de la planta y la absorbancia (nm) de la bacteria *S. aureus*, de esta manera la concentración del ET afecta en un 56% la absorbancia de *S. aureus*, lo que se explica teniendo en cuenta que la absorbancia vario significativamente solo a las concentraciones mayores 1024, 512 y 256 ppm con respecto a las concentraciones más pequeñas 64, 32, 16, 8, 4 y 2 ppm.

La CMI determinada para *S. aureus* fue de 1024 ppm y para *E. Coli* no se alcanzó para la mayor concentración y que correspondía a 1024ppm.

La actividad antibacteriana presente se puede explicar por los metabolitos presentes en *S. incarnata* principalmente los flavonoides y seguidamente los taninos, cumarinas y saponinas los cuales cumplen un papel fundamental en la actividad antimicrobiana a partir de extractos de diferentes plantas.

Según los resultados de natalidad y mortalidad de *A. franciscana* en relación con las concentraciones del extracto etanólico total (ET), y el número total de individuos se pudo observar que los tratamientos letales fueron las concentraciones más altas (1000, 500 y 100 ppm) y que la LC₅₀ es 7.5ppm.

La actividad tóxica generada por el ET por *S. incarnata* se puede explicar a los metabolitos secundarios que contiene, como los terpenoides, taninos, saponinas y cumarinas, corroborados a partir del tamizaje fitoquímico

Los resultados arrojados apoyan el uso tradicional que se le está dando a la planta ya que la presencia de flavonoides justificaría el uso como antidepresivo y antiestrés, además como antiespasmódico característico de los terpenos también presentes. Adicional a esto el uso como sedante se podría explicar tanto por los flavonoides presentes como por las saponinas que su vez corroborarían el uso antiinflamatorio.

Hay una expresión de las concentraciones altas del ET empleadas en el desarrollo de las pruebas, que describe los efectos nocivos del ET tanto en procariontas (*E. coli* y *S. aureus*) como en eucariotas (*A. franciscana*) para los mismos tratamientos (concentraciones (ppm)).

Al integrar las cosmovisiones de la comunidad Paéz, la etnobotánica y la ciencia demostrativa, se llega a un descubrimiento de elevada relevancia acerca de numerosos efectos biológicos que puede tener la especie *S. incarnata*, al relacionarlos con el sinergismo presente en sus componentes fitoquímicos y la actividad biológica

11. RECOMENDACIONES

Implementar una metodología de conservación y producción sostenible de la especie como un proceso de prevención para evitar su vulnerabilidad, teniendo en cuenta que las especies pertenecientes al género *Scutellaria* cuentan con muy pocas poblaciones silvestres en el país y que particularmente en la especie *S. incarnata* se puede observar un factor limitante en el bajo porcentaje de germinación o viabilidad de la semilla de la planta.

Guiar el fraccionamiento (Hexánico (FH), Clorofórmico (FC), Acetato de Etilo (FAE) y Acuoso (FA)) del extracto etanólico de *S. incarnata* a partir del bioensayo de toxicidad de *A. franciscana* con el objetivo de obtener y consecuentemente identificar metabolitos de interés farmacológico y así poder evaluar diferentes actividades biológicas de acuerdo a los antecedentes y posiblemente comprobar el uso tradicional por parte de la comunidad Paéz.

Evaluar la sensibilidad de los microorganismos frente a los extractos de plantas por la prueba de microdilución ya que es mucho más confiable y efectiva en estos casos, que la prueba de difusión en disco.

