

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



“Investigación del Posible Efecto Inhibitorio que ejerce La Calea Urticifolia sobre Pseudomona.sp”

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
Ana Delmy Hércules Morataya
José Alexander Alabí Mendoza

PARA OPTAR AL TITULO DE
Licenciado en Química y Farmacia



SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.

T
581.634
H539i



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

R E C T O R

DR. MIGUEL ANGEL PARADA

S E C R E T A R I O

DRA. ANA GLORIA CASTANEDA DE MONTOYA

D E C A N O

DRA. AMELIA RODRIGUEZ DE CORTES

S E C R E T A R I O

DRA. AMINTA ACEITUNO DE KAFIE

A S E S O R

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

JURADO CALIFICADOR

LIC. RHINA ANTONIETA TOLEDO

LIC. MARIA HERMINIA HERNANDEZ DE LUNA

LIC. MARIA ARACELY CUBIAS

LUGAR DE PRACTICAS

Laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia de la
Universidad de El Salvador

ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO DENTRO DEL PROYECTO

" OBTENCION Y APROVECHAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES
DE LA FLORA SALVADOREÑA"

QUE SE LLEVA A CABO EN LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR, BAJO COLABORACION DE LA ORGANIZACION DE LOS ESTADOS AMERICANOS (O.E.A.)

D E D I C A T O R I A

A DIOS TODOPODEROSO : Por iluminarme

A MIS PADRES : Miguel Angel Hércules
Cristina Morataya de Hércules

POR SU AMOR E INMENSO SACRIFICIO

A MI ESPOSO : José Francisco Melara Del Cid

POR BRINDARME SU APOYO

A MIS HIJOS : Angel Francisco

Héctor José

CON TODO AMOR

A MIS PROFESORES, AMIGOS Y DEMAS FAMILIA

ANA DELMY HERCULES

D E D I C A T O R I A

A DIOS TODOPODEROSO : Por permitirme lleagar al final de la jornada emprendida.

A MIS PADRES: Víctor Alabi
María Magdalena Mendoza de Alabi
CON PROFUNDO AMOR Y RESPETO POR HABERME
ENSEÑADO EL CAMINO DEL EXITO.

A MI ESPOSA : Blanca Margarita Méndez de Alabi
CON TODO MI AMOR

A MIS HIJOS: Schad Margarita
José Alexander
Luis Nazareth
CON TERNURA

A MIS HERMANOS : CON TODO RESPETO

A MIS PROFESORES, AMIGOS Y DEMAS FAMILIA.

JOSE ALEXANDER ALABI MENDOZA

A G R A D E C I M I E N T O

AL LICENCIADO SALVADOR CASTILLO AREVALO

Por su valiosa colaboración y dirección en el desarrollo del presente trabajo.

A LAS DOCTORAS: MERCEDES RAMOS VELASQUEZ

ROSA MARIA FORTILLO DE RIVAS, y

PROFESOR: JORGE ADALBERTO LAGOS

Por su valiosa y desinteresada colaboración.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR

Por la revisión y evaluación del trabajo.

A LOS LABORATORISTAS: DR. CARLOS RAUL RODRIGUEZ

MATEO EUGENIO DIAZ y

OSCAR GERARDO COREAS.

A NUESTROS PROFESORES, COMPANEROS Y AMIGOS.

AL PERSONAL QUE LABORA EN LOS DEPARTAMENTOS DE MICROBIOLOGIA DE -
LOS HOSPITALES VISITADOS.

A LA ORGANIZACION DE LOS ESTADOS AMERICANOS (O.E.A)

Que bajo sus auspicios se llevó a cabo el presente trabajo de graduación.

INDICE		PAGINA
I.	RESUMEN	11-12
II.	INTRODUCCION	13-16
III.	DESCRIPCION BOTANICA	17-18
IV.	PARTE EXPERIMENTAL	19
A.	MATERIAL Y EQUIPO	20
1.	MATERIAL	20
1.1	Especie Vegetal	20
1.2	Microorganismo	20
1.3	Medios de cultivo	20
1.4	Reactivos y Disolventes	20
1.5	Cristalería	21
1.6	O t r o s	21
2.	EQUIPO	21-22
B.	MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS	23
1.	METODOLOGIA DE CAMPO	23
2.	METODOLOGIA DE LABORATORIO	23
2.1.1.	Tratamiento de la planta	23
2.1.2.	Extracciones	23
2.1.3.	Pruebas preliminares	24
2.1.4.	Preparación de las diluciones de los extractos.	24

	PAGINA
2.2 RECOLECCION DE LA CEPA DE <u>Pseudomona s.p.</u> ...	25
2.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA.	25-28
2.4 PREPARACION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA.....	28
2.5 DETERMINACION DEL POTENCIAL DE INHIBICION POR EL METODO DE CILINDRO PLACAS.	28-29
2.6 FUNDAMENTO DEL METODO	30
V. RESULTADOS	31-35
VI. INTERPRETACION DE RESULTADOS	36-38
VII. CONCLUSIONES	39-40
VIII. ANEXOS	41-50
1. Técnica de Clarcks	42
2. Fórmulas Químicas	43-44
3. Espectros	45-49
4. Preparación del standar Mc Farland.	50
IX. BIBLIOGRAFIA	51-56

I RESUMEN

I. RESUMEN

- 1) Se hicieron extracciones del material vegetal seco, en un soxhlet, obteniéndose tres extractos diferentes : Clorofórmico, metánolico y etéreo.

- 2) Se determinó la presencia de sesquiterpenlactonas, en los tres extractos brutos y de la mezcla de sesquiterpenlactonas (T. CLARCKS), por medio de cromatografía en capa fina y espectros al I.R.

- 3) Se prepararon diluciones, de 10 a 10,000 p.p.m. de los tres extractos brutos y de la mezcla de sesquiterpenlactonas (T. CLARCKS), para su aplicación en el método microbiológico.

- 4) Se determinó la inhibición del crecimiento de Pseudomona s.p.; utilizando extractos de la especie botánica Calea urticifolia (Juanislama), de la familia de las compuestas (tribu heliantheae)

II INTRODUCCION

II. INTRODUCCION

Para continuar con la investigación de plantas medicinales de El Salvador, se seleccionó la Calea urticifolia, que pertenece a la familia de las compuestas, llamada comúnmente, Juanialama, especie caracterizada por poseer lactonas sesquiterpénicas del tipo - del Germacrano. (1) (ver Anexo NQ 2) Y que es utilizada por la medicina folklórica salvadoreña, atribuyéndole propiedades antirreumáticas, vermífugas, antiulcerosas y antibacterianas. Por otra parte se le atribuyen propiedades antitumorales, como a la mayor parte de las especies, en las que aparecen las mencionadas lactonas sesquiterpénicas.

Las sesquiterpenlactonas, se encuentran difundidas en las familias vegetales, entre las cuales, las compuestas revisten mayor importancia, debido a que más del 50% de las Lactonas descritas, se han aislado de sus diferentes géneros .

Estos compuestos, son importantes por sus propiedades farmacológicas, fundamentalmente, citotóxicas, antitumorales, analgésicas, amebicidas y por su acción microbiológica en la inhibición de bacterias gram(+), como Stafilococcus aureus y Levaduras como Cándida

(1) Domínguez, Xorge A. Métodos de Investigación Fitoquímica, 1a. ed., Editorial Limusa, México.

albicans (2).

