

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



TRABAJO DE GRADUACION

**INVESTIGACION DEL EFECTO INHIBITORIO DEL
EXTRACTO DE OCIMUN BASILICUM L.(ALBAHACA)
SOBRE EL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y
KLEBSIELLA PNEUMONIAE.**

PRESENTADO POR:

REYNA ELENA GUZMAN HIDALGO
MARIA LUISA ORTIZ RIVAS

PREVIA OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

MARZO DE 1988



T
581.634
G993m

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10124290

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR : LIC. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIO GENERAL : ING. RENE MAURICIO MEJIA MENDEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO : DR. FRANCISCO MANUEL CASTILLO

SECRETARIO : DRA. AMINTA ACEITUNO DE KAFIE

JURADO EXAMINADOR

: ING. MARIA DEL CARMEN DE MEDRANO

: LIC. JUANA DEL SOCORRO VALDEZ

: LIC. EVA MAGDALENA PADILLA DE
MONTERROSA.

MARZO, 1988

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA

ASESORES

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

LIC. ANA DELMY HERCULES DE MELARA

LUGAR DE PRACTICA

1. LABORATORIO DE INVESTIGACION APLICADA Y TESIS PROFESIONALES,
2. LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA,
3. LABORATORIO DE QUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD - DE CIENCIAS AGRONOMICAS, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

MARZO, 1988

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA

AGRADECIMIENTO

Agradecemos de una manera muy especial al cuerpo asesor, Lic. Salvador Castillo Arévalo y Lic. Delmy Hercules de Melara, por habernos orientado y dirigido en el desarrollo del trabajo, brindándonos su valioso tiempo en aras de la cultura.

También hacemos extensivo nuestro agradecimiento al personal de la sección de microbiología.

Nuestros agradecimientos para el Jurado Calificador, por su tiempo y colaboración:

Ing. María del Carmen de Medrano.

Lic. Juana del Socorro Valdez.

Lic. Eva Magdalena Padilla de Monterrosa.

A nuestros compañeros de trabajo por sus consejos y apoyo.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

A Dios Todopoderoso:

Quién guió mi camino al pedírselo en oración y me concedió suficiente paciencia para resistir los tropiezos y así lograr la meta que en nombre de él me propuse.

A Mis Queridos Padres:

Luz Maximina Hidalgo de Guzmán y Pedro Guzmán, en inmensa gratitud por su incondicionado apoyo en la realización de mis esfuerzos, especialmente en los estudios.

A Mis Hermanos:

Irma Rosaura, Jorge Arquímedes y Pedro Antonio Guzmán con mucho agradecimiento por la ayuda que me brindaron en mi formación profesional.

A mi Abuelita, Sobrinos, Cuñados y Demás Familia:

Que en una u otra forma me ayudaron en la cosecución - de este objetivo.

A mis Maestros, Amigos y Compañeros:

Que siempre me brindaron su oportuna asesoría, así como su afecto sincero.

A Todos Ellos:

Dedico con cariño, el presente trabajo.

Reina Elena Guzmán Hidalgo.

DEDICATORIA

Dedico todo el esfuerzo y empeño en mi carrera Universitaria así como este trabajo que representa la culminación y del - cual me siento satisfecha.

A Dios Todopoderoso:

Por concederme la capacidad y medios para lograrlo.

A Mis Padres:

Sr. Luis Rivas, Sra. Rosa Enma Ortiz. Por su amor, comprensión, paciencia y apoyo en todos los momentos de mi vida.

A Mis Hermanos:

José Armando, Guillermo Antonio, Medardo Antonio, Maribel Esperanza Ortiz, Sandra Morena Ortiz Rivas. Con mucho - cariño.

A Mi Esposo:

Adrian López Bonilla. Quién me bridó animos, apoyo, por su amor y comprensión.

A Mis Hijos:

Luis Adrian, Edgardo Antonio López Ortiz. Quienes me -- han inspirado ha seguir adelante.

A Mi Abuelita:

Maria Rivas. Con mucho cariño.

A Mis demás Familiares, Amigos y Compañeros de Trabajo.

Maria Luisa Ortiz Rivas.

I N D I C E

Página No.

INTRODUCCION

CAPITULO I

ASPECTOS GENERALES

A. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	1
B. DESCRIPCION BOTANICA	3
C. MATERIALES Y EQUIPO	3
1. Materiales	3
2. Equipo	5

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

A. METODOS	7
1. Metodología de Campo	7
2. Metodología de Laboratorio	7
B. PRUEBAS PRELIMINARES	8
C. ENSAYO MICROBIOLÓGICO (Para <u>Klebsiella pneumoniae</u>)	9
D. ENSAYO MICROBIOLÓGICO (Para <u>Mycobacterium tubercu - losis</u>)	12

CAPITULO III

RESULTADOS

A. RESULTADOS DE PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS	16
B. RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA	16
C. RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA: <u>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</u> (ATCC) No. 018 y <u>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</u> (RECOLECTADA EN HOSPITAL)	17
D. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA <u>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</u>	18
E. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DEL MEDIO	18
F. PRUEBAS FITOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE SESQUITERPEN LACTONAS	19
G. PRUEBAS FITOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE <u>ALCALOIDES</u>	20
H. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESPECTRO INFRARROJO ...	21

CAPITULO IV

INTERPRETACION DE RESULTADOS

A. DE LAS PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS	22
--	----

	<u>Página No.</u>
B. DEL ANALISIS FITOQUIMICO	22
C. DE LOS RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA	22
D. DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESPECTRO I.R. ..	23
E. DE LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA PARA -- <u>Klebsiella pneumoniae</u>	23
F. DE EL ENSAYO REALIZADO CON EL EXTRACTO ALCOHOLICO OBTENIDO SEGUN TECNICA DE Clark's	23
G. DE LA PRUEBA DE SUCEPTIBILIDAD MICROBIANA PARA <u>My-</u> <u>cobacterium tuberculosis</u>	24
H. CONCLUSIONES	25

CAPITULO V

ANEXOS

No. 1. TECNICA DE CLARK'S	26
No. 2. ESPECTRO INFRARROJO	27
No. 3. COLORACION DE GRAM Y PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LA BACTERIA <u>KLEBSIELLA -</u> <u>PNEUMONIAE</u>	29

	<u>Página No.</u>
DESCRIPCION DE ANEXO No. 3	30
A. FUNDAMENTO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS APLICADAS A IDENTIFICACION DE <u>Klebsiella Pneumoniae</u>	30
1. T S I	30
2. Indol	31
3. Rojo de Metilo	31
4. Voges Proskauer	32
5. Citrato	32
6. Movilidad	32
No. 4. PREPARACION DEL STANDARD MC. FARLAND	34
No. 5. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO LOWENSTEIN - JENSEN	35
BIBLIOGRAFIA	37

I N T R O D U C C I O N

El interés en las investigaciones acerca de la extracción de productos naturales de origen vegetal, ha venido aumentando con el correr de los años, a tal punto que últimamente la utilización de plantas medicinales es de gran importancia para el tratamiento de muchas enfermedades.

El presente estudio pretende dar aporte a dichas investigaciones en el campo de acciones antimicrobianas. Sabemos que últimamente se han aumentado los casos de infecciones que muestran una marcada resistencia bacteriana a los tipos de medicamentos que se utilizan actualmente en los hospitales. Por lo que nosotros como profesionales en el área de la salud, especializados en la producción de medicamentos, tratamos de encontrar una solución a este problema; en base a lo anterior consideramos que una de las especies que podría dar un resultado prometedor es el *Ocimum basilicum*, fundamentándose en las investigaciones que se han realizado en el género *Ocimum*.

El objetivo del presente trabajo, es investigar el efecto antibacteriano que pueda tener el extracto vegetal del *Ocimum basilicum* sobre *Mycobacterium tuberculosis* y *Klebsiella pneumoniae*, microorganismos que afectan el tracto respiratorio.

CAPITULO I

ASPECTOS GENERALES

A. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.

Haciendo una revisión de los estudios sobre plantas, que popularmente se usan como medicinales; encontramos que diferentes plantas del género *Ocimum* muestran propiedades antibacterianas, por lo que seleccionamos el *Ocimum basilicum* L. para nuestro estudio, el cual tiene un enfoque microbiológico para llegar a determinar la propiedad antibacteriana, así se tiene que de la fracción insaponificable del *Ocimum basilicum* se ha aislado:

- B - Sitosterol (I).
- Acido Oleanólico (II).
- Acido Ursólico (III).

El aceite esencial del *Ocimum basilicum* está constituido por: Sesquiterpenos, Geraniol, Eucaliptol, Eugenol, α -pineno, Linalol, Limoneno, Methylcavicol, Ocimeno, β -Caroteno, L-8 Cineol y un compuesto no identificado (8).

- Infusiones y decocciones de diferentes plantas medicinales nativas entre las que se mencionan el *Ocimum basilicum* fueron utilizadas para combatir una epidemia de disentería bacilar y diarrea que afectaba al 34% de la población de tres villas del norte de Morava, -

cerca de la Ciudad de Transtienick, (12).

- Las hojas del *Ocimum gratissimum* tienen en su composición Ocimol $C_{28}H_{44}O_2$, *gratissimum* un hidrocarburo tetraiocontano y un aceite esencial. (9).
- Cromatográficamente fué determinado el contenido de β -caroteno (1.6 mg/100) en el *Ocimum micranthum*. (10).
- Del *Ocimum sanctum* se aisló una sustancia activa que inhibe al *Mycobacterium tuberculosis* B-19-4 y al *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 10 y 100 microgramos/ml respectivamente.

Se ha encontrado que el *Ocimum gratissimum* presenta una marcada acción antitubercular y antibacteriana, por lo que está siendo objeto de estudios farmacológicos. Este aceite inhibe el movimiento y la relajación de la musculatura intestinal y uterina, antagoniza los efectos del cloruro de Bario en los movimientos intestinales.

El uso empírico de este aceite en condiciones como dolor de oído, dolor de muela, cólicos abdominales en niños, puede ser explicado por la acción anestésica local y la relajación de la musculatura que produce el aceite. (11).

B. DESCRIPCION BOTANICA.

Nombre científico : *Ocimum basilicum* L.
Familia : Labiadas.
Tribu : OCIMOIDEAS.
Nombre común : Albahaca o albahaca de los
jardines.