Identificar la actividad antibacteriana del extracto etanólico total de *S. incarnata* en otras cepas bacterianas, así como también hongos de interés clínico, teniendo en cuenta que se obtuvieron resultados promisorios para las bacterias ensayadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramov, A. Y., Zamaraeva, M. V., Hagelgans, A. I., Azimov, R. R., and Krasilnikov, O. V. (2001). Influence of plant terpenoids on the permeability of mitochondria and lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1512(1), 98-110.
- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, 5-16.
- Barroncas de oliveira, A. (2011). Estudio estructural y farmacologico de *s. agrestis*. (lamiaceae) una planta local utilizada por poblaciones ribereñas del Amazonas.
- Bazzaz, B., Khayat, M., Emami, S., Asili, J., Sahebkar, A., and Neishabory, E. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of methanol, dichloromethane, and ethyl acetate extracts of *Scutellaria litwinowii*. *ScienceAsia* 37, 327-334.
- Berlin, J. (1988). Formation of secondary metabolites in cultured plant cells and its impact on pharmacy. In *Medicinal and Aromatic Plants I* (Springer), pp. 37-59.
- Bernardo, A. (1984). *Farmacología medica*. Vol 1.
- Błaszczuk, T., Krzyzanowska, J., and Lamer-Zarawska, E. (2000). Screening for antimycotic properties of 56 traditional Chinese drugs. *Phytotherapy research* 14, 210-212.
- Bodeker, G. (2003). Traditional Medical Knowledge, Intellectual Property Rights & (and) Benefit Sharing. *Cardozo J Int'l & Comp L* 11, 785.
- Boyle, S.P., Doolan, P.J., Andrews, C.E., and Reid, R.G. (2011). Evaluation of quality control strategies in *Scutellaria* herbal medicines. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 54, 951-957.
- Brock, T.D. (1978). *Biología de los Microorganismos*, 2 edición edn (Barcelona, omega,S.A).
- Brook, M. P., McCarron, M. M., and Mueller, J. A. (1989). Pine oil cleaner ingestion. *Annals of emergency medicine* 18(4), 391-395.
- Brock, T. D. (1978). *Biología de los Microorganismos*. Barcelona, omega, S.A.
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*, 1ª Edición edn (Madrid).
- Bruneton, J. (1991). *Elementos de fitoquímica y farmacognosia*. Madrid.

Cabrera, C.E., Gómez, R.F., and Zúñiga, A.E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 38, 149-158.

Çaliş, I., Ersöz, T., Saracoğlu, I., and Sticher, O. (1993). Scalbidoside and albidoside, two iridoid glycosides from *Scutellaria albida* subsp. *Colchica*. *Phytochemistry* 32, 1213-1217.

Cantón, R., García, J., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J., and García, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Básicos Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos en Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor Picazo J J.

Casewell, M., and Hill, R. (1986). The carrier state: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 18.

Cyted (1995). Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia para el Desarrollo y Tecnología. Editado por CYTED.

Cole, M.D., Anderson, J.C., Blaney, W.M., Fellows, L.E., Ley, S.V., Sheppard, R.N., and Simmonds, M.S. (1990). Neo-clerodane insect antifeedants from *Scutellaria galericulata*. *Phytochemistry* 29, 1793-1796.

Constabel, F. Medicinal plant biotechnology. *Planta Med.* 56:421–425; 1990.

Chang, H.-M., and But, P.P.-H. (1986). *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*, 1986 World Scientific (Singapore).

Chirikova, N., Olennikov, D., and Tankhaeva, L. (2010). Pharmacognostic study of aerial parts of Baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi). *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 36, 909-914.

Chou, C. (1978). Rivularin, a new flavone from *Scutellaria rivularis*. *J Taiwan Pharm Assoc* 30, 36-43.

Chou, C., and Lee, S. (1986). Studies on the constituents of *Scutellaria indica* root (I). *J Taiwan Pharm Assoc* 38, 107-118.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:564-82.

Dai, S.-J., Tao, J.-Y., Liu, K., Jiang, Y.-T., and Shen, L. (2006). *neo*-Clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities. *Phytochemistry* 67, 1326-1330.

Delange, D.M., Rico, C.L.M., González, C., Salas, O., Sierra, P., Rodríguez, L., and Vicente, M. (2012). Tamizaje fitoquímico de *Scutellaria havanensis* Jacq.
Ducki, S.W., Hadfield, J.A., Lawrence, N.J., Liu, C.-Y., McGown, A.T., and Zhang, X. (1996). Isolation of E-1-(4'-Hydroxyphenyl)-but-1-en-3-one from *Scutellaria barbata*.