Se ha determinado que la mayoría de sesquiterpenolactonas, que poseen un grupo γ -Lactona, α - β -insaturado presentan este tipo de actividad, debido a la propiedad de efectuar una alquilación de los grupos sulfhidrilos presentes, en las moléculas enzimáticas - (3) (ver anexo NR 3). Este estudio, tiene como objetivo investigar la acción inhibitoria que dicha especie pudiera ejercer sobre el crecimiento de la bacteria gram(-), Pseudomona s.p., en vista de que hasta la fecha no han sido reportados estudios que pongan de manifiesto dicho efecto.

Además la Pseudomona s.p. participa frecuentemente en infecciones mixtas, produce infecciones en heridas y quemaduras, dando lugar a pus verde azulado, necrosis fecal de la piel, meningitis (cuando accidentalmente es introducida por punción lumbar), e infecciones en vías urinarias (cuando es acarreada por catéteres, instrumento o por irrigación de soluciones).

Por otra parte, es una de las bacterias que es resistente a la mayoría de agentes antimicrobianos comúnmente usados, por tanto se seleccionó la Galea urticifolia, a fin de buscar una droga

(2), (3) : Revista Latinoamericana de Química Vol. 8/2.
ORGANO OFICIAL DE LA FEDERACION LATINOAMERICANA
DE QUIMICA AL SERVICIO DE AMERICA LATINA.
Consejo Editorial Presidente Dr. Jesús Romo
U.N.A.M. Instituto de Química,
Ciudad Universitaria, México 20, D.F.

que venga a contribuir a la solución de los problemas antes mencionados, que tienen gran incidencia en la mayoría de los hospitales de nuestro país.

III DESCRIPCION BOTANICA

III. DESCRIPCION BOTANICA

Especie Calea urticifolia (Mill.) DC
Tribu Heliantheae
Familia Compuestas
Nombre común..... Juanislama, Guanislama,
amargón.

La Guanislama es un arbusto erecto de 1 a 2 metros de alto, ramificado y densamente piloso. Es común en diferentes zonas del país, tanto en la tierra caliente como en la templada.

Las hojas son sencillas, opuestas, con peciolo cortos, de bordes aserrados, pilosas, trinerviadas y de forma ovalada a oblonga lanceoladas o elíptico-lanceoladas; haz rugoso y áspero; envés también áspero y más claro que el haz; flores amarillas, reunidas en capítulos, dispuestas en inflorescencia umbeliformes (a menudo, son más cortos que las hojas) con pedicelos delgados que miden entre 0.5 - 2.5 cm de largo; las umbelas están sostenidas por pedicelos largos y axilares; los frutos son aquenios aproximadamente de 2.5 mm de largo, piloso, papos con escamas de 3.4 mm de largo.

IV PARTE EXPERIMENTAL

A. MATERIAL Y EQUIPO

1. MATERIAL

1.1 Especie vegetal : Calea urticifolia

1.2 Microorganismos : Pseudomona s.p.

1.3 Medios de cultivo:

- Agar Tripticasa soya (T.S.A.)
- Agar Nutritivo
- Agar Mueller Hinton
- Agar Tres Azucares y Hierro (T.S.I.)
- Agar Citrato de Simmons
- Caldo Urea
- Caldo Triptófano
- Solución salina estéril 0.9%
- Standar Macfarland 0.5×10^8 ml

1.4 Reactivos y Disolventes :

- Cloroformo C.R.
- Metanol C.R.
- Eter de petróleo C.R.
- Propilenglicol
- Agua destilada estéril

- Benceno C.R.
- Acetona C.R.
- Iodo (Revelador)

1.5 Cristalería

- Material de vidrio de rutina usado en el Laboratorio de Farmacognosia.
- Material de vidrio propio de Laboratorio microbiológico

1.6 Otros

- Espátulas
- Microespátulas
- Regla milimetrada
- Pinzas de extensión
- Pinzas de sostén
- Mallas de asbesto.

2. EQUIPO

- Balanza Granataria
- Balanza analítica
- Mechero

- Mantas de Calentamiento CattM14 Ser NQ 31031A.
- Cocina eléctrica
- Espectrofotómetro I.R. Perkin Elmer Mod: 710A.
- Placas Cromatográficas 5 x 20 cm
- Refrigeradora General Electric
- Estufa
- Autoclave
- Cilindros de acero inoxidable
- Incubadora
- Termostato VG130B NV120
- Baño de María.

B. METODOS Y PROCEDIMIENTOS

1. METODOLOGIA DE CAMPO

La planta fue recolectada en el departamento de Sonsonate en los meses de Junio y Julio.

2. METODOLOGIA DE LABORATORIO

2.1.1 Tratamiento de la planta

- a) secado
- b) pulverizado

2.1.2 Extracciones

El material seco y pulverizado, es sometido al proceso de extracción en un soxhlet.

Utilizando tres disolventes :

- a) éter de petróleo
- b) cloroformo
- c) metanol

Con la mitad del extracto clorofórmico se siguió la MARCHA DE CLARCK para la obtención de la mezcla de sesquiterpenlactonas (ver anexo Nº 1)

2.1.3 Pruebas preliminares

- Observación directa de las características organolépticas de los extractos.
- Pruebas cromatográficas en capa fina, variando la polaridad de la fase móvil.
- Espectros al I.R. para identificar bandas características de las Lactonas sesquiterpénicas presentes. (Ver espectros en Anexos Nº 4)

2.1.4 Preparación de las diluciones de los extractos - de la planta.

Tanto los extractos, clorofórmicos, metanólico y etéreo, así como de la mezcla de sesquiterpenlac tonas (T.CLARCKS), se hicieron diluciones con - agua destilada estéril y propilenglicol como di- luyente (4), a las siguientes concentraciones :

(4) Revista Latinoamericana de Química, vol 70/4, Organo Ofi- cial de la Federación Latinoamericana de Química, al ser- vicio de América Latina, Cap I.

10 p.p.m, 100 p.p.m. 500 p.p.m., 1000 p.p.m, 5000 p.p.
m. y 10,000 p.p.m.

2.2 RECOLECCION DE LA CEPA Pseudomona s.p.

La cepa de Pseudomona s.p., fue proporcionada por los hospita
les ANTEL, ROSALES, MATERNIDAD.

2.3 PRUEBAS BIOQUIMICAS DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA

Las pruebas de identificación bioquímicas están basadas en -
las necesidades energéticas de las bacterias y ponen de mani-
fiesto características propias de cada microorganismo, facili
tando así su identificación.

a) Desdoblamiento de UREA:

Se sembró densamente la superficie del medio agar
Urea, o emulsionar la colonia bacteriana en caldo urea,
incubar por 24 horas a 37°C. Si hay actividad de la
ureasa, desdoblará la urea con producción de amoníaco, y
cambio de color del indicador; el medio se tornará rosado
total o parcialmente.

La Pseudomona s.p. dió (-) esta prueba.

b) Utilización de citrato :

Se inoculó el agar Citrato de simmons, incubar por 24 ho-
ras y observar la Reacción.

La utilización de citrato como fuente única de carbono, en un medio sintético (Simmons), puede ser apreciada cuando el indicador que se añade al medio (azul de bromotimol), recupera su color alcalino (azul prusia) a medida que se oxida el radical citrato. La -
Reacción será positiva si se forma color azul prusia (azul intenso)

La Pseudomona s.p. dio (+) esta prueba.

c) Prueba del Indol

Se inculó el caldo de triptosa o triptona, incubar 48 h, añadir 1 ml de éter o xilol agitar bien y dejar reposar por unos minutos hasta que el solvente suba a la superficie. Suavemente añada aproximadamente 0.5 ml del -
Reactivo de ERLICH, de manera que baje por las paredes del tubo y forme un anillo en la interfase entre el medio de cultivo y el solvente. Cuando el resultado sea positivo se formará un anillo rojo brillante justamente debajo de la capa del solvente.

