

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

“Investigación del Posible Efecto Inhibitorio de Alvaradoa Amorphoides Lieb. en Pseudomonas sp. y Staphylococcus Aureus.”

TRABAJO DE GRADUACION

PRESENTADO POR

Carlos Alfonso Flores Lima

Aída Mejía Marroquín

PARA OPTAR AL TITULO DE

Licenciado en Química y Farmacia

DICIEMBRE DE 1986



SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

T
615.42
= 6342

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

R E C T O R

DR. LUIS ARGUETA ANTILLON

SECRETARIO GENERAL

ING. RENE MAURICIO MEJIA MENDEZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

D E C A N O

DRA. GRACIELA CHACON GOMEZ

SECRETARIO

DRA. AMINTA ACEITUNO DE KAFIE

A S E S O R E S

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

LIC. RHINA ANTONIETA TOLEDO MENDOZA

JURADO EXAMINADOR

DRA. MERCEDES RAMOS VELASQUEZ

LIC. ANA ARELY CACERES MAGAÑA

LIC. MARIA HERMINIA HERNANDEZ DE LUNA

L U G A R D E P R A C T I C A

LABORATORIO DE INVESTIGACION APLICADA Y TESIS PROFESIONALES
DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE EL
SALVADOR.

ESTE TRABAJO SE HA REALIZADO DENTRO DEL PROYECTO

DE INVESTIGACION EN LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DE OBTENCION Y APROVECHAMIENTO DE EXTRACTOS VEGETALES DE LA FLORA SAL-
VADOREÑA.

QUE SE LLEVA A CABO EN LA FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA, EN COLABO-
RACION CON LA ORGANIZACION DE ESTADOS AMERICANOS. (O.E.A.)

D E D I C A T O R I A

- A DIOS TODOPODEROSO : Por permitirme ser el Arquitecto de mi pro
pio destino.
- A NUESTRA ALMA MATER :
- A MIS PADRES : CARLOS FLORES MDLINA
AMELIA LIMA DE FLORES
Con Profundo Agradecimiento.
- A MIS HIJOS : JENNIFFER LINETT
LESLIE CAROLINA
CARLOS FRANCISCO
Con todo Amor
- A LA MADRE DE MIS HIJOS : ELSY YANIRA
Con gratitud
- A MIS HERMANOS : ESTELA
Con Amor Fraternal
FABIO Y FRANCISCO
En Memoria

DEDICATORIA

A NUESTRA MADRE NATURALEZA, CREADORA DE TODAS LAS ESPECIES.

A NUESTRA ABNEGADA ALMA MATER, QUE NO OBSTANTE LAS ADVERSIDADES, SE RESISTE A MORIR.

A MI PADRE : RODOLFO MARROQUIN

A quien tuve siempre presente.

A MI MADRE : DOMINGA MEJIA

Que con su amor, dedicación y esfuerzo me ayudó a realizar mis objetivos.

A MI HERMANO : EDMUNDO MARROQUIN

Quien me brindó apoyo espiritual y material en los momentos más difíciles de mis estudios.

A MIS PROFESORES: Quienes uno a uno colaboraron en sus diferentes especialidades para darme formación profesional.

A MIS COMPAÑEROS DE ESTUDIO Y DE TRABAJO.

Reciban todos, mis más sinceros reconocimientos.

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

A LA LICENCIADA RHINA ANTONIETA TOLEDO MENDOZA

AL LICENCIADO SLAVADOR CASTILLO AREVALO

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

A LA DOCTORA ROSA MARIA PORTILLO DE RIVAS (JEFE DEL DEPARTAMENTO DE -
FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA)

Por su valiosa colaboración.

A LA LICENCIADA DELMY HERCULES MORATAYA

AL PROFESOR JORGE ADALBERTO LAGOS

Por su desinteresada colaboración.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR

Por la revisión y Evaluación del Trabajo.

A LOS SEÑORES LABORATORISTAS

Br. Carlos Raúl Rodríguez y

Oscar Gerardo Coreas

A NUESTROS PROFESORES, COMPAÑEROS 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
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	3
MATERIALES Y METODOS	6
- Materiales y Equipo	7
- Metodología de Campo	10
- Metodología de Laboratorio.....	10
RESULTADOS	18
DISCUSION	24
CONCLUSIONES	28
ANEXOS	30
BIBLIOGRAFIA	37

R E S U M E N

Se recolectaron ramas de Alvaradoa amorphoides (Cola de Zorro o Plumajillo), las cuales se secaron y molieron.

Se hicieron extracciones etanólicas de la muestra y se concentraron para obtener el extracto bruto. Con una porción de este extracto se montaron dos columnas cromatográficas y se aislaron de cada una de ellas, tanto la Alvaradona como la Umbeliferona.

Se realizaron evaluaciones antibacterianas, aplicando el método-Cilindro-Placa, con el extracto bruto y con cada una de las sustancias aisladas a diluciones de 1000 ppm., 5000 ppm y 10000 ppm, utilizando como cepas de ensayo la Pseudomona sp. y el Staphylococcus aureus.

