

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DE LAS  
FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA DE COLUMNA  
PROCEDENTES DEL EXTRACTO DICLOROMETANICO DE LA GOMA-  
RESINA DE *Eucalyptus citriodora* (EUCALIPTO).**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR  
SONIA IVETTE RENDON SOSA  
LUCI NOEMY TORRES ORELLANA**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA.**

MARZO, 2012  
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

## **COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION**

### **COORDINADORA GENERAL**

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez

### **ASESORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

### **DOCENTES DIRECTORES**

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios y a la Virgen María:**

Por darnos sabiduría, paciencia, fortaleza y por poner en nuestro camino las personas indicadas para llevar a cabo uno de nuestros sueños.

### **A nuestros Docentes Directores:**

MSc. Morena Lizette Martínez de Díaz, MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez e Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda por el tiempo, paciencia, dedicación, conocimientos y sobre todo el apoyo brindado para poder realizar nuestro trabajo. Gracias por habernos guiado.

### **A la Coordinadora General y Coordinadoras de Área:**

Licda. María Odette Rauda, Msc. Sonia Maricela Lemus y Licda. Ivonne Arévalo de Márquez por ser objetivas en sus evaluaciones y su buena crítica que ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Marvin Núñez, a la Licda. Rina Antonieta Toledo y Licda. Susana Doño por su apoyo y ayuda desinteresada.

Y demás personas que contribuyeron para la realización y finalización de esta meta. Infinitas gracias y que Dios los Bendiga por siempre.

Luci y Sonia.

## **DEDICATORIA**

### **A Dios y a la Virgen María**

Por brindarme toda su protección, por darme sabiduría, fuerzas en los momentos que creí ya no poder seguir más y haberme permitido llegar hasta aquí y culminar uno de mis más grandes sueños.

### **A mis Padres:**

José Wilfredo Rendón y Blanca Sonia de Rendón. Por el sacrificio de todos estos años, por su amor, paciencia, apoyo y comprensión. Sin ustedes yo no hubiera podido alcanzar esta meta.

### **A mis hermanos:**

Karen Astrid Rendón y Christian Wilfredo Rendón por motivarme a seguir adelante, por creer en mí y por haberme acompañado en algunas noches de desvelos.

### **A mi compañera:**

Luci, por ser una gran persona, excelente amiga y compañera. Dios no me pudo poner mejor persona que tu. Gracias por tu comprensión y ayuda, sin ti esto tampoco sería posible.

### **A mis amistades:**

Liss, Jessica y Kike por haberme acompañado en este camino, hasta en los momentos más difíciles y por la ayuda brindada. Mil gracias.

Sonia Ivette Rendón

## **DEDICATORIA**

### **A Dios Todopoderoso y a la Santísima Virgen María**

Por iluminarme y guiarme por el buen camino, además de brindarme la sabiduría y la fortaleza necesaria para permitirme alcanzar esta etapa tan importante de mi vida.

### **A mis Padres**

Roberto Torres y Marinella Orellana de Torres. Por brindarme todo su amor y con especial agradecimiento a su sacrificio y apoyo incondicional; lo cual, hizo posible la culminación de mi Carrera.

### **A mis hermanos**

Roberto Edgardo, William Alexander y David Ernesto por motivarme a seguir adelante, por creer en mí y por estar conmigo en todo momento.

### **A mi compañera**

Sonia, por ser una gran persona, excelente compañera y sobre todo amiga. Agradezco a Dios por ponerte en mi camino y haber compartido contigo una de mis grandes metas. Te quiero mucho.

### **A mis amistades**

Lissette, Jessica y Enrique, agradecerles por haber compartido conmigo momentos difíciles y también momentos felices a lo largo de este caminar juntos. Los quiero muchísimo.

A todas mis amigas y compañeras que manifestaron su apoyo a lo largo de mi carrera.

Luci Noemy Torres Orellana

## INDICE

	N° Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xix
Capítulo II	
2.0 Objetivos	22
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	24
3.1 Generalidades del eucalipto	25
3.2 Exudados de las plantas	29
3.3 Generalidades sobre los metabolitos secundarios	30
3.3.1 Terpenos	30
3.3.1.1 Monoterpenos	30
3.3.1.2 Sesquiterpenos	31
3.3.1.3 Diterpenos	32
3.3.1.4 Triterpenos	33
3.3.2 Antranósidos	34
3.3.3 Flavonoides	35
3.3.4 Compuestos fenólicos	36
3.3.4.1 Ácidos cinámicos	37
3.3.4.2 Ácidos benzoicos	37
3.4 Métodos de extracción	38
3.5 Generalidades sobre cromatografía	41
3.5.1 Cromatografía en columna	44
3.6 Generalidades sobre <i>Candida albicans</i>	45
3.7 Generalidades sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	46

3.8 Método de difusión en placa	47
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	49
4.1 Tipo de estudio	49
4.2 Investigación bibliográfica	49
4.3 Universo y muestra	49
4.4 Investigación de campo	50
4.5 Parte experimental	50
4.5.1 Caracterización organoléptica de la goma-resina de <i><b>Eucalyptus citriodora</b></i>	51
4.5.2 Obtención del extracto etanólico de la goma-resina del <i><b>Eucalyptus citriodora</b></i>	51
4.5.3 Obtención del extracto diclorometánico de la goma-resina de <i><b>Eucalyptus citriodora</b></i>	52
4.5.4 Cromatografía en columna	53
4.5.5 Ensayos microbiológicos	56
4.5.5.1 Pruebas de identificación microbiológica	56
4.5.5.2 Determinación del potencial de inhibición	58
Capitulo V	
5.0 Resultados	61
5.1 Caracterización organoléptica de la goma-resina de <i><b>Eucalyptus citriodora</b></i>	61
5.2 Cuantificación del rendimiento del extracto etanólico de la goma- resina de <i><b>Eucalyptus citriodora</b></i>	62
5.3 Cuantificación del rendimiento del extracto diclorometánico de la goma-resina de <i><b>Eucalyptus citriodora</b></i>	64
5.4 Cromatografía en columna	65

5.5 Preparación de las diluciones a diferentes concentraciones de las fracciones <i>n</i> -hexano/AcOEt al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro de la goma-resina de <b><i>Eucalyptus citriodora</i></b>	68
5.6 Resultados de la evaluación microbiológica	68
5.6.1 Pruebas de identificación de <b><i>Candida albicans</i></b> y <b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	68
5.6.2 Resultados de la determinación del potencial de inhibición para <b><i>Candida albicans</i></b>	71
5.6.3 Resultados de la determinación del potencial de inhibición para <b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	78
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	88
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	91
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

## INDICE ANEXOS

### ANEXO N°

1. Instalaciones de laboratorios
2. Metodología general de trabajo
3. Metodología general de trabajo (Análisis Microbiológico)
4. Análisis de la composición de las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de columna del extracto diclorometánico por cromatografía en capa fina.
5. Resultados de la Cromatografía en Capa Fina.
6. Técnica de la tinción de Gram
7. Cálculos para la preparación de las fases móviles utilizadas en la cromatografía de columna
8. Cromatografía en columna. Obtención de las fracciones *n*-hexano: acetato de etilo 10%, 30%, 50% y 70%, acetato de etilo puro y metanol puro.
9. Cálculos para la preparación de las diluciones a diferentes concentraciones de las fracciones *n*-hexano/AcOEt al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***
10. Determinación del potencial de inhibición por el Método de Kirby Bauer Modificado
11. Certificación del genero y especie ***Eucalyptus citriodora***
12. Materiales, equipos, reactivos y solventes

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°		N° Pág.
1.	Metabolitos Secundarios aislados del <b><i>Eucalyptus citriodora</i></b> .	28
2.	Características macroscópicas de los microorganismos de prueba en su medio de cultivo.	57
3.	Características microscópicas de los microorganismos de prueba en las diferentes tinciones.	57
4.	Pesos obtenidos de las fracciones a ensayar para análisis microbiológicos.	67
5.	Características macroscópicas de los microorganismos de prueba en su medio de cultivo. (Resultados)	68
6.	Características microscópicas de microorganismos de prueba en las diferentes tinciones. (Resultados)	69
7.	Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30%, 50%, 70%, Acetato de etilo puro y Metanol puro) obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometanico de la goma-resina de <b><i>Eucalyptus citriodora</i></b> , por el método de Kirby Bauer Modificado para <b><i>Candida albicans</i></b> .	71
8.	Controles utilizados en los ensayos microbiológicos.	73
9.	Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30%, 50%, 70%, Acetato de etilo puro y Metanol puro) obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometanico de la goma-resina de <b><i>Eucalyptus citriodora</i></b> , por el método de Kirby Bauer Modificado para <b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b> .	78
10.	Controles utilizados en los ensayos microbiológicos.	80

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°		N° Pág.
1.	Árbol de <i>Eucalyptus citriodora</i>	24
2.	Hojas de <i>Eucalyptus citriodora</i>	25
3.	Goma-resina de <i>Eucalyptus citriodora</i>	26
4.	Estructura del isopreno	30
5.	Estructura del citral	31
6.	Estructura del bisabolol	31
7.	Estructura del taxol	32
8.	Estructura del ácido glicirrético	33
9.	Estructura de la shikonina	35
10.	Estructura de la chalcona	36
11.	Estructura del ácido caféico	37
12.	Estructura del ácido gálico	38
13.	Partes del Equipo Soxhlet	39
14.	Morfología microscópica de la cepa <i>Candida albicans</i>	45
15.	Morfología microscópica de la cepa <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	46
16.	Equipo Rota evaporador	52
17.	Preparación y relleno de la columna cromatográfica.	53
18.	Preparación de la muestra (Extracto diclorometánico).	54
19.	Vista de la columna cromatográfica de la elución de las fracciones.	56
20.	Goma-resina de <i>Eucalyptus citriodora</i>	61
21.	Recolección de la goma-resina de <i>Eucalyptus citriodora</i>	61
22.	Pulverización de la goma-resina de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	62
23.	Extracción alcohólica de la goma resina de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	63

24.	Evaporación del etanol	63
25.	Partición agua /Diclorometano del extracto etanólico.	65
26.	Extracto diclorometánico	65
27.	Fracciones al 10%, 30%, 50%, 70%, Acetato de etilo puro y metanol puro respectivamente.	67
28.	Morfología de <b>Candida albicans</b> en agar saboraud.	69
29.	Morfología de <b>Trichophyton mentagrophytes</b> en agar saboraud.	69
30.	Morfología de <b>Candida albicans</b> en tinción al Gram.	70
31.	Morfología de <b>Trichophyton mentagrophytes</b> en lactofenol.	70
32.	Resultados de la evaluación antimicótica contra <b>Candida albicans</b> , correspondientes a la concentración de 5000 ppm de cada fracción.	75
33.	Resultados de la evaluación antimicótica contra <b>Candida albicans</b> , correspondientes a la concentración de 10000 ppm de cada fracción.	76
34.	Resultados de la evaluación antimicótica contra <b>Candida albicans</b> , correspondientes a la concentración de 15000 ppm de cada fracción.	77
35.	Resultados de la evaluación antimicótica de cada fracción contra <b>Trichophyton mentagrophytes</b> , correspondientes a la concentración de 5000 ppm.	82
36.	Resultados de la evaluación antimicótica de cada fracción contra <b>Trichophyton mentagrophytes</b> , correspondientes a la concentración de 10000 ppm.	83
37.	Resultados de la evaluación antimicótica de cada fracción contra <b>Trichophyton mentagrophytes</b> , correspondientes a la concentración de 15000 ppm.	84

38. Comparación del efecto inhibitorio de las concentraciones de las fracciones de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** en ***Candida albicans***. 85
39. Comparación del efecto inhibitorio de las concentraciones de las fracciones de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** en ***Trichophyton mentagrophytes***. 86

## ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
$\mu\text{g}$	microgramo
mg	miligramo
mg/mL	miligramo por mililitro
cm	centímetro
m	metro
mm	milímetro
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear por protones
MO/mL	microorganismo por mililitro
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
BaCl <sub>2</sub>	cloruro de bario
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol

## RESUMEN

La presente investigación pretende aportar, una alternativa en la búsqueda de un fitofármaco con actividad antimicótica; debido a que los hongos van adquiriendo resistencia contra los medicamentos antimicóticos sintéticos porque éstos poseen tratamientos prolongados, con un elevado costo económico y ocasionan como efecto secundario hepatotoxicidad, por lo cual se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces, mediante el descubrimiento de moléculas bioactivas, que pueden ser aisladas de fuentes naturales, principalmente de especies vegetales.

Las plantas medicinales constituyen una fuente natural importante en la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas de interés para la industria farmacéutica como lo es el árbol de ***Eucalyptus citriodora*** que exuda una goma-resina a través de su tronco, la cual posee propiedades antimicrobianas que han sido comprobadas en investigaciones anteriores, cuyos resultados promovieron a continuar el estudio de esta especie.

Para la realización de esta investigación se inició con la recolección de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***, para obtener el extracto etanólico de la goma-resina se utilizó el equipo soxhlet, del cual se parte para realizar la partición agua/diclorometano, obteniendo el extracto diclorometánico, el cual se utilizó para realizar la columna cromatográfica, en donde se obtuvieron las fracciones al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro, con las cuales, se evaluó la actividad antimicótica de tres concentraciones de cada una de las fracciones, mediante el método microbiológico Kirby Bauer Modificado, utilizando las cepas de ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes***. Así mismo se utilizaron discos de Ketoconazol como patrón de comparación. De

acuerdo a los resultados obtenidos se confirmó la actividad antimicótica del extracto diclorometánico de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora***.

Las fracciones con mayor actividad antimicótica fueron *n*-hexano:acetato de etilo 30% y *n*-hexano:acetato de etilo 50%, cuya actividad se presume a la presencia de sustancias de naturaleza terpénica y compuestos fenólicos, comprobando así que las fracciones antes mencionadas poseen actividad antimicótica contra ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes***.

Por lo que se recomienda continuar el estudio de las fracciones del 30% y 50%, a fin de aislar y elucidar los compuestos que poseen la actividad antimicótica, con el objetivo de poder validar la metodología de extracción y así en un futuro proceder a formular un fitofármaco.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

Las infecciones micóticas incluyen hongos de tipo moho que causan: pie de atleta, tiña, etc., y las del tipo levaduriformes, como la candida e incluyen: Candidiasis cutánea, dermatitis de pañal y en algunos casos de erupciones genitales.

Las micosis superficiales se deben principalmente a especies de los géneros ***Microsporum, Trichophyton y Epidermophyton***, que en conjunto se conocen como dermatófitos.<sup>(3)</sup> Los dermatófitos son hongos saprófitos cuya única alimentación es la queratina de la epidermis, por eso crecen en extensión buscando alimento. Pero puede haber otros hongos contaminantes y levaduras (***Candida albicans***) y/o bacterias que compliquen y agraven la evolución patológica del problema.<sup>(8)</sup>

La presente investigación está orientada a la búsqueda de una alternativa terapéutica (fitofármaco) para el tratamiento de las enfermedades micóticas causadas por ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes***; ya que en El Salvador este tipo de enfermedades se encuentran entre las diez primeras causas de morbilidad; convirtiéndose en un problema de salud pública<sup>(17)</sup>, esto puede deberse a que existe resistencia del agente etiológico al producto; por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces, mediante el descubrimiento de moléculas bioactivas, las cuales pueden ser aisladas de fuentes naturales, principalmente de especies vegetales.<sup>(14, 24)</sup>

Una de las especies vegetales con mayores bondades en el área de la salud es el ***Eucalyptus citriodora*** (eucalipto), la cual exuda una goma-resina a través de su tronco, que posee propiedades antimicrobianas; que han sido comprobadas en investigaciones anteriores<sup>(23)</sup>; estos resultados promovieron

continuar el estudio de esta especie, determinando propiedades antimicóticas *in vitro* de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***; iniciando con la recolección de la muestra (goma-resina), para luego obtener el extracto etanólico utilizando un equipo soxhlet, posteriormente, se realizó la partición agua/diclorometano obteniéndose el extracto acuoso y el diclorometánico. El extracto diclorometánico fue sometido a un fraccionamiento utilizando una cromatografía de columna eluyéndose con mezclas de solventes y solventes puros, iniciando con *n*-hexano y luego con mezclas de *n*-hexano:acetato de etilo al 10%, 30%, 50% y 70%, acetato de etilo puro y metanol, obteniendo de esta forma siete fracciones. A cada una de las fracciones obtenidas se les realizó una evaluación microbiológica utilizando el método de Kirby Bauer Modificado, con el fin de determinar la actividad antimicótica contra los hongos: ***Candida albicans***<sup>(2)</sup> y ***Trichophyton mentagrophytes***<sup>(3)</sup>, ambos causantes frecuentes de dermatomicosis; los cuales fueron comparados con discos de antimicóticos estandarizados de Ketoconazol. De acuerdo a los resultados obtenidos se confirmó la actividad antimicótica del extracto diclorometánico de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora***.

Las fracciones con mayor actividad antimicótica fueron las mezclas *n*-hexano:acetato de etilo 30% y *n*-hexano:acetato de etilo 50%, cuya actividad se presume a la presencia de sustancias de naturaleza terpénica y compuestos fenólicos, comprobando así que las fracciones antes mencionadas poseen actividad antimicótica contra ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes***, respectivamente. La extracción, partición y fraccionamiento de la goma-resina se realizaron en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia; y la evaluación de la actividad antimicótica de las fracciones se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), de la Universidad de El Salvador durante el tercer trimestre del año 2011.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicótica de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Obtener el extracto etanólico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, por medio del método de extracción continua (soxhlet).

2.2.2 Realizar la partición líquido-líquido (agua/diclorometano) de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

2.2.3 Obtener las fracciones, *n*-hexano:acetato de etilo 10%, 30%, 50% y 70%, acetato de etilo puro y metanol puro, a partir de la cromatografía de columna del extracto diclorometánico.

2.2.4 Comprobar la actividad antimicótica de las fracciones *n*-hexano: acetato de etilo 10%, 30%, 50% y 70%; acetato de etilo puro y metanol puro, por el método microbiológico Kirby Bauer Modificado, contra los hongos *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1 GENERALIDADES DEL EUCALIPTO<sup>(23)</sup>

Nombre común: Eucalipto limón, Eucalipto aromático, Gomero de olor a limón.

Nombre científico: *Eucalyptus citriodora*

Familia: Myrtaceae.

Subfamilia: Leptospermoideae

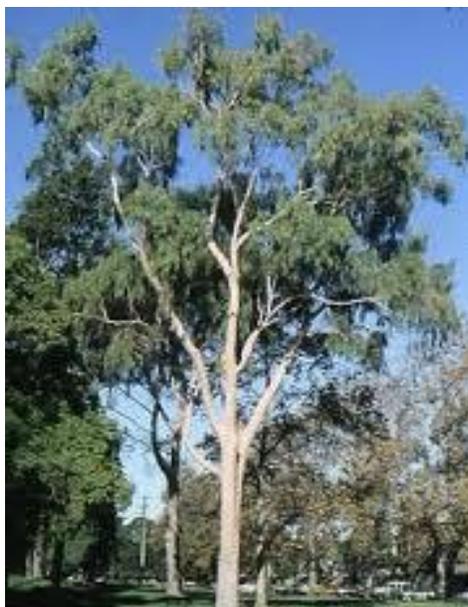


Fig. N°1 Árbol de *Eucalyptus citriodora*

Es una especie de gran adaptabilidad y rápido crecimiento, cuya madera es castaño-oscura a castaño-grisácea, dura, fuerte, proporciona leña de alto valor calorífico, tiene gran potencial en el establecimiento y manejo de sistemas agroforestales. Produce un apreciable aceite esencial empleado en perfumería.

El árbol es originario de Australia, Tasmania y diversas islas de la zona. De sus lugares de origen ha sido distribuido artificialmente por todo el mundo, especialmente en zonas de clima mediterráneo, subtropical y tropical.