Si el resultado es negativo no se producirá color.

La Pseudomona s.p. dió negativa esta prueba.

d) Prueba de Voges-PROSKAUER :

Se inculó el medio de R.M.-V.P. (Rojo de Metilo Voges

Proskauer) incubar 48 h, añada 15 gotas de ∞ -Naftol al 5% en alcohol etílico absoluto y 10 gotas de KOH al 40%. La prueba es positiva si se desarrolla color Rojo en 15 a 30 minutos.

Este medio se utiliza para determinar la presencia de acetilmetilcarbinol, a las 48 horas.

La Pseudomona s.p. dió negativa esta prueba.

e) Prueba de Rojo de Metilo.

Se inculó el caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer, durante 24-48 horas, añadir 5 gotas del reactivo.

La prueba es positiva si hay desarrollo de color Rojo, detectando así la formación de Acido. Y el resultado es negativo cuando hay desarrollo de color amarillo.

La Pseudomona s.p. dió negativa esta prueba.

f) Movilidad en Medio Semisólido.

Con el asa recta, se tomó una colonia y se introdujo perpendicularmente, en el medio hasta 2/3 partes del mismo, incubar de 18-24 horas. Las bacterias móviles se difunden a partir del trazo de inoculación a las 18 a 24 horas.

La Pseudomona s.p. dió positiva esta prueba.

g) Prueba de Agar Tres Azúcares y Hierro (T.S.I.)

Con un asa en aguja se tomó una colonia, puncionar primero el medio hasta el fondo y luego estriar el inóculo sobre el bisel, incubar 24 h y Leer.

Este medio se utiliza para determinar la fermentación de dextrosa, Lactosa y/o sucrosa y la producción de sulfuro de hierro.

En el caso de la bacteria no fermenta ninguna azúcar.

(VER RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS EN PAG Nº 33)

2.4 PREPARACION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA

Se efectuaron resiembras cada semana a partir de una cepa pura que ha sido mantenida en refrigeración de 4°C a 5°C en caldo nutritivo. Un día antes de la prueba, inocular la cepa bacteriana por el método de estrías, en placas con medio de cultivo de tripticasa soya agar (T.S.A.), e incubar a 37°C por 24 h.

2.5 DETERMINACION DEL POTENCIAL DE INHIBICION POR EL METODO DE CILINDRO PLACA

a) Suspensión del microorganismo.

A partir del cultivo de Pseudomona s.p. en placas de tripticasa soya Agar (T.S.A.), en su fase exponencial si-

guiendo las técnicas microbiológicas adecuadas de asepsia, se inoculó la bacteria en un tubo conteniendo solución salina estéril 0.9%, agitar hasta formar una suspensión uniforme, luego comparar la turbidez aproximada con el standar Mcfarland 0.5×10^8 ml. (ver pág 50).

b) Inoculación del Microorganismo

Se inoculó el microorganismo de prueba en las placas de Petry que contienen 20 ml de medio de cultivo MUELLER HINTON Agar, por el método de Extendido utilizando para ello isopos estériles impregandos con la suspensión del microorganismo, extendiéndose uniformemente sobre toda la superficie del medio de cultivo; secar los extendidos por diez minutos.

c) Aplicación de los extractos acuosos.

Colocando sobre la superficie del medio, los cilindros de acero inoxidable, equidistante uno del otro, con una separación de 10 m.m. aproximadamente, utilizando seis cilindros por placa, añadiendo dentro del cilindro con mucho cuidado, seis gotas del extracto, con pipeta Pasteur, incubar las placas a 37°C por 24h, se midieron los diáme -

tros de los halos de inhibición con una regla milimétrica.

Todas las pruebas efectuadas se hicieron por triplicado, llevando testigo positivo y testigo negativo.

2.6 FUNDAMENTO DEL METODO.

El Método se basó en la difusión del extracto de Calea urticifolia en solución desde un cilindro vertical sobre una capa de agar solidificado que contiene en la superficie el microorganismo de prueba, presentando un halo de inhibición alrededor del cilindro que contiene la solución del extracto vegetal, cuando esta bacteria es susceptible.

V RESULTADOS

R E S U L T A D O S

1. Al tratar el extracto clorofórmico con la técnica de Clarcks, se obtuvo una resina amarilla transparente. (Mezcla de Sesquiterpenlactonas)
2. En cromatografía en capa fina, la mezcla de sesquiterpenlactonas y los extractos brutos, presentaron algunas manchas similares.
3. En los espectros al I.R. se obtuvieron absorciones a una longitud de onda de $1700-1790\text{ cm}^{-1}$ (ver anexo página (45-49))
4. Los extractos brutos y la mezcla de lactonas sesquiterpénicas (I. Clarcks), presentaron escasa solubilidad en agua; más alusar el propilenglicol, la solubilidad aumentó.
5. Las diluciones efectuadas de los extractos brutos fueron de color verde; mientras que, hechas con la mezcla de sesquiterpenlactonas (T. CLARCKS), se observaron claras.

6. PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA LA IDENTIFICACION DE LA BACTERIA Pseudomonas s.p. *

MICROORGANISMO DE PRUEBA	INDDL	ROJO DE METILO	VOGES-PORSKAUER	UTILIZACION DE CITRATO	UREA	MOVILIDAD	T.S.I.	COLO RACION DE GRAM
<u>Pseudomonas s.p.</u>	-	-	-	+	-	+	N/N	(-)

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

* Dr. WILLIAM BURROWS, tratado de Microbiología, traducido al español por el Dr. Roberto Espinosa Zarza, vigésima edición, editorial interamericana, año 1974.

7. INHIBICION DE Pseudomona s.p. A DIFERENTES CONCENTRACIONES CON LOS EXTRACTOS ENSAYADOS.

CONCENTRACION EN P.P.M.	EXTRACTO CLOROFORMICO	EXTRACTO METANOLICO.	EXTRACTO ETereo	MEZCLA DE SESQUITERPENLACTONAS.
10	+	+	-	+
100	+	+	-	+
500	+	+	-	+
1000	++	++	-	++
5000	++	++	+	++
10,000	+++	+++	++	+++

S I M B O L O G I A :

+++ : Zona de inhibición de 12-14 m.m.

++ : Zona de inhibición de 10-12 m.m.

+ : Zona de inhibición de 8-10 m.m.

- : Ausencia de Zona de inhibición

8. En todas las pruebas realizadas, a las diferentes diluciones, tanto de los extractos brutos, como de la mezcla de Lactonas sesquiterpénicas, (T. CLARKS), se observaron halos de inhibición de crecimiento, a excepción del Extracto etéreo que sólo presentó inhibición a las concentraciones más altas.