Hierba aromática cultivada en los jardines. Nativa de Asia y Africa.

Esta especie tiene un tallo que se alza unos dos - pies, con ramas opuestas en cruz. Las hojas son opuestas óvalo-lanceoladas, pecioladas, planas. Las flores están en espigas verticiladas en torno del tallo y de las ramas. Cada flor tiene un cáliz monófilo, corto, barbudo, bilabiado, el labio inferior de cuatro dientes agudos, corola monopétala bilabiada, cuatro estambres, de los - cuales dos son más largos; ovario súpero de cuatro lóbulos, estilo filiformes, terminado por un estigma bifido, flores blancas o purpurinas.

C. MATERIALES Y EQUIPO.

1. MATERIALES.

a. Especie vegetal : *Ocimum basilicum* L.

b. Microorganismo de prueba:

Klebsiella pneumoniae (ATCC) No. 018

Klebsiella pneumoniae (recolectada en hospital)

Mycobacterium tuberculosis (cepa hospitalaria)

Mycobacterium tuberculosis (cepa H-37 Rv)

c. Medios de cultivo:

- Agar Mueller Hinton.
- Agar tres azúcares y hierro. (T.S.I.)
- Agar citrato de Simmons.
- Agar movilidad.
- Agar cistina tripticasa (cta).
- Agar MacConkey.
- Agar con peptona y hierro.
- Caldo rojo de metilo (Voges-proskauer).
- Caldo nutritivo.
- Medio Lowenstein-Jensen (para Mycobacterium, t).

d. Reactivos y disolventes:

- Agua destilada.
- Agua destilada estéril.
- Alcohol etílico.
- Benceno.
- Acetona.
- Cloroformo.
- Propilenglicol.

- Hidróxido de sodio.
- Acido sulfúrico al 1%.
- Cloruro de bario al 1%.
- Standard McFarland (de una densidad celular aproximada 9×10^8 bacterias/ml).
- Sílica gel.
- Acido clorhídrico diluido 10%.
- Acetato de plomo 5%.
- Solución salina 0.85%.

e. Cristalería:

- Material de vidrio utilizado de rutina en el laboratorio de Farmacognosia.
- Material de vidrio propio de laboratorio microbiológico.

2. EQUIPO.

- a). Balanza granataria.
- b). Balanza analítica.
- c). Baño de maría.
- d). Evaporador flash.
- e). Autoclave.
- f). Lámpara ultravioleta.
- g). Mantas de calentamiento.
- h). Mecheros.

- i). Espectrofotómetro I.R. Perkin Elmer. MODELO 710 A.
- j). Refrigerador.
- k). Estufa.
- l). Incubadora.
- ll). Microscopio compuesto.
- m). Cilindros de acero inoxidable.
- n). Placas cromatográficas.
- ñ). Microespátula.
- o). Regla milimetrada.

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO II

PARTE EXPERIMENTAL

A. METODOS.

La metodología se efectúa en dos etapas:

1. De campo.
2. De laboratorio.

1. Metodología de Campo:

La recolección de la planta se efectuó en el Departamento de Usulután, en los meses de Abril-Mayo - de 1985 y en San Salvador en los meses de Octubre-Noviembre de 1986, la muestra constituida por: Tallos, flores y hojas fue secada al sol y luego molida.

2. Metodología de Laboratorio:

La muestra seca, fue sometida a un proceso de - extracción por reflujo, utilizando como solvente de extracción etanol, hasta agotar la muestra. Este proceso se repite por diez veces consecutivas, con muestras de igual tamaño, procediendo a unir los extractos y se concentraron por destilación simple. Parte - de el extracto obtenido se trató por la marcha de -

Clark's. (Ver Anexo No. 1).

B. PRUEBAS PRELIMINARES.

Al extracto obtenido por la marcha de Clark's se le hicieron las siguientes pruebas:

1. Observación directa de las características organolépticas de los extractos.
2. Pruebas cromatográficas en capa fina.
3. Pruebas Fitoquímicas.
4. Espectro al infrarrojo. (Ver Anexo No. 2).

- Preparación de Las Diluciones del Extracto.

Se preparan diluciones del extracto alcohólico y del extracto tratado por la marcha de Clark's usando agua destilada estéril y propilenglicol como diluyente.

CUADRO No. 1

PREPARACION DE LAS DILUCIONES DE LOS EXTRACTOS PARA

AMBOS MICROORGANISMOS:

MICROORGANISMO	CONCENTRACION EN ppm.
<u>Klebsiella pneumoniae</u>	10,000
	15,000
	20,000
	30,000
	40,000
	50,000
<u>Mycobacterium tuberculosis</u>	4
	20

C. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

(Para Klebsiella pneumoniae).

1. A la cepa recolectada en el Hospital Rosales, se le hicieron las siguientes pruebas:

a. Tinción al gram.

b. Pruebas bioquímicas. (Ver anexo No. 3).

2. Preparación del Microorganismo de Prueba:

Con la cepa previamente identificada, se hicieron resiembras semanales para su conservación en tubos conteniendo agar cistina y tripticasa (CTA) y se mantuvo a una temperatura de 4-5 °C.

3. Determinación del Potencial de Inhibición por el Método de Cilindro Placa. (Método de Kirby-Bauer modificado).

El fundamento de este método es la difusión de la sustancia en investigación, colocada en un cilindro vertical sobre una capa de agar (Mueller-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 .

DESARROLLO SECUENCIAL DEL METODO: (Kirby-Bauer modificado).

a). La cepa se sembró en medio McConkey y se incubó durante 24 horas a 37°C.

b). Suspensión del microorganismo:

Del cultivo puro de 24 horas, se selecciona

ron 4 a 5 colonias bien aisladas, las que se inocularon en un tubo conteniendo solución salina - estéril (0.85%) hasta obtener una suspensión uniforme de una turbidez visualmente comparable a - la del standard Mcfarland, de una densidad celular aproximada de: 9×10^8 bacterias/ml. (Ver anexo No. 4).

c). Inoculación del microorganismo:

Usando el método del extendido en placa con hisopos impregnados con la suspensión patrón del microorganismo equivalente a : 9×10^8 bacterias/ml. Se inoculó la superficie del medio dejando secar los extendidos durante 10 minutos a temperatura ambiente, en área estéril.

d). Aplicación de los extractos:

Usando técnica estéril y presionando suavemente se colocan los cilindros de acero inoxidable para asegurar su implantación en la superficie del medio.

Utilizando cinco cilindros en cada placa, - se colocan dentro de cada uno seis gotas del extracto, con pipeta Pasteur. Se incuban las pla--cas a 37°C por 24 horas.

Pasado este tiempo, se midieron los diámetros de los halos de inhibición por la parte posterior de la placa, sin abrirla, utilizando para ello una regla adecuada para medición de halos.

Todas las pruebas efectuadas se hicieron por triplicado, llevando testigos :

i). Agua.

ii). Propilenglicol.

Estas pruebas se hicieron ocho veces consecutivamente.

D. ENSAYO MICROBIOLÓGICO.

(Para Mycobacterium tuberculosis).

1. Recolección de la cepa de Mycobacterium tuberculosis.

La cepa de Mycobacterium tuberculosis en estudio fué recolectada en el laboratorio del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

2. Preparación del medio de cultivo: Lowestein - Jensen.

(Ver anexo No. 5).

3. Método empleado: Método de las Proporciones Simplificadas Indirectas.

Este método se basa en que para diferenciar en el laboratorio, una cepa sensible de otra resistente, se necesita disponer de un sistema que permita separar en ella los bacilos sensibles de los que son resistentes y que al contar unos u otros se pueda determinar su proporción.

Con este método se preparan medio con droga y medio sin droga y en ambos se siembra el microorganismo; teniendo en el tubo sin droga el número total de la población sembrada y, en el tubo que tenemos la droga el número de mutantes resistentes, estableciendo luego, la relación entre ambos.

NOTA: El medio de cultivo con quimioterápico se prepara incorporándole la droga en estudio antes de la coagulación del medio.

4. Preparación de la Suspensión Patrón.

Pesar aproximadamente, 20 mg. de la masa bacilar de la cepa H-37 Rv. Colocar en un balón con perlas de vidrio, adicionar 0.5 ml. de agua destilada estéril, agitar hasta obtener una masa homogénea, agregar mas agua, agitando hasta obtener una suspensión homogénea que contenga una concentración de 1 mg/ml.

La suspensión así preparada contiene aproximadamente 1,000,000 bacilos/ml. (suspensión A).

Partiendo de la suspensión Patrón se preparan seis diluciones en escala decimal, en tubos rotulados así: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

5. Control de la Sensibilidad del Medio.

Tomando diez tubos al azar (tubos con droga) y colocando en serie de 5 tubos cada uno.

- a). La primera serie es sembrada con 0.2 ml. de una suspensión de 10^{-5} mg/ml. de la cepa estándar - H - 37 (Rv: Rugosa Virulenta).
- b). La segunda serie es sembrada con 0.2 ml. de una suspensión de 10^{-3} mg/ml. de la cepa standard - H - 37 Rv.
- c). Se incuba por 30 días a 37 °C, pasado este tiempo, se contarán las colonias desarrolladas. Este resultado se compara con el patrón normal de desarrollo de las suspensiones de: 10^{-5} mg/ml. y 10^{-3} mg/ml. de la cepa standard y en base a ello, se juzga la sensibilidad del medio en estudio.

6. Prueba de Susceptibilidad Para Mycobacterium tuberculosis.

Colocando dos set de tubos:

- a). En el primer set, se colocan las muestras de bacilos ya neutralizados.
- b). En el segundo set, se colocan los tubos con el medio de cultivo ya teniendo las diluciones de la cepa en estudio, se preparan las de concentración de 10^{-3} mg/ml. y la concentración de 10^{-5} mg/ml. las cuales se colocarán sobre los tubos que tienen el medio con las diluciones del extracto en estudio.
- c). Luego, se incubarán a 37°C . Se tomarán lecturas a los siguientes intervalos de tiempo; a los 28 días; a los 42 días y finalmente a los 60 días.