### **DESCRIPCION BOTANICA**<sup>(21)</sup>

Árbol de gran altura que puede superar los 43 m, con la corteza lisa, caediza, blanca o con ligera tonalidad azulada. (Fig. N°1) Hojas juveniles opuestas, un poco peltadas, pecioladas, estrechamente lanceoladas, de 10-16 cm de longitud y 1-2 cm de anchura. Todas las hojas desprenden un fuerte olor a limón. Inflorescencias terminales corimbosas formadas por umbelas de 3-5 flores. Pedúnculos cilíndricos. Opérculo hemisférico, ligeramente rostrado, más corto que el tubo del receptáculo. Cápsula urceolada, pedicelada, de 8-10 mm de diámetro, con valvas sin sobresalir. (Fig. N°2)



Fig. N°2 Hojas de *Eucalyptus citriodora*

Las plantas superiores producen compuestos o sustancias con actividad antimicrobiana principalmente como mecanismo de defensa contra infecciones o como constituyentes del metabolismo celular, tales como: resinas, gomas, goma-resinas, látex, oleoresina.<sup>(24,28)</sup> En El Salvador, existen diferentes especies vegetales a las cuales, se le atribuyen estas propiedades medicinales en particular como en el caso del ***Eucalyptus citriodora*** que exuda una goma-resina de su tronco que se presume posee metabolitos activos con propiedades antimicrobianas.<sup>(1,23)</sup>



Fig. N°3 Goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***

### **USOS TERAPEUTICOS**<sup>(31)</sup>

El Eucalipto es considerado como una de las mejores especies vegetales para el tratamiento de diferentes enfermedades ya que sus hojas poseen propiedades medicinales, tales como: antimicrobianas, expectorantes, antiinflamatorias, etc.

El principal componente que le otorga la propiedad antimicrobiana es el cineol, también llamado eucaliptol que es, al mismo tiempo, el componente más abundante del aceite esencial; para obtener el aceite se destilan las hojas de los árboles, tanto jóvenes como de más edad.

El cineol es el componente que le proporciona sus propiedades antisépticas aunque también intervienen otros componentes como el pineno, el alfa-pineno, el limoneno, terpenos, sesquiterpenos, etc. Su riqueza en taninos (ácido gálico) y flavonoides son los responsables de las propiedades bacteriostáticas.

En medicina popular se emplea sus hojas como sudorífico, espasmódico, contra la gripe y los resfriados. En inhalaciones se aprovecha con gran resultado en caso de ronquera, pérdida de la voz y en la sinusitis; el aroma de la hojas y corteza son un repelente de zancudos y mosquitos. Su aceite esencial es destilado de las hojas y ramas jóvenes se utiliza en inhalaciones, vaporizaciones, fricciones y masajes. Se ha utilizado además como antiséptico, balsámico, anticatarral, desodorante, cicatrizante, antiparasitario y como descongestionante nasal. Es usado principalmente en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias, gripe, sinusitis, cistitis, llagas, quemaduras y reumatismo.

### **Composición de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora***

Del tamizaje fitoquímico realizado por medio de RMN<sup>1</sup>H de la goma resina de ***Eucalyptus citriodora***, resultaron presentes los siguientes metabolitos secundarios: flavononas, chalconas, flavonoles, isoflavonoides, ácidos fenólicos y triterpenos.<sup>(28)</sup>

A continuación se presentan los diferentes metabolitos secundarios aislados de las hojas y la corteza de ***Eucalyptus citriodora***. (Cuadro N°1)

Cuadro N°1 Metabolitos Secundarios aislados del *Eucalyptus citriodora*.<sup>(1)</sup>

ORGANO DE LA PLANTA	TIPO DE EXTRACTO	TIPO DE COMPUESTO	NOMBRE DEL COMPUESTO
Hojas	Etanólico	Derivados del fenol	1.Acido gálico 2.Acido elágico
		Tanino	3.Castalagina
		Flavonoides	4.Quercetina 5.Miricitina 6.Miricitina-3-O-glucosa 7.Quercetina-3-O-glucosa 8.Myricetina-3-O-ramnosa
		Antocianida	9.Cianidina
		Antocianidina	10.Delphinidina 11.Citriodorina 12.Eucalyptina
		Esterol	13.β-Sitosterol
		Triterpenos	14.Acido botulínico 15.Acido ursólico
		Ácidos carboxílicos	16.Acido shikímico 17.Acido glutárico 18.Acido succínico 19.Acido cítrico 20.Acido málico
		Fenilpropanopolimérico	21.Lignina
		Monoterpenos	22.Citral 23.Citronelal
		Corteza	Clorofórmico
Derivados del fenol	5.4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído 6.Acido 4-hidro-3,5-Dimetoxibenzoico		
Acido graso	7.Acido linoleico		
Hidrocarburo	8.Escualeno		
Terpenoquinona	9.α-tocoferol		
Triterpenos	10.Eritrodiol 11.Acido morólico 12.Acido botulínico		
Esteroles	13.Cicloescualenol 14.Vernolitato de cicloeucalenol 15.β-sitosterol 16.β-sitosterilo-β-O-glucopiranosido 17.β-sitosterona		
Lignanós	18.Yamgambina 19.Sesamina		

### 3.2 EXUDADOS DE LAS PLANTAS<sup>(24)</sup>

Los exudados vegetales son mezclas naturales sólidas o semisólidas químicamente complejas de origen vegetal. La proporción de los compuestos puede variar según el clima, la época del año y otros factores.

Los exudados son producidos por células y se forman sobre la superficie de las plantas, usualmente como el resultado de una herida producida a la planta, pueden tener una apariencia física y propiedades muy similares, pero estructuras moleculares muy diferentes.

Estos pueden clasificarse de la siguiente manera:

**Resinas:** Son mezclas insolubles en agua compuestas en mayor parte por terpenos (derivados orgánicos compuestos de componentes de isopreno), o se definen también como los compuestos químicos extraídos en la fase orgánica. La fosilización vuelve a las resinas extremadamente resistentes a la disolución, y cada uno de estos materiales es referido usualmente como fósiles de resinas ó inapropiadamente en el sentido general como ámbar.

**Gomas:** Son mezclas de polisacáridos de alto peso molecular solubles en agua ó dispersables en agua. El ejemplo más famoso es probablemente la goma arábiga de la especie **Acacia**.

**Goma-resina:** Es una mezcla de componentes como terpenos y carbohidratos. Se obtiene del árbol por medio de incisiones longitudinales en el tronco, fluye abundantemente, tiene color rojizo y cuando se seca con el sol se vuelve quebradiza, formando así masas irregulares que se recogen para su utilización.

**Látex:** Son usualmente fluidos lechosos consistentes de pequeñas gotas de compuestos orgánicos suspendidos o dispersados en un medio acuoso.

**Oleoresina:** Son una mezcla de aceites esenciales y terpenos insolubles en agua.

### 3.3 GENERALIDADES SOBRE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

#### 3.3.1 TERPENOS<sup>(34)</sup>

Los terpenos son compuestos orgánicos producidos por las plantas, caracterizados por esqueletos carbonados que contienen diez átomos de carbono o múltiplos de diez.

Los monoterpenos tienen esqueletos de carbono con diez átomos de carbono. Los compuestos afines llamados sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tienen quince, veinte y treinta átomos de carbono, respectivamente, y hay múltiples adicionales del esqueleto terpénico.

Todos los terpenos sencillos y la mayoría de los politerpenos son formados en la plantas a partir de unidades que tienen el esqueleto del isopreno. (Fig. N°4)

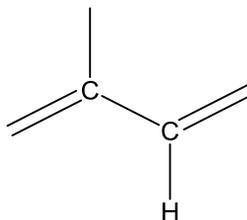


Fig. N°4 Estructura del Isopreno

##### 3.3.1.1 MONOTERPENOS<sup>(7)</sup>

Formados por dos moléculas de isopreno; los monoterpenos suelen ser los componentes de las esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de las hierbas y especies, en los que los monoterpenos pueden constituir incluso el 5% del peso seco de las plantas. Estos pueden aislarse tanto por

destilación como por extracción, y son utilizados para la producción industrial de sabores y perfumes.

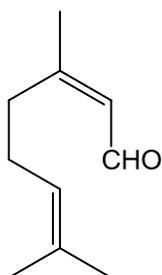


Fig. N°5 Citral (limón)

### 3.3.1.2 SESQUITERPENOS

Son estructuras  $C_{15}$  formadas a través de la condensación isoprénica. Se encuentran frecuentemente formando parte de los aceites esenciales. Están presentes principalmente en las familias ***Labiatae***, ***Mirtaceae***, ***Asteraceae*** y ***Rutaceae***, aunque pueden observarse en miembros de otras familias. Presentan actividad antifúngica, antibiótica, antiinflamatoria o espasmolítica. Dentro de los sesquiterpenos destacan el bisabolol (Fig. N°6) y el camazuleno, presentes en la esencia de la manzanilla (***Matricaria chamomilla***), con actividad antiulcerosa, antiinflamatoria y espasmolítica.<sup>(7)</sup>

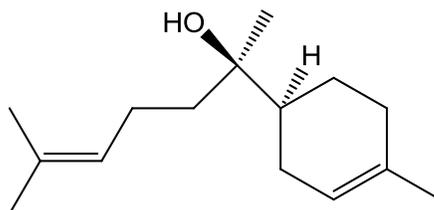


Fig. N°6 Bisabolol

### 3.3.1.3 DITERPENOS<sub>(7)</sub>

Son estructuras C<sub>20</sub> que pueden presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos, siendo estos últimos conocidos desde tiempo atrás como ácidos resínicos obtenidos como componentes de las resinas exudadas obtenidas por cortes en los troncos de pinos y abetos.

Se subdividen atendiendo al tipo de esqueleto carbonado, entre otros, como bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos.

Algunos diterpenos tienen actividad anticancerígena y/o citotóxica. Destaca el Taxol (Fig. N°7) y otros diterpenos presentes en la familia de las ***Euphorbiaceae***. También se les atribuyen otras actividades terapéuticas entre las que destacan las antibacterianas, antifúngica, antirretroviral y la antioxidante de algunos diterpenos fenólicos.

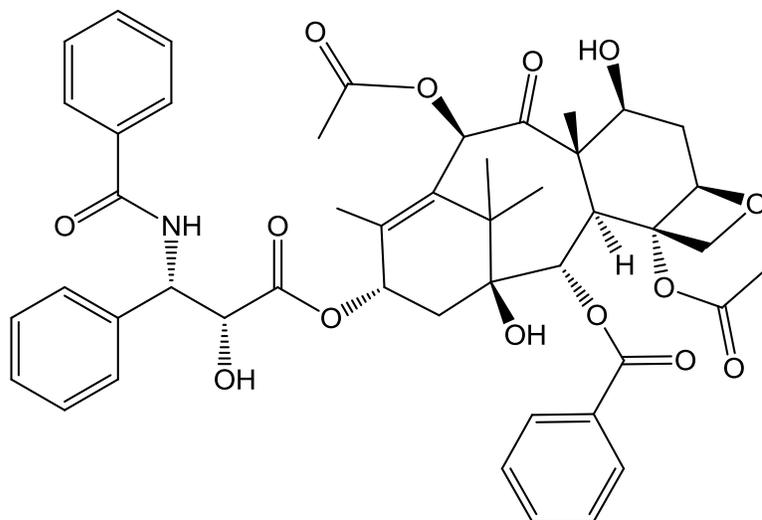


Fig. N°7 Taxol

### 3.3.1.4 TRITERPENOS<sub>(7)</sub>

Son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogénicamente del escualeno, hidrocarburo acíclico estructura C<sub>30</sub>. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos, y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran formando las llamadas saponinas triterpénicas. Las saponinas triterpénicas pueden tener una estructura pentacíclica o tetracíclica. Son frecuentes en dicotiledóneas, sobre todo en las familias **Caryophyllaceae**, **Polygalaceae**, **Sapotaceae**, **Araliaceae**. Los saponósidos son espumantes en soluciones acuosas y hemolíticos. Modifican la permeabilidad de la membrana celular, por lo que en ocasiones se suministra con otros fármacos para mejorar la entrada de éstos en las células.

Algunas saponinas triterpénicas tienen actividad espermicida (pittósido de **Pittosporum nilghirinese**), citotóxica (ácido ursólico aislado de **Prunella vulgaris**), expectorante y/o antitusiva (segenina de **Polygala senega**), cicatrizantes (asiaticósido de **Cebtella asiatica**), antifúngica (camellidina aislada de **Camellia japonica**) o antiinflamatoria (ácido glicirrético de **Glucyrrhiza glabra**). (Fig. N°8)

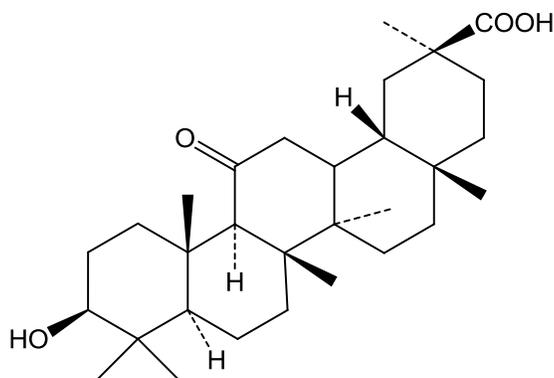


Fig. N°8 Ácido glicirrético

### 3.3.2 ANTRANÓSIDOS<sub>(16)</sub>

Las quinonas naturales, son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas donde su color está enmascarado por otros pigmentos. Se presentan mayormente al estado libre, pero las hidroxiladas pueden encontrarse glicosidadas. Para confirmar su presencia puede ser útil una reacción de color basada en la propiedad redox de las quinonas.

Para su mayor estudio, las quinonas se subdividen en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas isoprenoide. Ellas además pueden contener diversos grupos funcionales, anillos de furano o pirano, encontrarse como dímeros, ser parcialmente reducidas como los antranoles y antronas. Se asume que la mayoría de las antraquinonas han sido elaboradas a través de la ruta acetato y en otros casos, han sido formadas de la ruta del ácido shikímico. Incluye O-heterósidos y C-heterósidos (estos últimos son enlace carbono-carbono entre el azúcar y el aglicón) su acción más específica es la de estimular la musculatura lisa del intestino grueso. La cual llega a ocasionar una mayor dilución del contenido intestinal. En conjunto producen un claro efecto laxante que se manifiesta después de unas 6 a 7 horas. Las plantas que contienen antraquinonas se comportan como laxantes o purgantes según la dosis. Este tipo de laxantes está contraindicado en caso de embarazo, menstruación y hemorroides.

Las quinonas han sido conocidas desde épocas antiguas por sus propiedades tintóreas; algunas presentan otras propiedades como la emodina que es catártica; shikonina<sub>(11)</sub> (Fig. N°9), antimicótica; reina, bajo la forma de diacetato,

antirreumático; plumbagina, muy activa para la leishmaniasis; lapachol, citostática, bacteriostática, fungistático, entre otros.

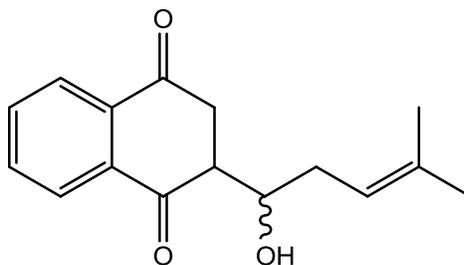


Fig. N°9 Shikonina

### 3.3.3 FLAVONOIDES<sub>(16)</sub>

Los flavonoides son pigmentos vegetales que se encuentran en forma libre y en forma de glicósidos, poseen esqueleto carbonado  $C_6-C_3-C_6$  como se encuentran en las flavononas, aurona, chalcona (Fig. N°10), flavona, flavanonol, antocionadina, catequina, isoflavona, antocianidina, etc. Los flavonoides naturales se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, en sus flores, frutos y hojas, en su mayoría están en forma de glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. Se conocen diez tipos de flavonoides cada uno de los cuales suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar los cuales se ubican en los carbonos,  $C_3$  y/o  $C_7$ . Los diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante reacciones de coloración y por sus propiedades de solubilidad.

Proviene de la ruta del acetato y shikimato, el primer flavonoide formado es la chalcona, a partir del cual se derivan los otros tipos de flavonoides por modificaciones que ocurren en varias etapas.

Las agliconas son más comunes en tallo, corteza, raíces y exudaciones resinosas de la madera. Los disolventes empleados en la extracción de estos compuestos son desde muy polares como el agua, etanol, para glicósidos o agliconas muy hidroxilados, hasta menos polares como el éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas.

Algunos pigmentos flavónicos desprovistos de toxicidad para el hombre, tienen propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antihemorrágicas, hemostáticas, antiarrítmicas, cardíacas, antiinflamatorias, antirradicales libres, antimicrobianas, antihepatotóxicas y antiinfecciosas; además son ampliamente usadas en problemas circulatorios ya que disminuyen la fragilidad capilar, se usan como edulcorantes y hepatoprotectores.

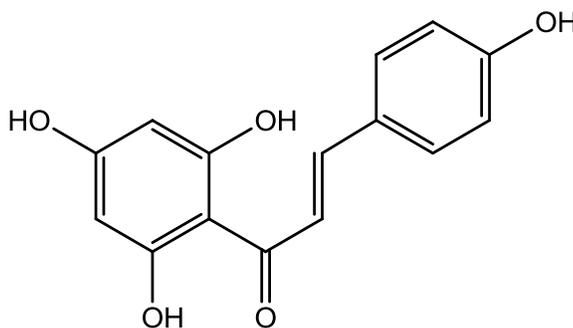


Fig. N°10 Chalcona

### 3.3.4 COMPUESTOS FENÓLICOS<sub>(16)</sub>

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilados, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcares. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua; pueden ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que producen

cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Entre los compuestos fenólicos podemos encontrar los siguientes:

#### 3.3.4.1 ÁCIDOS CINÁMICOS<sup>(16)</sup>

Los ácidos cinámicos son obtenidos por reacciones de hidroxilación y de metilación, que sigue la secuencia de los patrones de la substitución, típicos de los metabolitos de la vía del shikimato, es decir un patrón orto de la hidroxilación. Algunos de los ácidos cinámicos naturales más comunes son los ácidos 4-coumárico (fungicida, antioxidante, alelopático), caféico (colagogo, antifúngico) (Fig. N°11), ferúlico y sinápico (antioxidantes). Éstos se pueden encontrar en plantas en forma libre y en una gama de formas esterificadas.

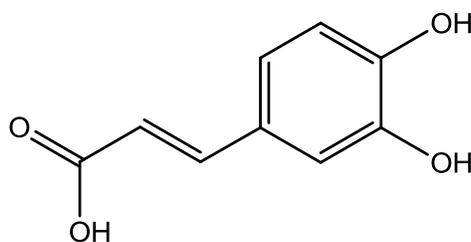


Fig. N°11 Ácido caféico

#### 3.3.4.2 ÁCIDOS BENZOICOS<sup>(16)</sup>

Los ácidos benzoicos derivados de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, componen algunos de los ácidos hidroxibenzoicos simples (compuestos C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) por ejemplo el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido gálico (Fig. N°12) que se pueden formar directamente de intermediarios en la vía del shikimato, ejemplo, el ácido 3-dihidrosihikímico o el ácido chorísmico, aunque existen rutas alternativas en las cuales, los derivados de ácidos cinámicos (compuestos C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) se rompen en el enlace doble y pierden dos carbonos de la cadena lateral. Así, el ácido 4-coumárico

puede actuar como precursor del ácido 4-hidroxibenzóico, y el ácido ferúlico puede dar el ácido vanílico (ácido 4-hidroxí-3-metoxibenzóico).

Algunos de estos compuestos poseen actividad antibacterial, bacteriostática y bactericida. Otros como los cumaratos de bencilo poseen propiedades antifúngicas.

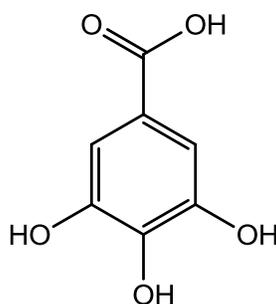


Fig. N°12 Ácido gálico

### 3.4 METODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interfase.

**Tipos de extracción:**

- 1. Maceración**
- 2. Percolación**
- 3. Extracción en arrastre de vapor**
- 4. Extracción con fluidos supercríticos**

### 5. Extracción continua (soxhlet):

Es el proceso de extracción más usado en la química de los productos naturales. El sistema (soxhlet) consta de tres partes: El refrigerante, el cuerpo extractor y un balón. (Fig. N°13).

El proceso de extracción es sencillo, se introduce el material seco en un cartucho de papel de filtro, y luego este dentro del cuerpo extractor, en el balón se coloca el disolvente con el que vamos a extraer, calentamos hasta ebullición, y se forma un ciclo continuo, el vapor que sube por el cuerpo extractor se condensa en el refrigerante, cae de forma pura sobre el cartucho, produciéndose la extracción y cuando se llena el cuerpo extractor, el disolvente cae al balón por un simple sifonamiento, arrastrando con él los compuestos. El proceso se repite varias veces.