VI INTERPRETACION DE RESULTADOS

INTERPRETACION DE RESULTADOS

- 1) En cromatografía en capa fina, se obtienen mejores resultados en la identificación de manchas con la mezcla de sesquiterpen lactonas (T. Clarcks) ya que éstas se encuentran en forma más puras, por lo que se toma como patrón de comparación para las cromatografías realizadas con los extractos brutos.
- 2) En los espectros al I.R. se observaron absorciones de $1700 - 1790 \text{ cm}^{-1}$ que dan indicio de que tenemos Lactonas sesquiterpénicas.
- 3) Se utilizó la Técnica de Clarcks, para eliminar la clorofila a fin de obtener halos traslúcidos, por cuanto en los extractos brutos la clorofila daba lugar a la formación de halos de color café.
- 4) Las respuestas bioquímicas obtenidas nos identificaron y determinaron la pureza de la Pseudomona s.p.
- 5) Para la extracción de los principios activos que ejercen el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de Pseudomona s.p., los mejores resultados se obtuvieron con los extractos metanólico y clorofórmico; mientras que con el etéreo sólo es eficaz en concentraciones altas.

6. Según los resultados obtenidos, el efecto inhibitorio que -
ejercen los extractos de la Calea urticifolia, sobre la
Pseudomona s.p. posiblemente se atribuyen a las Lactonas ses-
quiterpénicas presentes en dicha planta.

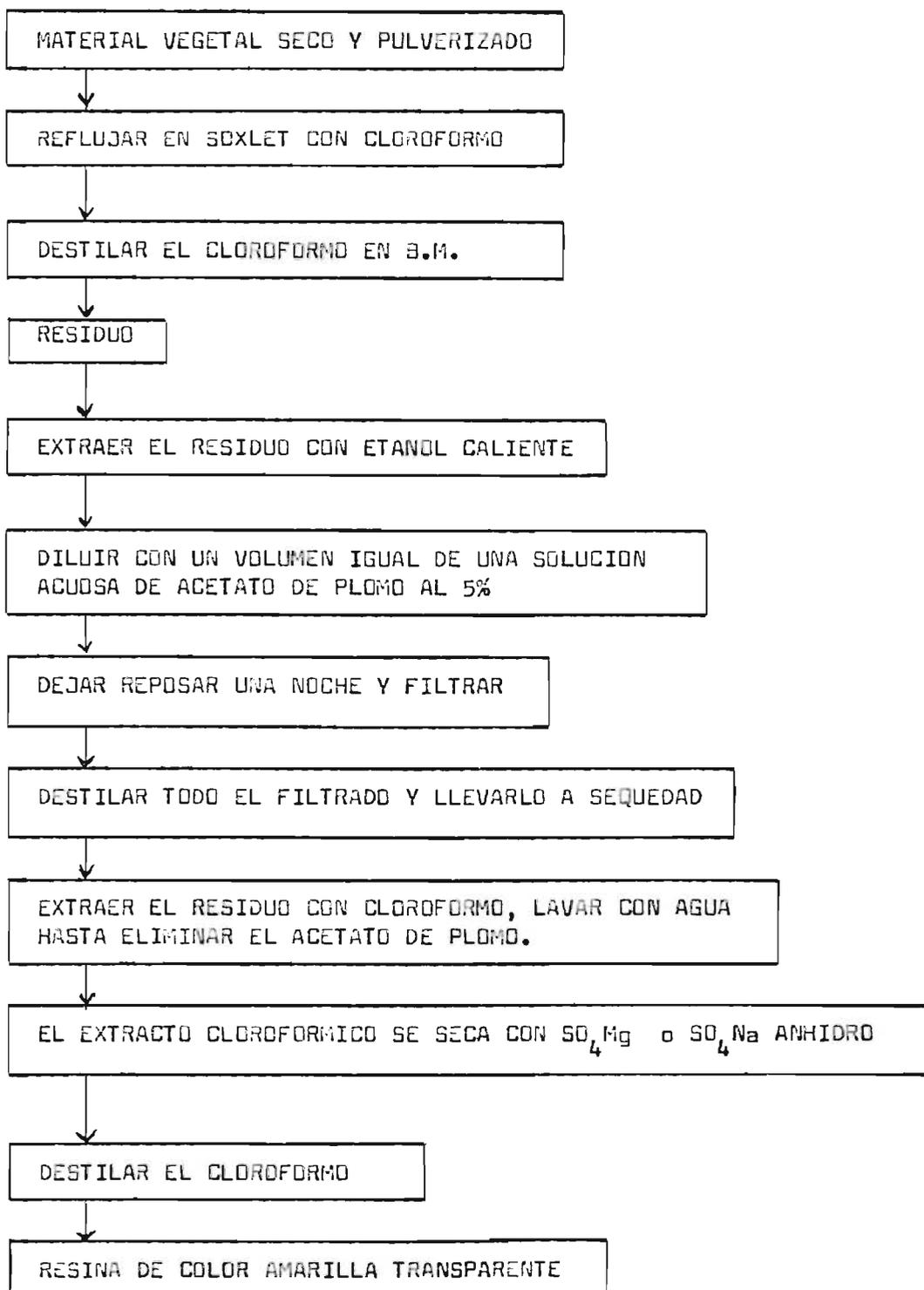
VII CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- 1) Los extractos brutos concentrados, como la mezcla de sesquiterpenlactonas (Técnica de Clarcks), obtenidos de la *Calea urticifolia*, inhibieron el crecimiento de *Pseudomona s.p.*
- 2) En los ensayos de inhibición microbiana con extractos vegetales, se obtuvieron mejores resultados eliminando la clorofila, del extracto por medio de la técnica de Clarcks.
- 3) El método de cilindro placa, fue el más adecuado en las pruebas de inhibición de crecimiento de la *Pseudomona s.p.*, utilizando extractos vegetales de *Calea urticifolia*.
- 4) La concentración más efectiva fue la de 10,000 p.p.m. tanto de los extractos clorofórmicos, metanólicos y mezcla de sesquiterpenlactonas. (T. Clarcks).