CAPITULO III

RESULTADOS

CAPITULO III

RESULTADOS

A. RESULTADOS DE PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS.

El extracto obtenido tratado según técnica de Clark's, presenta las siguientes características: --

1. COLOR : AMARILLO TRASLUCIDO.
2. CONSISTENCIA: RESINOSA.
3. OLOR : AROMATICO PICANTE.
4. SABOR : AMARGO.

B. RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Los resultados más claros se obtienen con la fase móvil benceno-acetona en una proporción de 1:1.

Al sacar la placa se observan seis manchas de las cuales dos se evaporan al secarse el solvente, observando bajo luz ultravioleta cuatro manchas bien definidas.

CUADRO No. 2

C. RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD

ANTIMICROBIANA PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE (ATCC) N° 018

Y KLEBSIELLA PNEUMONIAE (RECOLECTADA EN HOSPITAL)

CONCENTRACION EN PPM	EXTRACTO AISLADO DE CLOROFILA	EXTRACTO BRUTO
10,000	8 - 10 mm	16 mm
15,000	10 - 12 mm	16 mm
20,000	12 - 14 mm	16 mm
30,000	14 - 16 mm	16 mm
40,000	14 - 16 mm	16 mm
50,000	16 - 18 mm (difuso).	16 mm

Método Cilindro Placa.

CUADRO No. 3

D. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD

ANTIMICROBIANA PARA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

CONCENTRACION DE 20 Y 4 PPM PARA AMBOS EXTRACTOS

DILUCION DE BACILOS	EXTRACTO AISLADO DE CLOROFILA	EXTRACTO BRUTO
10^{-3}	+ + +	+ + +
10^{-5}	+ +	+ +

(+ + +) : Colonias confluentes.

(+ +) : Colonias separadas.

E. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DEL MEDIO.

La cepa fué resistente a la droga, en la concentración de 4 μ g/ml. y 20 μ g/ml.

En cuanto a las pruebas fitoquímicas para determi-

nar la posible presencia de alcaloides y de núcleo esteroidal como también de la lactona insaturada, se obtu--vieron resultados positivos. Las absorbanCIAS del espectro infrarrojo, nos vienen a confirmar la posible pre--sencia de la lactona insaturada.

CUADRO No. 4

F. PRUEBAS FITOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION

DE SESQUITERPENLACTONAS

PRUEBA	EXTRACTO SIN TRATAMIENTO TECNICA DE CLARK'S	EXTRACTO CON TRATAMIENTO TECNICA DE CLARK'S
Hidroximatos ferricos	+	+
Baljet	+ -	+
Legal	+	+
Lieberman Buchard	+	+

(+) : Reacción Positiva.

(-) : Reacción Negativa.

(+ -) : Reacción Leve.

CUADRO No. 5

"

G. PRUEBAS FITOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE

ALCALOIDES

PRUEBA	EXTRACTO SIN TRATAMIENTO TECNICA DE CLARK'S	EXTRACTO CON TRATAMIENTO TECNICA DE CLARK'S
Marme	+	+
Wassicky	-	-
Bertrand	+	+
Sherbles	+	+
Erdman	+ -	+
Mayer	+	+
Frohde	+ -	+
Dragendorff	+	+
Hidrato de cloral	-	-
Mandelin	-	+

(+) : Reacción Positiva.

(-) : Reacción Negativa.

(+ -) : Reacción Leve.

CUADRO No. 6

H. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESPECTRO INFRARROJO

ABSORCIONES: cm^{-1}	GRUPO FUNCIONAL
1700 - 1900	ESTER
2800 - 3300	Tensión C = O del ester

CAPITULO IV

INTERPRETACION DE RESULTADOS

CAPITULO IV

INTERPRETACION DE RESULTADOS

A. DE LAS PROPIEDADES ORGANOLEPTICAS.

Se determina que el extracto tiene un alto contenido de aceites volátiles de características propias, de acuerdo al sabor que es amargo se considera que es debido a los principios activos de la planta que ejercen su acción medicinal.

B. DEL ANALISIS FITOQUIMICO.

Del extracto se obtiene resultados mas claros con el tratado con técnica de Clark's, indicando la presencia de nucleo esteroidal y de la lactona insaturada. Como también se demuestra la presencia de alcaloides los cuales son principios activos de grandes propiedades medicinales.

C. DE LOS RESULTADOS DE CROMATOGRAFIA.

En capa fina se determinó que el extracto presenta seis constituyentes diferentes de los cuales cuatro po-

drian ser aislados, por este método ya que los demás -- componentes son aceites volátiles.

D. DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESPECTRO I.R.

Se deduce la presencia de el grupo ester y de la - lactona insaturada.

E. DE LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA PARA Klebsie-
lla pneumoniae.

Con el extracto alcoholico se obtiene un mismo halo de inhibición para las diferentes concentraciones en sayadas, debido a que la solubilidad de el extracto no es completa por los diferentes componentes, los cuales forman una pelicula sobre el medio, lo que no permite un resultado proporcional con respecto a la concentración.

F. DE EL ENSAYO REALIZADO CON EL EXTRACTO ALCOHOLICO OBTE-
NIDO SEGUN TECNICA DE Clark's.

El halo de inhibición aumenta conforme se aumenta la concentración. Manteniendose constante en las concen-
traciones de 30,000 a 40,000 ppm. por lo que se conside-
ra que es la óptima de inhibición, ya que a la concen--

tración de 50,000 ppm. se obtiene un halo de diametro - mayor, pero difuso. Por lo que se descarta como adecuada.

G. DE LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA PARA Mycobacterium tuberculosis.

Con ambos extracos de 4 ppm. fué negativo por lo - que se ensayó con una concentración de 20 ppm. dando el mismo resultado.

C O N C L U S I O N E S

- El extracto de *Ocimum basilicum* L. tratado con la técnica de Clark's, presento una concentración mínima de inhibición (CMI) a la concentración de 10,000 ppm.

- De los ensayos para la prueba de inhibición bacteriana con el extracto previamente tratado con la técnica de Clark's en las concentraciones de : 10,000 ; 15,000 ; 20,000 ; 30,000 ; 40,000 y 50,000 ppm. para la Klebsiella pneumoniae se determino que la concentración óptima es la de 30,000 ppm.

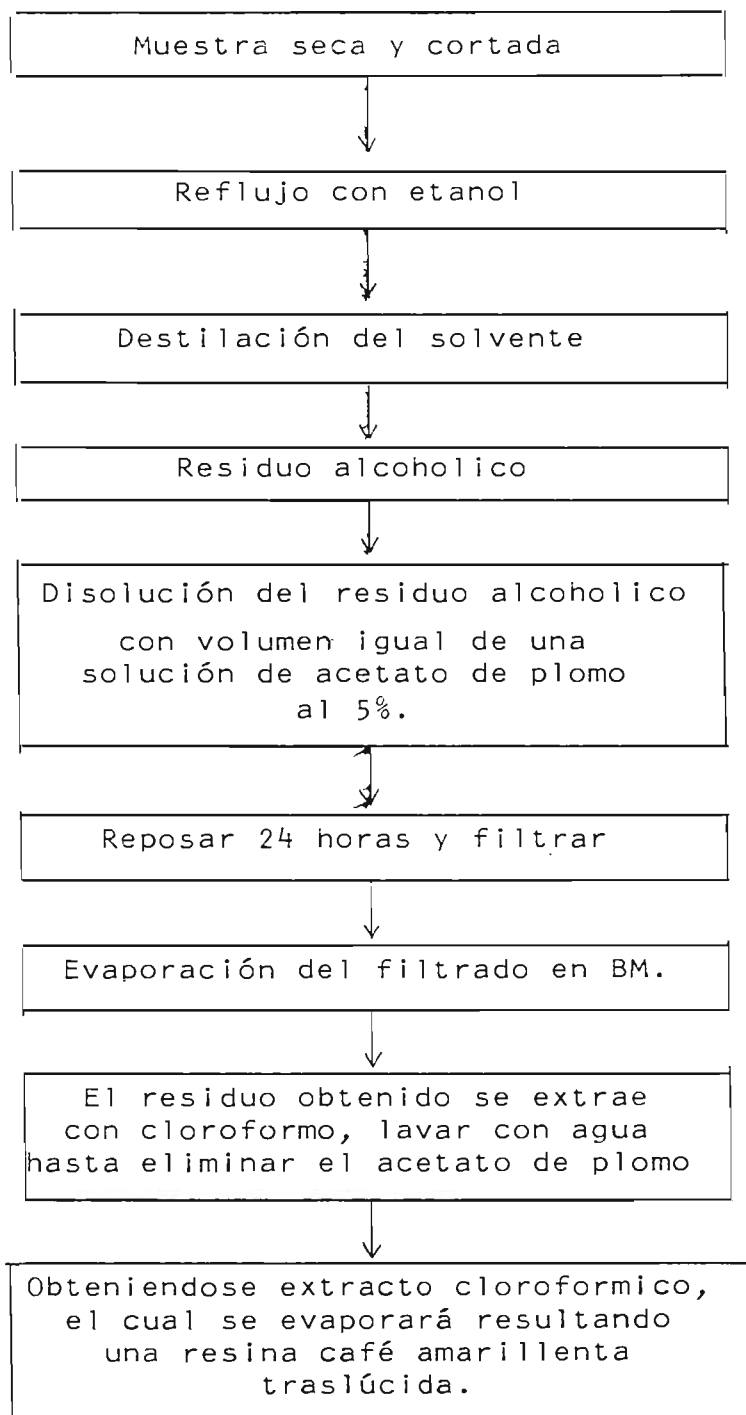
- En los ensayos realizados para la prueba de susceptibilidad microbiana para Mycobacterium tuberculosis con las concentraciones de 20 y 4 ppm. no hubo inhibición.

CAPITULO V

ANEXOS

ANEXO No. 1

TECNICA DE CLARK'S



PERKIN-ELMER

SPECTRUM NO. 4

SAMPLE 1 Ext de albacea

SAMPLE 2

ORIGIN Resina de albacea.