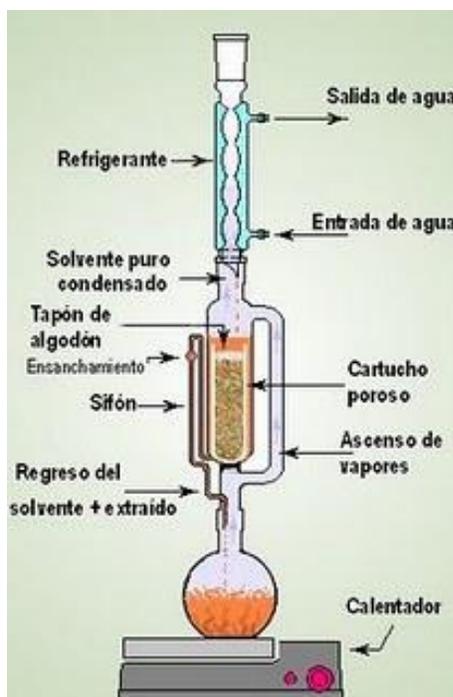


Fig. N°13 Partes del Equipo Soxhlet

La extracción se puede llevar a cabo por dos vías:

La **extracción total** consiste en hacer un extracto bruto con etanol generalmente y luego fraccionar este aprovechando sus propiedades físico-químicas, de esta forma podemos hacer un fraccionamiento kupchan en función de la polaridad o un fraccionamiento ácido-base según el carácter ácido o básico de los distintos compuestos a aislar.

La **extracción parcial o gradual** se lleva a cabo con disolventes de polaridad creciente.

Ejemplo de extracción gradual:

Introducimos el material vegetal en el soxhlet y comenzamos a extraer con un disolvente de baja polaridad como es el hexano, en dicho extracto tendremos grasas y ceras; luego separamos el resto vegetal del extracto hexánico. Aumentamos la polaridad del disolvente usando diclorometano, tendremos aquí algunos compuestos terpenoides, separamos el resto vegetal del extracto diclorometánico, añadimos un disolvente más polar, acetato de etilo, que arrastra sustancias de polaridad intermedia, para terminar con un alcohol que extrae los compuestos más polares y el agua que se lleva los polifenoles y polisacáridos. Una vez obtenido nuestros extractos eliminamos los disolventes, en un rota-evaporador, a presión reducida, con lo que se consigue destilar a temperaturas más bajas. Los extractos secos son guardados en la refrigeradora hasta su posterior fraccionamiento, para evitar la aparición de hongos.

Tendremos todos nuestros metabolitos separados en 5 partes a distinta polaridad.

La extracción de Kupchan es similar a la anterior. Al igual que antes, introducimos el material vegetal en el soxhlet y comenzamos a extraer, pero

ahora con un disolvente de alta polaridad como es el etanol, realizando una extracción exhaustiva, luego eliminamos el disolvente en el rota-evaporador obteniendo el extracto seco. Disolvemos este en una mezcla etanol agua y comenzamos a extraer en un embudo de decantación con un disolvente de muy baja polaridad, hexano, separando ceras y ácidos grasos, luego aumentamos la polaridad con diclorometano, sacando en este algunos terpenoides. Seguimos con uno de polaridad media, acetato de etilo, y luego con *n*-butanol tendremos las mas polares, quedando los polifenoles y polisacáridos en la fase acuosa.

Otro fraccionamiento típico es el usado para los alcaloides, donde ponemos en contacto la droga pulverizada en una mezcla acuosa ácida, los alcaloides en medio ácido se convierten en sal y son extraídos por la fase acuosa, y luego separamos el resto vegetal de la fase acuosa ácida por filtración, esta última la tratamos con una base y extraemos con un disolvente orgánico, se rompe la sal y los alcaloides pasan a la fase orgánica, eliminamos el disolvente y tenemos los alcaloides totales.

Tras haber eliminado los compuestos no deseados y haber realizado la extracción del material vegetal, debemos usar nuevas técnicas de separación ya que aun tendremos una mezcla muy compleja de compuestos.

### **3.5 GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA<sup>(24)</sup>**

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

- Retención: Efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- Desplazamiento: Efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases.

La repetición sucesiva de las operaciones elementales de detección y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original.

El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la móvil, recibe el nombre de elución. La cromatografía puede emplearse para conocer el número de componentes de una mezcla y su identificación, por comparación con patrones (cromatografía analítica). También se aplica a la separación de mezclas de compuestos, tanto a pequeña como a gran escala, y como método de purificación (cromatografía preparativa).

### **Tipos de cromatografía<sup>(23)</sup>**

1. Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria (sólida o líquida) y de la fase móvil (líquida o gaseosa).
  - Cromatografía sólido-líquido: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.
  - Cromatografía líquido-líquido: la fase estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido y la fase móvil es un líquido.
  - Cromatografía líquido-gas: la fase estacionaria es un líquido no volátil impregnado con un sólido y la fase móvil es un gas.
  - Cromatografía sólido-gas: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.

2. Al tipo de interacción que se establezca entre los componentes de la mezcla y las fases móvil y estacionaria.
  - Cromatografía de adsorción: la fase estacionaria es un sólido polar capaz de adherir los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar.
  - Cromatografía de partición: la separación se basa en diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en las fases estacionaria y móvil, que son ambas líquidas. Si la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, se denomina cromatografía en fase inversa.
  - Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria es un sólido que lleva anclado grupos funcionales fijos ionizables, cuya carga esta contra balanceada por iones que se pueden intercambiar por aquellos presentes en la fase móvil.
  
3. En función del tipo de soporte empleado para la fase estacionaria, se puede establecer otra clasificación:
  - Cromatografía en columna: El adsorbente se deposita en el interior de una columna de vidrio.
  - Cromatografía en capa fina: Una capa de adsorbente de espesor uniforme se deposita sobre una capa de vidrio, aluminio o plástico.

### 3.5.1. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA<sub>(16)</sub>

Es el método más general para la separación y purificación de compuestos orgánicos, sólidos o líquidos, a escala preparativa. La fase estacionaria (adsorbente) se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina en un estrechamiento con una llave, y se impregna con una fase móvil (eluyente). La mezcla a separar se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria, y la fase móvil atraviesa el sistema.

Los compuestos eluidos, disueltos en la fase móvil, van saliendo de la columna y se recogen en fracciones. Los menos polares, que son los que se retienen poco en el adsorbente, son los primeros en salir. Los polares quedan más retenidos y para su elución generalmente es necesario incrementar la polaridad del disolvente.

El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna recibe el nombre de tiempo de retención. Es característico para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, diámetro de la columna, presión, etc.).

El adsorbente más utilizado para cromatografía en columna, es sílica gel. La elución de la cromatografía puede realizarse por gravedad o a media presión (flash chromatography). En este último caso se conecta la cabeza de la columna a un compresor de media presión o a una línea de aire comprimido. El tamaño de partícula de sílica gel para cromatografía a media presión es más pequeño que el que se utiliza para cromatografía por gravedad. Si por gravedad se empleará sílica gel de tamaño de partícula más pequeño; la elución no se produciría, ya que impediría el flujo del disolvente. Sin embargo, si se aplica presión, se fuerza al disolvente a eluir.

### 3.6 GENERALIDADES SOBRE *Candida albicans*<sub>(5,23)</sub>



Fig. N°14 Morfología microscópica de la cepa *Candida albicans*

Miembro de la flora normal de las mucosas en los aparatos respiratorio, digestivo y genital femenino. En tales lugares puede ganar dominio y relacionarse con otras enfermedades. Algunas veces produce enfermedad general progresiva en enfermos debilitados o con inmunosupresión. *Candida albicans* tiene predilección por colonizar los pliegues macerados y húmedos de la piel. Por ende, el intertrigo es la forma de presentación clínica más habitual de la infección por este patógeno en la piel limpia. Las localizaciones más frecuentes son las regiones inguinal, axilar, glútea, interdigital e inframamaria y entre ellos los pliegues de la piel de la pared abdominal. Los factores predisponentes son la obesidad, la utilización de prendas de vestir oclusivas, la diabetes mellitus y algunos factores ocupacionales. La infección causada por *Candida albicans* se presenta como lesiones pruriginosas, eritematosas y maceradas en las regiones intertriginosas con vesiculopústulas satélites. Dichas pústulas se rompen dejando una base eritematosa con un anillo circundante de epidermis necrosada fácilmente desprendible.

Tratamiento para las infecciones comunes causadas por *Candida albicans*: El ketoconazol ha producido una notable mejoría en algunas infecciones

sistémicas, en especial la candidiasis mucocutánea. Un tratamiento eficaz ampliamente aceptado es Anfotericina B por vía intravenosa. En vulvovaginitis se utiliza clotrimazol.

### 3.7 GENERALIDADES SOBRE *Trichophyton mentagrophytes*<sup>(6,23)</sup>



Fig. N°15 Morfología microscópica de la cepa *Trichophyton mentagrophytes*

Es un hongo dermatofítico patógeno filamentosos con gran queratinofilia por lo que coloniza las estructuras queratinizadas de los animales y hombres como la epidermis, el pelo y las uñas. Este hongo posee queratinasas que le permite utilizar la queratina de estas estructuras como una fuente de nitrógeno.

*Trichophyton mentagrophytes* es una de las seis especies causantes de casi todas las infecciones dermatofíticas humanas producidas en los Estados Unidos<sup>(6)</sup>, por lo que hay que prestarle un especial interés. Además es uno de los principales causantes de la tiña de los pies o pie de atleta.

Morfología colonial: este hongo produce diferentes variantes coloniales, sin embargo, se reconocen solo dos patrones básicos, veloso y granular. El primero tiene mayor tendencia a asociarse con dermatosis inflamatorias en

humanos. En general el color es blanco a rosado, algunas cepas producen pigmento rojo-marrón.

### 3.8 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA<sup>(16)</sup>

Probablemente la técnica de ensayo más ampliamente utilizada, aunque no necesariamente la mejor, es el método de **difusión en agar**, también conocido como método de **Kirby-Bauer Modificado**, se inocula (“siembra”) uniformemente toda la superficie de una placa de Petri, que contiene un medio con agar, con una cantidad normalizada del microorganismo a ensayar. A continuación se colocan sobre la superficie del agar solidificado discos de papel de filtro con concentraciones conocidas de agentes quimioterapéuticos. Durante la incubación los agentes quimioterapéuticos difunden por el agar a partir de los discos.

Si el quimioterápico es eficaz se forma un halo de inhibición que rodea al disco y puede medirse el diámetro de ese halo. Como el tamaño del halo de inhibición se ve afectado por la velocidad de difusión del quimioterapéutico un halo más grande no siempre indica una mayor actividad antimicrobiana. El diámetro se compara con los de una tabla de referencia para cada fármaco y dosis. El resultado informa acerca de si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente. Esta información es a menudo inadecuada para muchos fines clínicos; sin embargo, es un ensayo sencillo y tiene un valor considerable en la práctica médica.

**CAPÍTULO IV**  
**DISEÑO METODOLÓGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLOGICO

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO:

**Estudio retrospectivo** porque está basado en investigaciones anteriores, de los cuales partimos para realizar el presente trabajo.

**Estudio prospectivo** debido a que se dejará un antecedente bibliográfico, el cual podrá aplicarse a futuras investigaciones.

**Estudio experimental** ya que propone una alternativa terapéutica para el tratamiento de las enfermedades micóticas causadas por ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes*** mediante datos obtenidos experimentalmente.

Además es un **estudio hipotético-deductivo** ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permite formular la siguiente hipótesis: “Las fracciones de las mezclas *n*-hexano:acetato de etilo al 10%, 30%, 50% y 70%, acetato de etilo puro y metanol puro provenientes del extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** poseen actividad antimicótica contra ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes***.”

La investigación del presente estudio se dividió en tres etapas:

### 4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA:

- Se realizó consultas de libros, trabajos de graduación, manuales, etc. en la Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer
- Biblioteca de la Universidad Nueva San Salvador.

- Revistas científicas
- Internet

### **4.3 UNIVERSO Y MUESTRA**

Universo de trabajo: Los árboles de eucalipto localizados en la zona del parqueo de la Facultad de Humanidades de la Universidad de El Salvador.

Muestra de trabajo: Los árboles de ***Eucalyptus citriodora***.

### **4.4 INVESTIGACION DE CAMPO**

La recolección de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora*** se realizó utilizando un muestreo al azar, teniendo como universo de trabajo los árboles de eucalipto localizados en la zona del parqueo de la Facultad de Humanidades de la Universidad de El Salvador durante la época seca, en el primer trimestre del año 2011. La muestra se recolectó en frascos de vidrio con tapadera de metal y se almacenó en un lugar fresco y seco.

Para solicitar la confirmación del nombre científico de la muestra botánica recolectada, se visitó las instalaciones del herbario LAGU del Jardín Botánico La Laguna, el Licenciado Jorge Alberto Monterrosa Salomón revisó la muestra y la comparó con el material de referencia que se encontraba en dicho herbario, concluyendo que la especie vegetal correspondía a ***Eucalyptus citriodora***. (Anexo N°11)

### **4.5 PARTE EXPERIMENTAL**

La extracción, partición y fraccionamiento de la goma-resina se realizó en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia; y los análisis para evaluar la actividad antimicótica de las

fracciones se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, CENSALUD (Anexo N°1), de la Universidad de El Salvador durante el tercer trimestre del año 2011.

#### **4.5.1 CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA DE LA GOMA-RESINA DE *Eucalyptus citriodora*.**

Se determinaron las características organolépticas de la goma-resina: color, olor y consistencia. (Ver resultados y discusión de resultados).

#### **4.5.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA GOMA-RESINA DE *Eucalyptus citriodora*.**

El material vegetal (goma-resina) seco y cristalizado se pulverizó en un mortero, luego se pesó en una balanza granataria obteniendo 377.9 g de goma-resina pulverizada; la cual se empaquetó en un cartucho de papel filtro colocándolo en el cuerpo extractor del equipo soxhlet, posteriormente se realizó la extracción con etanol al 90° en el equipo soxhlet (Fig. N°13). La muestra se sometió a numerosas extracciones hasta que el color del líquido en el dedal estaba tenue, lo cual, indicó que la muestra se encontraba ya agotada.

Luego se concentró el extracto etanólico a sequedad usando el equipo rota-evaporador (Fig. N°16), con el fin de eliminar el solvente. (Anexo N°2)



Fig. N°16 Equipo Rota evaporador

#### **4.5.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE LA GOMA-RESINA DE *Eucalyptus citriodora*.**

Al extracto etanólico concentrado a sequedad, se le realizó una partición líquida-líquida agua/diclorometano con tres volúmenes de 500 mL de agua y 500 mL de diclorometano, en una ampolla de separación formándose una fase acuosa y una orgánica, se reunieron las tres capas diclorometánicas en un balón para eliminar el solvente en un rota evaporador, obteniendo así el extracto diclorometánico; en el cual, se encuentran la mayoría de metabolitos secundarios responsables de las diferentes actividades terapéuticas; siendo los ácidos fenólicos y los flavonoides los que parecen ser los responsables de la actividad antimicrobiana.<sup>(23)</sup>

El extracto diclorometánico se fraccionó empleando cromatografía en columna utilizando como sistema de elución solventes puros y mezclas de solventes: *n*-hexano puro, mezclas de *n*-hexano:acetato de etilo al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro; obteniendo así, siete fracciones; las cuales se evaluaron por cromatografía en capa fina para identificar la presencia de compuestos activos, por lo que solo se utilizaron para el ensayo microbiológico

las últimas seis fracciones; ya que en la primera fracción de *n*-hexano no se observaron manchas que indicaran compuestos activos en el revelado de la cromatografía de capa fina, por lo que se descartó; esto con la finalidad de determinar la actividad antimicótica. (Anexo N°2)

#### 4.5.4 CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

##### PROCEDIMIENTO

##### Preparación y relleno de la columna

Se seleccionó una columna de diámetro adecuado a la muestra (62.4 g del extracto diclorometánico). Se realizó una mezcla de *n*-hexano y sílice gel, la cual se incorporó en el interior de la columna y se dejó compactar por gravedad (Fig. N°17). Una vez depositado el adsorbente en el fondo de la columna, se colocaron 20 cm de algodón para proteger el frente del adsorbente, quedando el solvente a la altura del nivel del algodón.



Fig. N°17 Preparación y relleno de la columna cromatográfica.

### Preparación de la muestra

Se disolvió la muestra (62.4 g del extracto diclorometánico) en una mínima cantidad de diclorometano y se añadió una cantidad de sílice gel proporcional a la cantidad de muestra.

Posteriormente se eliminó el solvente en el rota-evaporador (Fig. N°18), obteniéndose una mezcla homogénea, pulverulenta y exenta de solvente; la cual, se incorporó por medio de un embudo sobre los 20 cm de algodón de la columna.



Fig. N°18 Preparación de la muestra (Extracto diclorometánico).

### Elución de las fracciones

Se utilizó como sistema de elución volúmenes de solventes puros (*n*-hexano, AcOEt, MeOH) y mezclas de solventes de *n*-hexano:acetato de etilo (en orden creciente de polaridad) con el fin de arrastrar la mayor cantidad de metabolitos secundarios activos en la muestra, empleando el siguiente orden:

1. 600 mL de *n*-hexano puro
2. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 10%
3. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 30%
4. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 50%
5. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 70%

6. 600 mL Acetato de etilo puro

7. 1500 mL de metanol puro para lavar la columna. (Fig. N°19, Anexo N°7)

Cada una de las fracciones resultantes se recogió de forma dividida, en tres volúmenes de 200 mL en erlenmeyers de 250 mL.

Todas las fracciones se evaluaron por cromatografía en capa fina, con la finalidad de identificar la presencia de compuestos activos empleando como reactivo revelador óleum<sub>(22)</sub>, reuniéndose siete fracciones por la similitud presentada en la cromatografía de capa fina, conociéndose las fracciones como: *n*-hexano puro, *n*-hexano:AcOEt al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro; para el ensayo microbiológico solo se utilizaron las últimas seis fracciones; ya que en la primera fracción de *n*-hexano puro no se observaron manchas que indicaran la presencia de compuestos activos, por lo que se descarto. (Anexo N°4 y Anexo N°5).

Cada fracción fue llevada a sequedad en un rota evaporador; obteniendo así todos los compuestos (metabolitos secundarios) arrastrados por la mezcla de solventes y solventes puros; las cuales, se disolvieron con dimetilsulfóxido (DMSO) para determinar por medio de ensayos microbiológicos la actividad antimicótica de las diferentes fracciones (*n*-hexano/AcOEt al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro).<sup>(9,36)</sup> (Anexo N°8)



Fig.N°19 Vista de la columna cromatográfica de la elución de las fracciones.

## 4.5.5 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

### 4.5.5.1 Pruebas de identificación microbiológica<sub>(23)</sub>

A los microorganismos de ensayo se le realizaron dos clases de pruebas:  
(Anexo N° 3)

- Características macroscópicas.

La identificación se basó en el crecimiento que tienen los diferentes microorganismos en medios de cultivos selectivos y diferenciales, para ello se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

Cuadro N°2 Características macroscópicas de los microorganismos de prueba en su medio de cultivo.

Microorganismo de prueba	Medio de Cultivo
<b><i>Candida albicans</i></b>	Agar sabouraud: colonias blandas circulares de color crema y con olor característico a levadura. Con el tiempo se vuelven amarillentas.
<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	Agar sabouraud: Colonias vellosas color blanco, aspecto de algodón.

- Características microscópicas.

Se utilizó el método de coloración de Gram (Anexo N°6), para observar la morfología de los microorganismos a ensayar.

Cuadro N°3 Características microscópicas de los microorganismos de prueba en las diferentes tinciones.

Microorganismo de prueba	Tinción
<b><i>Candida albicans</i></b>	Tinción Gram: microorganismos Gram +, coloración morada, ovalados y algunos en gemación.
<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	Tinción con lactofenol azul algodón: Microconidias en forma de racimo de uva.

#### 4.5.5.2 Determinación del potencial de inhibición<sub>(1,23)</sub>

Para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a una sustancia antimicrobiana en particular, existen varios métodos; los más comúnmente empleados, son el método de Dilución Seriada y el de Difusión en Agar desde discos de papel. Alternativamente, el agente antibacteriano puede colocarse en cilindros de vidrio, porcelana o acero inoxidable sobre la superficie del medio, en lugar de discos de papel absorbentes (método Cilindro Placa). El método que se utilizó para el desarrollo del presente estudio es el método Kirby Bauer modificado.