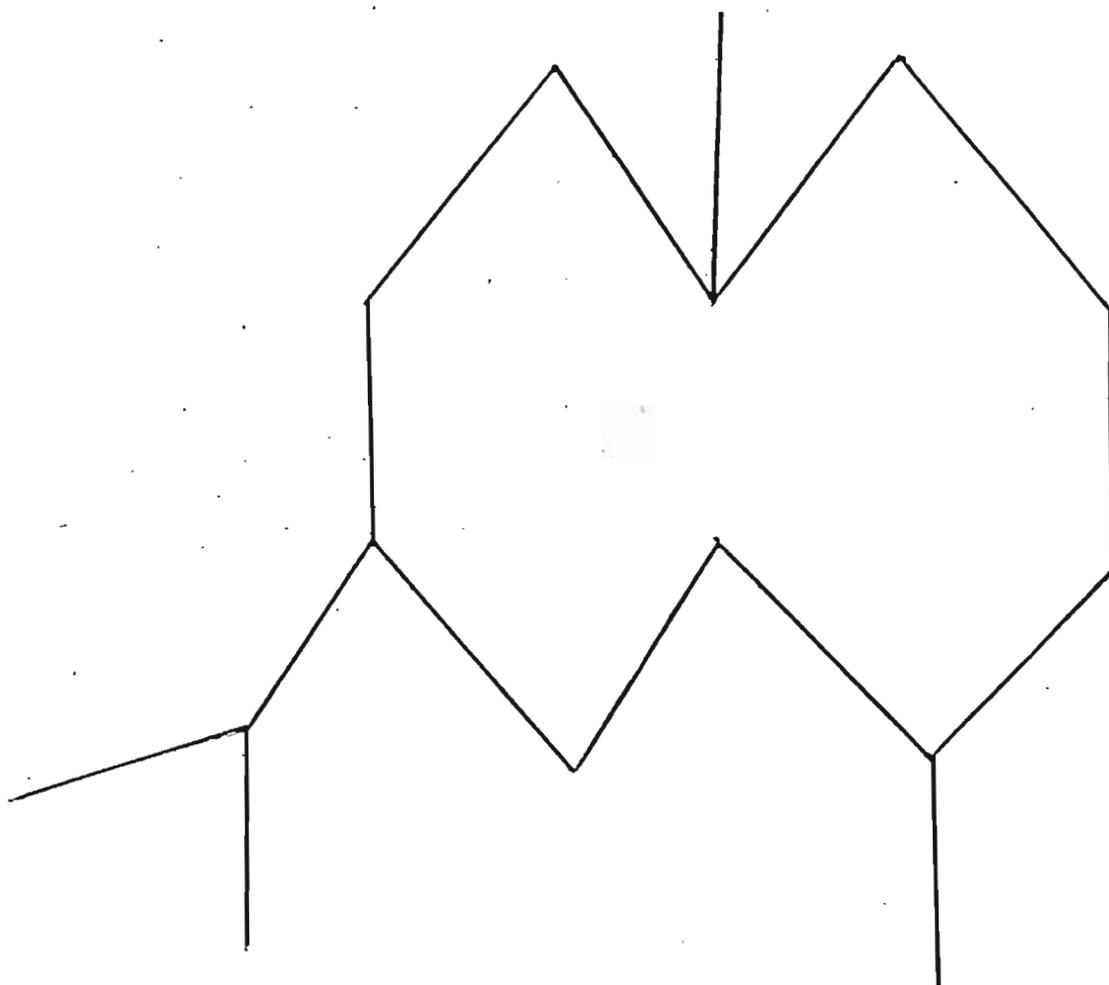
VIII ANEXOS

ANEXO 1 : TECNICA DE CLARCKS



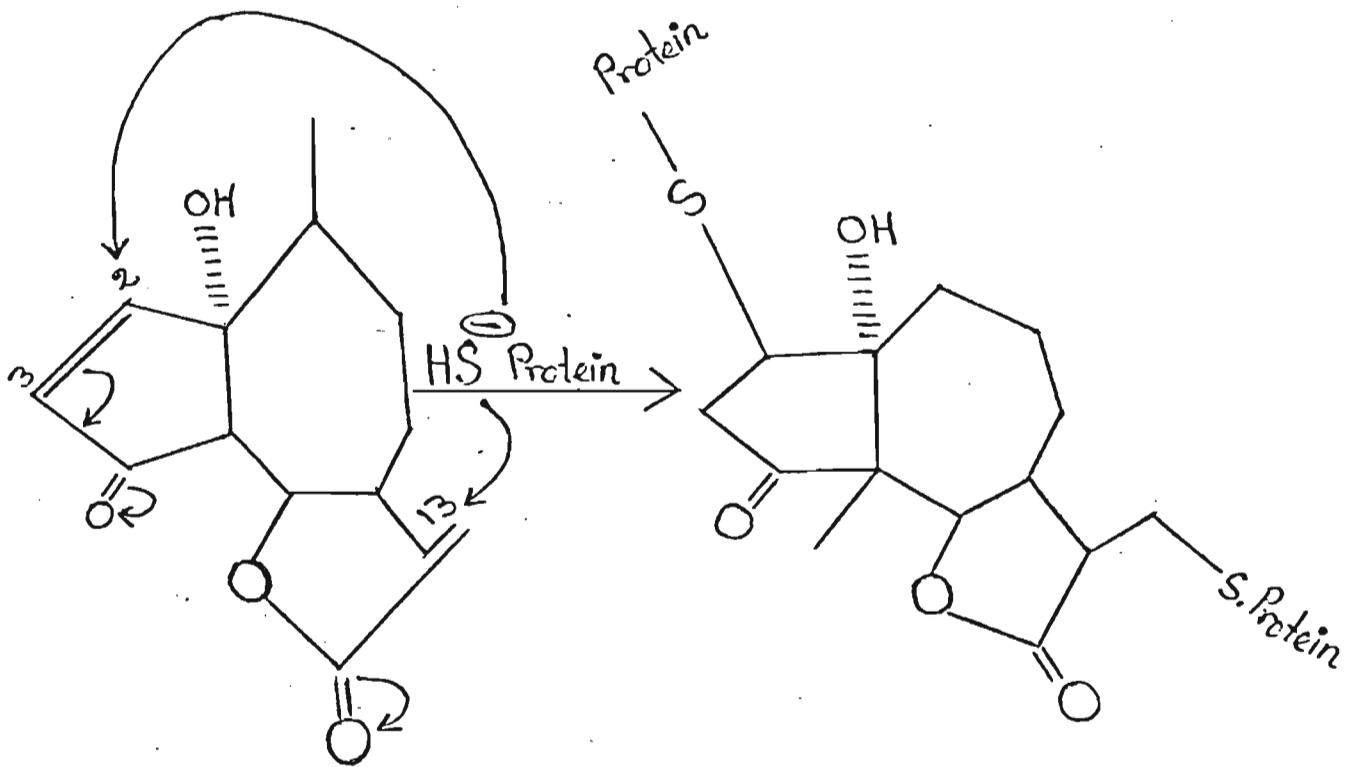
ANEXO Nº 2

ESTRUCTURA DEL GERMACRANO



ANEXO Nº 3

ALQUILACION DE LOS GRUPOS SULFIHIDRILOS



NO. 007-1081

REMARKS

ORIGIN Extremo Juvislana
 PURITY _____
 SPEED _____ NORMAL _____ FAST _____
 SLITS _____ NORMAL _____ WIDE _____
 PHASE Lien
 CONCENTRATION _____
 THICKNESS _____
 DATE 30-7-85
 OPERATOR _____