Duke, J.A. (1990). CRC handbook of medicinal herbs. *International Clinical Psychopharmacology* 5, 74.

Ezer, N., Akcos, Y., and Rodriguez, B. (1998). Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria orientalis* subsp. *sintensisii*. *Phytochemistry* 49, 1825-1827.

Felter, H., and Lloyd, J. (1898). The herb of *Scutellaria lateriflora*, Linné. The green herb is preferred in Eclectic pharmacy.

Franzblau, S.G., Witzig, R.S., McLaughlin, J.C., Torres, P., Madico, G., Hernandez, A., Degnan, M.T., Cook, M.B., Quenzer, V.K., and Ferguson, R.M. (1998). Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 362-366.

Fu, J., Cao, H., Wang, N., Zheng, X., Lu, Y., Liu, X., Yang, D., Li, B., Zheng, J., and Zhou, H. (2008). An anti-sepsis monomer, 2', 5, 6', 7-tetrahydroxyflavanonol (THF), identified from *Scutellaria baicalensis* Georgi neutralizes lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*. *International immunopharmacology* 8, 1652-1657.

Gao, J., Morgan, W.A., Sanchez-Medina, A., and Corcoran, O. (2011). The ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology* 254, 221-228.

Gao, Z., Huang, K., Yang, X., and Xu, H. (1999). Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1472, 643-650.

González, R.T. (2005). La transición desde lo etnobotánico hacia usos comerciales de plantas colombianas.

Graham, J., Quinn, M., Fabricant, D., and Farnsworth, N. (2000). Plants used against cancer—an extension of the work of Jonathan Hartwell. *Journal of ethnopharmacology* 73, 347-377.

Habel K. Habel test for potency. Annex: Calculating 50 % end-point dilutions by the method of Reed and Muench. En: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneva: WHO, 1996:371-2

Hacek, D.M., Dressel, D.C., and Peterson, L.R. (1999). Highly reproducible bactericidal activity test results by using a modified National Committee for Clinical Laboratory Standards broth macrodilution technique. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 1881-1884.

Herreno, N., Pombo, L., and Mejia, A. (2001). Análisis fitoquímico preliminar y cromatografía en capa delgada de dos especies de alegría (*S. incarnata* Venth. y *Scutellaria coccinea*). *Órgano Informativo De La Escuela De Medicina Juan N Corpas / Fundación Escuela De Medicina Juan N Corpas* 14, 15-34.

Himeji, M., Ohtsuki, T., Fukazawa, H., Tanaka, M., Yazaki, S.-i., Ui, S., Nishio, K., Yamamoto, H., Tasaka, K., and Mimura, A. (2007). Difference of growth-inhibitory effect of *Scutellaria baicalensis*-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell. *Cancer letters* 245, 269-274.

Hoareau, L., and DaSilva, E.J. (1999). Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology* 2, 3-4.

Horna Quintana, G., Silva Diaz, M., and Vicente Taboada, W. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered* 16, 39-45.

Huang, K.C., and Williams, W.M. (1999). *The pharmacology of Chinese herbs*, Vol 874 (CRC Press LLC).

Hui, K.M., Huen, M.S.Y., Wang, H.Y., Zheng, H., Sigel, E., Baur, R., Ren, H., Li, Z.W., Wong, J., and Xue, H. (2002). Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochemical pharmacology* 64, 1415-1424.

Jackson, L.C., Machado, L.A., and Hamilton, M.L. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica* 8, 13-27.

Juan, M. (1994). Infección urinaria. *Rev Med Hered* 5, 97-104.

Kanegusuku, M., Benassi, J. C., Pedrosa, R., Yunes, R. A., Filho, V., Maia, A., de Souza, M. M., Monache, F., and Niero, R. (2002). Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). *Zeitschrift fur naturforschung c* 57(3/4), 272-276.