#### **Método Cilindro Placa**

(Método de Kirby Bauer Modificado)

El fundamento de este método es la difusión de la sustancia, colocada en un cilindro de acero inoxidable vertical sobre una capa de agar (Müller-Hinton) solidificado, que contiene en la superficie el microorganismo de prueba, de tal manera, que si es susceptible, se forma un halo de inhibición alrededor del cilindro. (Anexo N°10)

#### **- Preparación de la suspensión de microorganismos**

Del cultivo de *Candida albicans* mantenido en la placa de agar dextrosa sabouraud; se transfirió cierto número de colonias a un tubo de ensayo utilizando un asa bacteriológica. El tubo contiene 10 mL de solución salina isotónica estéril 0.85%. Este procedimiento se repitió hasta obtener una turbidez equivalente al estándar Mc Farland de 0.5, el cual se preparó con: 0.05 mL de BaCl<sub>2</sub> al 1% + 9.95 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%. Obteniéndose una densidad celular aproximada de  $1.5 \times 10^8$  MO/mL<sub>(12)</sub>. De igual manera se realizó para *Trichophyton mentagrophytes* con la diferencia que el diluyente en el cual se

preparó la suspensión contenía Tween 80 al 0.1%, con el fin de que las esporas del hongo se incorporaran a la suspensión.

#### **- Inoculación de las placas**

Por el método del extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalente a  $1.5 \times 10^8$  MO/mL se inoculó uniformemente la superficie del medio Agar Müller Hinton para ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes***.

El medio se dejó secar con la suspensión de microorganismos durante 10 minutos a temperatura ambiente. En condiciones estériles.

#### **- Inoculación con la solución de prueba**

Se colocaron sobre la superficie del medio inoculado tres cilindros de acero inoxidable, a intervalos de 90° entre cada uno; luego se llenaron con una micropipeta con la solución de prueba y se incubaron a 20-25°C por 5 días. Los diámetros de inhibición se midieron con una regla milimetrada transparente especial, usada en la lectura de resultados de antibiogramas.

Las pruebas se realizaron por triplicado para los solventes puros y para las mezclas de solventes: *n*-hexano:acetato de etilo al 10%, 30%, 50% y 70%, acetato de etilo puro y metanol.

Se colocaron discos de antimicóticos estandarizados de Ketoconazol en placas inoculadas como control positivo de inhibición de los hongos estudiados. Además se llevaron placas inoculadas a las cuales se les colocaron cilindros conteniendo únicamente dimetilsulfóxido (DMSO) como blanco. Como parámetros de referencia de los halos de inhibición, se utilizó la escala de sensibilidad de Duraffourd.<sup>(2)</sup>

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 5.1 Caracterización organoléptica de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

La goma-resina de *Eucalyptus citriodora* sin haber recibido tratamiento alguno (Fig. N°20), posee una consistencia sólida pero fácilmente quebradiza, al haber estado expuesta a la luz solar, color ámbar (rojizo) y el olor es característico a eucalipto. Esta goma-resina se obtuvo del tronco del eucalipto, recolectada durante la época seca; es decir, en el primer trimestre del año 2011. (Fig. N°21)



Fig. N°20 Goma-resina de *Eucalyptus citriodora*



Fig.N°21 Recolección de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*

## 5.2 Cuantificación del rendimiento del extracto etanólico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

Para obtener el extracto alcohólico, fue necesario pulverizar la muestra (Fig. N°22); la cual se pesó en una balanza granataria, obteniendo un total de 377.9 gramos de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

Los 377.9 g de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* se empaquetaron en un cartucho de papel filtro y éste se colocó dentro del cuerpo extractor del equipo soxhlet.



Fig. N°22 Pulverización de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

Se realizaron cuatro extracciones con 500 mL de etanol al 90° cada una, a partir del polvo de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, durante cuatro semanas utilizando dos equipos soxhlet hasta agotar la muestra (Fig. N°23).

Después de haber obtenido el extracto etanólico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, se evaporó el etanol con ayuda de un rota- evaporador (Fig. N°24) hasta concentrarlo a sequedad.

Cantidad de la muestra = 377.9 g.de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* pulverizada.

Cantidad del extracto etanólico obtenido después de someterse al rota evaporador = 266.7 g. de extracto etanólico.

Porcentaje de rendimiento = 70.6 % rendimiento del extracto etanólico.

377.9 g \_\_\_\_\_ 100%

266.7 g \_\_\_\_\_ X

X = 70.6 % rendimiento del extracto etanólico.



Fig. N°23 Extracción alcohólica de la goma resina de *Eucalyptus citriodora*.



Fig. N°24 Evaporación del etanol.

### 5.3 Cuantificación del rendimiento del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

Al extracto etanólico concentrado a sequedad, se le realizaron tres particiones agua/diclorometano, en una ampolla de separación de 4000 mL con volúmenes de 500 mL de agua y 500 mL de diclorometano. (Fig. N°25)

Se reunieron las capas diclorometánicas y luego se evaporó el solvente con ayuda de un rota-evaporador.

Cantidad del extracto diclorometánico obtenido después de someterse al rota-evaporador = 62.4 g de extracto diclorometánico. (Fig. N°26)

Cantidad del extracto etanólico obtenido después de someterse al rota evaporador = 266.7 g de extracto etanólico.

Porcentaje del rendimiento = 23.4% rendimiento del extracto diclorometánico.

$$\begin{array}{r} 266.7 \text{ g} \text{ _____ } 100\% \\ 62.4 \text{ g} \text{ _____ } X \end{array}$$

X = 23.4% rendimiento del extracto diclorometánico.



Fig. N°25 Partición agua /  
Diclorometano  
del extracto  
etanólico.



Fig. N°26 Extracto diclorometánico

#### 5.4 Cromatografía en columna

##### PROCEDIMIENTO:

##### Preparación y relleno de la columna

Se seleccionó una columna de diámetro adecuado a la muestra (62.4 g del extracto diclorometánico). Se realizó una mezcla de *n*-hexano (500 mL) y sílica gel, la cual se incorporó en el interior de la columna utilizando un embudo y se dejó compactar por gravedad (Fig. N°17). Una vez depositado el adsorbente en el fondo de la columna, se colocaron 20 cm de algodón para proteger el frente del adsorbente, quedando el solvente a la altura del nivel del algodón.

### **Preparación de la muestra**

Se disolvió la muestra (62.4 g del extracto diclorometánico) en una mínima cantidad de diclorometano y se añadió una cantidad de sílica gel proporcional a la cantidad de muestra. Posteriormente se eliminó el solvente en el rota-evaporador, obteniéndose una mezcla homogénea, pulverulenta y exenta de solvente; la cual, se incorporó por medio de un embudo sobre los 20 cm de algodón de la columna.

### **Elución de las fracciones**

Se utilizó como sistema de elución volúmenes de solventes puros (*n*-hexano, AcOEt, MeOH) y mezclas de solventes de *n*-hexano:acetato de etilo (en orden creciente de polaridad) con el fin de arrastrar la mayor cantidad de metabolitos secundarios activos en la muestra, empleado el siguiente orden:

1. 600 mL de *n*-hexano
2. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 10%
3. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 30%
4. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 50%
5. 600 mL de la mezcla *n*-hexano: acetato de etilo 70%
6. 600 mL Acetato de etilo puro
7. 1500 mL de metanol puro para lavar la columna. (Fig. N°19, Anexo N°7)

Cada una de las fracciones resultantes se recogió de forma dividida, en tres volúmenes de 200 mL en erlenmeyers de 250 mL. Todas las fracciones se evaluaron por cromatografía de capa fina con la finalidad de identificar la presencia de compuestos activos empleando como reactivo revelador óleum<sup>(22)</sup>, reuniéndose siete fracciones por la similitud presentada en la cromatografía de capa fina, conociéndose las fracciones como: *n*-hexano puro, *n*-hexano:AcOEt al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro; para el ensayo

microbiológico solo se utilizaron las últimas seis fracciones; ya que en la primera fracción de *n*-hexano puro no se observaron manchas que indicaran la presencia de compuestos activos, por lo que se descarto. (Anexo N°4 y Anexo N°5).

Cada fracción fue llevada a sequedad en un rota-evaporador; obteniendo así todos los compuestos (metabolitos secundarios) arrastrados por la mezcla de solventes y solventes puros. Obteniendo diferentes pesos para cada fracción, siendo la fracción del 50% la que posee un mayor rendimiento. (Cuadro N°4, Fig. N°27)

Cuadro N°4 Pesos obtenidos de las fracciones a ensayar para análisis microbiológicos.

Fracción	Peso (gramos)
10%	0.4
30%	3.9
50%	12.8
70%	2.6
Acetato de etilo	0.5
Metanol	1.0

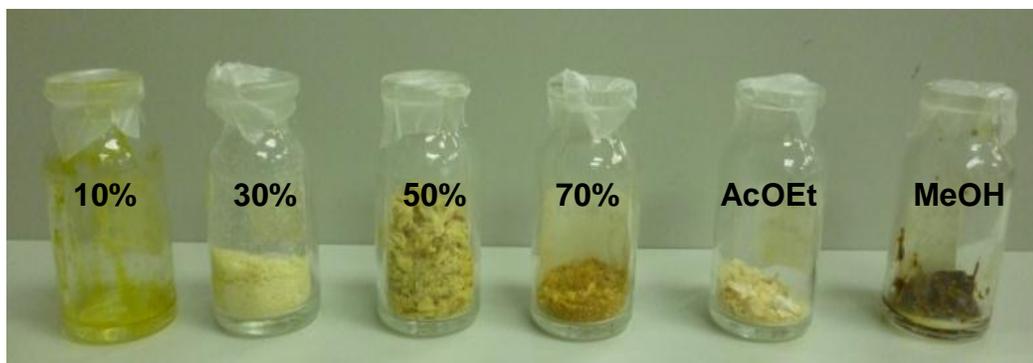


Fig. N°27 Fracciones de las mezclas *n*-hexano:AcOEt 10%, 30%, 50%, 70%, AcOEt y MeOH puro respectivamente.

### 5.5 Preparación de las diluciones a diferentes concentraciones de las fracciones *n*-hexano/AcOEt al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*.

Se decidió hacer una dilución a una concentración de 10000 ppm, la cual fue determinada en base a investigaciones realizadas en la sección de Investigación Aplicada y Tesis Profesionales.<sup>(9,36)</sup>

Al obtener resultados satisfactorios con esta concentración, se evaluaron dos diluciones más a diferentes concentraciones una superior y otra inferior (15000 ppm, 5000 ppm). (Anexo N°9)

### 5.6 Resultados de la evaluación microbiológica.

#### 5.6.1 Pruebas de identificación de *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Cuadro N°5 Características macroscópicas de los microorganismos de prueba en su medio de cultivo.

Microorganismo de prueba	Medio de Cultivo	Resultado
<b><i>Candida albicans</i></b>	Agar sabouraud: colonias blandas circulares de color crema y con olor característico a levadura. Con el tiempo se vuelven amarillentas. (Fig. N°28)	Prueba (+) Confirmación de <b><i>Candida albicans</i></b>
<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	Agar sabouraud: Colonias vellosas color blanco, aspecto de algodón. (Fig. N°29)	Prueba (+) Confirmación de <b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>

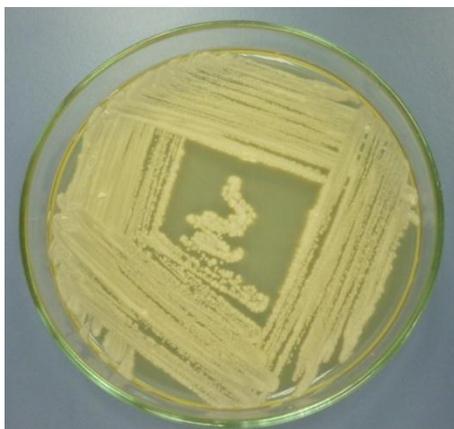


Fig. N°28 Morfología de ***Candida albicans*** en agar saboraud.

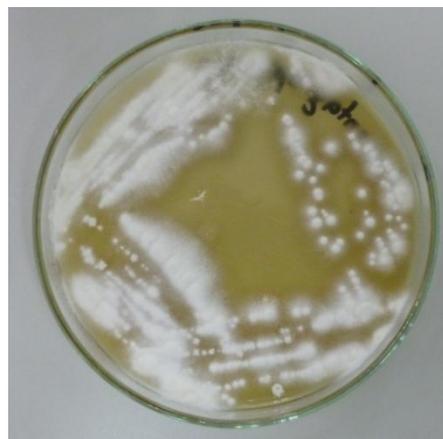


Fig. N°29 Morfología de ***Trichophyton mentagrophytes*** en agar saboraud.

Cuadro N°6 Características microscópicas de los microorganismos de prueba en las diferentes tinciones.

Microorganismo de prueba	Tinción	Resultado
<b><i>Candida albicans</i></b>	Tinción Gram: microorganismos Gram +, coloración morada, ovalados y algunos en gemación. (Fig. N°30)	Prueba (+) Confirmación de <b><i>Candida albicans</i></b>
<b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>	Tinción con lactofenol azul algodón: Microconidias en forma de racimo de uva. (Fig. N°31)	Prueba (+) Confirmación de <b><i>Trichophyton mentagrophytes</i></b>

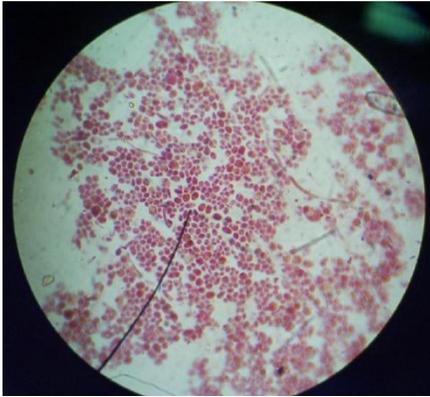


Fig. N°30 Morfología de ***Candida albicans*** en tinción al Gram.

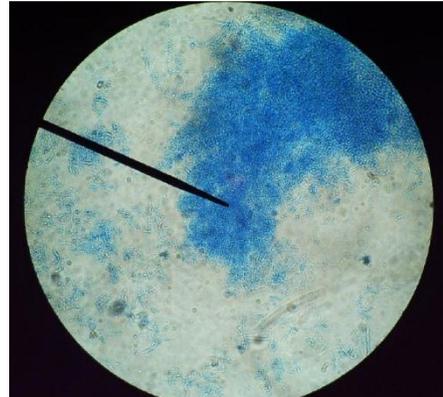


Fig. N°31 Morfología de ***Trichophyton mentagrophytes*** en lactofenol.

Se identificaron a los microorganismos ensayados como ***Candida albicans*** y ***Trichophyton mentagrophytes*** por dar positivo en las pruebas de identificación macroscópicas y microscópicas realizadas; por lo tanto, las cepas analizadas son puras; es decir, los cultivos utilizados en el análisis microbiológico no presentaban contaminación.

### 5.6.2 Resultados de la determinación del potencial de inhibición para *Candida albicans*.

Cuadro N°7 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30%, 50%, 70%, Acetato de etilo puro y Metanol puro) obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, por el método de Kirby Bauer Modificado para *Candida albicans*.

FRACCIONES	DILUCIONES	HALOS DE INHIBICION DE LAS FRACCIONES (mm)	HALOS DE INHIBICION PATRON KETOCONAZOL (mm)	RESULTADO
10%	5000 ppm	19	30	Intermedio
	10000 ppm	22	32	Sensible
	15000 ppm	22	30	Sensible
30%	5000 ppm	19	30	Intermedio
	10000 ppm	23	32	Sensible
	15000 ppm	25	30	Sensible
50%	5000 ppm	20	30	Sensible
	10000 ppm	21	32	Sensible
	15000 ppm	24	30	Sensible

Cuadro N°7 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30%, 50%, 70%, Acetato de etilo puro y Metanol puro) obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, por el método de Kirby Bauer Modificado para *Candida albicans*. (Continuación)

FRACCIONES	DILUCIONES	HALOS DE INHIBICION DE LAS FRACCIONES (mm)	HALOS DE INHIBICION PATRON KETOCONAZOL (mm)	RESULTADO
70%	5000 ppm	17	30	Intermedio
	10000 ppm	21	32	Sensible
	15000 ppm	23	30	Sensible
Acetato de etilo puro	5000 ppm	20	30	Sensible
	10000 ppm	19	32	Intermedio
	15000 ppm	22	30	Sensible
Metanol puro	5000 ppm	17	30	Intermedio
	10000 ppm	20	32	Sensible
	15000 ppm	22	30	Sensible

Valores de sensibilidad según Duraffourd<sup>(2)</sup>

Nula  $\leq$  8mm, Limite 9-14mm, Media 15-19 mm, Sumamente sensible  $\geq$  20 mm

### Análisis:

El cuadro N°7 refleja los resultados obtenidos en el ensayo, lo que muestra que las tres diluciones a las diferentes concentraciones ensayadas (5000 ppm, 10000 ppm y 15000 ppm) poseen actividad antimicótica contra ***Candida albicans***, siendo la concentración de 15000 ppm la más efectiva ya que sus halos de inhibición fueron superiores al rango reportado según Duraffourd<sup>(2)</sup>, por lo que la levadura resulto ser sumamente sensible; dentro de la concentración de 15000 ppm la fracción con mayor actividad inhibitoria es la del 30% ya que sus halos alcanzan los 25 mm de diámetro.

Cuadro N°8 Controles utilizados en los ensayos microbiológicos.

BLANCO: DIMETILSULFOXIDO	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO resistente
PATRON: DISCOS DE ANTIMICÓTICO KETOCONAZOL 10mcg/disco	Formación de halos de 31mm de diámetro. MO susceptible.
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en toda la placa.

Valores de sensibilidad según Duraffourd<sup>(2)</sup>

Nula  $\leq 8$  mm, Limite 9-14 mm, Media 15-19 mm, Sumamente sensible  $\geq 20$  mm

### Análisis:

El cuadro N°8 refleja que se llevó un blanco con Dimetilsulfóxido (DMSO), que fue el disolvente utilizado para preparar las diluciones, presentando un crecimiento abundante del hongo en toda la placa, es decir sin zona de inhibición, lo que significa que el efecto antimicótico se debe a los compuestos activos presentes en las diluciones de las fracciones ensayadas y no al solvente utilizado.

Se realizó una comparación entre las diluciones de las fracciones con discos estandarizados de Ketoconazol, haciendo notar la actividad antimicótica del Ketoconazol en comparación a las diluciones. También se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, con el fin de determinar la presencia de la cepa, a través de su crecimiento uniforme y abundante, y no a la contaminación de microorganismos del medio respectivamente.

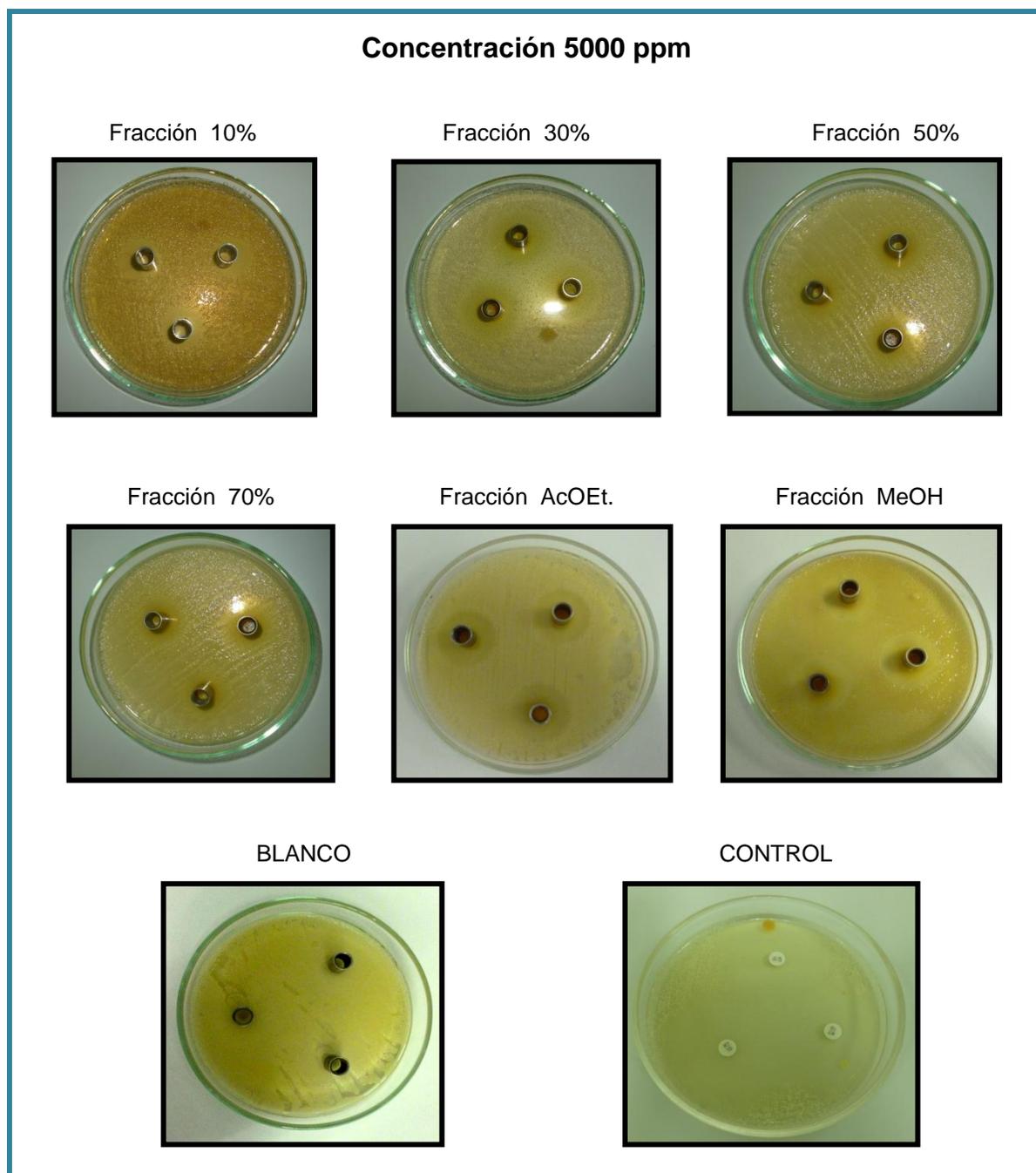


Fig. N°32 Resultados de la evaluación antimicótica contra *Candida albicans*, correspondientes a la concentración de 5000 ppm de cada fracción.