PERKIN-ELMER

SPECTRUM NO. 1

SAMPLE 1 Extremo beuto
Cloroformico

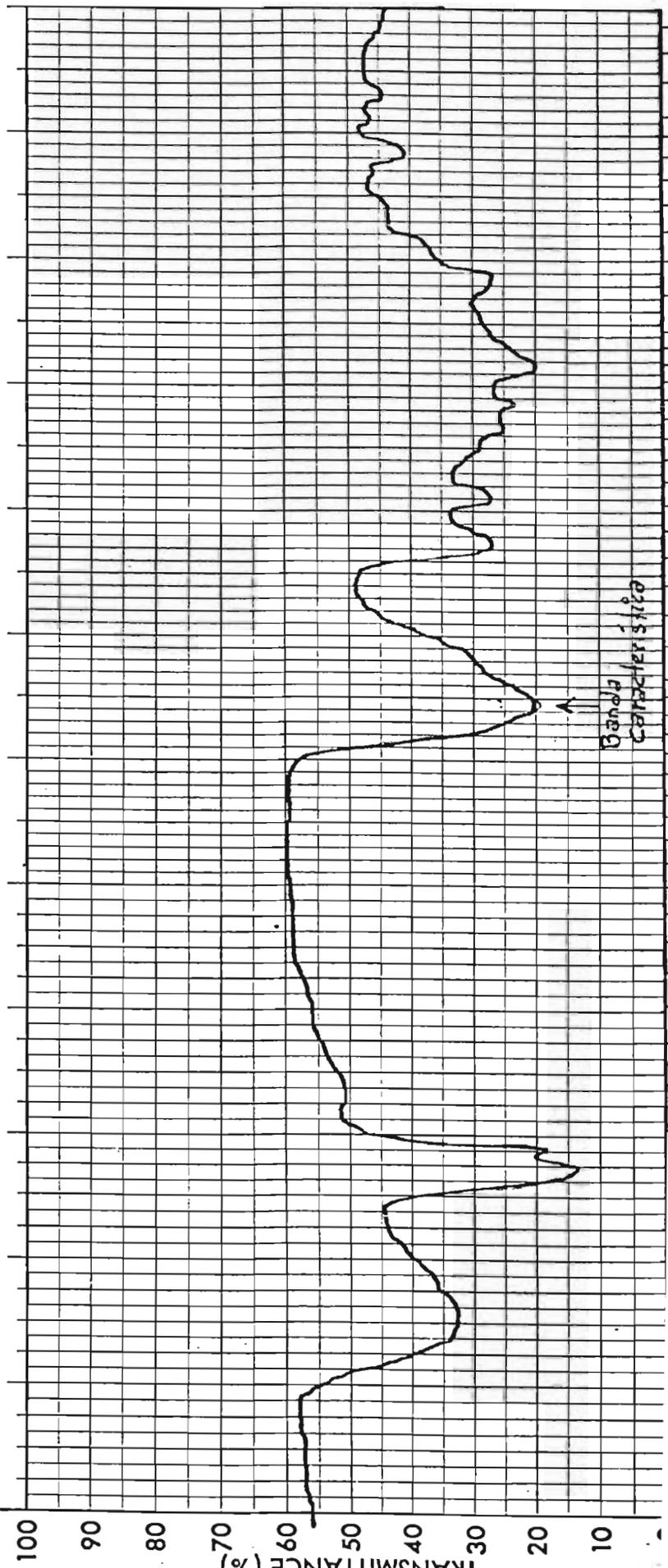
SAMPLE 2 _____

SAMPLE _____

SPECTRUM NO. _____

FREQUENCY (CM⁻¹)

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



ANEXO N° 4

85

PERKIN-ELMER

SPECTRUM NO. 2

SAMPLE 1 6x1000
6'ead

SAMPLE 2 _____

ORIGIN 6x1000 Linnic 1000

PURITY _____

SPEED _____ NORMAL _____ FAST _____

SLITS _____ NORMAL _____ WIDE _____

PHASE film

CONCENTRATION _____

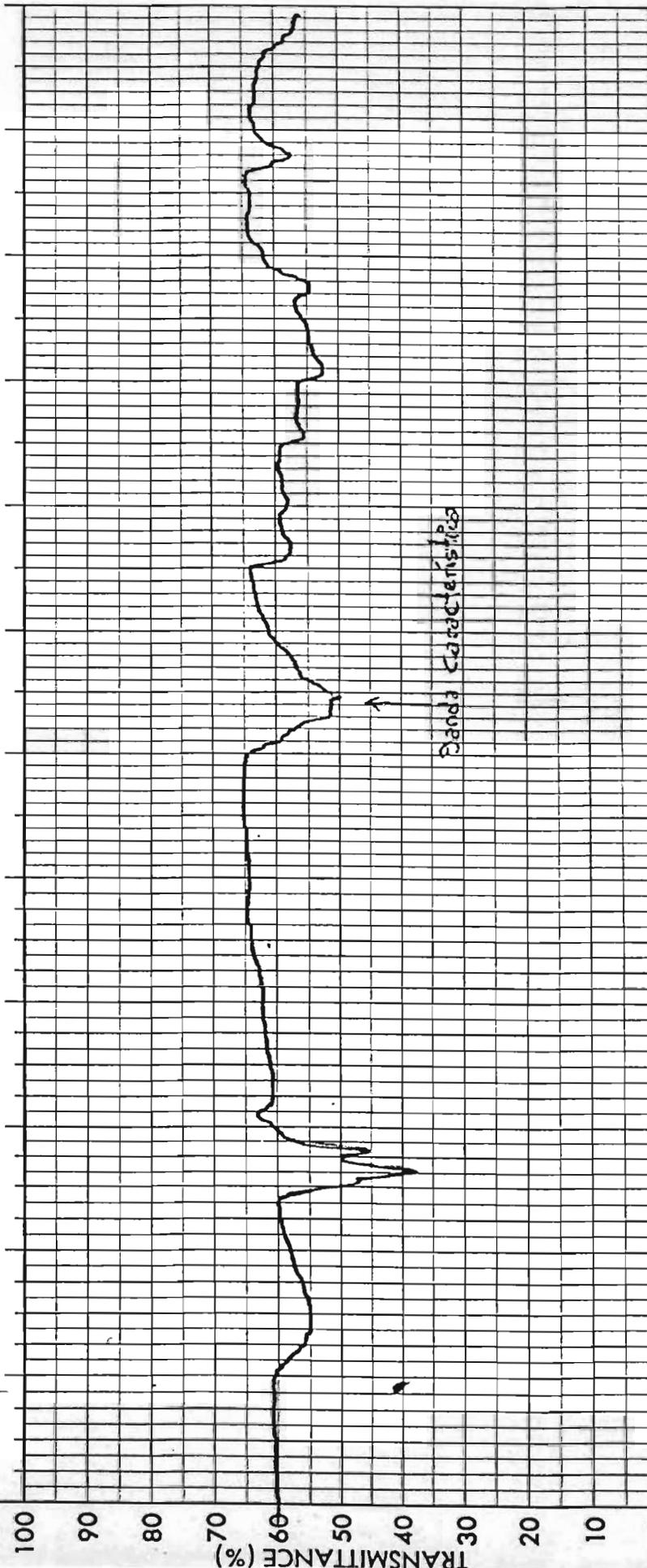
THICKNESS _____

DATE 30-1-85

OPERATOR _____

REMARKS

FREQUENCY (CM⁻¹)