PURITY 90%

SPEED NORMAL FAST

SLITS NORMAL WIDE

PHASE Film

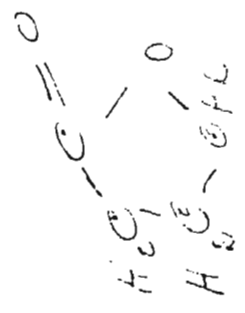
CONCENTRATION -

THICKNESS 0.025 mm

DATE 15-7-85

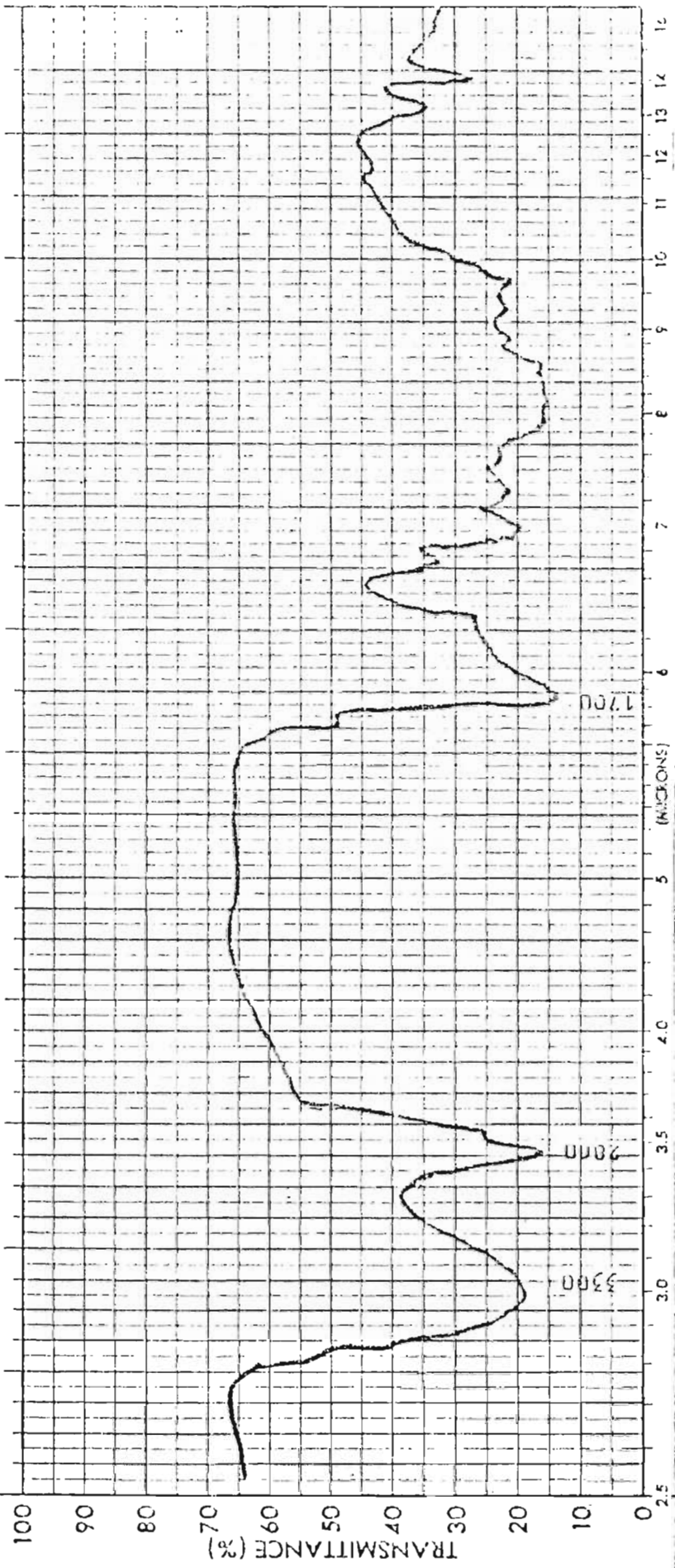
OPERATOR FG

REMARKS



FREQUENCY (CM⁻¹)

600 800 1000 1200 1400 1600 1800 2000 2400 2800 3200 3600 4000



WAVELENGTHS (MICRONS)

2.5 3.0 3.5 4.0 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

REMARKS



ORIGIN room of alcohol
 PURITY pure
 SPEED NORMAL X FAST
 SLITS NORMAL X WIDE
 PHASE film
 CONCENTRATION —
 THICKNESS 0.05 mm
 DATE 7 October 1955
 OPERATOR W.E.

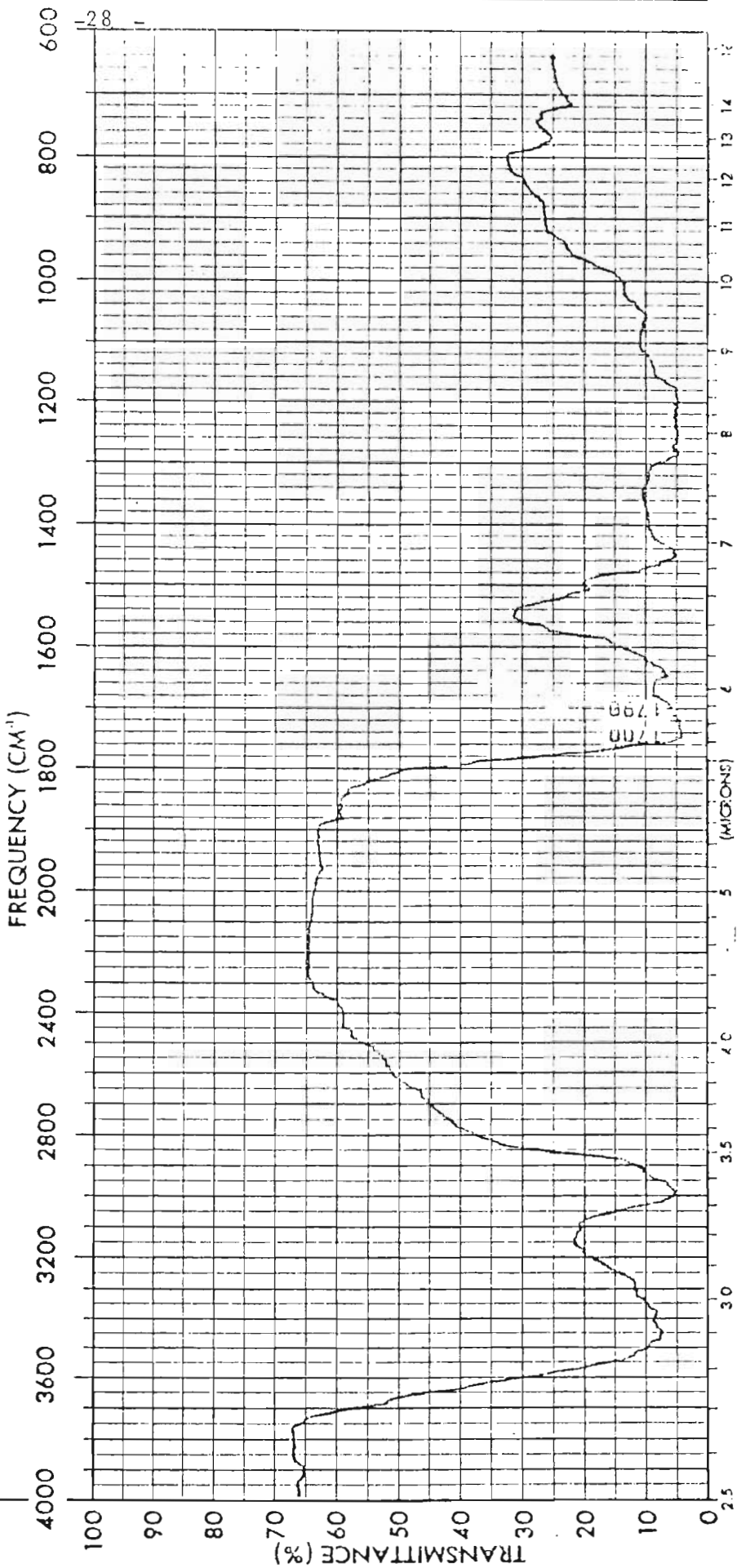
IRKIN-LMER

SPECTRUM NO.

SAMPLE 1 Room

W.E. at Washington

SAMPLE 2



ANEXO No. 3

COLORACION DE GRAM Y PRUEBAS BIOQUIMICAS

PARA LA IDENTIFICACION DE LA BACTERIA

KLEBSIELLA PNEUMONIAE

MICROORGANISMO DE PRUEBA	COLORACION DE GRAM	BIOQUIMICAS					
		TSI	INDOL	ROJO METILO	VOGES PROS KAUER	CITRATO	MOVILIDAD
<u>Klebsiella</u> <u>pneumoniae</u>	-	+	-	-	+	+	-

Las respuestas obtenidas en dichas pruebas son características de la bacteria en estudio

DESCRIPCION DE ANEXO No. 3

A. FUNDAMENTO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS APLICADAS A LA IDENTIFICACION DE Klebsiella Pneumoniae.

1. T S I.

Prueba diferencial para identificación primaria de patógenos entéricos gram negativos, con ella se determina la formación de ácido y gas de la fermentación de dextrosa, lactosa y sacarosa.

Interpretancose según la coloración observada:

- a). Bisel rosado (N), fondo rosado indica que la bacteria no fermentó ningún azúcar.
 - b). Bisel rosado, fondo amarillo (A), indica que la bacteria fermentó a la glucosa pero no la lactosa, ni la sucrosa.
 - c). Bisel amarillo (A), fondo amarillo (A), que indica que la bacteria fermentó la glucosa, lactosa y sucrosa.
- Para Klebsiella pneumoniae, la prueba del TSI --
fué positiva.

2. INDOL.

Prueba para determinar la presencia o ausencia de Indol como sub-producto del metabolismo de la bacteria. La producción de Indol depende de la presencia del grupo triptófano en el medio, la enzima triptofanasa es responsable de la formación del Indol - que es evidenciado por un anillo rojo brillante en la interfase del medio y el solvente.

- Para Klebsiella pneumoniae la prueba del Indol es negativa.

3. ROJO DE METILO.

Prueba para demostrar si la bacteria ha seguido la fermentación ácido mixta o formica. Los productos ácidos al agregar el indicador varían de amarillo a rojo.

Una reacción positiva se determina por un rojo definido.

