

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE LA  
ESPECIE *Pereskia autumnalis* (Matial) EN EL HONGO *Aspergillus niger* .

TRABAJO DE GRADUACION PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

PRESENTADO POR:

ANA LILIAN ABREGO URBINA

EUGENIA SORTO LEIVA

MARZO DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA



**©2004, DERECHOS RESERVADOS**

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

**SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

Dra. María Isabel Rodríguez

SECRETARIA GENERAL

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

Lic. Salvador Castillo Arévalo

SECRETARIA

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

## COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

### COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### ASESORA DE AREA DE BIOQUÍMICA Y CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

MSc. Sonia Maricela Lemus

### ASESOR DE AREA DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

MSc. Armando Nelson Genovés Leonor

### DOCENTE DIRECTOR

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

### DOCENTE DIRECTOR

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

## AGRADECIMIENTOS

### A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES:

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos e Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda. Por su tiempo, apoyo, paciencia, y dedicación para la realización del presente trabajo.

### A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE AREA:

Lic. María Odette Rauda, MSc. Sonia Maricela Lemus, MSc Armando Nelson Genovés Leonor. Por sus buenas observaciones y evaluación, las cuales ayudaron a mejorar este trabajo.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron en esta investigación. Nuestros más sinceros agradecimientos.

Lilian y Eugenia

## DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza espiritual y física para culminar con gran éxito mi carrera.

A mis padres América Leiva de Sorto e Iván Sorto Guzmán. Por el sacrificio de todos estos años. Por su preocupación, paciencia, amor y apoyo constante, sin los cuales no hubiera logrado las metas propuestas.

A mi hermano Alejandro por sacrificar parte de su tiempo y brindarme su apoyo y colaboración.

A Franklin Lemus por todo su amor, comprensión y apoyo constante e incondicional, y por llenar de alegría mi vida.

A mi compañera Lilian por su paciencia, comprensión y apoyo.

A mis amigas Silvia, Nancy Zeyda y Marina por hacer de todos estos años más agradables.

SINCERAMENTE Eugenia Sorto Leiva.

## DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por haberme guardado en todo momento y darme la sabiduría para poder culminar mis estudios.

A mis padres Ana Morena Urbina de Abrego y Emilio Abrego Fuentes por su apoyo y su esfuerzo a lo largo de estos años, por su amor y comprensión en este triunfo.

A mis hermanos Maribel, Silvia, Carlos, Emilio por brindarme y darme apoyo, confianza para seguir adelante.

A mi compañera Eugenia por su apoyo, comprensión y tiempo para realizar este trabajo.

A mi amigo y amiga por haber compartido el tiempo bueno y malo en todos estos años de estudio.

SINCERAMENTE Ana Lilian Abrego Urbina.

## INDICE

### CONTENIDO

RESUMEN	PÁGINA
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xvi
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General	19
2.2 Objetivos Específicos	19
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	21
3.1 Monografía	21
3.2 Generalidades de los compuestos químicos	23
3.2.1 Glicósidos Saponínicos	23
3.2.2 Taninos	25
3.2.3 Carbohidratos	26
3.3 Método General de Extracción	27
3.3.1 Extracción con Soxhlet	27
3.4 Generalidades de la cepa sometida a Bioensayo	28
3.4.1 <i>Aspergillus niger</i>	28
3.5 Generalidades sobre las Tinturas	29

## CAPITULO IV

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	32
4.1 Tipo de Estudio	32
4.2 Investigación Bibliográfica	32
4.3 Metodología de Campo	32
4.4 Metodología de Laboratorio	33
4.4.1 Obtención de los Extractos de Acuoso, Clorofórmico y Acetato de Etilo	33
4.4.2 Análisis Fitoquímicos Preliminares	34
4.4.3 Elaboración de las Tinturas (5%, 15% y 30%)	35
4.4.4 Ensayos Microbiológicos	35
4.4.4.1 Identificación del hongo <i>Aspergillus niger</i>	35
4.4.4.2 Ensayos de Susceptibilidad Antifúngica	35