Se observó que el crecimiento del Staphylococcus aureus fue inhibido por el extracto bruto y por la Alvaradona, pero no por la Umbeliferona.

La Pseudomona sp., no presentó ninguna susceptibilidad al extracto bruto, a la Alvaradona, ni a la Umbeliferona.

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

En los últimos años, el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos ha sido producto de numerosas investigaciones y, aunque muchos de estos agentes pueden sintetizarse en el laboratorio de Investigación Farmacéutica, constantemente se están buscando nuevas sustancias inhibitorias de origen natural.

Para contribuir a la búsqueda de nuevos compuestos para combatir las diversas infecciones que sufre el hombre, siendo mayor el problema en los hospitales debido a la resistencia de algunas bacterias, tales como *Pseudomona* sp., a los antibacterianos, se seleccionó la especie Alvaradoa amorphoides Lieb., de la familia Simarubáceas, conocida comúnmente como Cola de Zorro o Plumajillo por poseer entre sus componentes sustancias con propiedades inhibitorias.

Este estudio tiene como objetivo investigar el posible efecto antibacteriano in-vitro, del extracto bruto de Alvarados amorphoides, así mismo, de sus componentes aislados; la Alvaradona y la Umbeliferona sobre *Pseudomona* sp y Staphylococcus aureus.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

En el estudio fitoquímico de la especie Alvaradoa amorphoides, se reporta el aislamiento de diversas sustancias, entre ellas, la Alvaradona (1,5-dihidroxi-2-metil-antraquinona) (anexo 2a) y la Umbeliferona (7-hidroxicumarina) (anexo 3a.) (30)

La Alvaradona es un compuesto nuevo, aislado e identificado en el laboratorio de Investigación Aplicada y Tesis Profesionales de la Universidad de El Salvador; por tanto, se carece de referencias bibliográficas sobre ella ; esto motivó a que se investigaran las propiedades características de compuestos con estructura similar; es decir, de las Quinonas, encontrando la siguiente información :

- Algunos derivados de la Antraquinona, como la Emodina, inhiben el crecimiento del Staphylococcus aureus mediante un bloqueo de la respiración celular. (10)
- La Acción bactericida de la Quinona es superior a la del Fenol y Timol; su potencia germicida se debe a que actúa químicamente sobre algunos constituyentes de las proteínas esenciales para las bacterias o sobre algunos de los aminoácidos constituyentes de éstas. (12, 13)
- La p-quinona es de 80 - 190 veces tan eficaz en la destrucción del B.typhosus como el Fenol y el Quinol. A diferencia de los fenoles,

álcalis y aminas, la potencia bactericida de las quinonas disminuye con el aumento de la serie homóloga. (25)

- Las quinonas, las hidroquinonas y sus análogos nitrogenados, tienen fuerte acción bacteriostática sobre microorganismos Grampositivos como el Staphylococcus aureus y el Bacillus subtilis; además, son activas contra microorganismos Gramnegativos como la Escherichia coli y el Aerobacter aerogenes. (31).
- La Fenantraquinona, inhibe el crecimiento del Staphylococcus aureus a una concentración de 1,200000. (3)
- Se ha postulado que en las quinonas, se requiere la presencia simultánea de un grupo Me y 1 ó 2 grupos OH para que ejerzan un fuerte efecto inhibitorio sobre las bacterias. (22)

Con respecto a la Umbeliferona, se encontró la siguiente información sobre su actividad antibacteriana :

- Presenta actividad tuberculostática a una concentración de $5-10 \times 10^4$. (5)
- De las lactonas insaturadas, la Umbeliferona es la más simple y la más específica in-vitro contra la Brucella a concentración de 1:2500. (27)

DESCRIPCION BOTANICA

Nombre Científico <u>Alvaradoa amorphoides</u> Lieb.
Familia. Simarubáceas
Nombres Comunes. Cola de Zorro o Plumajillo.

El Plumajillo es un árbol mediano, de aproximadamente 15 mts de altura, común en bosques caducifolios; hojas alternas, imparipinnadas de 20 a 30 cm de largo; flores unisexuales distribuidas en diferentes plantas (dioicas); las inflorescencias masculinas son de 20 cm de largo y las femeninas de 13 cm de largo; el fruto es una sámara angosta de 1 a 1.5 cm de largo y 3 mm de ancho, de color café al madurar y cubierta de pelos blancos. (33)

MATERIALES Y EQUIPO

MATERIALES

- 1- Especie Vegetal : Alvaradoa amorphoides Lieb.
- 2- Microorganismos de prueba :
 - Pseudomonas aeruginosa (ATCC) Nº 9027
 - Pseudomonas sp. (recolectada en Hospital)
 - Staphylococcus aureus (ATCC) Nº 6538
 - Staphylococcus aureus (recolectado en Hospital)
- 3- Medios de Cultivo
 - Agar 110
 - Agar Cistina Tripticasa (CTA)
 - Agar Citrato de Simmons
 - Agar Movilidad
 - Agar Mueller-Hinton
 - Agar Tripticasa y Soya (TSA)
 - Agar Tres Azúcares y Hierro (TSI)
 - Agar con Sal y Manitol
 - Caldo Nutritivo
 - Caldo Rojo de Metilo (Voges-Proskauer)
 - Caldo Triptófano
 - Caldo Urea

- Caso Agar
- Solución salina estéril.