Una reacción negativa se determina por un color amarillo.

Para Klebsiella pneumoniae la prueba del Rojo de Metilo fué negativa.

4. VOGES PROSKAUER.

Prueba útil para determinar si la bacteria produce acetilmetilcarbinol ó acetoina a partir de ácido pirubico.

Una reacción positiva se determina por la coloración rosada ó roja.

Para Klebsiella pneumoniae la prueba de Voges Proskauer fué positiva.

5. CITRATO.

Prueba basada en la utilización del citrato por la bacteria.

Una reacción positiva se determina por un crecimiento exuberante, produciendo alcalinos y cambiado el medio de su color verde original a un azul intenso.

Para Klebsiella pneumoniae la prueba de Citrato fué positiva.

6. MOVILIDAD.

Prueba para determinar la movilidad de la bacteria.

Una reacción positiva se manifiesta por una zona difusa del desarrollo que se extiende desde la línea de inoculación.

Para Klebsiella pneumoniae la prueba de Movilidad fué negativa.

ANEXO No. 4

PREPARACION DEL STANDARD MC FARLAND

- A. Preparar un set de 10 tubos de igual tamaño.
- B. Preparar ácido sulfúrico al 1%.
- C. Preparar una solución acuosa al 1% de cloruro de bario.
- D. Agregar la cantidad indicada de ambas soluciones tal como se señala en el cuadro hasta tener un total de 10 ml. por tubo.
- E. Cerrar herméticamente los tubos o ampollas. El precipitado de SO_4Ba en suspensión corresponde aproximadamente a la densidad de células homogéneas de E. coli/ml. según la escala de patrones que pueden verse en la tabla.

NUMERO DE TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CL_2Ba 1%	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
H_2SO_4 1%	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
Densidad Células Aprox. X 10^8 /ml.	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

ANEXO No. 5

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO LOWENSTEIN - JENSEN

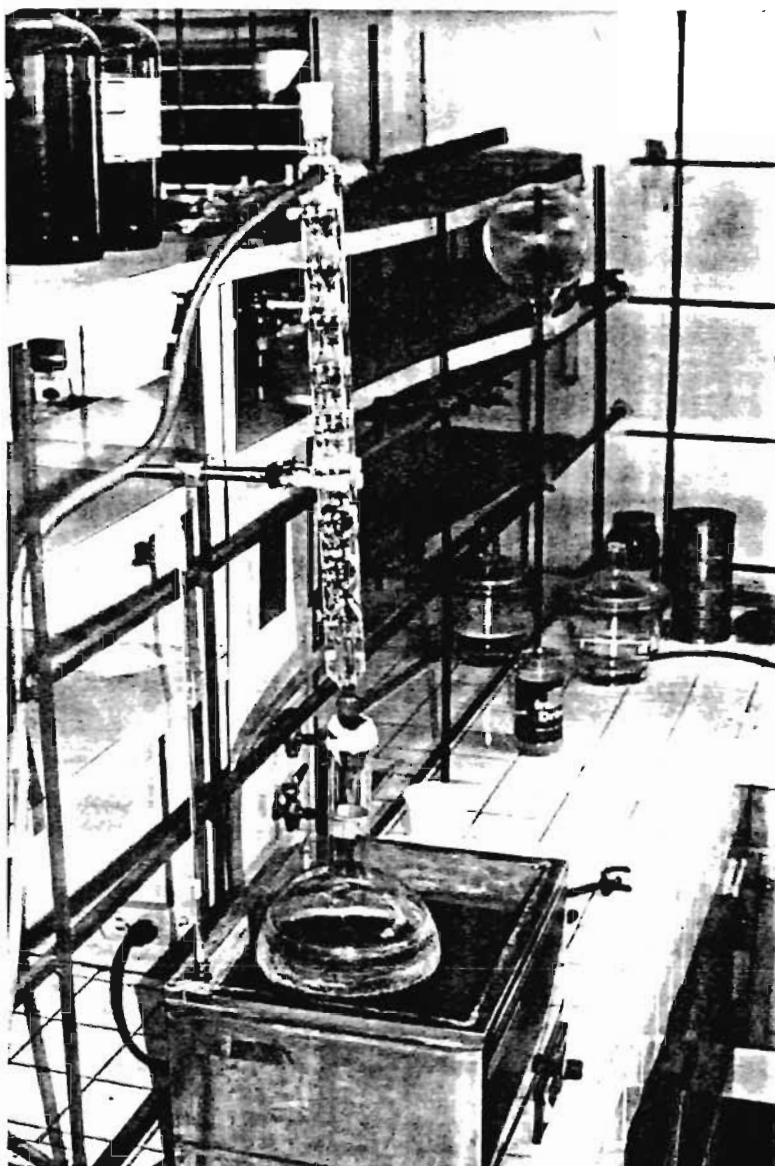
A. FORMULA:

1. Fosfato Monopotásico Anhidro 2.40 g.
2. Sulfato de Magnesio 0.24 g.
3. Citrato de Magnesio 0.60 g.
4. L-Asparagina 3.60 g.
5. Glicerina Bidestilada 12.0 ml.
6. Agua Destilada Estéril 600.0 ml.
7. Huevos Enteros 1000.0 ml.
8. Verde de Malaquita al 2% 20.0 ml.

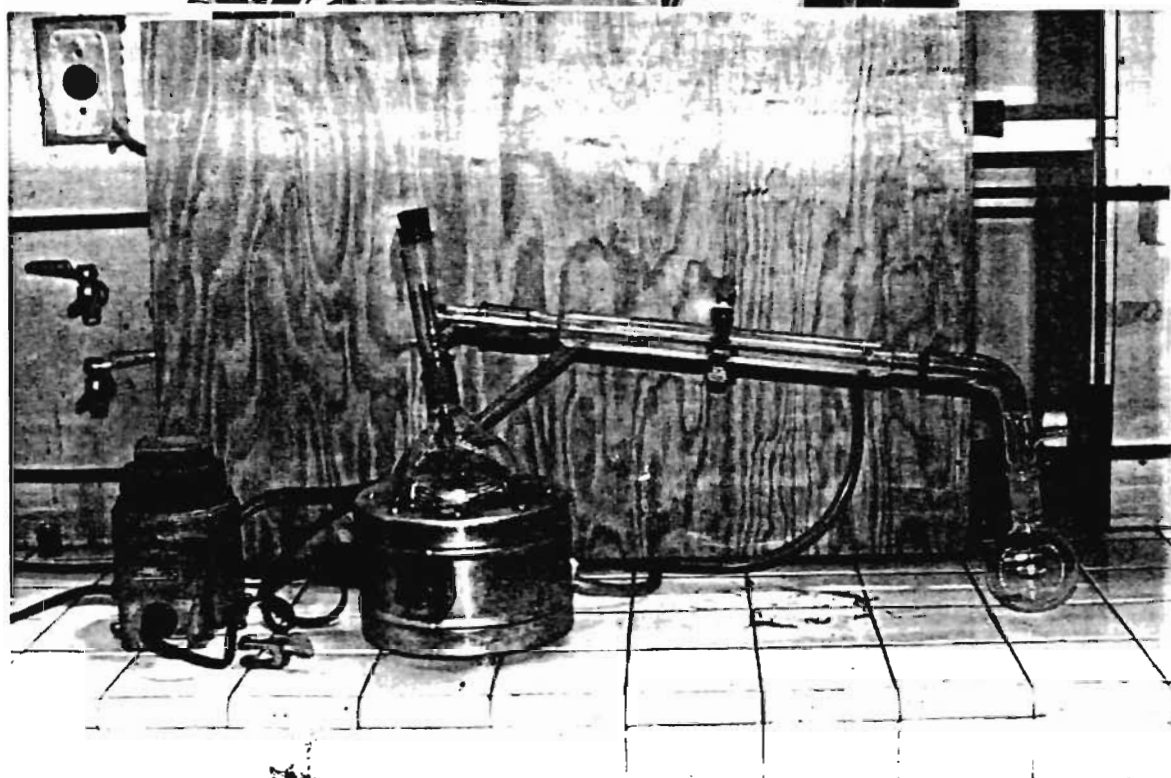
B. PROCEDIMIENTO:

1. Disolver las sales en agua destilada, agregar la Glicerina y L-Asparagina, esterilizar por 30 mnts. a 120°C. Dejar enfriar.
2. Lavar los huevos con cepillo en agua jabonosa por 30 mnts. Enjuagar en agua de chorro y sumergir en alcohol de 70° G. por 15 mnts.
3. Vaciar los huevos sobre una probeta de 1L, homogenizar a baja velocidad en una licuadora.

4. Agregar los huevos a la solución de sales filtrando sobre gasa estéril.
5. Agregar 20 ml. de una solución reciente de Verde de Malaquita al 2%.
6. Mezclar bien y dejar reposar por 30 mnts. a temperatura ambiente. (para eliminar burbujas de aire).