SAMPLE _____

SPECTRUM NO. _____

PERKIN-ELMER

ORIGIN Extrato de Azeite de

PURITY _____

SPEED _____ NORMAL _____ FAST _____

SLITS _____ NORMAL _____ WIDE _____

PHASE _____

CONCENTRATION _____

THICKNESS _____

DATE 30-7-85

OPERATOR _____

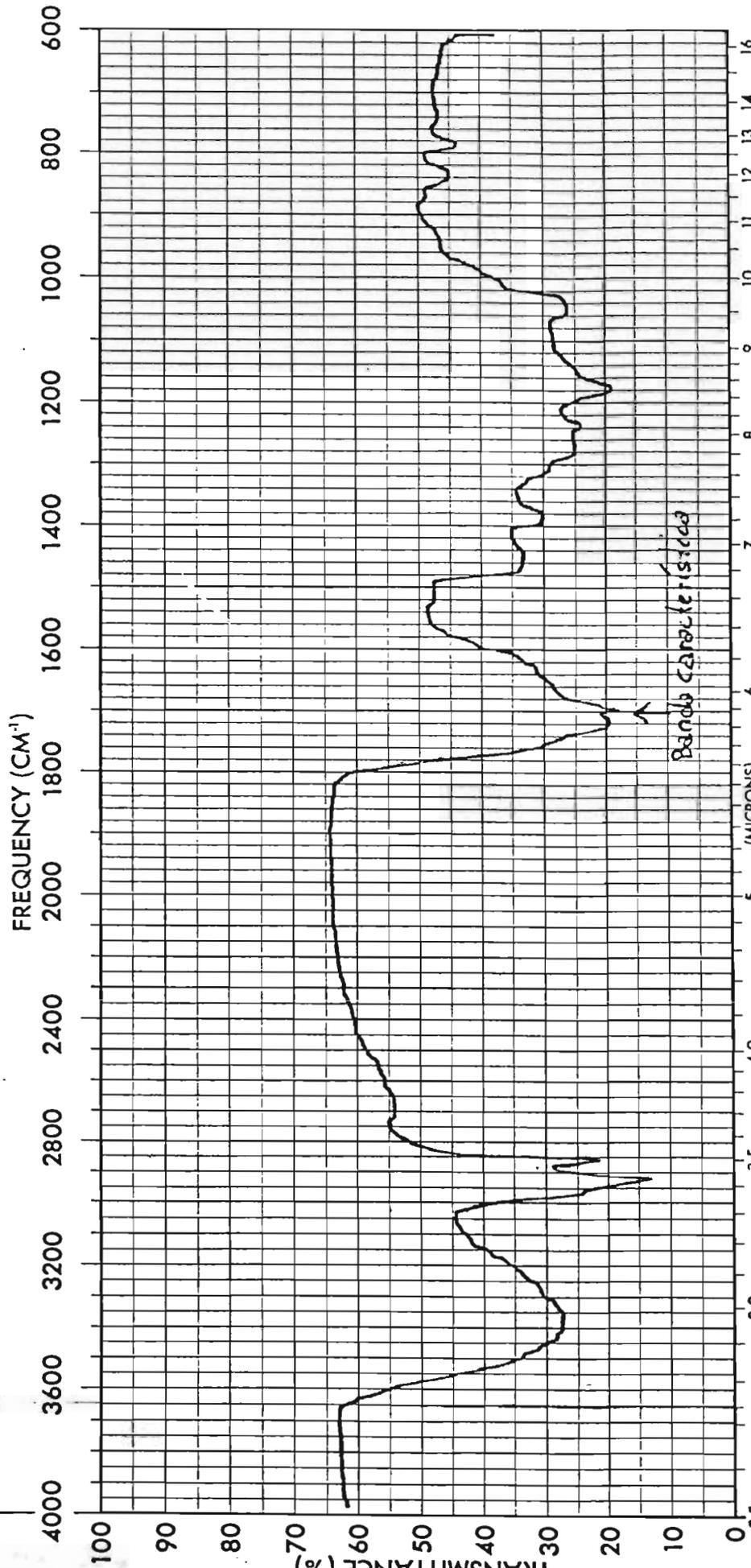
SPECTRUM NO. 3

SAMPLE 1 Extrato

cloroformado

SAMPLE 2 _____

REMARKS _____



NO: 007-1061

SAMPLE _____

SPECTRUM NO. _____

PERKIN-ELMER

SPECTRUM NO. 4

SAMPLE 1 Extrato
Molobida

SAMPLE 2 _____

ORIGIN Extrato de fermentação

PURITY _____

SPEED _____ NORMAL _____ FAST _____

SLITS _____ NORMAL _____ WIDE _____

PHASE _____

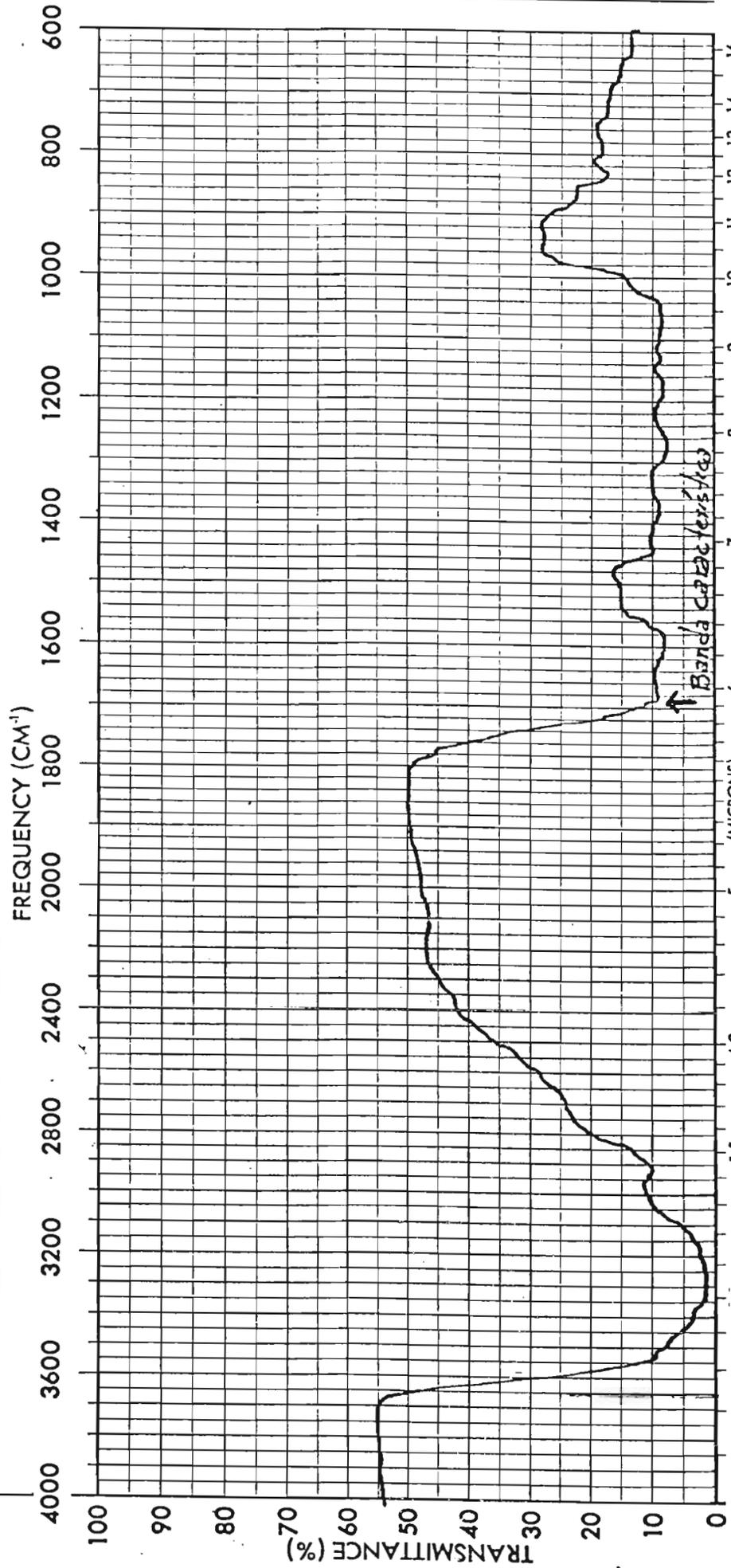
CONCENTRATION _____

THICKNESS _____

DATE 30-7-85

OPERATOR _____

REMARKS _____



NO: 007-1081

SAMPLE

SPECTRUM NO.