4- Reactivos y Disolventes

- Acetona C.R.
- Acido Acético Glacial
- Acido Sulfúrico al 1%
- Agua destilada estéril
- Alcohol etílico
- Amoníaco T.S.
- Benceno C.R.
- Cloruro de Bario al 1%
- Cristal Violet
- Hidróxido de sodio 0.1
- Lugol
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Plasma Humano
- Propilenglicol
- Safranina
- Sílica-gel Cromatográfica GF₂₅₄
- Sílica-gel 60 para cromatografía de columna
- Standares McFarland (15×10^8 microorg/ml)

5- Cristalería

- Material de vidrio utilizado rutinariamente en el labora

torio de Farmacognosia.

- Material de vidrio útil en el laboratorio de Microbiología.

6- Otros

- Espátulas
- Mallas de Asbesto
- Microespátulas
- Mecheros
- Regla milimetrada
- Trípodes

E Q U I P O

- Autoclave
- Balanza Analítica
- Balanza Granataria
- Baño de María 80 °C
- Cilindros de Acero Inoxidable
- Estufa °C
- Evaporador Flash
- Incubadoras
- Lámpara Ultravioleta
- Mantas de Calentamiento

- Microscopio compuesto
- Placas cromatográficas
- Refrigerador
- Termostato Superior

M E T O D O S

La metodología, se efectuó en dos etapas:

- a) De campo
- b) De Laboratorio

A) METODOLOGIA DE CAMPO.

La recolección de la planta, se efectuó en la zona occidental de El Salvador, Departamento de Santa Ana, en los meses de mayo - junio de 1985.

La muestra fresca, constituida por partes leñosas del árbol incluyendo la corteza, fue secada y molida.

B) METODOLOGIA DE LABORATORIO.

La metodología de laboratorio, se efectuó de la siguiente manera:

- a) Extracción con etanol, por medio de reflujo, de la muestra seca y molida.

b- Separación de los compuestos por cromatografía de columna.

c- Identificación y separación de las fracciones obtenidas.

d- Ensayos microbiológicos.

a- Extracción con etanol por medio de reflujo, de la muestra seca y molida.

Se refluja con etanol, durante cuatro días consecutivos, 3.5 kg del material seco y molido, hasta agotar la muestra.

Los extractos alcohólicos, se concentraron por destilación simple.

Una parte del concentrado se llevó a sequedad en baño de vapor y luego se pulverizó (extracto bruto); la otra parte, se concentró a presión reducida, obteniendo 75 g de extracto.

b- Separación de los compuestos por Cromatografía de Columna.

Con el extracto concentrado a presión reducida, se montaron dos columnas cromatográficas que se denominaron Columna G y P (Anexo NR I), las cuales se eluyeron con benceno, benceno-acetona en las proporciones 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5 y acetona; se recolectaron fracciones de 250 ml cada una y se concentraron.

c- Identificación y Separación de las fracciones obtenidas.

A cada una de las fracciones eluidas y concentradas, se les efectuaron cromatografía de capa fina, llevando un patrón de comparación de la Alvaradona (*); después de observarlas bajo luz visible y luz ultravioleta, se unieron las fracciones 4-39 y 49-54 de la columna G, así como las fracciones 4-20 y 23-27 de la columna P, ya que presentaban características similares de coloración y R_f ; además, eran los compuestos de nuestro interés.

Al evaporar el disolvente, se obtuvieron cristales que fueron identificados por medio de las pruebas específicas para antraquinonas (17) : Borntrager y Borntrager modificada. La Umbeliferona se identificó por la fluorescencia mostrada bajo luz ultravioleta. (Anexo 3-b)

Posterior a su identificación, la Alvaradona fue separada por Cromatografía en Capa Gruesa, utilizando como fase móvil benceno : acetona (9.5 : 0.5) ; finalmente, se recristalizó con benceno.

d- Ensayos Microbiológicos.

1- Reclasificación e identificación de los microorganismos.

Durante el desarrollo de las pruebas de susceptibilidad antibacteriana, se utilizaron los siguientes microorganismos de-

* Proporcionado en el Laboratorio de Investigación Aplicada y Tesis - Profesionales de la Universidad de El Salvador por la Lic. Rhina Antonieta Toledo. (Anexo 2-b)

prueba :

- Pseudomonas aeruginosa ATCC Nº 9027 (Colección Americana de Cultivos Tipos).
- Staphylococcus aureus ATCC Nº 6538
- Bacterias aisladas de ambientes hospitalarios (*). Se efectuó una reclasificación de especies a partir de las cepas de ambiente hospitalario, utilizando Agar Cetrimide para las Pseudomonas sp y Agar 110 para el Staphylococcus aureus. Finalmente, las cepas se identificaron con la tinción de Gram y las siguientes pruebas :

1.1 Pruebas Bioquímicas para Pseudomonas sp. :

- Desdoblamiento de Urea.
- Movilidad en Medio Semisólido.
- Prueba en Agar Tres Azúcares y Hierro (TSI).
- Prueba del Indol.
- Prueba del Rojo de Metilo.
- Prueba de Voges-Proskauer.
- Utilización del Citrato.