Kim, B.R., Kim, D.H., Park, R., Kwon, K.B., Ryu, D., Kim, Y.C., Kim, N.Y., Jeong, S., Kang, B.K., and Kim, K.S. (2001). Effect of an Extract of the Root of *Scutellaria baicalensis* and its Flavonoids on Aflatoxin B 1 Oxidizing Cytochrome P 450 Enzymes. *Planta medica* 67, 396-399.

Kim, H.-M., Moon, E.-J., Li, E., Kim, K.-M., Nam, S.-Y., and Chung, C.-K. (1999). The nitric oxide-producing activities of *Scutellaria baicalensis*. *Toxicology* 135, 109-115.

Lam, T., Lam, M., Au, T., Ip, D., Ng, T., Fong, W., and Wan, D. (2000). A comparison of human immunodeficiency virus type-1 protease inhibition activities by the aqueous and methanol extracts of Chinese medicinal herbs. *Life sciences* 67, 2889-2896.

Langfield, R.D., Scarano, F.J., Heitzman, M.E., Kondo, M., Hammond, G.B., and Neto, C.C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. *Journal of ethnopharmacology* 94, 279-281.

Lee, H., Kim, Y., Choi, I., Min, B.S., and Shim, S.H. (2010). Two novel neoclerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20, 288-290.

Lewington, A. (1993). *Medicinal Plants and Plant Extracts: A review of their importation into Europe*. Traffic International, Cambridge, UK.

Li-Weber, M. (2009). New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. *Cancer Treatment Reviews* 35, 57-68.

Li, J., Ding, Y., Li, X.-C., Ferreira, D., Khan, S., Smillie, T., and Khan, I.A. (2009). Scuteflorins A and B, Dihydropyranocoumarins from *Scutellaria lateriflora*. *Journal of natural products* 72, 983-987.

Lin, C.-C., Shieh, D.-E., and Yen, M.-H. (1997). Hepatoprotective effect of the fractions of Ban-zhi-lian on experimental liver injuries in rats. *Journal of ethnopharmacology* 56, 193-200.

López-Brea, M., and Domingo, D. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia* 16, 385-393.

Lorente Garín, J., Placer Santos, J., Salvadó Costa, M., Segura Álvarez, C., and Gelabert-Mas, A. (2005). Evolución de la resistencia antibiótica en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. *Revista clinica espanola* 205(6), 259-264.

Lowy, F.D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 339, 520-532.

Ma, S.-C., Du, J., But, P.P.-H., Deng, X.-L., Zhang, Y.-W., Ooi, V.E.-C., Xu, H.-X., Lee, S.H.-S., and Lee, S.F. (2002). Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of ethnopharmacology* 79, 205-211.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. (2003). *Biología de los microorganismos: Brock*, 10^a edn (Prentice Hall).

Marinoff, M. A., Zago, G. L., Pzocik, H. J., CHIFA, C., and GIMÉNEZ, M. (2005). Contribución al conocimiento de la actividad farmacológica de *Medicago sativa* L.(Fabaceae),“alfalfa”. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas* 2005.

Marrero Delange, D., Morales Rico, C.L., González Canavaciolo, V.L., Salas Oliver, E., Sierra Pérez, R.d.I.C., Rodríguez Leyes, E.A., and Vicente Murillo, R. (2012). Tamizaje fitoquímico de *Scutellaria havanensis* Jacq. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17, 402-407.

Martínez, M. (2001). Saponinas esteroides. *Revista UDEA* 3, 2-19.

Martínez, M. M., Ocampo, D. M., Galvis, J. H., and Valencia, A. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L.(Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 16(4), 313-323.

Martino, V. (2000). Los Flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 19(4), 303-308.

Mclaughlin, J. L., Rogers, L. L., and Anderson, J. E. (1998). The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug information journal* 32(2), 513-524.

Mendelsohn, R., and Balick, M.J. (1995). The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany* 49, 223-228.

Miyaichi, y., imoto, y., tomomimori, t., and lin, c.c. (1987). Studies on the Constituents of *Scutellaria* Species. IX.: On the Flavonoid Constituents of the Root of *Scutellaria indica* L.(Pharmacognosy, Chemical). *Chemical & pharmaceutical bulletin* 35, 3720-3725.