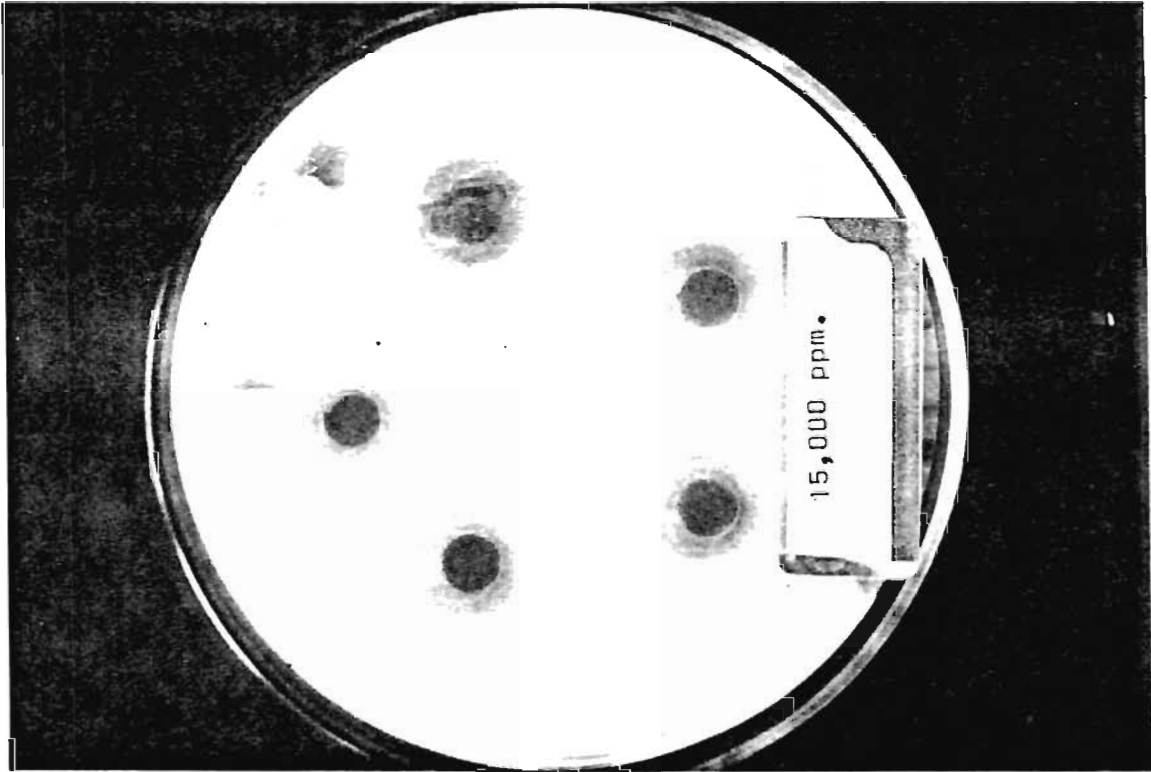
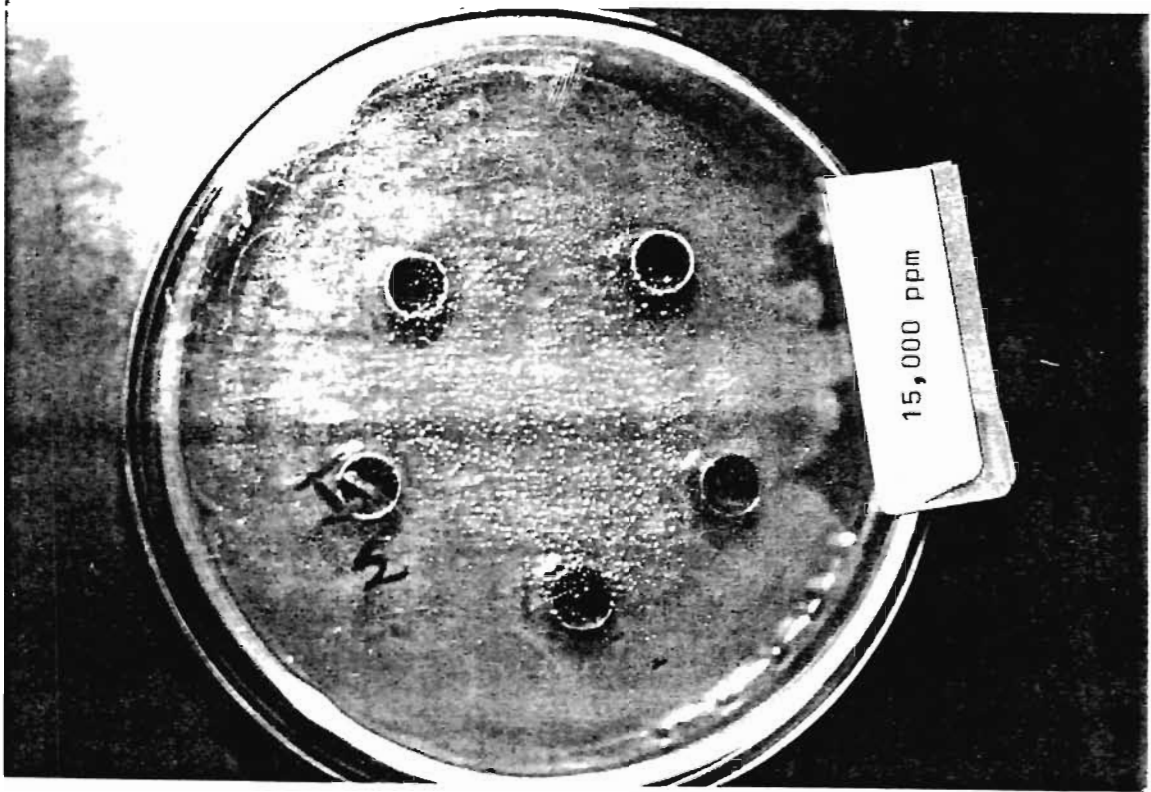