1.2 Pruebas Bioquímicas para el Staphylococcus aureus.

- Fermentación del Manitol.
- Movilidad en Medio Semisólido.

* Cepas de Pseudomonas sp. y de Staphylococcus aureus, recolectadas en el Hospital Bloom y el Hospital Rosales, de San Salvador, respectivamente.

- Reacción de la Catalasa.
- Reacción de la Coagulasa.

Para conservar las cepas, se hicieron resiembras semanales en tubos conteniendo Agar Cistina y Tripticasa (CTA), y se mantenían en refrigeración a 5 °C.

2- Determinación del Potencial de Inhibición.

Para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a una sustancia antibacteriana 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 (26). Alternativamente, el agente antibacteriano puede colocarse en cilindros de vidrio, porcelana o acero inoxidable sobre la superficie del medio, en lugar de los discos de papel absorbente (Método Cilindro-placa) (11). Este último método, fue considerado de elección para el desarrollo del presente estudio.

METODO 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) solidificada, que contiene en la superficie el microorganismo de prueba; de tal manera, que si es susceptible, se forma un ha

lo de inhibición alrededor del cilindro.

El desarrollo secuencial de este método, fue el siguiente :

- a) 24 horas antes de realizar las pruebas de susceptibilidad, se resembraron las cepas mantenidas en refrigeración, por el método de estrías en placas conteniendo TSA y se incubaron a 37 °C.
- b) Preparación de las diluciones.

Se realizaron pruebas de solubilidad de la Alvaradona, de la Umbe liferona y del extracto bruto en varios disolventes :

- Aceite mineral
- Aceite de oliva
- Aceite de ricino
- Acetona
- Acetona-agua
- Alcohol
- Propilenglicol - agua
- Tween 60- agua.

Finalmente, se prepararon diluciones a 1000 ppm., 5000 ppm., y 10000 ppm en propilenglicol-agua y en alcohol.

- c) Suspensión de los microorganismos.

A partir de los cultivos puros de 24 horas, contenidos en placas con Tripticase Soya Agar (TSA), se seleccionaron 4 ó 5 colonias bien aisladas, y se transfirieron a tubos que contenían de 4 a 5

ml de Caldo Nutritivo. Los tubos inoculados, se incubaron durante 2-5 horas para producir suspensiones de los microorganismos, con una turbidez visualmente comparable a la del estandar McFarland (Anexo 4), preparado por la adición de 0.5 ml de Cloruro de bario al 1% a 9.5 ml de ácido sulfúrico al 1% (Correspondiente a 15×10^8 bacterias/ml).

d) Inoculación de las Placas.

Por el método del extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalente a 15×10^8 bacterias/ml se inoculó uniformemente la superficie del medio - Agar Mueller-Hinton; dejando secar los extendidos durante 10 minutos a temperatura ambiente, en condiciones estériles.

e) Aplicación de las Soluciones Acuosas y/o Alcohólicas de la Alvaradona, de la Umbeliferona y del Extracto Bruto.

Se colocó sobre la superficie del medio inoculado seis cilindros - de acero inoxidable, equidistantes uno del otro (a 2.8 cm de radio con respecto al diámetro de las placas y a una distancia de 60° entre un cilindro y otro); luego, con una pipeta Pasteur se añadió cuidadosamente dentro de cada cilindro, seis gotas de la dilución en prueba y se incubaron a 27°C por 24 horas.

Los diámetros de inhibición, si los había, se medían con regla milimetrada y los resultados se interpretaban de acuerdo al tamaño - del halo como "susceptible", (un halo mayor de 10 mm), "moderadamente

te resistente" (un halo de 9-10 mm) o "resistencia" (halos de 8 mm) del microorganismo a las muestras en prueba.

Las pruebas se hicieron por triplicado, llevando un testigo positivo (constituido por el medio de cultivo con el crecimiento del microorganismo de prueba) y un testigo negativo (medio de cultivo con aplicación de las soluciones). Cuando se utilizó alcohol como diluyente, además de los testigos antes mencionados, se agregó otro que contenía en los cilindros únicamente alcohol, en presencia del microorganismo inoculado en las placas.

En la preparación y el desarrollo de las pruebas de susceptibilidad antibacteriana, se utilizó material y diluyentes estériles, guardando las precauciones asépticas necesarias.