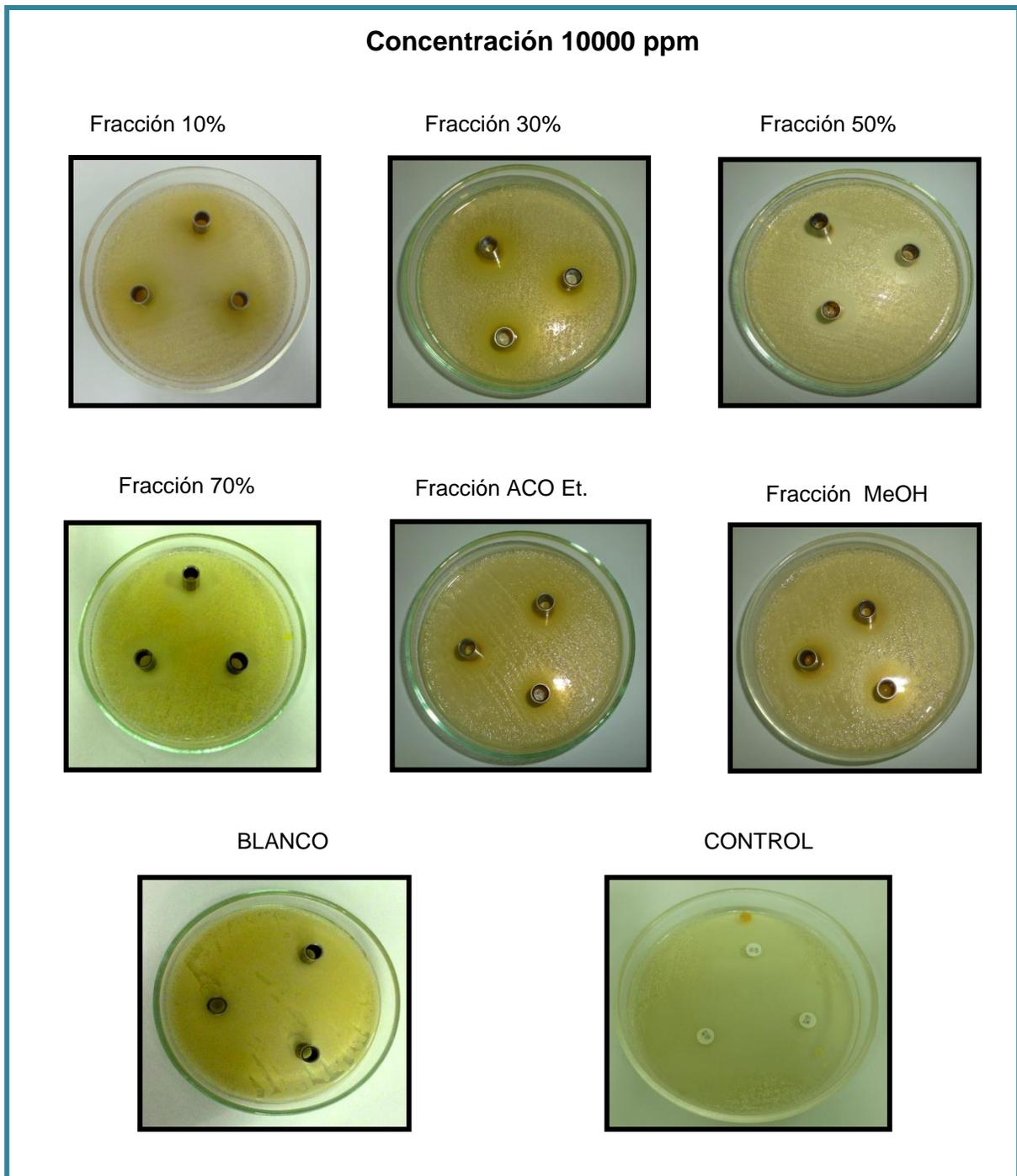


Fig. N°33 Resultados de la evaluación antimicótica contra *Candida albicans*, correspondientes a la concentración de 10000 ppm de cada fracción.

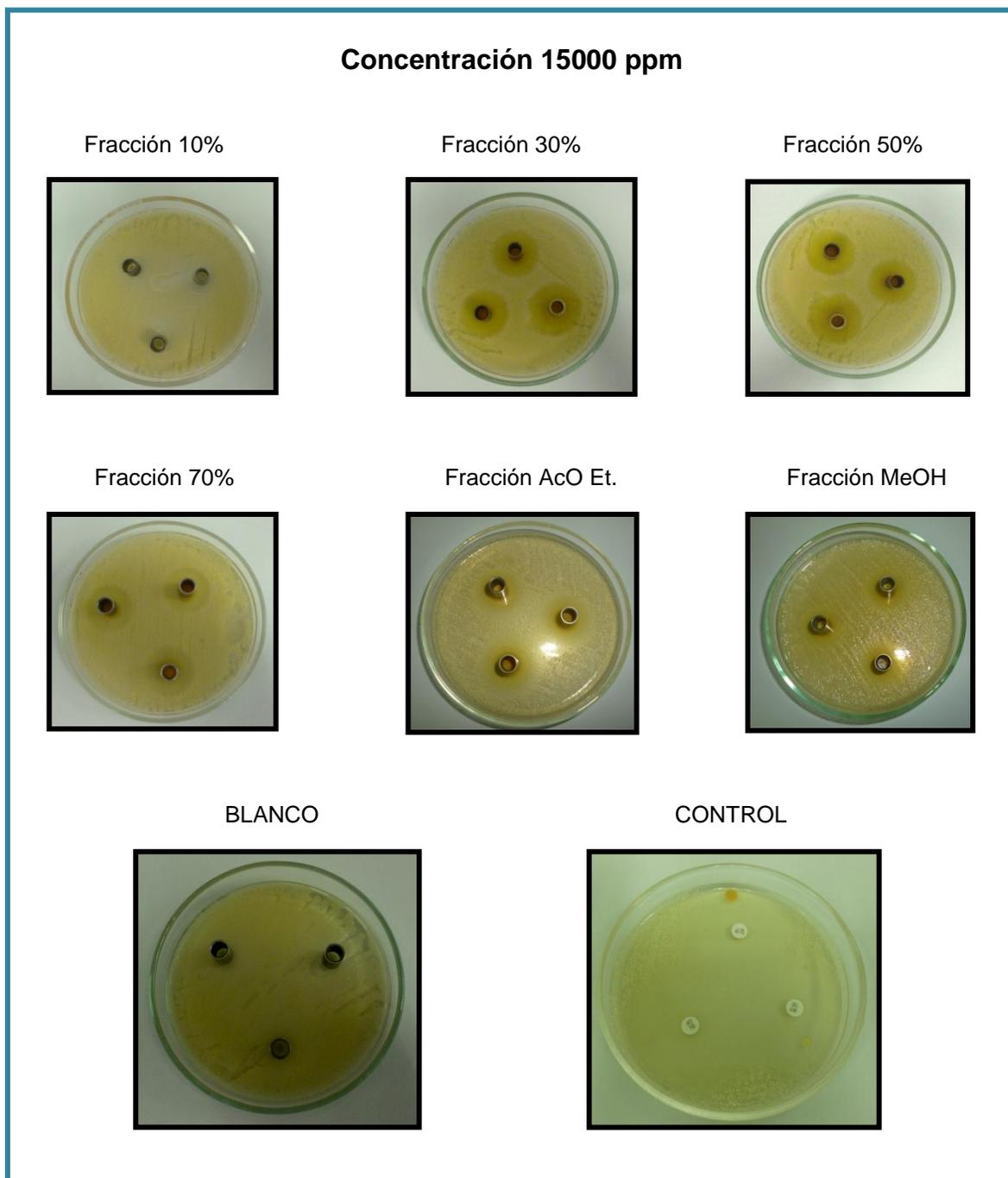


Fig. N°34 Resultados de la evaluación antimicótica contra *Candida albicans*, correspondientes a la concentración de 15000 ppm de cada fracción.

### 5.6.3 Resultados de la determinación del potencial de inhibición para *Trichophyton mentagrophytes*.

Cuadro N°9 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30%, 50%, 70%, Acetato de etilo puro y Metanol puro) obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometanico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, por el método de Kirby Bauer Modificado para *Trichophyton mentagrophytes*.

FRACCIONES	DILUCIONES	HALOS DE INHIBICION DE LAS FRACCIONES (mm)	HALOS DE INHIBICION PATRON KETOCONAZOL (mm)	RESULTADO
10%	5000 ppm	10	21	Resistente
	10000 ppm	15	22	Intermedio
	15000 ppm	19	21	Intermedio
30%	5000 ppm	25	21	Sensible
	10000 ppm	25	22	Sensible
	15000 ppm	29	21	Sensible
50%	5000 ppm	26	21	Sensible
	10000 ppm	30	22	Sensible
	15000 ppm	36	21	Sensible

Cuadro N°9 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30%, 50%, 70%, Acetato de etilo puro y Metanol puro) obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometanico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, por el método de Kirby Bauer Modificado para *Trichophyton mentagrophytes*. (Continuación)

FRACCIONES	DILUCIONES	HALOS DE INHIBICION DE LAS FRACCIONES (mm)	HALOS DE INHIBICION PATRON KETOCONAZOL (mm)	RESULTADO
70%	5000 ppm	18	21	Intermedio
	10000 ppm	27	22	Sensible
	15000 ppm	31	21	Sensible
Acetato de etilo puro	5000 ppm	19	21	Intermedio
	10000 ppm	15	22	Resistente
	15000 ppm	24	21	Sensible
Metanol puro	5000 ppm	18	21	Intermedio
	10000 ppm	20	22	Sensible
	15000 ppm	21	21	Sensible

Valores de sensibilidad según Duraffourd<sup>(2)</sup>

Nula  $\leq$  8mm, Limite 9-14mm, Media 15-19 mm, Sumamente sensible  $\geq$  20 mm

### Análisis:

El cuadro N°9 refleja los resultados obtenidos en el ensayo, por lo muestra que las tres diluciones a las diferentes concentraciones ensayadas (5000 ppm, 10000 ppm y 15000 ppm) poseen actividad antimicótica contra *Trichophyton mentagrophytes*, siendo la concentración de 15000 ppm la más efectiva ya que sus halos de inhibición fueron superiores al rango reportado según Duraffourd<sup>(2)</sup>, por lo que la levadura resulto ser sumamente sensible excepto en la fracción del 10%; dentro de la concentración de 15000 ppm la fracción con mayor actividad inhibitoria es la del 50% ya que sus halos alcanzan los 36 mm de diámetro.

Cuadro N°10 Controles utilizados en los ensayos microbiológicos.

BLANCO: DIMETILSULFOXIDO	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO resistente
PATRON: DISCOS DE ANTIMICÓTICO KETOCONAZOL 10 mcg/disco	Formación de halos de 21mm de diámetro MO susceptible.
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en toda la placa.

Valores de sensibilidad según Duraffourd<sup>(2)</sup>

Nula  $\leq$  8mm, Limite 9-14mm, Media 15-19mm, Sumamente sensible  $\geq$  20mm

### Análisis:

En el cuadro N°10 se refleja que se llevó un blanco con Dimetilsulfóxido (DMSO), que fue el disolvente utilizado para la preparación de las diluciones, presentando un crecimiento abundante del hongo en toda la placa, es decir sin zona de inhibición, lo que significa que el efecto antimicótico se debe a los compuestos activos presentes en las diluciones de las fracciones ensayadas y no al solvente utilizado.

Se realizó una comparación entre las diluciones de las fracciones y con discos estandarizados de Ketoconazol, haciendo notar la actividad antimicótica del Ketoconazol en comparación a las diluciones de las fracciones.

También se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, con el fin de determinar la presencia de la cepa, a través de su crecimiento uniforme y abundante, y no a la contaminación de microorganismos del medio respectivamente.

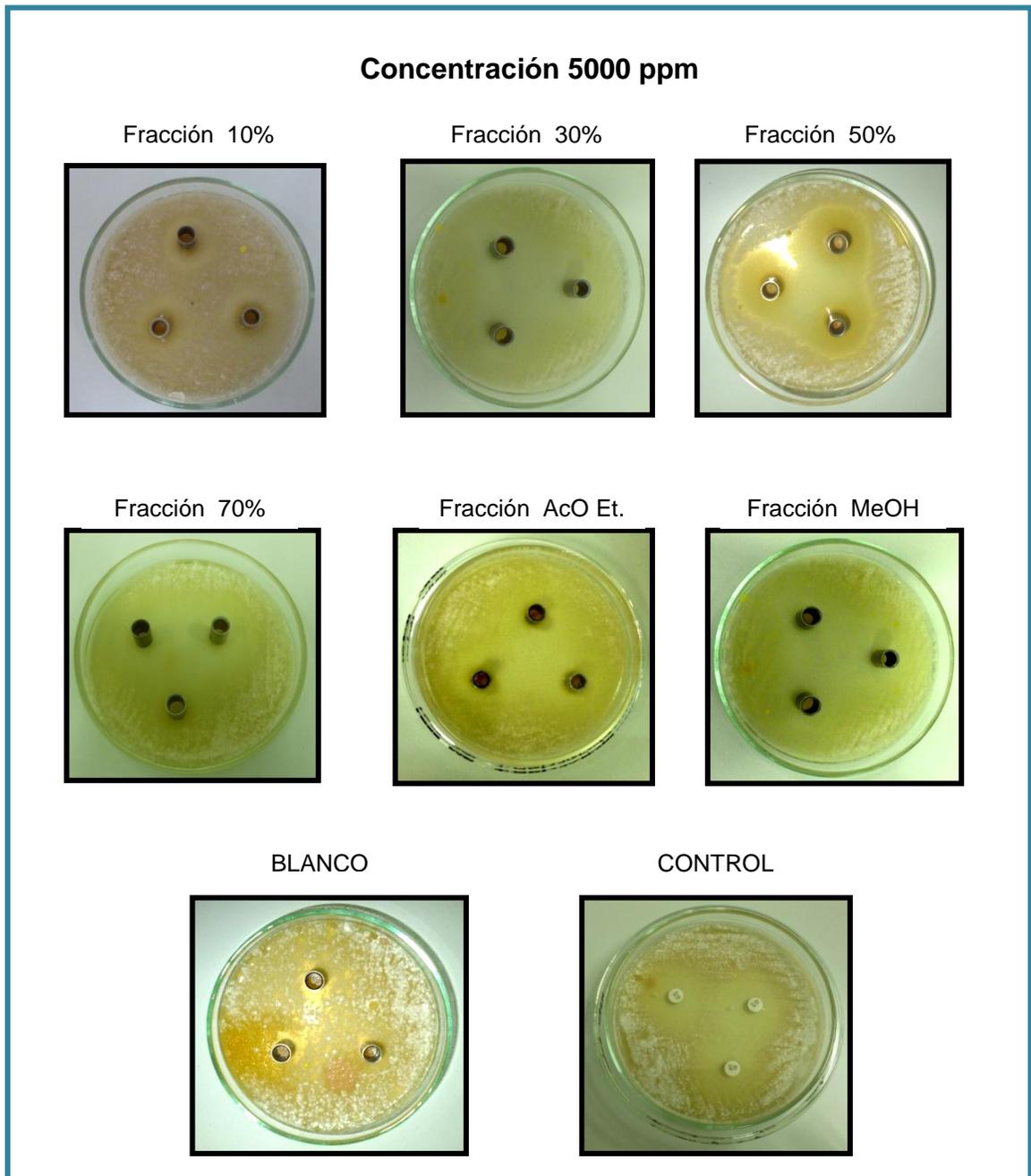


Fig. N°35 Resultados de la evaluación antimicótica correspondientes a la concentración de 5000 ppm de cada fracción contra *Trichophyton mentagrophytes*.

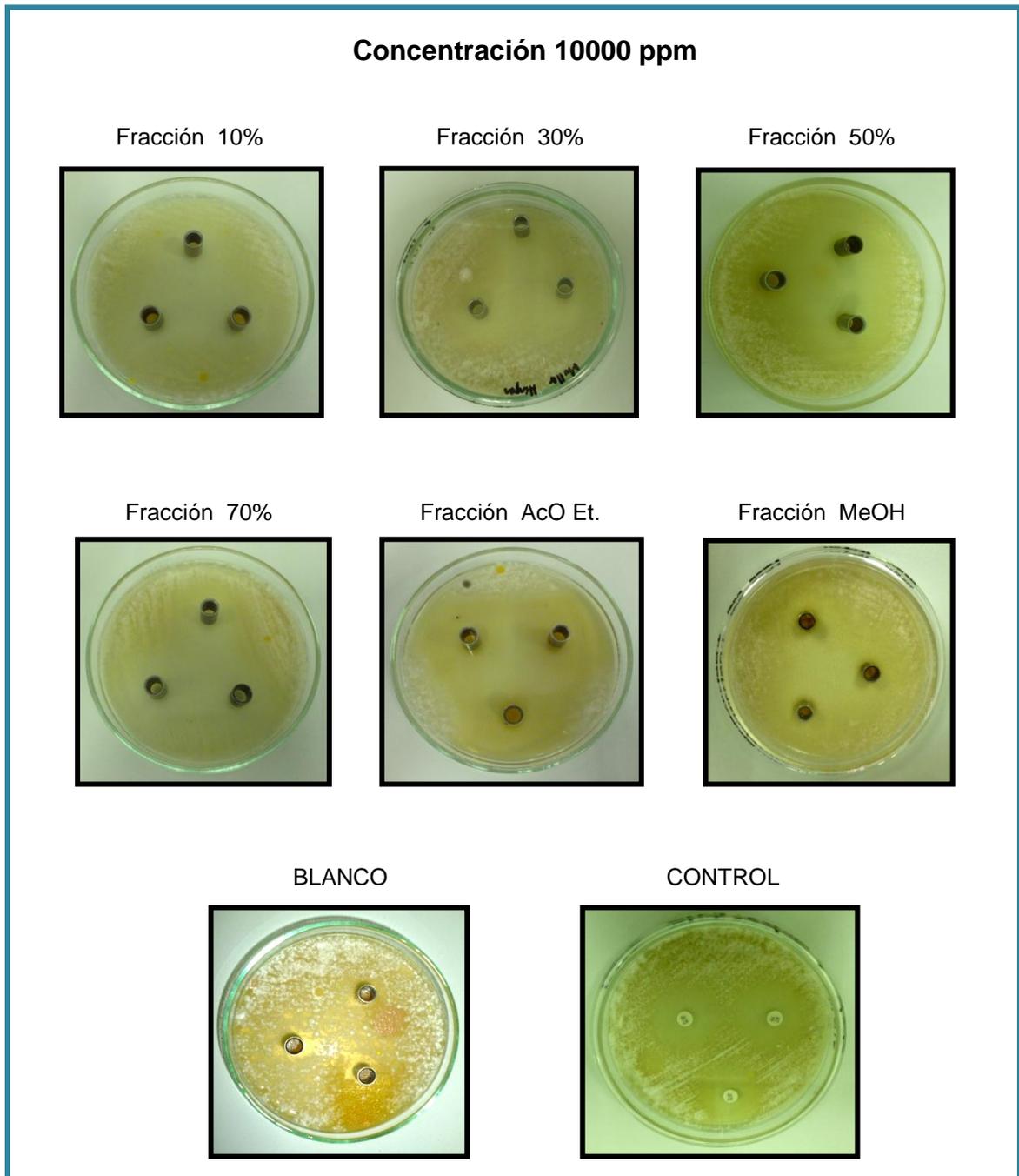


Fig. N°36 Resultados de la evaluación antimicótica correspondientes a la concentración de 10000 ppm de cada fracción contra *Trichophyton mentagrophytes*.