## CAPITULO V

5.0 RESULTADO Y DISCUSIÓN DE RESULTADO	39
5.1 Resultado del análisis fitoquímico preliminar del extracto de Acetato de Etilo.	39
5.2 Determinación de la cantidad de sólido obtenido de la evaporación del extracto de Acetato de Etilo para elaborar las tinturas a las diversas concentraciones (5%, 15% y 30%).	41

5.3 Resultados de la evaluación antifúngica.	44
5.3.1 Pruebas de Identificación del hongo <i>Aspergillus niger</i> .	44
5.3.2 Resultados de la evaluación antifúngica. Método Kirby Bauer Modificado.	45
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	49
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

## INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Resultado del análisis organoléptico del Extracto de Acetato de Etilo de las hojas, corteza y parte mucilaginosa del tallo de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial).

Tabla N° 2 Pruebas Fitoquímicas Preliminares realizadas en el Extracto De Acetato de Etilo de las hojas, corteza y parte mucilaginosa del tallo de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial).

Tabla N° 3 Morfología Macroscópica y Microscópica del hongo ***Aspergillus niger***

Tabla N° 4 Resultado de la Evaluación Antifúngica de la Tintura al 30% del Extracto de Acetato de Etilo del Matial en el hongo ***Aspergillus niger***

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: Fotografía de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial).

ANEXO N° 2: Técnica General de Trabajo.

ANEXO N° 3: Fotografía de los Equipos utilizados para la obtención de los extractos acuoso, clorofórmico y acetato de etilo.

ANEXO N° 4: Características microscópicas y microscópicas del hongo ***Aspergillus niger***.

ANEXO N° 5: Resumen de Pruebas Fitoquímicas.

ANEXO N° 6: Esquema del Método Kirby Bauer Modificado.

ANEXO N° 7: Esquema de Preformulación de Tinturas.

ANEXO N° 8: Fotografía de la Comparación Antifúngica de la Tintura al 30% del extracto de Acetato de Etilo.

ANEXO N° 9: Material, equipos y reactivos utilizados.

## INDICE DE FIGURAS

- FIGURA N° 1: Esqueleto Esteroidal.
- FIGURA N° 2: Esqueleto Triterpeno Pentacíclico.
- FIGURA N° 3: Grafica de los resultados de la evaluación antifúngica de las tinturas preparadas a partir del acetato de etilo.
- FIGURA N° 4: Fotografía de la *Pereskia autumnalis* (Matial).
- FIGURA N° 5: Técnica General de Trabajo
- FIGURA N° 6: Aparato soxhlet.
- FIGURA N° 7: Aparato de Rotavapor.
- FIGURA N° 8: Esquema del Método Kirby Bauer Modificado para las tinturas.
- FIGURA N° 9: Esquema del Método Kirby Bauer Modificado, para el patrón y el blanco.
- FIGURA N° 10: Esquema de Preformulación de Tinturas.
- FIGURA N° 11: Comprobación antifúngica de la tintura al 30 % de Acetato de Etilo

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1: Características Macroscópicas y Microscópicas del hongo.

CUADRO N° 2: Pruebas Fitoquímicas.

## RESUMEN

En el presente estudio se demostró la actividad antifúngica de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial), para lo cual se partió de la hoja, corteza y parte mucilaginoso del tallo, sometido a extracción por método Soxhlet, usando etanol como solvente, se sometió a evaporación; obteniendo un extracto seco de donde se prepararon los extractos acuoso, clorofórmico y acetato de etilo realizándoles un análisis fitoquímico preliminar de color y precipitación identificando la presencia de Saponinas, Taninos y Carbohidratos en el extracto de Acetato de Etilo, a partir del cual se elaboran las tinturas al 5%, 15% y 30%. A estas soluciones se les determinó la actividad antifúngica, por método de Kirby Bauer Modificado, sobre el hongo ***Aspergillus niger***.