R E S U L T A D O S

C U A D R O 1

De una porción del extracto bruto, se aislaron, por cromatografía en columna, la Alvaradona y la Umbeliferona, de acuerdo con las fracciones dadas en el siguiente cuadro :

COMPUESTO	Columna G (Fracciones eluidas)	Columna P (Fracciones eluidas)
ALVARADONA	4 - 39	4 - 20
UMBELIFERONA	49 - 54	23 - 27

CUADRO 2

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA IDENTIFICACION DE LAS *Pseudomonas* sp. (6)

Microorganismo de Prueba.	Colo ra ción	BIOQUIMICAS						
	Gram	TSI	Movili dad	Urea	Citra to	Voges Pros- kauer	Rojo de Metilo	Indol
<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> (ATCC) Nº 9027	Negativo	N/N	+	-	+	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp (Recolectada en Hospital)	Negativo	N/N	+	-	+	-	-	-

CUADRO 3

RESULTADOS OBTENIDOS EN LA IDENTIFICACION DE Staphylococcus aureus

Microorganismo de Prueba	Coloración.	BIOQUIMICAS			
	Gram	Catalasa	Coagulasa	Fermentación del Manitol	Movilidad
<u>Staphylococcus aureus</u> (ATCC) Nº 6538	Positivo	+	+	+	-
<u>Staphylococcus aureus</u> (Recolectada en Hospital.	Positivo	+	+	+	-

CUADRO 4

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

PARA *Pseudomonas* sp y *Pseudomona aeruginosa* (ATCC) Nº 9527

M E T O D O C I L I N D R O P L A C A

Concentra- ción (ppm)	Antraquinona. Solvente Propilenglicol : agua.	Antraquinona. Solvente Alcohol etilico.	Extracto bruto. Solvente Propilenglicol : agua.	Extracto bruto. Solvente Alcohol etilico.	Umbeliferona. Solvente Propilenglicol : agua.	Umbeliferona. Solvente Alcohol etilico.
1000	-	-	-	-	-	-
5000	-	-	-	-	-	-
10000	-	-	-	-	-	-

S I M B O L O G I A :

(-) : Ausencia de zona de inhibición.

C U A D R O 5

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PA
RA Staphylococcus aureus (ATCC) Nº 6538 y Staphylococcus aureus (reco-
 lectado en hospital)

METODO CILINDRO PLACA

Concentra ción (ppm)	Antraquinona Solvente Propilenglicol : agua.	Antraquinona Solvente Alcohol etilico.	Extracto bruto Solvente Propilenglicol : agua.	Extracto bruto Solvente Alcohol etilico	Umbeliferona Solvente Propilenglicol : agua	Umbeliferona Solvente Alcohol etilico
10000	8 - 10 mm	8 - 10 mm	8 - 10 mm	8 - 10 mm	-	-
5000	10 - 12 mm	10 - 12 mm	8 - 10 mm	8 - 10 mm	-	-
100000	12 - 14 mm	12 - 14 mm	10 - 12 mm	10 - 12 mm	-	-

D I S C U S I O N

La muestra pulverizada, obtenida a partir de los extractos alcohólicos de Alvaradoa amorphoides, presentaba color café y era de consistencia homogénea no untuosa al tacto.

La Alvaradona, al purificarla por Cromatografía en Capa Gruesa y -recristalizarla en benceno, se obtuvo en forma de cristales anaranjados muy brillantes.

Los disolventes más adecuados para preparar las diferentes soluciones de la Alvaradona, de la Umbeliferona y del extracto bruto en los -ensayos microbiológicos fueron : Propilenglicol-agua, y alcohol.

Las soluciones utilizadas en las pruebas de susceptibilidad, presentaban la siguiente coloración: .

Café rojizo, las del extracto bruto.

Amarillo - naranja, las de Alvaradona.

Café - verdoso, las de Umbeliferona.

- De acuerdo con las pruebas microbiológicas realizadas con la Alvaradona, la Umbeliferona y el extracto bruto de Alvaradoa amorphoides Lieb., resultaron con efecto inhibitorio sobre el Staphylococcus aureus, la Alvaradona y el extracto bruto; la Umbeliferona no inhibió a este microorganismo.

Las Pseudomonas, no fueron inhibidas por estas sustancias.

- Los efectos inhibitorios de Alvaradona y del extracto bruto, probablemente se deban a los siguientes mecanismos de acción :

- 1) Los derivados de la quinona, pueden actuar químicamente sobre las proteínas esenciales de las bacterias, precipitándolas, -posiblemente, siguiendo el proceso reportado por Cooper, E.A. " The Chemical Action of Quinones upon Proteins" 1913. (12)

- 2) También podrían actuar, de acuerdo con lo propuesto por Chiung-Hua Chen y colaboradores, " Mechanism of Antibiotic Action of Antraquinone derivates. Effects on the Respiration of Staphylococcus aureus" 1963, inhibiendo la respiración celular del Staphylococcus aureus, mediante una inhibición de la oxidación y deshidrogenación de la mayoría de los aminoácidos (a excepción de Cistina y Cisteína), glucosa y/o productos intermedios del metabolismo de los carbohidratos. (10).

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

La umbeliferona no inhibió el crecimiento de *Pseudomonas* sp, ni del *Staphylococcus aureus*.

La *Pseudomona* sp., no es susceptible a la Alvaradona, a la Umbeliferona ni al extracto bruto.

El *Staphylococcus aureus*, es susceptible a la Alvaradona y al extracto bruto, pero es resistente a las Umbeliferona.