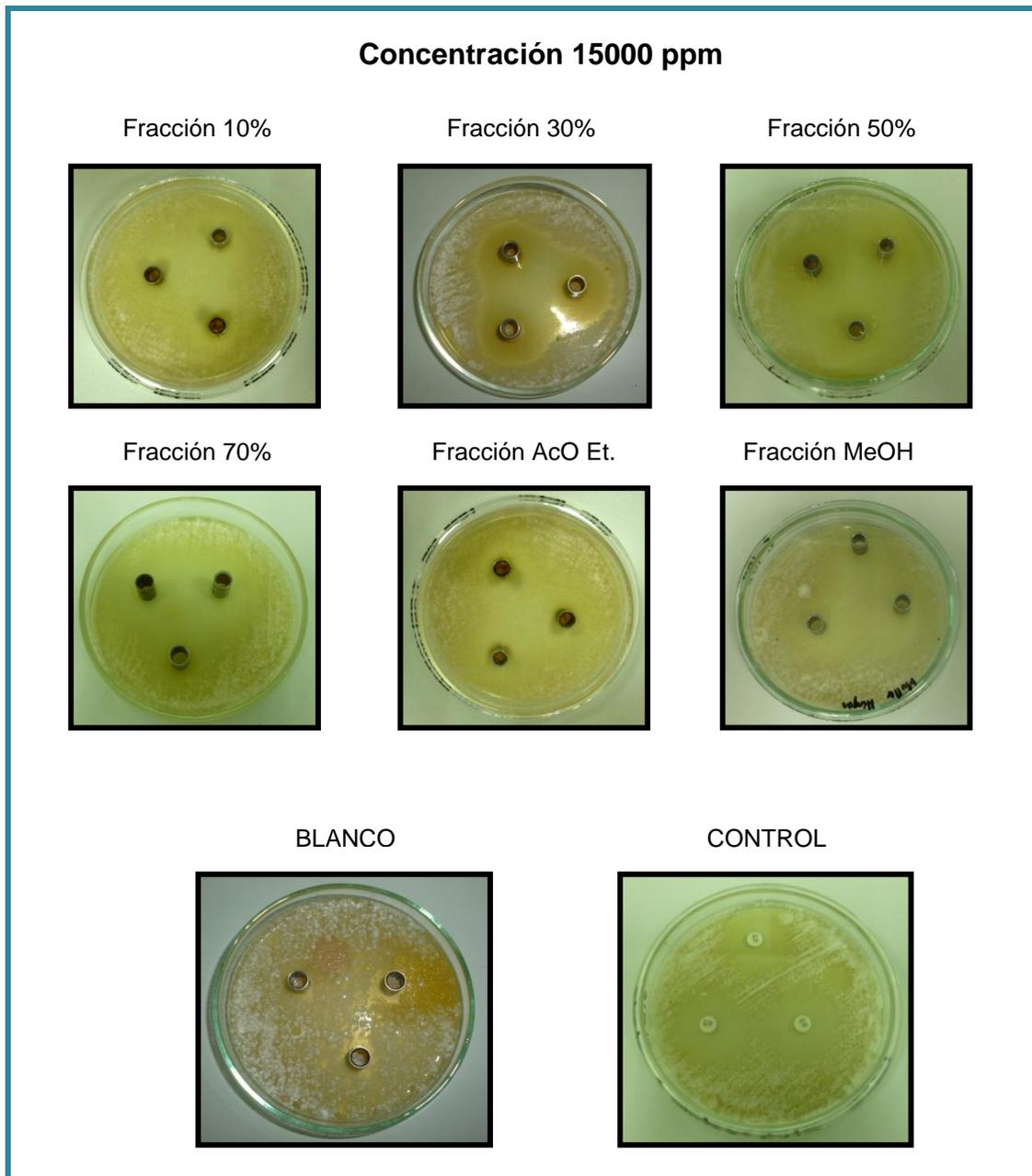


Fig. N°37 Resultados de la evaluación antimicótica correspondientes a la concentración de 15000 ppm de cada fracción contra *Trichophyton mentagrophytes*.

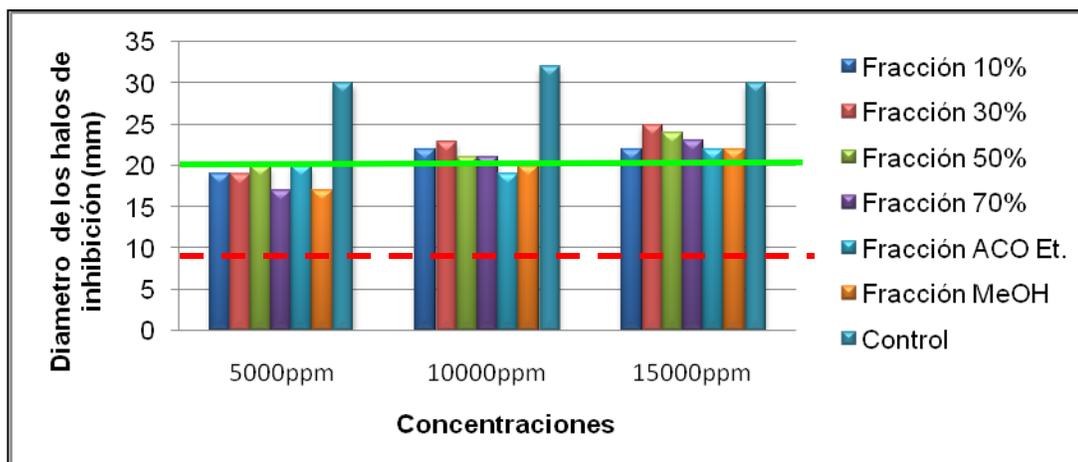


Fig. N°38 Comparación del efecto inhibitorio de las concentraciones de las fracciones de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* en *Candida albicans*.

Valores de sensibilidad según Duraffourd<sup>(2)</sup>

Nula  $\leq 8$ mm, Limite 9-14mm, Media 15-19mm, Sumamente sensible  $\geq 20$ mm

En base a los resultados del cuadro N°9 se realizó una representación gráfica (Fig. N°38); la cual, compara los diferentes niveles de actividad antimicótica que presentan las fracciones del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*; por lo que se establece que las tres diluciones a las diferentes concentraciones ensayadas poseen actividad antimicótica contra *Candida albicans* ya que sus halos de inhibición se encuentran en la zona media de los valores de sensibilidad según Duraffourd (línea intermitente roja), pero la concentración con mayor actividad es la de 15000 ppm, porque sus halos de inhibición sobrepasan el rango, en donde la cepa es sumamente sensible debido a que es mayor que 20 mm de diámetro (línea color verde); dentro de la concentración de 15000 ppm la fracción con mayor actividad inhibitoria es la del 30%, ya que sus halos de inhibición miden 25 mm de diámetro; por lo que, esta fracción posee mayor actividad antimicótica.

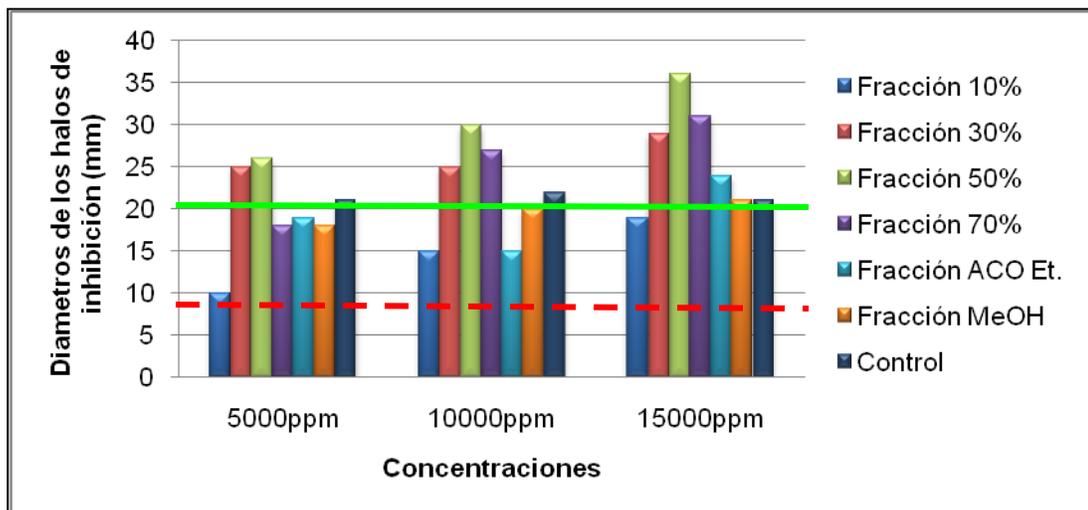


Fig. N°39 Comparación del efecto inhibitorio de las concentraciones de las fracciones de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* en *Trichophyton mentagrophytes*.

Valores de sensibilidad según Duraffourd<sub>(2)</sub>

Nula  $\leq 8$ mm, Limite 9-14mm, Media 15-19mm, Sumamente sensible  $\geq 20$ mm

En base a los resultados del cuadro N°9 se realizó una representación gráfica (Fig. N°39); la cual, compara los diferentes niveles de actividad antimicótica que presentan las fracciones del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, por lo que se establece que las tres diluciones a las diferentes concentraciones ensayadas poseen actividad antimicótica contra *Trichophyton mentagrophytes* ya que sus halos de inhibición se encuentran en la zona media de los valores de sensibilidad según Duraffourd (línea intermitente roja), pero la concentración con mayor actividad es la de 15000 ppm, debido a que sus halos de inhibición sobrepasan el rango, en donde la cepa es sumamente sensible ya que es mayor que 20 mm de diámetro (línea color verde); dentro de la concentración de 15000 ppm, la fracción con mayor actividad inhibitoria es la del 50%, ya que sus halos de inhibición miden 36 mm de diámetro; por lo que, esta fracción posee mayor actividad antimicótica.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. El rendimiento obtenido del extracto etanólico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* fue de 70.6%, mientras que el rendimiento del extracto diclorometánico fue de 23.4%, siendo este último donde se encuentran presentes los compuestos de naturaleza terpénica y compuestos fenólicos.
2. Las tres concentraciones ensayadas (5000 ppm, 10000 ppm y 15000 ppm) de cada una de las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico, presentan actividad inhibitoria contra *Candida albicans*, siendo la de 15000 ppm (para todas las fracciones) la que presenta mayor efecto antimicótico.
3. Para la concentración de 15000 ppm, la fracción con mayor actividad antimicótica contra *Candida albicans*, fue la fracción de 30%, ya que sus halos de inhibición fueron de 25 mm de diámetro siendo superior al rango reportado según los valores de sensibilidad de Duraffourd, el cual establece que  $\geq 20\text{mm}$  la cepa es sumamente sensible.
4. La concentración de 15000 ppm presenta mayor actividad inhibitoria contra *Trichophyton mentagrophytes*, de las tres concentraciones ensayadas provenientes de las fracciones obtenidas del extracto diclorometánico.

5. Para la concentración de 15000 ppm, la fracción con mayor actividad antimicótica contra *Trichophyton mentagrophytes*, fue la fracción de 50%, ya que sus halos de inhibición fueron de 36 mm de diámetro, superiores al rango reportado según los valores de sensibilidad de Duraffourd.
6. La goma-resina de *Eucalyptus citriodora* posee mayor actividad antimicótica frente a *Trichophyton mentagrophytes* que contra *Candida albicans*, debido a que se formaron halos de inhibición de mayor diámetro.
7. El comportamiento de las concentraciones para *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans* es lineal; es decir, a mayor concentración mayor efecto antimicótico en todas las fracciones, excepto la fracción del acetato de etilo puro.
8. A diferencia de otros estudios en donde se utilizan partes de plantas como materia prima de ensayos fitoquímicos, se garantiza la continuidad de la especie vegetal, ya que al utilizar la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, no provoca la destrucción de la especie vegetal, ya que es un exudado de la planta y no una parte fundamental de ella.
9. Las fracciones de las mezclas *n*-hexano/acetato de etilo al 10%, 30%, 50% y 70%, acetato de etilo puro y metanol puro obtenidas del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* poseen actividad antimicótica contra *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*; lo cual, confirma la hipótesis planteada en un inicio en el diseño metodológico.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Mejorar el sistema de extracción del exudado de *Eucalyptus citriodora*, ya que se ha comprobado su efecto antimicótico.
2. Fomentar un desarrollo ordenado de las plantaciones de eucalipto, ya que es un árbol que absorbe mucha agua, lo que ocasiona aridez en los suelos; esto con el fin, de evitar un impacto ambiental negativo en la zona de siembra.
3. Investigar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna, contra cepas de interés clínico, diferente a las estudiadas, para comprobar su espectro de acción y así poder utilizarlo en un mayor número de afecciones.
4. Continuar el estudio de las fracciones del 30% y 50%, a fin de aislar y elucidar los compuestos que poseen la actividad antimicótica, con el objetivo de validar la metodología de extracción y así en un futuro proceder a formular un fitofármaco.
5. Realizar estudios de toxicidad con el fin de evaluar el efecto que los compuestos presentes en la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* puedan ocasionar sobre las células normales.
6. Buscar otro solvente diferente al diclorometano, que sea de menor toxicidad, para los procesos de extracción de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alas Galdámez M.C., Pinto Flores J.A. Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna (*n*- hexano: AcOEt 10%, 30% y 50%) procedentes del extracto diclorometanico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto). [Trabajo de Graduación]. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 2007.
2. Alzamora L., Morales L., Armas L., Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. [Trabajo de Graduación]. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas. Antonio Raimondi. Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM. Laboratorio de Química Facultad de Ciencias. Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2001. Disponible en:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/v62\\_n2/pdf/a08v62n2.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/anales/v62_n2/pdf/a08v62n2.pdf)
3. Ascencio García K. Y., Sánchez García C., Merlos Umanzor K. Frecuencia de micosis superficiales en niños hasta 12 años de edad del centro social SOS Doctor Hermann Gmeiner de aldeas infantiles SOS departamento de San Miguel, en el periodo comprendido de julio a septiembre de 2007. [Trabajo de Graduación]. Universidad Doctor Andrés Bello. Facultad Ciencias de la Salud. Licenciatura en Laboratorio Clínico. Regional San Miguel. 2007. [Acceso 5 marzo 2011]. Disponible en:  
<http://www.unab.edu.sv/bvirtual/10529/>

4. Ávalos García, A., Pérez-Urria Carril, E. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. [Acceso 5 febrero 2012] Disponible en:  
[http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)
5. B. Fitzpatrick Thomas. Dermatología en Medicina General. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. 2009 (7ª edición); Tomo 3: 1824.
6. C. Ferrándiz. Dermatología Clínica. Madrid, España. Editorial Elsevier. 2006 (2ª edición); 64.
7. Castillo García E., Martínez Solís I. Manual de Fitoterapia. Barcelona, España. Editorial Elsevier Masson. 2007; 30-32
8. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Disponible en:  
[http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000029.nsf/voD ocumentos/C397A37BB0986922C1256B6B0048FAE0/\\$File/pie%20de% 20atleta.htm](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000029.nsf/voD ocumentos/C397A37BB0986922C1256B6B0048FAE0/$File/pie%20de% 20atleta.htm)
9. CYTED. Programa de ciencia y tecnología para el desarrollo de Iberoamérica.
10. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 88(2): 308-316. [Acceso 7 junio 2011]. Disponible en:  
<http://books.google.com.sv/books?id=vSERRK973U0C&pg=PA406&dq=Dorman+HJD,+Deans+SG.+Antimicrobial+agents+from+plants:+Antibact>

[erial+activity+of+plant+volatile+oils.+J.+Appl.+Microbiol.&hl=es&ei=zufvTf6FJ8b1gAex7ZjyAQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=7&ved=0CFQQ6AEwBg#v=onepage&q=Dorman HJD%2C Deans SG. Antimicrobial agents from plants%3A Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol. &f](#)

11. Galbis Perez J. A. Panorama actual de la Quimica Farmaceutica Universidad de Sevilla. 2004 (2ª edición); 215. Disponible en:

[http://books.google.com.sv/books?id=xPlmnSeN9ZYC&pg=PA215&lpg=PA215&dq=estructura+de+la+shikonina&source=bl&ots=holcQ17xuD&sig=CkEgW coU 5X00oflgGqOu5Kj6A&hl=es&ei=kk8JTU6wCo3rgQe848j9AQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=2&ved=0CB0Q6AEwAQ#v=onepage&q=estructura%20de%20la%20shikonina&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=xPlmnSeN9ZYC&pg=PA215&lpg=PA215&dq=estructura+de+la+shikonina&source=bl&ots=holcQ17xuD&sig=CkEgW coU 5X00oflgGqOu5Kj6A&hl=es&ei=kk8JTU6wCo3rgQe848j9AQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CB0Q6AEwAQ#v=onepage&q=estructura%20de%20la%20shikonina&f=false)

12. Gamazo C., López-Goñi I., Díaz R. Manual Práctico de Microbiología. MASSON S.A, 2005 (3ª edición): Disponible en:

[http://books.google.com.sv/books?id=MfW3TuHLA4gC&pg=PA45&lpg=PA45&dd=patrones+McFarland&source=bl&ots=4n aSRTzJ&sig=91LEXhP6OiRHPY9WARnE4kFM&hl=es&ei=7kYvTqHpGYLVgAe416i2AQ&sa=X&oi=book\\_result&cc=result%20&resnum=5&ved=0CD4Q6AEwBA#v=onepage&q=patrones%20McMcFarla&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=MfW3TuHLA4gC&pg=PA45&lpg=PA45&dd=patrones+McFarland&source=bl&ots=4n aSRTzJ&sig=91LEXhP6OiRHPY9WARnE4kFM&hl=es&ei=7kYvTqHpGYLVgAe416i2AQ&sa=X&oi=book_result&cc=result%20&resnum=5&ved=0CD4Q6AEwBA#v=onepage&q=patrones%20McMcFarla&f=false)

13. Giannetti, A., Galimberti, Ricardo L., Tratado de Dermatología, PICCIN, Italia, 2012. Vol. 1: 572-573. [Acceso 5 diciembre 2011] Disponible en:

<http://books.google.com.sv/books?id=EsvN7RHR-EsC&pg=PA572&dq=queratinofilia&hl=es&sa=X&ei=fYsxT9rMAcmCgAeExKGuBQ&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q=queratinofilia&f=false>

14. Giménez S., Peral E. Infecciones por hongos: en verano más. Julio de 1997. [Acceso 5 marzo del 2011]. Disponible en:  
<http://www.medycom.com/lavanguardia/hongos.html>
15. Gennaro, A. R. Remington Farmacia. Médica panamericana. Argentina. 2003 (20ª edición); Tomo 1: 683. Disponible en:  
<http://books.google.com.sv/books?id=Av4llsyH-qcC&pg=PA686&dq=cromatografia+fase+estacionaria&hl=es&sa=X&ei=7kQxT-TUMczrggf6mPymBQ&ved=0CEwQ6AEwBQ#v=onepage&q=cromatografia%20fase%20estacionaria&f=false>
16. Guzmán Díaz I., Henríquez Ardón J. Determinación de la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna (*n*- hexano: Acetato de Etilo al 70%, acetato de etilo puro y metanol puro) procedentes del extracto diclorometanico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***. [Trabajo de Graduación]. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. C. A. 2007.
17. Harris, D.C., Análisis químico cuantitativo. Reverté S.A. 2007 (3ª edición); 553-556. [Acceso 10 diciembre 2011]. Disponible en:  
[http://books.google.com.sv/books?id=H-\\_8vZYdL70C&pg=PA555&dq=cromatografia+elucion&hl=es&sa=X&ei=UzsxT6DVNo6-gAfg-PSsBQ&sqi=2&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q=cromatografia%20elucion&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=H-_8vZYdL70C&pg=PA555&dq=cromatografia+elucion&hl=es&sa=X&ei=UzsxT6DVNo6-gAfg-PSsBQ&sqi=2&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q=cromatografia%20elucion&f=false)

18. Koneman E. W., Allen Stephen D., Janda Willian M., Schreckenberger P. C. Diagnostico Microbiológico Texto y atlas color. Editorial médica panamericana. Argentina 1999 (5ª Edición); 85-87.
19. Kummerer, K. Resistance in the environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54 (3), 311, 2004.
20. Lambert, J. B., Wu, Y., Santiago-Blay, J. A. Taxonomic and Chemical Relationships Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Plant Exudates. *Journal of Natural Products*, 68 (5), 635-638, 2005.
21. López Lillo, A., Sánchez de Lorenzo Cáceres J., Árboles de España, Manual de Identificación. Ediciones Mundi-prensa, 2001. (2ª edición): 363, 562-569. [acceso 20 octubre 2011]. Disponible en:  
[http://books.google.com.sv/books?id=KCcb7h7lvpAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=KCcb7h7lvpAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
22. López Sánchez M., Méndez T., Pérez Galván F., Torres Padrón M., Métodos físicos de separación y Purificación de sustancias orgánicas. Universidad de Las Palmas de La Gran Canaria. Departamento de Química. 2005. Pág. 28. Disponible en:  
<http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>
23. Martínez Guerrero R. E., Quinteros Pérez M. T. Comprobación de la actividad antimicótica in Vitro de una tintura elaborada con oleorresina de Eucalipto. [Trabajo de Graduación]. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 2003. Técnicas experimentales en síntesis orgánicas. Editorial Síntesis. Págs. 168-177.