En la evaluación microbiológica de las tinturas resultó sensible la tintura al 30% obteniéndose mayores halos de inhibición, siendo la más efectiva por encontrarse en mayor cantidad los principios activos.

Por lo tanto, realizar investigaciones Fármaco-Toxicológicas así como también análisis cuantitativos y cualitativos del extracto de Acetato de Etilo de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial), es importante para ser utilizada como materia prima para la formulación de productos farmacéuticos de buena calidad que brinden beneficios a la población.

CAPITULO I  
INTRODUCCION

## 1.0 INTRODUCCION

En los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de las drogas de origen natural, dando como resultado mejoras en los procedimientos de aislamiento, modificación estructural y experimentación farmacológica que permite con estas drogas vegetales, encontrarles aplicación en el mundo de la medicina.

En la región centroamericana y específicamente El Salvador, la actividad biológica de muchas plantas no ha sido investigada, posiblemente porque no se les ha dado la importancia necesaria para su buen desarrollo y aporte al conocimiento de las drogas de origen natural. Y aunque el empleo de los fármacos sintéticos constituyen uno de los avances de la medicina moderna y son ampliamente utilizados para el control de hongos puede ocasionar resistencia por parte de los microorganismos, ante esta situación una alternativa prometedora es el uso de productos naturales, ya que permite encontrar compuestos bioactivos y reducir los efectos secundarios como una de sus ventajas.

Por lo que la presente investigación pretende el aprovechamiento de las propiedades del extracto de la especie vegetal *Pereskia autumnalis* (Matial) y su posible actividad antifúngica.

Por lo que el estudio comprende un análisis fitoquímico preliminar a los diferentes extractos acuoso, clorofórmico y acetato de etilo, la preparación de las tinturas al 5%, 15% y 30% y la evaluación microbiológica de las tinturas

trabajando para ello con el hongo ***Aspergillus niger***, que es una especie que se asocia a menudo con aspergiloma y con la otomicosis.

Los extractos de plantas son un recurso accesible para la elaboración de formas farmacéuticas relativamente de bajo costo, como una alternativa terapéutica para que puedan ser utilizadas principalmente por la población de limitados recursos económicos, contribuyendo de esta manera a la salud de las grandes mayorías, además de promover así el cultivo de esta especie vegetal e implementando una agroindustria que daría lugar a mejoras económicas en esta área.

## CAPITULO II

### OBJETIVOS

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Comprobar la actividad antifúngica del extracto de la especie ***Pereskia autumnalis*** (Matial) en el hongo ***Aspergillus niger***.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Extraer con etanol por método Soxhlet el extracto del Matial seco y molido.

2.2.2 Obtener un extracto acuoso, clorofórmico y de acetato de etilo.

2.2.3 Realizar un análisis fitoquímico a los extractos acuoso, clorofórmico y acetato de etilo.

2.2.4 Elaboración de las tinturas a diversas concentraciones (5%, 15% y 30%) a partir de los diferentes extractos.

2.2.5 Evaluar la actividad antifúngica de las tinturas siguiendo el método de Kirby Bauer Modificado.

2.2.6 Dar a conocer la concentración de la tintura en que es efectiva.

CAPITULO III  
MARCO TEORICO

### 3.0 MARCO TEÓRICO

#### 3.1 MONOGRAFÍA <sup>(10)</sup>

##### ***Pereskia autumnalis***

**Clase:** Magnoliopsida.

**Orden:** Caryophyllales.

**Familia:** Cactáceas.

**Nombre Científico:** *Pereskia Lychnidiflora*.

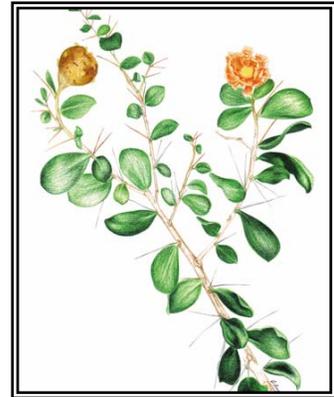
**Sinónimos:** autumnalis de *Pereskia*,