REMARKS

ORIGIN _____

PURITY _____

SPEED _____ NORMAL _____ FAST _____

SLITS _____ NORMAL _____ WIDE _____

PHASE _____

CONCENTRATION _____

THICKNESS _____

DATE _____

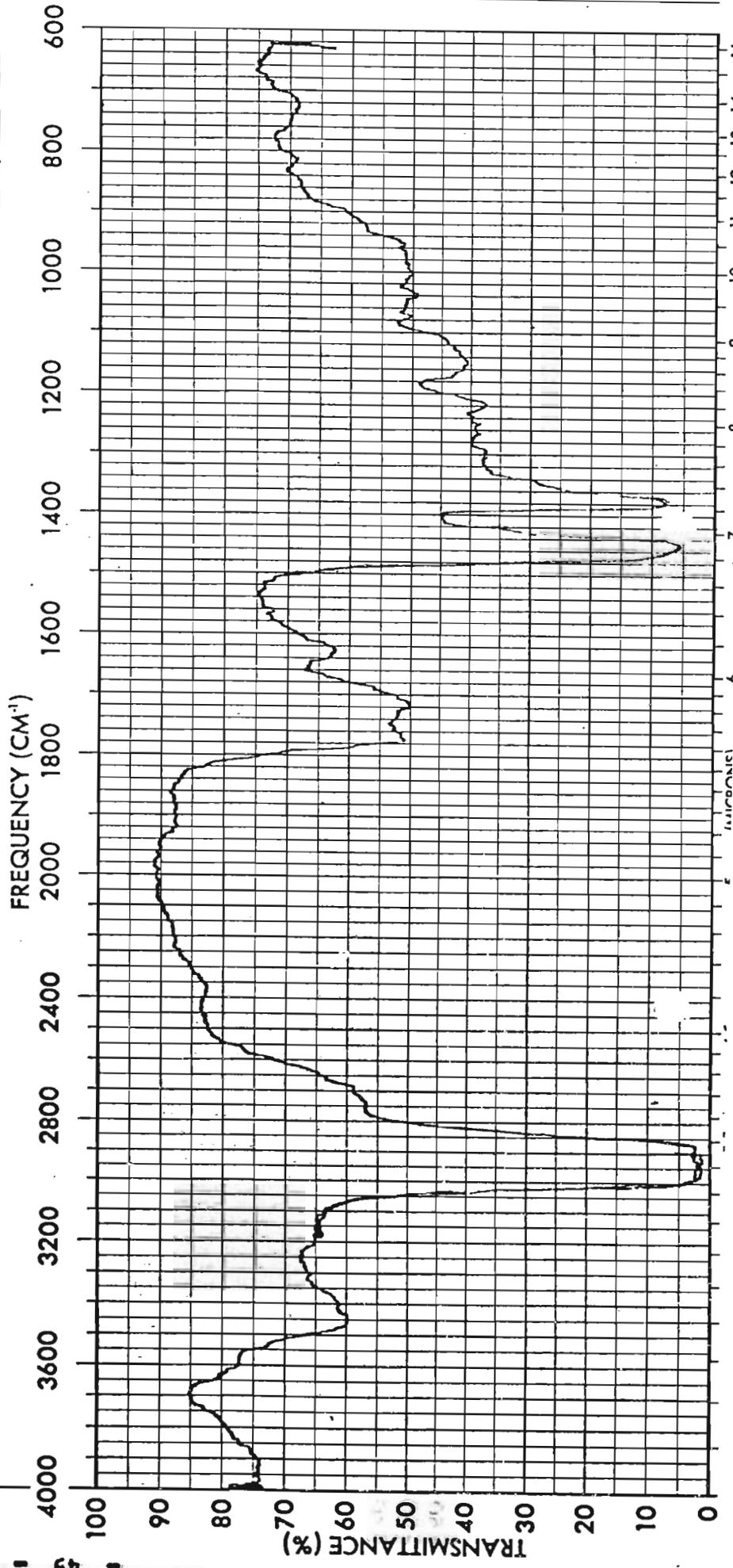
OPERATOR _____

PERKIN-ELMER

SPECTRUM NO. 5

SAMPLE 1 Mezcla de Sesquiterpenoide

SAMPLE 2 _____



ANEXO Nº 5

PREPARACION DE REACTIVOS ESPECIALES

Preparación del Standar MC FARLAND

- a) Preparar 10 tubos de ensayo 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 ver en la tabla.

Número 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
H_2SO_4 1%	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Densidad células Aprox. $\times 10^8$ /ml	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

IX BIBLIOGRAFIA

IX BIBLIOGRAFIA

- 1) Alas Pouzeaud, L.M., Pineda Pineda, M.A, Portillo Hernández A.D., ESTUDIO BACTERIOLOGICO PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE PORTADORES ASINTOMATICOS DEL GENERO SALMONELLA EN PERSONAS QUE HAN PADECIDO FIERES ENTERICAS., Universidad de El Salvador, Facultad de Medicina, mayo 1982.

- 2) By Isao Kubo Yue-wei Lee, Michael Pettei, Frank Pilkewioz, and Koji Nakannishi.
(Depto. of Chemistry, Columbia University, New York, 10027)
POTENT ARMY WORM ANTIFEEDANTS FROM THE EAST
African Warburgia Plants.

- 3) Domínguez Xorge A. METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA,
1a. Ed. Editorial Limusa, México.

- 4) Domínguez Xorge A. REVISTA LATINDAMERICANA DE QUIMICA
Vol. 8/2, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de
Monterrey, Depto de Química.

- 5) Dr. William Burrows, TRATADO DE MICROBIOLOGIA,
Editorial Interamericana 1974, Vigésima edición.

- 6) Genovez Leonor, Armando. ESTUDIO INICIAL DE CUATRO GERMA
CRANOLIDOS DE LA CALEA URTICIFOLIA (Juanislama).
Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia
Año 1980

- 7) JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS (Lloydia) Published by the
American Society of Pharmacognosy and the Lloyd Library
and Museum. Mar-Apr. 1984. Vol. 47, Number 2 Pág. 365.

- 8) JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS (Lloydia) Published by
The American Society of Pharmacognosy and the Lloyd
Library and Museum. Mar-Apr. 1983, Vol. 46, number 2
Pág. 218 a 222.

- 9) JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY
Chemical communications
1976
The chemical society, Burlington house. London WLVOBN

- 10) Koji Nakanishi, NATURAL PRODUCTS CHEMISTRY,
Kodansha L.T.D., Academic Press, Inc. New York,
and London, Vol. 1, año 1974.

- 11) Lagos, Jorge Adalberto. COMPENDIO DE BOTANICA SISTEMATICA.
Segunda edición, año 1983.

- 12) MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA, Ernest Jaweltz, Joseph L.
Melnick, Edward A. Adelberg, 6a. Ed. Pág. 245.

- 13) Morrison Robert Thornton and Boyd Robert Neilson
QUIMICA ORGANICA, Edit. Fondo Educativo Interamericano
México - Bogotá - Caracas - Santiago - San Juan - Panamá
Año 1976.

- 14) QUIMICA ORGANICA, G. P. Ellis, Edit. Limusa, Wiley S.A.
México 1973, Pág. 98

15) REVISTA LATINOAMERICANA DE QUIMICA, Vol. 10/4, Organo Oficial de la Federación Latinoamericana de Química al Servicio de América Latina. Capítulo I.

16) REVISTA LATINOAMERICANA DE QUIMICA, Vol. 8/2
Organo Oficial de la Federación Latinoamericana de
Química al Servicio de América Latina.

Consejo Editorial Presidente Dr. Jesús Romo.

U.N.A.M.

Instituto de Química, Ciudad Universitaria, México 20 D.F.

17) VIII SEMINARIO LATINOAMERICANO DE QUIMICA

(VIII SELAQ)

Química y Bioquímica de los Productos Naturales

Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico

Depto de Asuntos Científicos

Organización de los Estados Americanos (OEA)

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Depto de Química Orgánica

Buenos Aires - Argentina

19 - 23 noviembre 1979, Pág. 129

18) W. Robert Balley, DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO

2a. edición, año 1966 .