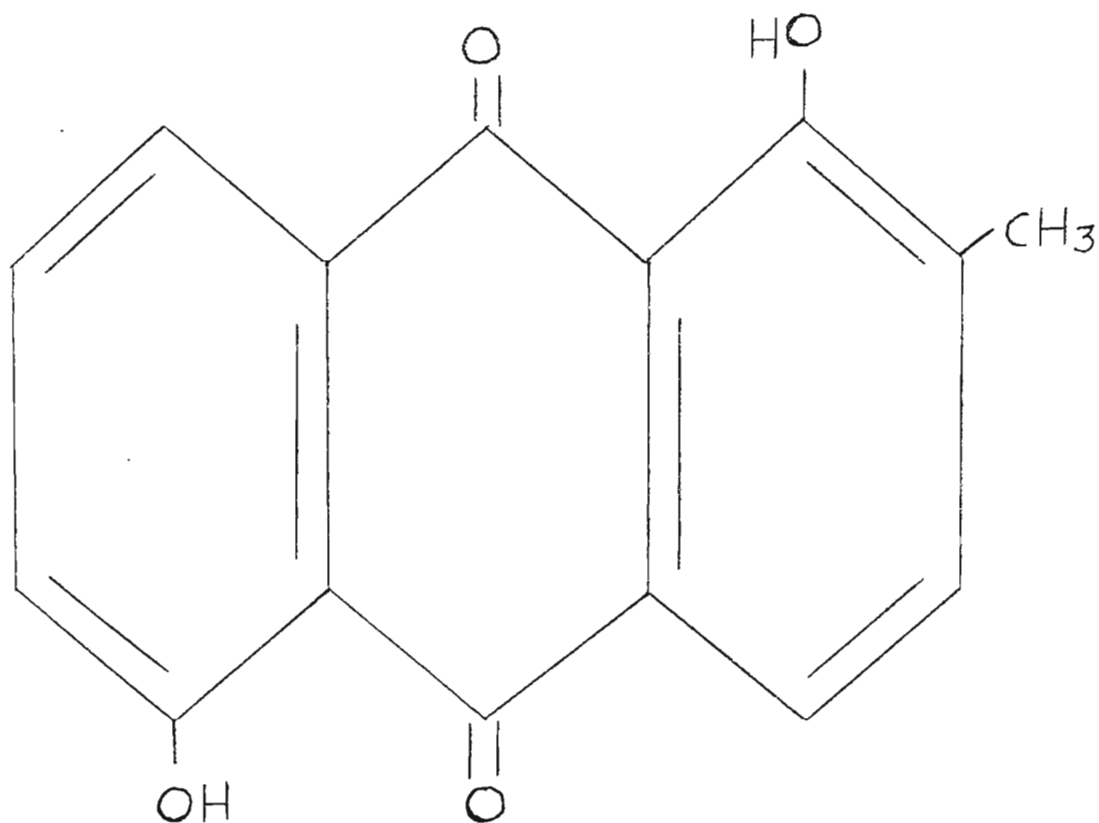
La Alvaradona produjo halos de inhibición de diámetros mayores a los obtenidos con el extracto bruto, de donde se infiere que los resultados óptimos se obtienen con productos aislados.

ANEXO Nº 1

CARACTERISTICAS DE LAS COLUMNAS ELUIDAS

C A R A C T E R I S T I C A S	COLUMNA "G"	COLUMNA "P"
Longitud	1500 mm	750 mm
Diámetro interno	43 mm	43 mm
Diámetro externo	50 mm	50 mm
Silica Gel Cromatográfica	715 g	345 g
Cantidad de extracto bruto en polvo utilizado	50 g	23 g
Cantidad de solvente agregado en cada una de las proporciones usadas.	4 L	2 L
Número de fracciones de 250 ml obtenidas.	115	56