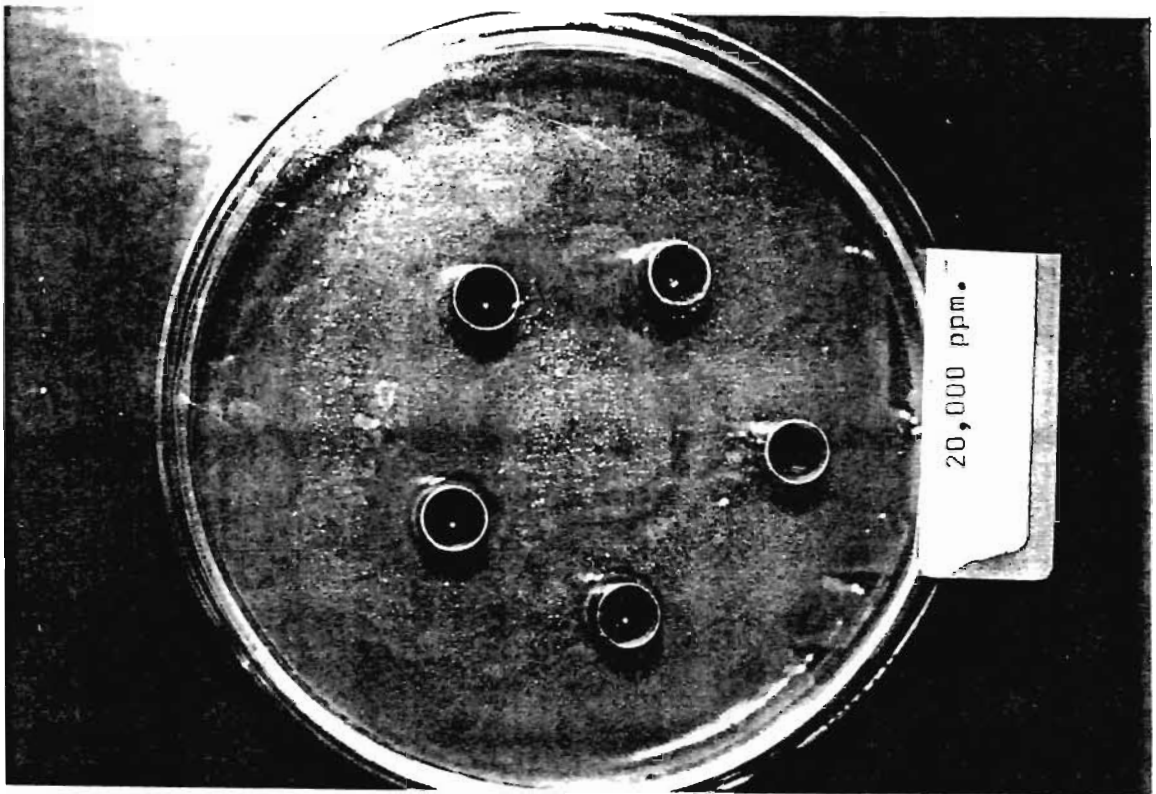
PROCESO DE EXTRACCION

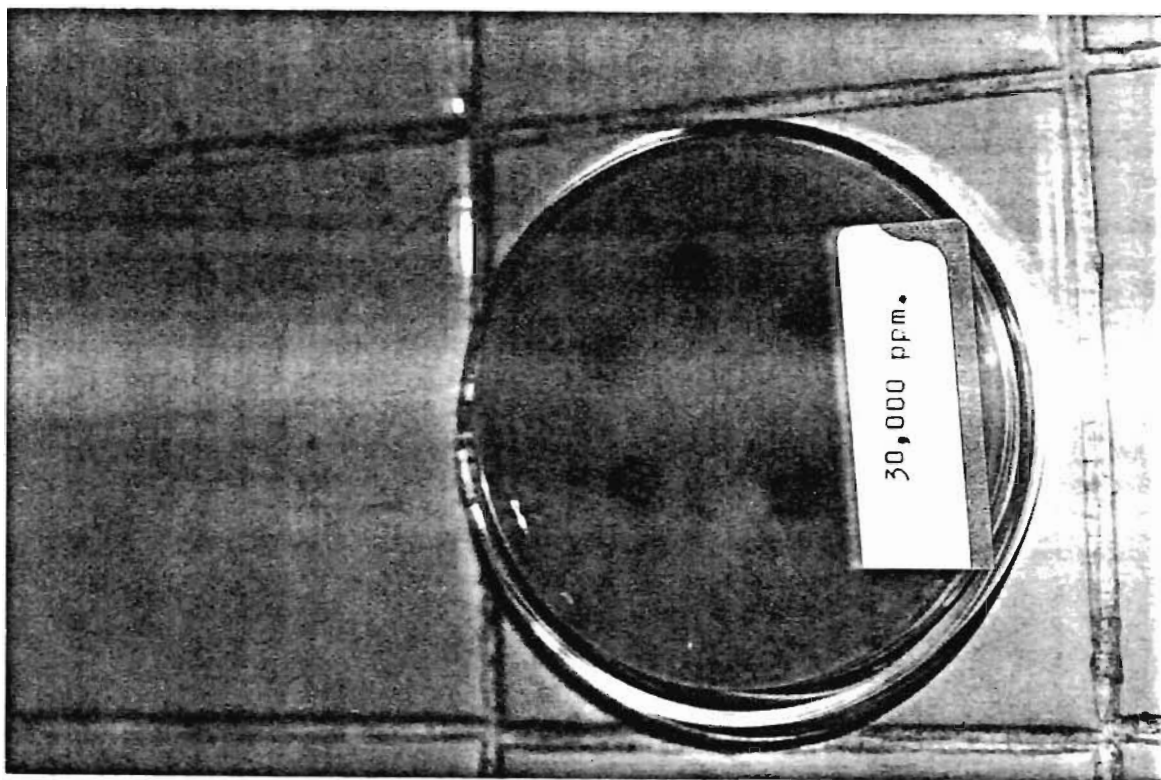
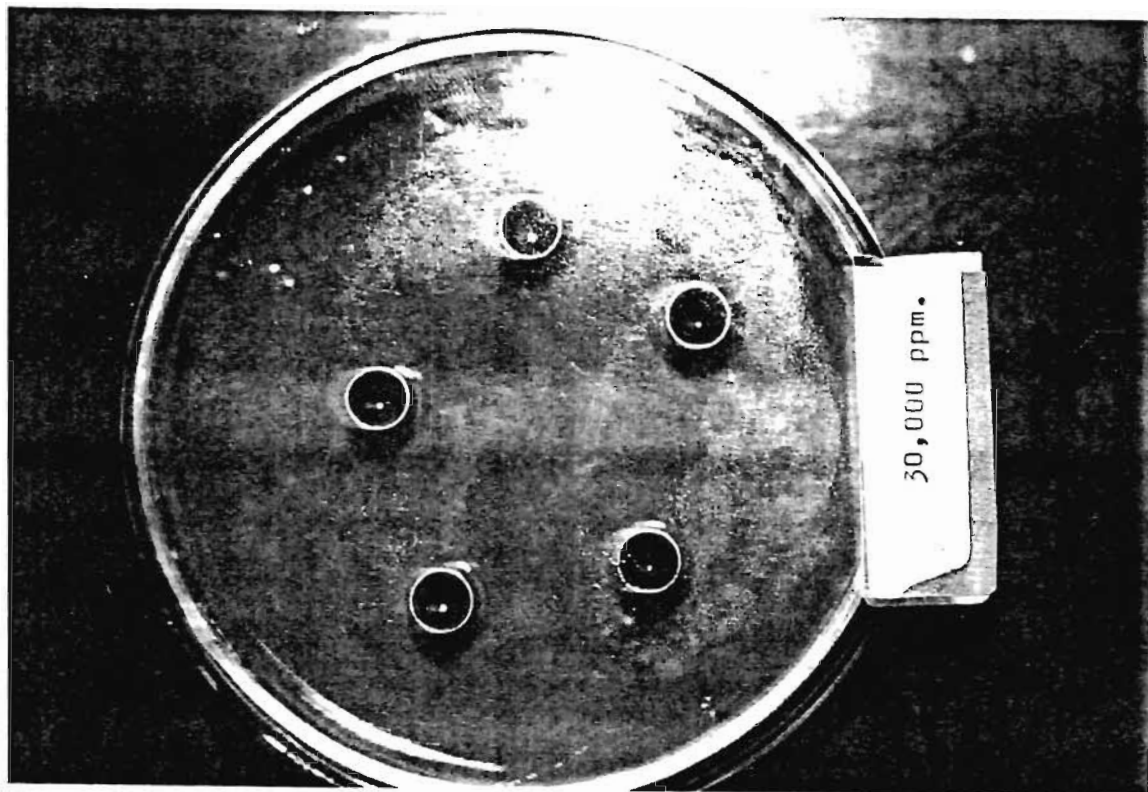


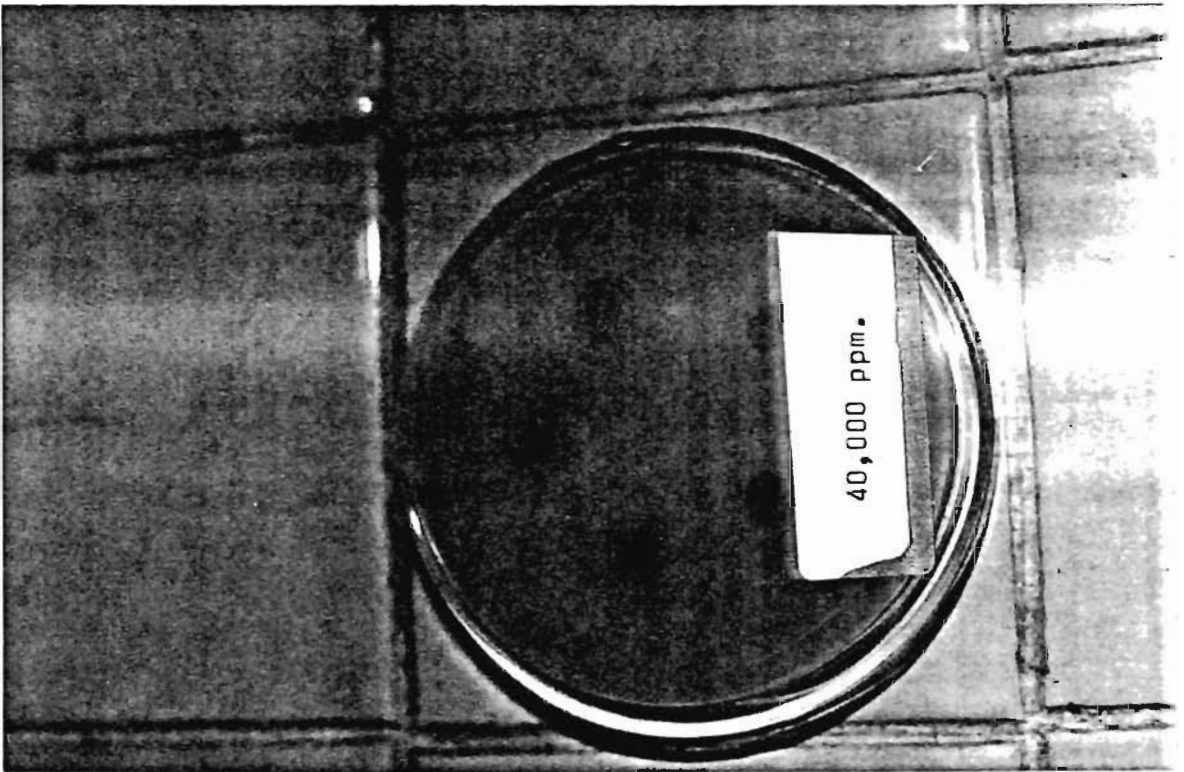
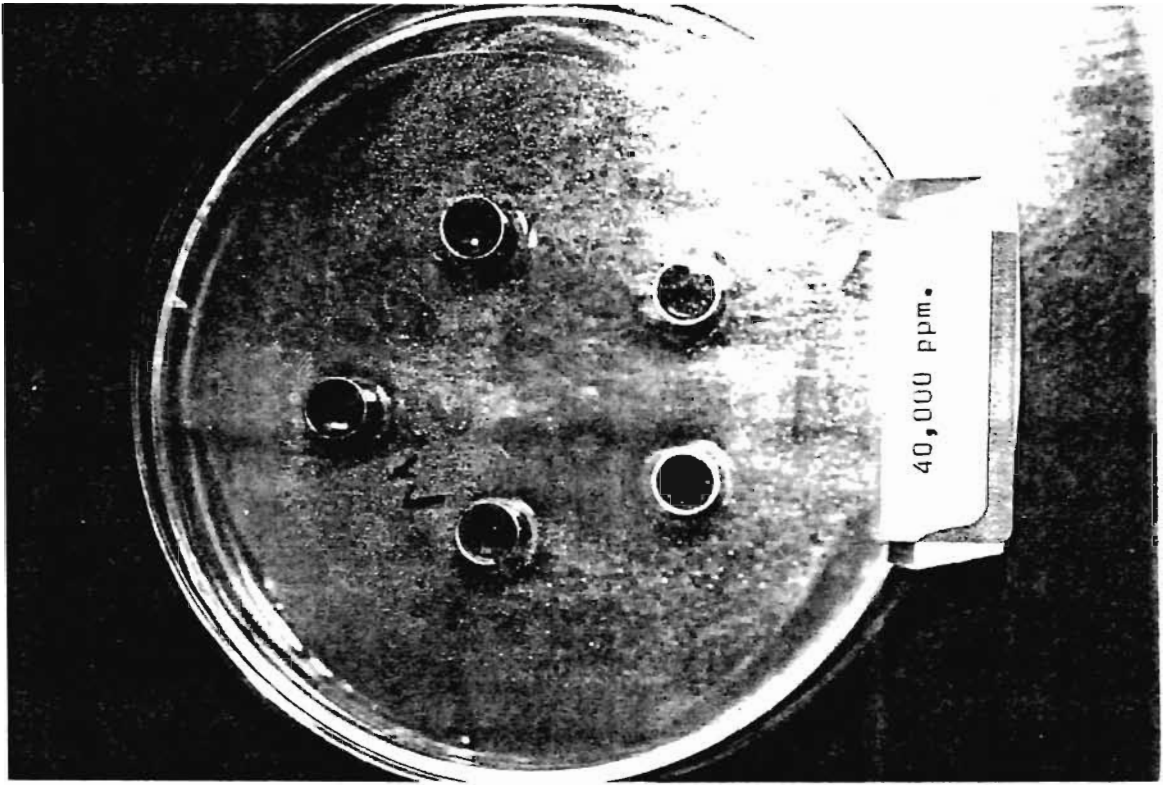
RECUPERACION
SOLVENTE