24. Méndez Rivas M. C., Ramírez Mendoza J. L. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico de la goma resina de ***Eucalyptus citriodora*** Eucalipto. [Trabajo de Graduación]. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. C.A. 2006.
25. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Causas Frecuentes y Principales año 2008. [Actualizado el jueves 3 de junio del 2010; acceso 5 marzo del 2011]. Disponible en:  
<http://www.salud.gob.sv/index.php/temas/politicas-sectoriales/vigilancia-sanitaria/informacion/estadisticas/130>
26. Najarro Mendoza C.M., Ramírez Henríquez D.J. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la oleoresina del ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto). [Trabajo de Graduación]. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. C.V. 2005.
27. Núñez M., Pozo M., Valladares J. Concentración Inhibitoria Mínima de tres extractos de plantas medicinales sobre bacterias del género ***Aeromonas***, causante de enfermedades en peces. Ciudad de La Habana (Cuba). 2001. Disponible en:  
<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1402/extractos.htm>
28. Núñez M., Quinteros T., Maravilla S., Sánchez de Ramos M. E., Bazzocchib I., Jiménez I. Tamizaje fitoquímico por RMN-<sup>1</sup>H de la goma resina del ***Eucalyptus citriodora*** y su actividad antimicrobiana. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, El Salvador. Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González”, Universidad

de La Laguna e Instituto Canario de Investigación del Cáncer, La Laguna, Tenerife, España. 2007. [Acceso 28 mayo 2010]. Disponible en: <http://www.usam.edu.sv/usam/images/stories/ARTICULOSICTUSAM/ME MORIAS%20SEGUNDA%20JORNADA.pdf>

29. Rodríguez Carranza R. Vademécum Académico de Medicamentos (VAM). Mc Graw Hill. México 2005. (4º Edición): 61-62 y 459.

30. Roig, J. T.: Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. La Habana. Ed. Científico-Técnica, 1988: 1125.

31. Ryman D. Aromaterapia. Barcelona, España. Kairós. 1995.: 107-108. Disponible en: [http://books.google.com/books?id=IBldh49NSScC&pg=PA107&dq=eucalipto+propiedades+antisepticas&hl=es&ei=c7vTfGbO66u0AHDn7TyDA&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=4&ved=0CDgQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com/books?id=IBldh49NSScC&pg=PA107&dq=eucalipto+propiedades+antisepticas&hl=es&ei=c7vTfGbO66u0AHDn7TyDA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=4&ved=0CDgQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false)

32. Santamarina Siurana, M. P. Roselló Caselles, J. García Breijo, F. J. Prácticas de Biología y Botánica. Universidad Politécnica de Valencia: 93.

33. Sharapin, N. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Área de Ciencia y Tecnología del Convenio Andrés Bello, Red Iberoamericana de productos farmacéuticos (RIPROFITO) del subprograma CYTED. Colombia. 2000 (1ª edición):198. [Acceso 7 febrero 2012]. Disponible en:

<http://books.google.com.sv/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA198&dq=tamizaje+fitoquimico&hl=es&sa=X&ei=fI0xT CqHYScgQez98WVBQ&ved=0CC4Q6AEwAA#v=onepage&q=tamizaje%20fitoquimico&f=false>

34. Smith, Jr. L.O. Cristol S. J. 1970-1972. Química Orgánica. Barcelona España. Reverté, S. A.: 793.
35. Stuart, W. Microbiología, McGraw-Hill Interamericana, Editores S.A. de C.V.: 153-154, 2000.
36. Toledo Mendoza, R. A., 2011. Entrevista. Coordinadora del proyecto de investigación en: “Ensayos simples para el aislamiento de compuest bioactivos de plantas medicinales”. Laboratorio de investigación en productos naturales. Facultad de Química y Farmacia.
37. Vásquez Hidalgo, A. Micosis en El Salvador. Un problema de Salud Pública. “Propiedades Antimicóticas In Vitro de una Planta Natural **Allium sativum**”. 2001. [acceso 27 de febrero del 2011] Disponible en: <http://www.redisal.org.sv/Inventario/articulo%20micosis%20allium%20sat.pdf>
38. Vera García. Introducción a la Microbiología. EUNED. (2ªedicion) : 91 [Acceso 12 de Octubre del 2001] Disponible en: [http://books.google.com.sv/books?id=K ETVnqnMZIC&pg=PA92&dq=clamidosporas&hl=es&ei=DzmWTpjhLsHw0qHj1vDMBw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=clamidosporas&f=false](http://books.google.com.sv/books?id=K ETVnqnMZIC&pg=PA92&dq=clamidosporas&hl=es&ei=DzmWTpjhLsHw0qHj1vDMBw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCkQ6AEwAA#v=onepage&q=clamidosporas&f=false)

## GLOSARIO

**Anfotericina B:** Antimicótico-Antiprotozoario. Antibiótico producido por *Streptomyces nodosus*, con propiedades fungistáticas o fungicidas, la cual depende de las concentraciones alcanzadas en los líquidos orgánicos y de la susceptibilidad de los microorganismos. Es altamente eficaz contra micosis sistémicas producidas por *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* y especies de *Candida*. En los organismos, altera la permeabilidad de la membrana celular que contiene esteroides, lo que se traduce en pérdida de los componentes celulares.<sup>(29)</sup>

**Antimicótico:** Sustancia utilizada en el tratamiento de enfermedades causadas por hongos.<sup>(18)</sup>

**Caduco, ca:** Dícese del órgano poco durable y caedizo.<sup>(21)</sup>

**Caedizo, za:** Caduco.<sup>(21)</sup>

**Cápsula:** Fruto seco y dehiscente.<sup>(21)</sup>

**Clamidosporas:** Son las esporas más resistentes de los hongos. Resisten las condiciones desfavorables como el calor y la desecación, promueven la sobrevivencia en ambientes hostiles, al originar nuevos individuos cuando las condiciones son favorables.<sup>(38)</sup>

**Coloración de Gram:** Se usa principalmente para el examen microscópico directo de muestras y subcultivos. Las bacterias que retienen el colorante se ven negroazuladas cuando se observan al microscopio, y se denominan entonces gram positivas. Algunas bacterias pierden la coloración primaria con

cristal violeta cuando son tratadas con el decolorante, presumiblemente debido al alto contenido de lípidos de su pared celular. Estas bacterias decoloradas toman el colorante de contraste, la safranina, y se ven rojas cuando se observan al microscopio denominándose gram negativas.<sup>(18)</sup>

**Corimbo:** Inflorescencia con diversos pedúnculos que sitúan las flores al mismo nivel.<sup>(21)</sup>

**Corimboso, sa:** Con aspecto de corimbo.<sup>(21)</sup>

**Corteza:** Parte externa de la raíz, tallo y ramas de la planta que se separa con mayor o menor facilidad de la parte interna, más dura.<sup>(21)</sup>

**Dehiscente:** Que se abre después de la madurez.<sup>(21)</sup>

**Elución:** Es el proceso de paso de un líquido o un gas a través de una columna cromatográfica; es decir, es el fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la móvil.<sup>(17)</sup>

**Estándar o Escala McFarland:** se destina para el ajuste de densidad de las suspensiones bacterianas. La escala de McFarland relaciona la turbidez de unos patrones de sulfato bórico (mezcla de cloruro bórico al 1% y ácido sulfúrico al 1%) con el número de bacterias presentes en una muestra.<sup>(12)</sup>

**Fase Móvil:** Es el disolvente que desciende a través de la columna cromatográfica, puede ser un líquido puro o una mezcla de soluciones o también puede ser un gas (puro o una mezcla homogénea).<sup>(15,17)</sup>

**Fase Estacionaria:** Es la fase que se encuentra fija en el interior de la columna cromatográfica, puede ser un sólido poroso o finamente dividido, o un líquido que ha sido colocado en una capa delgada sobre un material de soporte inerte.<sup>(15,17)</sup>

**Fitofármacos:** Medicamentos que contienen como principio activo exclusivamente plantas, partes de plantas, ingredientes vegetales o bien, preparaciones obtenidas a partir de ellas.

**Inflorescencia:** Es un sistema de ramas especializado, destinado a la producción de flores (y frutos más tarde), ya que es raro que el tallo termine en una sola flor, en general lleva más de una, a menudo muchas, ordenadas de diversa manera formando grupos o racimos de aspecto variado.<sup>(32)</sup>

**Ketoconazol:** Antimicótico. Antibiótico con alto potencial terapéutico para el manejo de micosis superficiales y profundas. Es muy activo contra ***Candida albicans***, ***Blastomyces***, ***Histoplasma*** y diversos hongos superficiales: ***Trichophyton***, ***Epidermophyton*** y ***Microsporum***.<sup>(29)</sup>

**Lanceolado, da:** Se aplica a la hoja de una planta que tiene forma de punta de lanza.<sup>(21)</sup>

**Limbo:** Porción laminar de la hoja.<sup>(21)</sup>

**Metabolitos secundarios:** Compuestos derivados del metabolismo secundario, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos,

insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales.<sup>(4)</sup>

**Opérculo:** Órgano a modo de tapadera que se desprende en un capullo, fruto, etc.<sup>(21)</sup>

**Opuesto, a:** Puesto enfrente.<sup>(21)</sup>

**Peciolado, da:** Provisto de pecíolo.<sup>(21)</sup>

**Pecíolo:** Rabillo que une el limbo de la hoja al tallo.<sup>(21)</sup>

**Pedunculado, da:** Provisto de pedúnculo.<sup>(21)</sup>

**Pedúnculo:** Dícese del cabillo que una flor en las inflorescencias compuestas.<sup>(21)</sup>

**Pedúnculo:** Sirve para levantar y sostener la flor; por lo regular carece de hojas; pero las tiene algunas veces en la parte inferior.<sup>(32)</sup>

**Peltado, da:** Dícese de las hojas del limbo redondeado y con el pecíolo inserto en el centro.<sup>(21)</sup>

**Reactivo de Óleum:** Se utiliza para hacer visibles aquellas señales que no se detectan a la luz UV ni son coloreadas, es una mezcla de ácido sulfúrico (4%) ácido acético (80%) y agua (16%); El revelado consiste en rociar el cromatograma con la especie reveladora y posterior calentamiento en una estufa alrededor de 100°C, lográndose de esta manera la carbonización de los compuestos orgánicos. El cromatograma una vez revelado nos presenta mediante manchas el grado de pureza de la muestra o el número de compuestos presentes en ella.<sup>(22)</sup>

**Queratinofilia:** Propiedad de lisar estructuras córneas (piel, uñas y pelos) por medio de la enzima queratinasa y utilizar los productos de degradación como nutrientes. <sup>(13)</sup>

**Tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico:** 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, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. <sup>(33)</sup>

**Tinción lactofenol azul algodón:** A causa de los grupos sulfónicos, este colorante es fuertemente ácido y ha sido usado como contra colorante para tejidos no fijados, bacterias y protozoos. En la actualidad se usa con más frecuencia para la tinción directa de micelios fúngicos y estructuras de fructificación, las cuales toman un color azul pálido delicado. <sup>(12)</sup>

**Umbela:** Inflorescencia con el extremo del raquis o eje principal ensanchado formando un receptáculo, del cual parten los pedicelos, todos de igual longitud. <sup>(21)</sup>

**ANEXOS**

**ANEXO N°1**  
**Instalaciones de laboratorios**



Fig. N°40 Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia



Fig. N°41 Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, CENSALUD

## ANEXO N°2

### Metodología general de trabajo

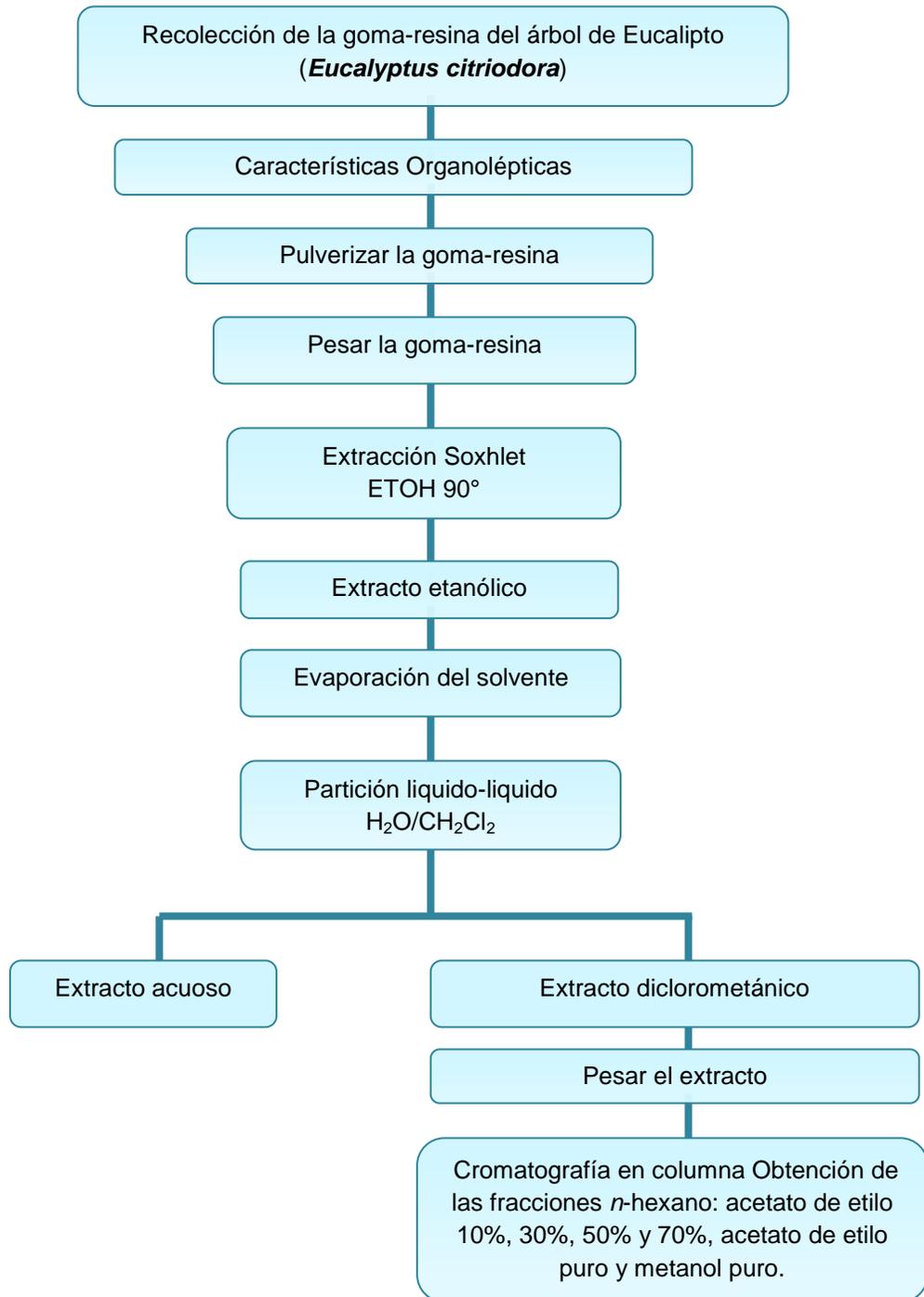


Fig. N°42 Diagrama de la metodología general de trabajo.

### ANEXO N°3

#### Metodología general de trabajo (Análisis Microbiológico)

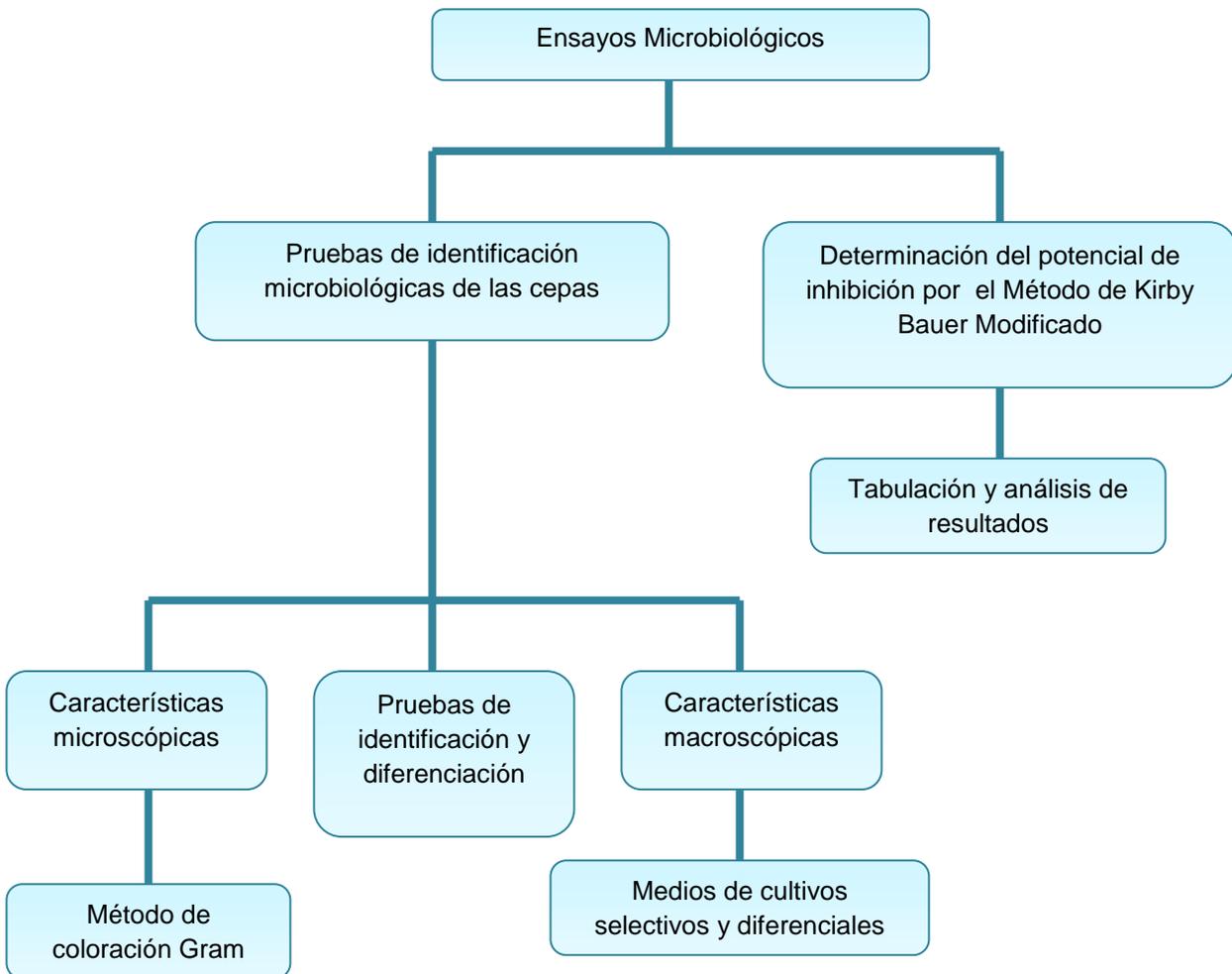
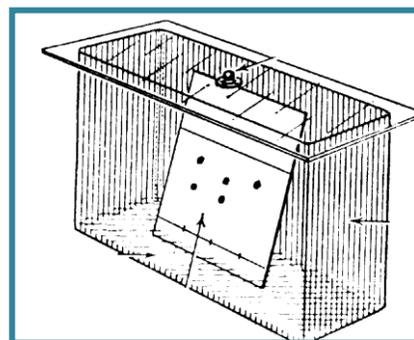
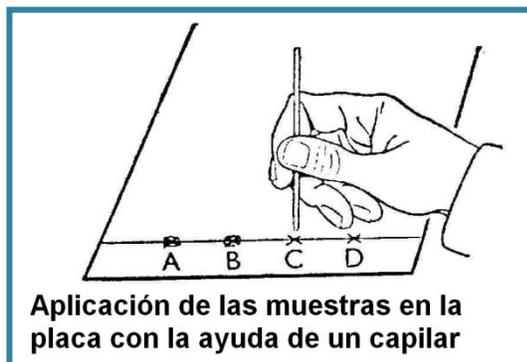


Fig. N° 43 Diagrama de la metodología general de trabajo (Análisis Microbiológico)

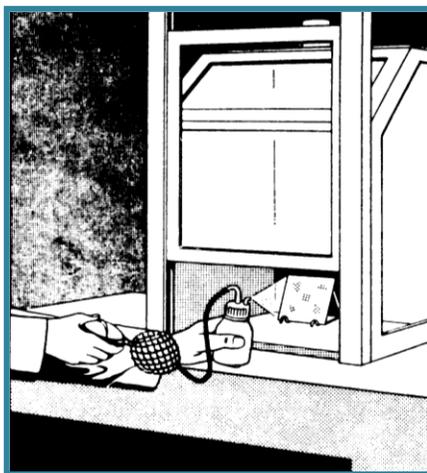
## **ANEXO N°4**

**Análisis de la composición de las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de columna del extracto diclorometánico por cromatografía en capa fina**



Colocar la placa en una cámara cromatográfica donde habrá una mezcla de disolventes (*n*-hexano:acetato de etilo de polaridad adecuada. El disolvente ascenderá a través de las manchas y arrastrará a sus componentes a lo largo de la placa a una distancia mayor o menor dependiendo de sus características moleculares.