A N E X O N º 2-a



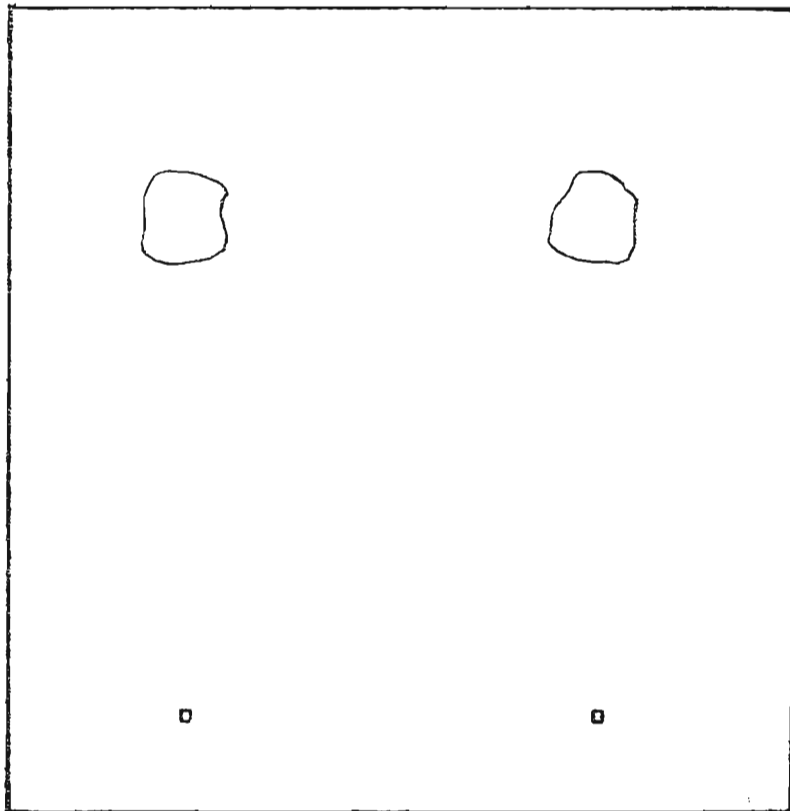
ALVARADONA

Aislada e identificada por primera vez en el Laboratorio de Investigación Aplicada y Tesis Profesionales de la Facultad de Química y Farmacia UES, por la Lic. Rina Antonieta Toledo M. 1980 .

A N E X O N O 2-b

CROMATOGRAMA DE LA ALVARADONA

Observado con luz visible



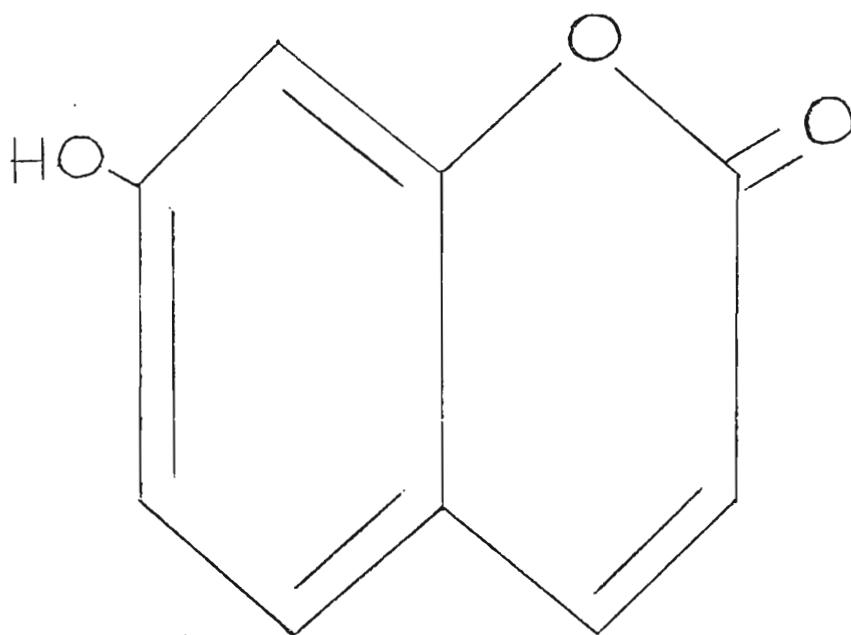
MUESTRA

PATRON

Fracciones eluidas:
(4 - 39 Columna G)
(4 - 20 Columna P)

Solvente desarrollador : Benceno - acetona (9.5:0.5)

ANEXO Nº 3-a

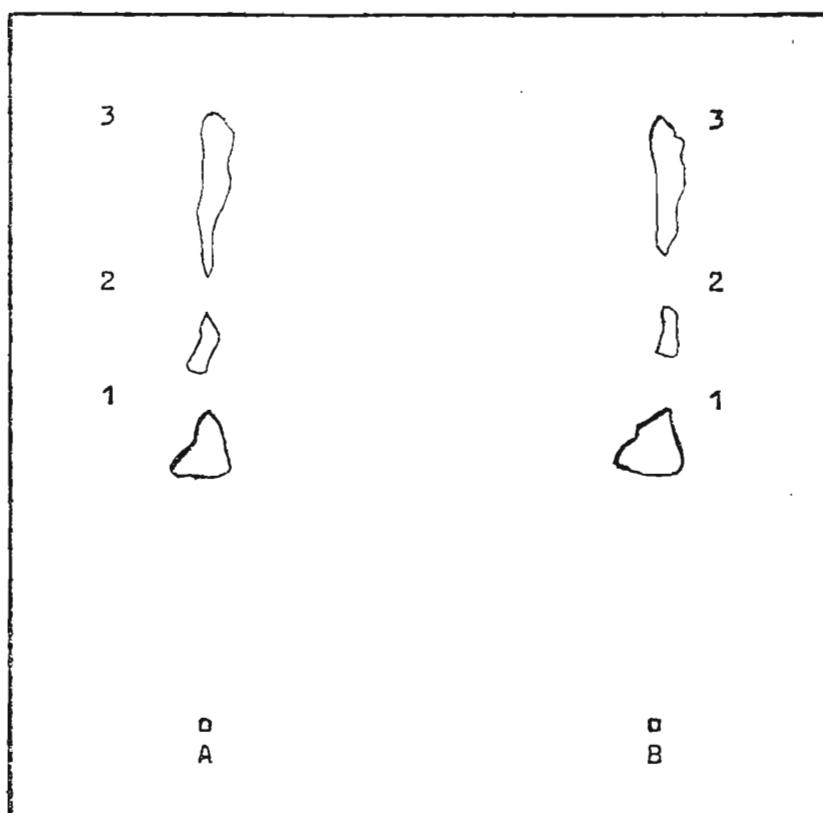


UMBELIFERONA

A N E X O N O 3-b

CROMATOGRAMA DE LA UMBELIFERONA

Observado bajo luz Ultravioleta.