Miyaichi, y., imoto, y., tomomimori, t., and lin, c.c. (1989). Studies on the Constituents of *Scutellaria* Species. XI.: On the Flavonoid Constituents of the

Aerial Parts of *Scutellaria indica* L. Chemical & pharmaceutical bulletin 37, 794-797.

Miyaichi, Y., Kizu, H., Yamaguchi, Y., and Tomimori, T. (1994). Studies on the constituents of *Scutellaria* species. XV. On the diterpenoid constituents of the leaves of *Scutellaria alpina* L]. Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan 114, 264.

Miyaichi, Y., Morimoto, T., Yaguchi, K., and Kizu, H. (2006). Studies on the constituents of *Scutellaria* species (XXI): constituents of the leaves of *Scutellaria strigillosa* Hemsley. Journal of Natural Medicines 60, 157-158.

Miyaichi, Y., Y. Imoto, H. Kizu, and T. Tomimori. (1988). Studies on the Nepalese Crude Drugs. IX.: On the Flavonoid Constituents of the Root of *Scutellaria scandens* BUCH.-HAM. ex D. DON. Chemical & pharmaceutical bulletin 36, 2371-2376.

Muzquiz, M. (2000). Factores antinutricionales en fuentes proteicas. En: Jornada internacional sobre proteínas Alimentarias Vioque J, Clemente A, Bautista J y Millán F, 131-139.

Nirmal Joshee, T.S.P., Rao S. Mentreddy, and Anand K. Yadav (2001). Skullcap (*Scutellaria* species): A potential medicinal crop. New Crops and New Uses: Strength in Diversity.

Noble, W., Valkenburg, H., and Wolters, C.H. (1967). Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. Journal of Hygiene 65, 567-573.

Núñez, C.E. (2008). Extracciones con equipo Soxhlet. Obtenido el 15.
Ojito Ramos, K., Herrera Sánchez, Y., Vega Pérez, N., and Portal Villafaña, O. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp.(Rutaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales 17(4), 368-379.

Okazaki, S., Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., and Yuasa, H. (2007). New triterpene saponins from *Stenocereus eruca* (Cactaceae). Journal of Natural Medicines 61, 24-29

Oliveira, A.B.d., Mendonça, M.S.d., and Meira, R.M. (2013). Anatomy of vegetative organs of *Scutellaria agrestis*, a medicinal plant cultivated by riverine populations of the Brazilian Amazon. Revista Brasileira de Farmacognosia, 0-0.

Ortiz, B. (2012). Colibríes Asociados a *Scutellaria incarnata* Vent en la Reserva Forestal Protectora Tarpeya del Municipio de Iquira - Huila (Neiva, Universidad Surcolombiana).

Osorio, E. (2009). Aspectos básicos de farmacognosia.

Pant, C.C., Melkani, A.B., Mohan, L., and Dev, V. (2012). Composition and antibacterial activity of essential oil from *Scutellaria grossa* Wall ex Benth. *Natural Product Research* 26, 190-192.

Paton, A. (1990). A global taxonomic investigation of *Scutellaria* (Labiatae). *Kew Bull.* 45:399-450.

Pérez-Cano, H.J., and Robles-Contreras, A. (2004). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. 4.

Pérez, D., Lannacone, J., and Tueros, A. (2008). Toxicidad de *paullinia clavigera* schtdl. (sapindaceae) y *chondrodendron tomentosum* ruiz et pav. (menispermaceae) sobre el piojo saltador del camu camu *tuthillia cognata* (hemiptera: psyllidae). *Gayana Bot* 65(2), 145-152

Perez , L. (2010). Aislamiento y caracterización de compuestos de plantas del noreste de México con actividad contra cepas de *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Aeromonas hydrophila*. . In *Química Analítica* (Monterrey Mexico, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL)), pp. 150.

Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 22(1), 0-0.

Poblete, H., Roffael, E., and Miertzsch, H. (2010). Extraíbles de cortezas chilenas: efecto sobre la luminiscencia de bacterias. *Maderas. Ciencia y tecnología* 9(1), 79-84.