*Lychnidiflorus* de *Rhodocactus*, autumnalis de *Pereskiopsis*, autumnalis de *Rhodocactus*, calandriniaefolia de *Pereskia*, konzattii de *Pereskia*, konzattii de *Rhodocactus*, golziana del opuntia, nicoyana de *Pereskia*, nicoyanus de *Rhodocactus*, opuntiflora de *Pereskia*, opuntiflora de *Pereskia*, opuntiaeflora de *Pereskia*, opuntiaeflora de *Pereskiopsis*, pititache de *Pereskia*, pititache de *Pereskiopsis*, pititache del opuntia.

Nombre común: “matial”, “árbol del matrimonio”, “guititache, guichitache”, “manzanote”.

**Localidad:** El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y México.

**Descripción diagnóstica:** Árbol o arbusto de 4 a 6 m de altura, en general profusamente ramificado, con el tronco principal y los viejos densamente cubiertos por espinas. Tallos con espinas. Hojas de 2 a 4.5 por 1 a 2 cm,



elípticas, agudas apicalmente, anchamente obtusas en la base, cortamente pecioladas, glabras y muy carnosas.

Flores sin tubo o con tubo no visible, anaranjadas, hasta de 2 cm de ancho, generalmente dispuestas al final de las ramas floríferas. Frutos verde-rojizos al madurar. A primera impresión, es muy similar a un árbol de “jícara” (*Crescentia* spp), pero las numerosas espinas del tronco lo distinguen fácilmente. (Ver Anexo 9)



**©2004, DERECHOS RESERVADOS**

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,  
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

**SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

### 3.2 GENERALIDADES DE LOS COMPUESTOS QUIMICOS <sup>(4)</sup>

Los metabolitos primario se encuentran en todas las plantas y desempeñan funciones vitales para el desarrollo del vegetal. Aquí incluye lo que son las bases nitrogenadas, ácidos grasos, aminoácidos, lípidos, proteínas, entre otros.

A los metabolitos secundarios se les considera como no esenciales para la vida, aunque son fundamentales para operar una determinada función biológica.

Aunque son los compuestos de mayor interés farmacológico, y constituyen los llamados principios activos de las drogas.

Los grupos de los metabolitos secundarios son: glicósidos saponínicos, glicósidos flavonoides, glicósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas, taninos, carbohidratos, etc. A continuación hablamos sobre las generalidades de tres metabolitos secundarios encontrados en nuestro análisis fitoquímico.

#### 3.2.1 Glicósidos Saponínicos <sup>(3)</sup>

Las saponinas son glicósidos con genina esteroidal o triterpénico que se caracterizan por disminuir la tensión superficial, por lo tanto al sacudir sus soluciones forman una abundante espuma, y relativamente estable. A la parte no azucarada o genina se le denomina sapogenina.

Las saponinas tienen un elevado peso molecular por lo que su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades. Como heterósidos que son, se hidrolizan por ácidos dando una genina y diversos azúcares y ácidos urónicos relacionados. Según la estructura de la genina se conocen dos grupos de

saponinas; los tipo esteroide (generalmente triterpenoides tetracíclicos) y triterpenoide pentacíclico. Ambos presentan un enlace heterosídico en el C-3 y tienen un origen biogenético común, por vía del ácido mevalónico y están formadas por unidades de isopreno.