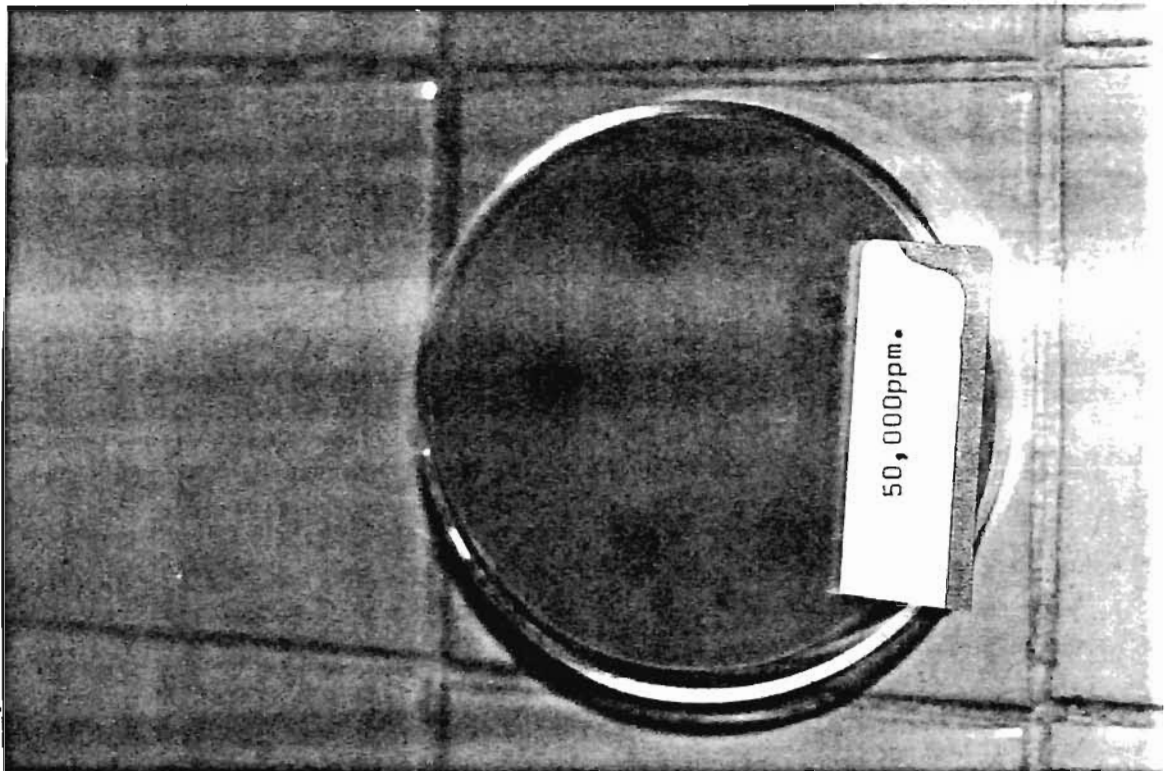
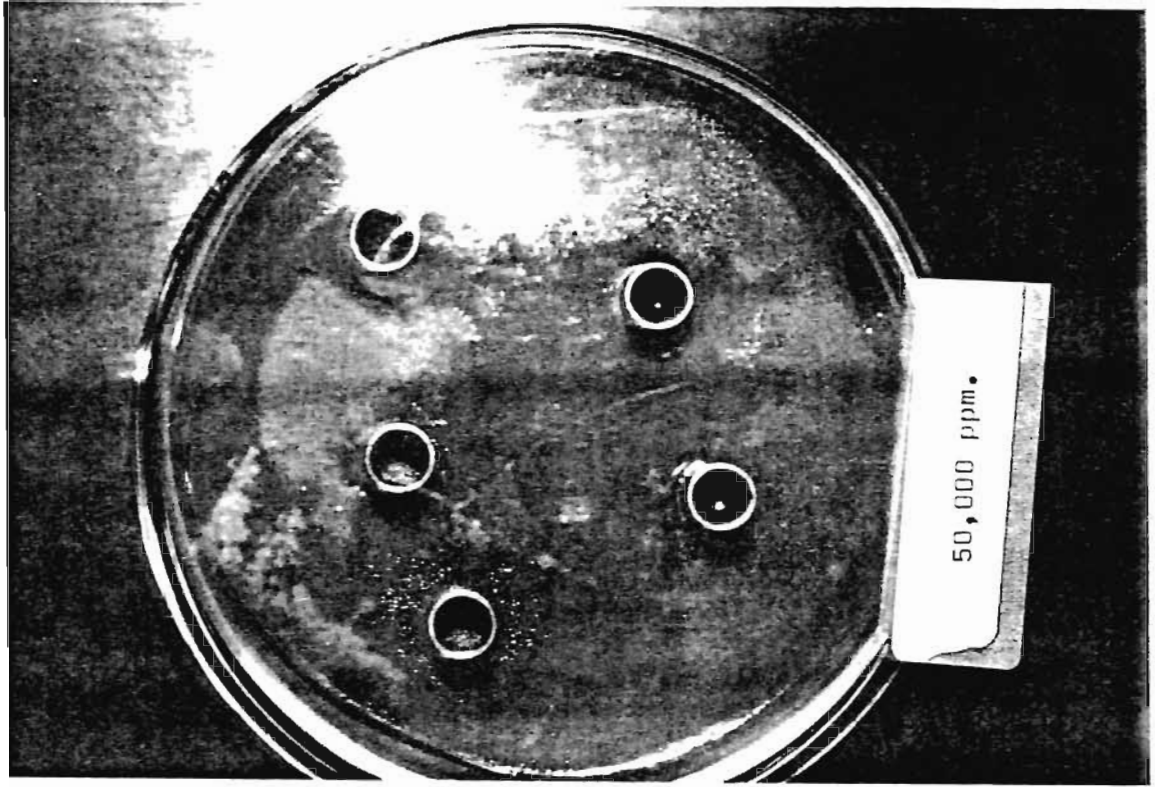
FOTOGRAFÍAS DE PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA
PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE Y MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

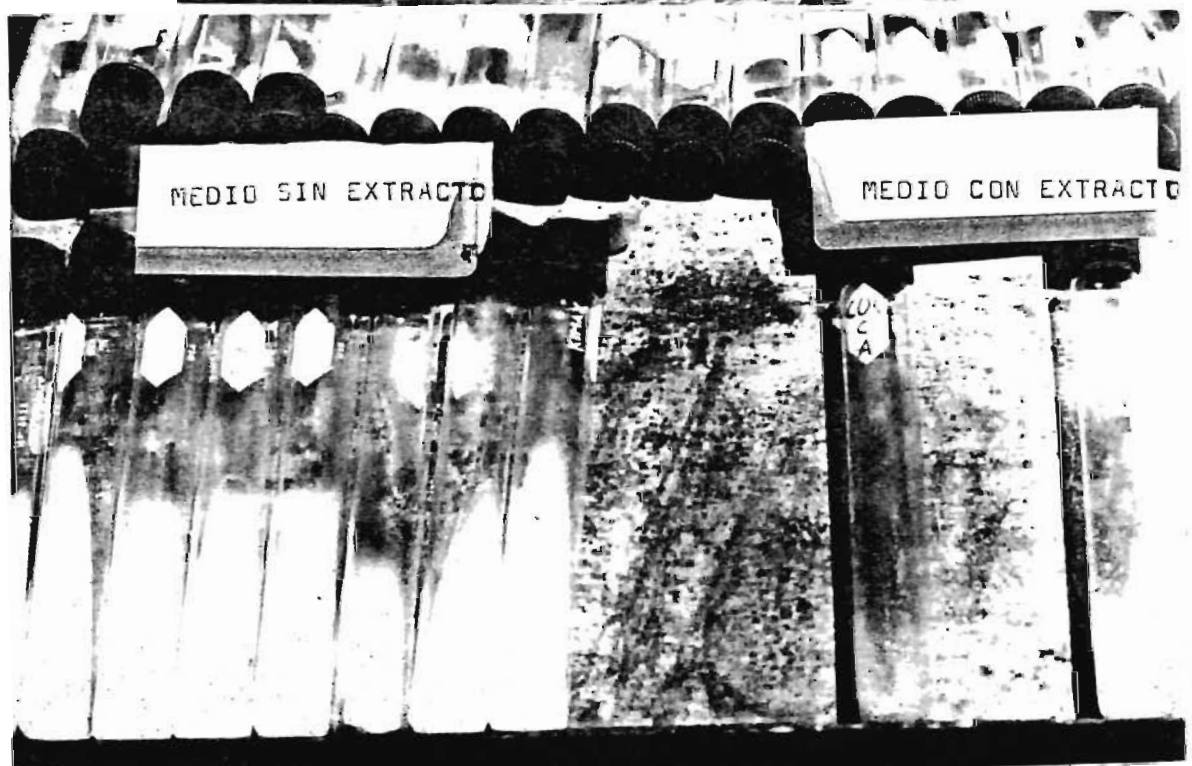












BIBLIOGRAFIA

B I B L I O G R A F I A

1. ALVAREZ ALVAREZ, REGINA DE LA PAZ. "Estudio etnobotánico y farmacognóstico de quince plantas medicinales de El Salvador, (Zona Central), San Salvador 1979. Páginas 18, 19 y 20.
2. CALDERON, S. y STANDLEY, P. "Lista Preliminar de Plantas de El Salvador" 2^{da} Edición. San Salvador. Ediciones Culturales de la Universidad de El Salvador, 1941, Página 66.
3. DOMINGUEZ, X. A. "Métodos de Investigación Fitoquímica" México. Edición Limusa, 1973, Páginas 71, 73, 95.
4. DIRECCION GENERAL DE ESTADISTICA Y CENSO. "Salud Pública en Cifras". Anuario No. 16. San Salvador 1983.
5. GUZMAN, D. J. "Especies Utiles de la Flora Salvadoreña" 3^{ra} Edición. San Salvador, El Salvador. Dirección de Publicaciones del Ministerio de Educación, 1975, Tomo I, Página 599.
6. GUPTA S. ET AL. "Introducción of frene basic Ocimum basilicum in jammu, Cultural practices and chemical constituents" Chemical abstracts 76:83559 g.1972.

7. CUPTA, K. C. AND VISWANATHAM, R. "A short note on anti-tubercular substance from ocimum sanctum" Chemical abstracts. 29:19457. 1938.
8. HAROLD, J. N. "The sterol and triterpene content of the Labiatea family" Chemical abstracts 53:9390 g.1959.
9. QUDRAT, J. K. ET AL. "Constituents of leaves of the plants chemical abstracts" 62:8119. g. 1965.
10. RODRIGUEZ, D. "Determinación of carotena in some food which are consumed in Perú" Chemical Abstracts. 51:3863. 1957.
11. SIRSI, M. ET AL. "Studies of the antimicrobial activity and pharmacological properties of some essential oil, extracted from locally cultivated plants" Biological abstracts. 27:7156, 1937.
12. SNAJDER, K. "Use of Indigenous Medicinal Plants Against Dysentery and diarrhea in the vicinity of tretnik (Control Serbia)" Biological Abstracts. 34:26038 1959.