MUESTRAS

Fracciones :
 (49 - 54)
 Columna "G"

Fracciones :
 (23 - 27)
 Columna "P"

Solvente desarrollador : Benceno-acetona (9: 1)

A₁ Umbeliferona

B₁ Umbeliferona

A N E X O N O 4

REACTIVOS ESPECIALES

PREPARACION DEL STANDAR McFARLAND

- a) Preparar 10 tubos de ensayo de igual tamaño
- b) Preparar Acido 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 indica en el cuadro, hasta obtener un total de 10 ml por tubo.
- e) Cerrar herméticamente los tubos

El precipitado de Sulfato de Bario en suspensión corresponde aproximadamente a la densidad de células homogéneas de Escherichia coli/ml, según la escala de patrones en la siguiente tabla:

Número del 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 celular aproximada $\times 10^8$ /ml	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

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

1. American Society for Microbiology. Manual of Clinical Microbiology. Second edition, 1974.
2. Balows A. Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections. American Public Health Association. 6^a ed. Washington. 1981.
3. Batista G. and Del Pianto E. Roma University. Chem. Abst. 42:3022^b (1948).
4. Bayley R.S.E. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana; Buenos Aires, 1973.
5. Bersch H.W. and Döpp W. Alemania. Chem. Abst. 8502^f (1955)
6. Branson D. Métodos en Bacteriología Clínica. Manual de Pruebas y Procedimientos. Ed. Médica Panamericana; Buenos Aires, 1974.
7. Burrows W. Tratado de Microbiología. Vigésima ed.

8. Brock T. and Brock K. Basic Microbiology. New Jersey, Prentice - Hall, Inc. 1978.
9. Carpenter P.L., Microbiología. Editorial Interamericana. Cuarta ed. México 1977.
10. Ciung - Hua Chen, Tien-Tung Li y Colaboradores. Chem. Abst. Med. Coll., Tientsin, China. 60:16214^e (1963)
11. Chichshank, R. Medical Microbiology. II ed. 1965.
12. Cooper, E.A. London Biochem. J. Chem. Abst. 78-2401 (1913)
13. Cooper, E.A. and Haines R.B. Biochem. Chem. Abst. 22:2960 (1928).
14. Delaat A.N.C., Microbiología. Ed. Interamericana.
15. Del Vecchio G., Del Vecchio V. y Colab. Chemical abstract 42:7825^f (1948) ; 45:7629^h (1949).
16. Domínguez X.A. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México 1973.

17. Fong H.S. y colab. Phytochemical Screening., Departament of Pharmacognosy and Pharmacology, College of Pharmacy, University of Illinois. Chicago, 1982.
18. Frobisher - Fuerst. Microbiología. Ed. Interamericana 13^a ed. México, 1976.
19. Grey & Discombe, Patología Clínica. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1966.
20. Hayashi S., Hiroshi V. y colab. Univ. Kumamoto Japan. Chem. Abst. 61:12507g (1963).
21. Hércules - Alabí, Investigación del Posible Efecto Inhibitorio que ejerce la Galea urticifolia sobre Pseudomonas sp. UES, 1985.
22. Hoffman - Ostenhof y Fellner - Feldeg. Univ. de Viena. Chem. Abst. 44:5962^e (1949).
23. James P. and Friedlman H. Opportunistic Pathogens. Univ. Park Press, USA, 1976.
24. Jawest E. Microbiología Médica . 10^a ed. 1983.

25. Morgan , G.T. and Cooper, E.A. Biochem. 16:730 (1921).
26. Payne - Brown. Microbiología. Presentación Programada. Centro Regional de Ayuda Técnica, AID. México, 1974.
27. Pierre D. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux 51:2115 (1955).
28. Revista Latinoamericana de Química. Vol. 10/4. Organo Oficial de la Federación Latinoamericana de Química al Servicio de la América Latina. Cap. I. 1979.
29. Stainer D., Adelberg. The Microbial World. Third edition. Prentice Hall, USA. 1970.
30. Toledo M.R.A. Estudio Fitoquímico de Alvaradoa amorphoides - (Cola de Zorro). Fac. de Química y Farmacia UES. 1980.
31. Walton B.G. Arch. Biochem. Chemical Abstract. 40:7279³ (1946).
32. Willet - Joklik- Amos. Zinsser Microbiología. Ed. Panamericana. Buenos Aires, 1983.
33. Witsberger, D., Current. D., Archer E. Arboles del Parque Deininger.