Purves, W. K., Hermitte, G., and Fernández, J. J. G. (2003). "Vida: la ciencia de la biología." Editorial Médica Panamericana.

Raccuglia, R.A., Bellone, G., Loziene, K., Piozzi, F., Rosselli, S., Maggio, A., Bruno, M., and Simmonds, M.S. (2010). Hastifolins A–G, antifeedant neoclerodane diterpenoids from *Scutellaria hastifolia*. *Phytochemistry* 71, 2087-2091.

Ramírez, A., Stella, L., and Marín Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia*.

Reija Otero, B. (2007). Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes (Univ Santiago de Compostela).

Rojas Campos, N. (1995). El lipopolisacárido bacteriano: una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas, recientes avances en estructura, genética y bioquímica; Lipopolysaccharides, bacterial: an potent endotoxin with multiples biological activities. *Rev. costarric. cienc. méd* 16(3), 71-84.

Romero, A., Zeinsteger, P., Teibler, P., Montenegro, M., Ruiz, R., and Rios, E. (2003). Toxicidad hepática de componentes volátiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones. Resumen

Russo, T.A., and Johnson, J.R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Journal of Infectious Diseases* 181, 1753-1754.

Sanabria, O.L. (2001). Manejo vegetal en agroecosistemas tradicionales de Tierradentro, Cauca, Colombia (Editorial Universidad del Cauca).

Sanabria, B. G. (2008). Evolución de la resistencia en *Staphylococcus aureus*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 3, 27-39.

Sánchez Perera, L. M., Fraga Chávez, I., Macebo Dorveny, B., and Miranda, R. L. (2008). Toxicidad aguda y subaguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Rhizophora mangle* L. en ratas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 13(3), 0-0.

Sánchez Pérez, Y. (2011). Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de representantes de la tribu Pipereae. *Revista de Protección Vegetal* 26, 204-204.

Sarin, R. (2005). Useful metabolites from plant tissue cultures. *Biotechnology* 4, 79-93.

Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., and Higuti, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology* 72, 483-488.

Schinella, G., Tournier, H., Prieto, J., De Buschiazzo, P.M., and Rios, J. (2002). Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life sciences* 70, 1023-1033.

Seong, I. (2004). Antimicrobial Activities of *Scutellaria baicalensis* and *Phellodendron amurense* Against MRSA and *Candida*. *The Korean Journal of Microbiology* 40.

Shang, X., He, X., He, X., Li, M., Zhang, R., Fan, P., Zhang, Q., and Jia, Z. (2010). The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of ethnopharmacology* 128, 279-313.

ShanShan, G., YuJing, S., YingJie, G., Dan, S., and XiaoLan, C. (2009). The cytology mechanism of anti-parainfluenza virus infection of total flavone of *Scutellaria barbata*. *Acta Pharmaceutica Sinica* 44, 1348-1352.

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*, Vol 78 (Convenio Andrés Bello).

Skaltsa, H.D., Lazari, D.M., Mavromati, A.S., Tiligada, E.A., and Constantinidis, T.A. (2000). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. *Planta medica* 66, 672-673.

Song, W. (1981). Studies on the resource of the Chinese herb *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Acta Pharm Sin* 16, 139-145.

Stojakowska, A., and Kisiel, W. (1999). Secondary metabolites from a callus culture of *Scutellaria columnae*. *Fitoterapia* 70, 324-325.

Sussman, M. (1997). *Escherichia coli: mechanisms of virulence* (Cambridge University Press).

Tafur, J.D., Torres, J.A., and Villegas, M.V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio* 12, 217-226.

Tamargo, J. (1971). Un viejo trabajo sobre cardiotónicos. *JANO* 1, 15-16.

Tan, B.K., and Vanitha, J. (2004). Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. *Current medicinal chemistry* 11, 1423-1430.

Tejerina, W., Farfán, R., and Cuevas, C. (2007). Efectos del Amoniaco, sulfuro y taninos sobre la actividad de un lodo anaeróbico. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* 11, 06.23-06.28.