Fig. N°44 Esquema de la Cromatografía en Capa Fina



Revelado mediante el reactivo revelador óleum (ácido sulfúrico + ácido acético glacial + agua, 4/80/16) y posterior calentamiento. De esta manera aparecerán en la placa diferentes manchas según la complejidad de la mezcla de partida, esto con la finalidad de visualizar los diferentes componentes en el soporte sólido una vez separados.

Fig. N°44 Esquema de la Cromatografía en Capa Fina  
(Continuación)

## **ANEXO N°5**

### **Resultados de la Cromatografía en Capa Fina**

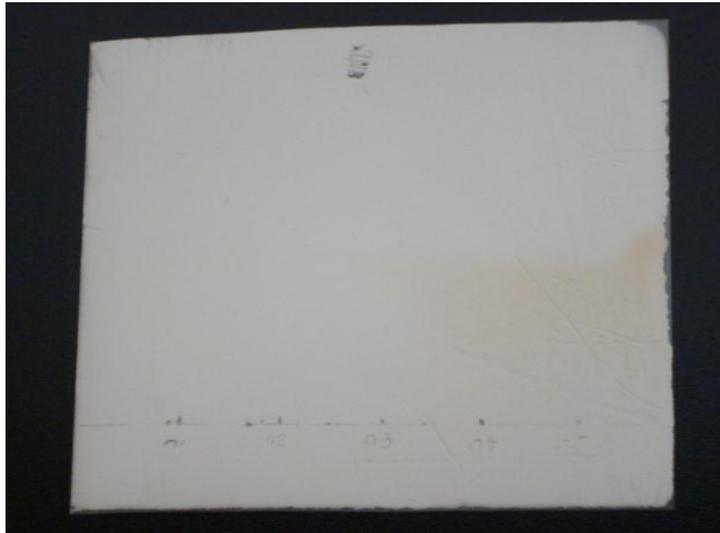


Fig. N°45 Fracciones de *n*-hexano y *n*-hexano-acetato de etilo al 10%



Fig. N°46 Fracciones de *n*-hexano-acetato de etilo al 30%

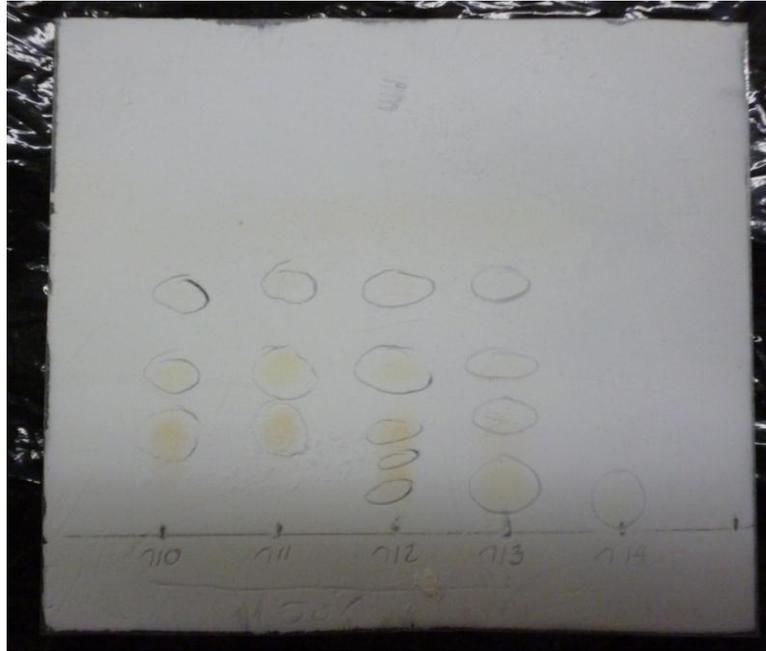


Fig. N°47 Fracciones de *n*-hexano-acetato de etilo al 50% y 70%

## **ANEXO N°6**

### Método de la tinción de Gram

1. Realice un frotis fino del material de estudio y déjelo secar al aire.
2. Fije el material al portaobjetos pasándolo tres o cuatro veces a través de la llama de un mechero Bunsen, de manera que el material no se lave durante la tinción.
3. Coloque el frotis en un soporte para tinción y recubra la superficie con solución de cristal violeta.
4. Luego de 1 minuto de exposición al colorante cristal violeta, lave exhaustivamente con agua destilada.
5. Cubra el frotis con solución yodada de Gram durante 1 minuto. Nuevamente, lave con agua destilada.
6. Impregne la superficie con unas gotas de decolorante alcohol-acetona, hasta que el lavado deje de tener color violeta. Esto suele tomar 10 segundos o menos.
7. Lave con agua destilada. Cubra la superficie con la tinción de safranina durante 1 minuto. Lave con agua destilada.
8. Coloque el frotis en posición vertical en el soporte para tinción, para permitir que el exceso de agua drene y el frotis se seque.
9. Examine el frotis teñido bajo el objetivo de 100 x (de inmersión) de un microscopio. Los microorganismos gram positivos se tiñen de azul oscuro; y los gram negativos de color rosa o rojo.

## **ANEXO N° 7**

**Cálculos para la preparación de las fases móviles utilizadas en la  
cromatografía de columna**

- **Mezcla *n*-hexano/acetato de etilo 10% (v/v)**

Mezcla \_\_\_\_\_ AcOEt.

100 mL \_\_\_\_\_ 10 mL

600 mL \_\_\_\_\_ X            X= 60 mL de AcOEt.

600 mL – 60 mL de AcOEt = 540 mL de *n*-hexano

- **Mezcla *n*-hexano/acetato de etilo 30% (v/v)**

Mezcla \_\_\_\_\_ AcO Et.

100 mL \_\_\_\_\_ 30 mL

600 mL \_\_\_\_\_ X            X= 180 mL de AcOEt.

600 mL – 180 mL de AcOEt. = 420 mL de *n*-hexano

- **Mezcla *n*-hexano/acetato de etilo 50% (v/v)**

Mezcla \_\_\_\_\_ AcOEt.

100 mL \_\_\_\_\_ 50 mL

600 mL \_\_\_\_\_ X            X= 300 mL de AcOEt.

600 mL – 300 mL de AcO. Et = 300 mL de *n*-hexano

- **Mezcla *n*-hexano/acetato de etilo 70% (v/v)**

Mezcla \_\_\_\_\_ AcOEt.

100 mL \_\_\_\_\_ 70 mL

600 mL \_\_\_\_\_ X            X= 420 mL de AcOEt.

600 mL – 420 mL de AcOEt. = 180 mL de *n*-hexano

## **ANEXO N°8**

**Cromatografía en columna. Obtención de las fracciones *n*-hexano:  
acetato de etilo 10%, 30%, 50% y 70%, acetato de etilo puro y  
metanol puro.**



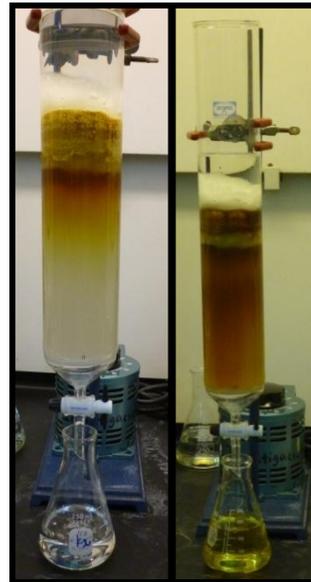
Preparación y relleno de la columna cromatográfica



Preparación de la muestra (cabeza de la columna cromatográfica)



Recolección de las seis fracciones.



Fraccionamiento de la muestra, utilizando como sistema de elución n-hexano/acetato de etilo al 10%,30%, 50%, 70% y AcOEt. puro, y MeOH puro.



Fig. N°48 Esquema de la Cromatografía en Columna



Evaporación de los solventes utilizados en la elución para obtener los compuestos activos (metabolitos secundarios).



Cristalización de los compuestos activos.



Obtención de las seis fracciones para posterior análisis microbiológico.

Fig. N°48 Esquema de la Cromatografía en Columna  
(Continuación)

## **ANEXO N° 9**

**Cálculos para la preparación de las diluciones a diferentes concentraciones de las fracciones *n*-hexano/AcOEt al 10%, 30%, 50%, 70%, acetato de etilo puro y metanol puro de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.**

- Cálculos para preparar diluciones con la concentración de 10000 ppm de cada una de las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica.

$$10000 \text{ ppm} = 10000 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mg/mL} \text{ ————— } 1000 \text{ } \mu\text{g/mL} \\ X \text{ ————— } 10000 \text{ } \mu\text{g/mL} \end{array}$$

$$X = 10 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g/mL} \text{ ————— } 1000 \text{ mg/mL} \\ X \text{ ————— } 10 \text{ mg/mL} \end{array}$$

$$X = 0.010 \text{ g/mL}$$

$$\begin{array}{l} 0.010 \text{ g/mL} \text{ ————— } 1 \text{ mL} \\ X \text{ ————— } 5 \text{ mL} \end{array}$$

X= 0.050 g de cada una de las fracciones a ensayar para preparar 5 mL



Fig. N°49 Diluciones de cada una de las fracciones *n*-hexano/AcOEt, con una concentración de 10000 ppm.

- Cálculos para preparar diluciones con la concentración de 15000 ppm de cada una de las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica.

$$15000 \text{ ppm} = 15000 \mu\text{g/mL}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ mg/mL} \text{ ————— } 1000 \mu\text{g/mL} \\ X \quad \text{ ————— } 15000 \mu\text{g/mL} \end{array}$$

$$X = 15 \text{ mg/mL}$$

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g/mL} \text{ ————— } 1000 \text{ mg/mL} \\ X \quad \text{ ————— } 15 \text{ mg/mL} \end{array}$$

$$X = 0.015 \text{ g/mL}$$

$$\begin{array}{l} 0.015 \text{ g/mL} \text{ ————— } 1 \text{ mL} \\ X \quad \text{ ————— } 5 \text{ mL} \end{array}$$

$X = 0.075\text{g}$  de cada una de las fracciones a ensayar para preparar 5mL



Fig. N°50 Diluciones de cada una de las fracciones *n*-hexano/AcOEt, con una concentración de 15000 ppm.

- Cálculos para preparar diluciones con la concentración de 5000ppm de cada una de las fracciones obtenidas de la columna cromatográfica.

$$5000 \text{ ppm} = 5000 \mu\text{g/mL}$$

$$1 \text{ mg/mL} \text{ ————— } 1000 \mu\text{g/mL}$$

$$X \text{ ————— } 5000 \mu\text{g/mL}$$

$$X = 5 \text{ mg/mL}$$

$$1 \text{ g/mL} \text{ ————— } 1000 \text{ mg/mL}$$

$$X \text{ ————— } 5 \text{ mg/mL}$$

$$X = 0.005 \text{ g/mL}$$

$$0.005 \text{ g/mL} \text{ ————— } 1 \text{ mL}$$

$$X \text{ ————— } 5 \text{ mL}$$

$X = 0.025\text{g}$  de cada una de las fracciones a ensayar para preparar 5mL

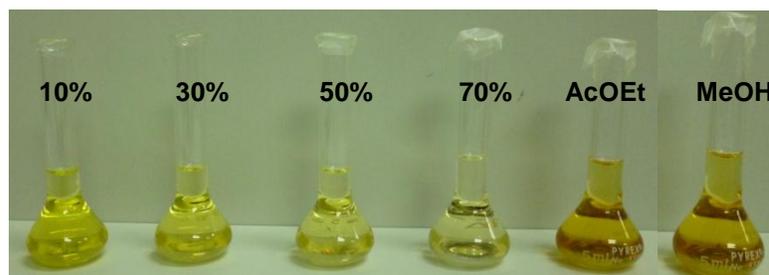
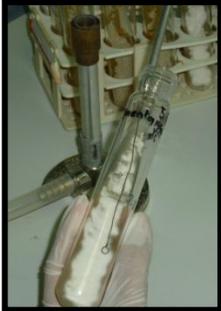


Fig. N°51 Diluciones de cada una de las fracciones *n*-hexano/AcOEt, con una concentración de 5000 ppm.

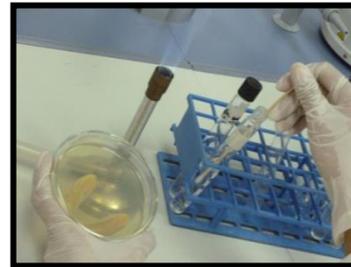
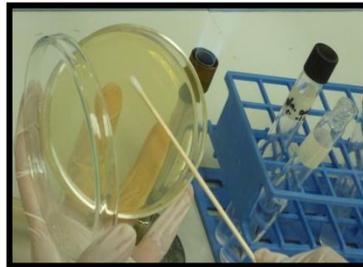
**ANEXO N°10**

**Determinación del potencial de inhibición por el Método de Kirby  
Bauer Modificado**

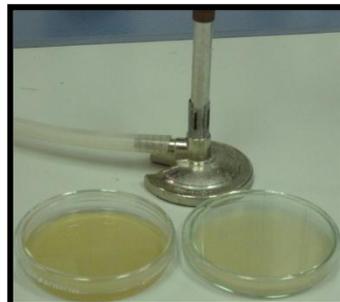


Preparar las suspensiones de los hongos de prueba; *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*.

Comparar las suspensiones de los hongos con el estándar McFarland.

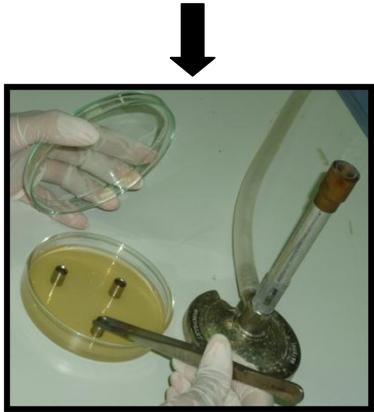


Por el método del extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del hongo equivalente a  $1.5 \times 10^8$  MO/mL, inocular uniformemente la superficie del medio Agar Müller Hinton para *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

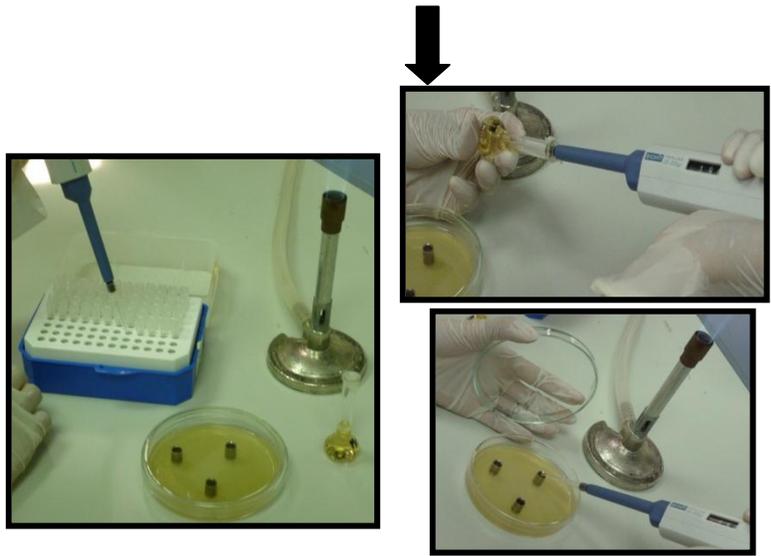


Dejar secar el medio con la suspensión del hongo durante 10 minutos a temperatura ambiente. En condiciones estériles.

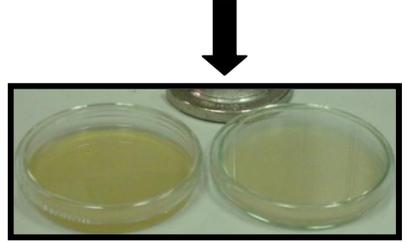
Fig. N°52 Esquema del Método Kirby Bauer Modificado



Colocar sobre la superficie del medio inoculado tres cilindros de acero inoxidable.



Llenar los cilindros de acero inoxidable con la solución de prueba utilizando una micropipeta.



Incubar a 20-25°C (Temperatura ambiente) por 5 días.

Fig. N°52 Esquema del Método Kirby Bauer Modificado (Continuación)

**ANEXO N°11**

**Certificación del género y especie *Eucalyptus citriodora***



Antiguo Cuscatlán, jueves 3 de noviembre de 2011

Por este medio se hace constar que las alumnas Luci Noemy Torres y Sonia Ivette Rendón se hicieron presentes en las instalaciones de nuestro herbario solicitando la confirmación del nombre científico de una muestra botánica. Después de revisar la muestra y compararlo con nuestro material de referencia, se concluye que la especie corresponde a *Eucalyptus citriodora* de la familia Myrtaceae.

Y para los usos que estimen conveniente los interesados, se extiende la presente nota.

Jorge Alberto Monterrosa Salomón  
Sección Técnica-Científica  
Herbario LAGU  
Curador



## **ANEXO N°12**

### **Materiales, equipos, reactivos y solventes**

## MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLVENTES

### Material Vegetal

- Goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

### Cepas de Referencia

- *Candida albicans*
- *Trichophyton mentagrophytes*

### Material de Laboratorio

- Agitadores de vidrio
- Beakers (250, 100, 50, 30 mL)
- Embudos de vidrio
- Ampollas de separación (125, 60 mL)
- Erlenmeyers (500, 250mL)
- Probetas (100, 25, 10 mL)
- Vidrio reloj
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con rosca
- Pipetas Mohr (5 y 1 mL)
- Pipetas volumétricas (5.0, 1.0 mL)
- Balón fondo redondo de 500 mL
- Cajas de petri
- Laminas portaobjetos
- Frasco de vidrio color ámbar con tapón de rosca (500 mL)
- Asas bacteriológicas
- Pipeteadores
- Mecheros Bunsen

- Aros metálicos
- Trípode
- Mortero y pistilo
- Espátula metálica
- Microespátula
- Gradilla para tubos
- Malla de asbesto
- Pinzas (de extensión y de soporte)
- Papel filtro
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Tirro
- Etiquetas
- Plumones
- Fósforos
- Mangueras para entrada y salida de agua
- Gabacha, mascarilla, gorro y guantes estériles

#### Equipo

- Autoclave: de vapor húmedo
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- Hot plate
- Microscópio
- Refrigeradora
- Rotaevaporador
- Aparato soxhlet

## Reactivos y Solventes

- Diclorometano
- Alcohol etílico 90°
- Acetato de etilo
- *n*-hexano
- Acetona calidad reactivo
- Ácido sulfúrico 1%
- Cloruro de Bario 1%
- Metanol
- Cristal violeta sólido
- Alcohol-cetona
- Lugol
- Safranina
- Amoníaco
- Agua destilada
- Lactofenol azul de algodón
- Sílica gel
- Dimetilsulfóxido
- Tween 80

## Medios de Cultivo

- Agar Müller-Hilton
- Agar Saboraud con dextrosa al 4%
- Solución salina isotónica estéril 0.85%