Tobar, L. (2010). Estudio micromorfológico, estructural y caracterización molecular de las reservas de semillas de *Scutellaria incarnata* vent. In *Biología General* (Popayán, Universidad Del Cauca).

Tomimori, T., Imoto, Y., and Miyaichi, Y. (1990). Studies on the constituents of *Scutellaria* species. XIII. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria rivularis* Wall. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 38, 3488-3490.

Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H., and Namba, T. (1985). Studies on nepalese crude drugs. V: On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria discolor* COLEBR.(1). *Chemical and pharmaceutical bulletin* 33, 4457-4463.

- Tomimori, T., Miyaichi, Y., Imoto, Y., Kizu, H., and Namba, T. (1986). Studies on the nepalese crude drugs. VI: On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria discolor* COLEBR.(2). Chemical and pharmaceutical bulletin 34, 406-408.
- Tsao, S.-m., and Yin, M.-c. (2001). In vitro activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 47, 665-670.
- Vanisree, M., Lee, C.-Y., Lo, S.-F., Nalawade, S.M., Lin, C.Y., and Tsay, H.-S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. Bot Bull Acad Sin 45, 1-22.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., and Memelink, J. (2000). Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. Transgenic research 9, 323-343.
- Vioque, J. (2000). Jornada internacional sobre proteínas alimentarias, Vol 47 (Universidad de Sevilla).
- Wang, H.-H., Liao, J.-F., and Chen, C.-F. (2000). Anticonvulsant effect of water extract of *Scutellariae radix* in mice. Journal of ethnopharmacology 73, 185-190.
- Wang, T.-s., Wang, S.-q., and Xiao, D.-I. (2012). A review of phytochemistry and antitumor activity of a valuable medicinal species: *Scutellaria barbata*. Journal of Medicinal Plants Research, 4259.
- Wang, Z.Q., Xu, F.M., Yan, X.Z., and Zhu, Y. (1996). Scutebarbatine A, a new neoclerodane-type diterpenoid alkaloid from *Scutellaria barbata*. Chin Chem Lett 7, 333-334.
- Wenzel, R., and Perl, T. (1995). The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and the incidence of postoperative wound infection. Journal of Hospital Infection 31, 13-24.
- Wilkinson, J.M. (2006). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs, 157-171.
- Yaghmai, M.S. (1988). Volatile constituents of *Scutellaria lateriflora* L. Flavour and fragrance journal 3, 27-31.
- Yang, Z.-C., Wang, B.-C., Yang, X.-S., Wang, Q., and Ran, L. (2005). The synergistic activity of antibiotics combined with eight traditional Chinese medicines against two different strains of *Staphylococcus aureus*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 41, 79-81.

- Yu, J., Lei, J., Yu, H., Cai, X., and Zou, G. (2004). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria barbata*. *Phytochemistry* 65, 881-884.
- Yufer, E. (2007). *Química orgánica básica aplicada: de la molécula a la industria*, Reverte edn (Barcelona.universidad politécnica de valencia).
- Zargari, A. (1810). *Medicinal plants*. Iran: Tehran University Publications 4.
- Zargari, A. (1990). *Medicinal Plants*. Tehran. University Press 4, 574-578.
- zepeda (1978). Método de estudio de susceptibilidad de staphylococcus aureus a los antimicrobianos. *REV MED HONDUR* 47.
- Zhang, Z., Lian, X.-y., Li, S., and Stringer, J.L. (2009). Characterization of chemical ingredients and anticonvulsant activity of American skullcap (*Scutellaria lateriflora*). *Phytomedicine* 16, 485-493.
- Zhou, L., Zhang, Y., Cai, Y., Liu, Y., Wang, J., Wang, J., and Yang, C. (1997). Antifungal activities in vitro of flavonoids and steroids from medicinal plants. *Natural Product Research and Development* 9, 24-29.
- Zhu, P., and Liu, G. (1993). Isolation and identification of the diterpenoid and flavone in *Scutellaria barbata* D. Don *J Plant Resour Environ* 2, 63-64.