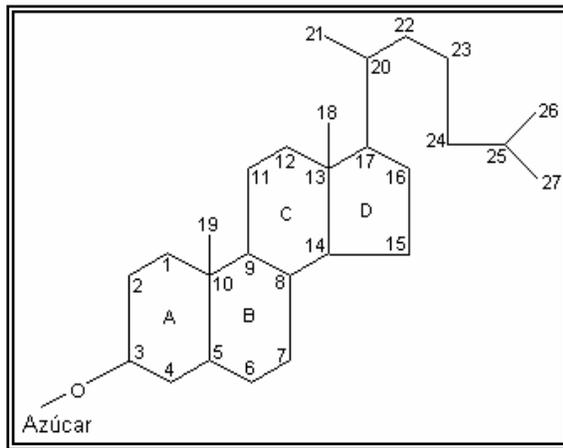


Figura No 1. Esqueleto esteroide

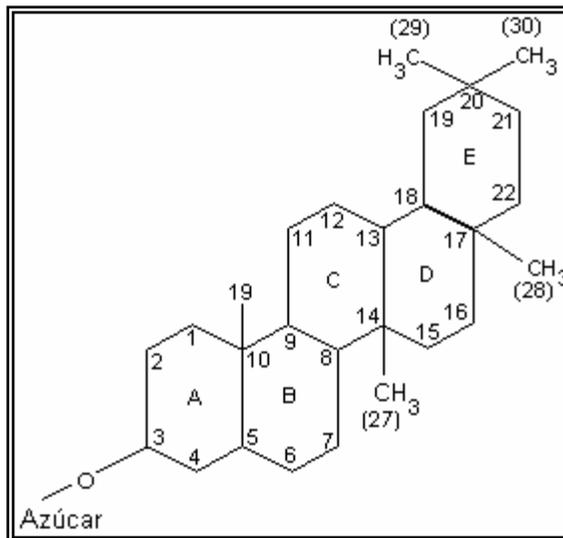


Figura No 2. Esqueleto triterpenoide Pentacíclico

Las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Al concentrar la solución alcohólica se separan las saponinas que después se cristalizan en mezclas de alcohol y agua. Para obtener sapogeninas, se pueden hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico (este último se prefiere en el caso de sapogeninas insaturadas). Luego se extraen las sapogeninas, que son poco polares, con benceno, éter de petróleo, o cloroformo y se recristalizan. La saponina y sus sapogeninas insaturadas dan coloraciones con varios reactivos ácidos, como el de Liebermann – Burchard, Salkowski, Cloruro de tionilo y Tricloruro de antimonio. Las saponinas dan positivas las pruebas para carbohidratos como la de Molish o la de Antrona.

En cuanto a sus usos, muchas saponósidos tienen propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Las propiedades farmacológicas se deben todo a los saponósidos triterpénicos.

### 3.2.2. Taninos <sup>(3)</sup>

Los taninos son compuestos químicos no cristalizables que forman soluciones coloidales de reacción ácida y sabor muy acre. Se presentan como polifenoles en mezclas, las cuales son difíciles de separar porque no cristalizan.

Son un grupo de sustancias muy complejas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, casi en todas las familias vegetales existen especies que los

contienen cuando se presentan en cantidades considerables, los taninos suelen localizarse en determinadas partes de las plantas, como hojas, fruto, corteza o tallo.

Los taninos precipitan las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolítico. Aplicada a los tejidos vivos, esta acción se conoce como acción astringente y constituye la base para la acción terapéutica de los taninos. Se emplea en medicina como astringente del tracto gastrointestinal y de las escoriaciones de la piel.

### 3.2.3 Carbohidratos

Los carbohidratos son un grupo de compuestos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno. Son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Las plantas verdes y las bacterias fotosintetizadoras los producen en el proceso conocido como fotosíntesis, durante el cual adsorben el dióxido de carbono del aire y por acción de la energía solar, producen glucosa y otros compuestos químicos necesarios para que el organismo sobreviva y crezcan. Estos pueden ser monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. Los carbohidratos que dan positivas las pruebas de Fehling y Benedict se conocen como azúcares reductores y todos los carbohidratos que contienen un grupo hemiacetal o hemicetal dan positivas esta pruebas.

### 3.3 MÉTODO GENERAL DE EXTRACCIÓN <sup>(7)</sup>

Las propiedades medicinales de las plantas se deben a la presencia de sustancias químicas llamadas principios activos, que tienen la capacidad de producir transformaciones fisiológicas, las cuales pueden ser benéficas o tóxicas según el principio activo de que se trate. Los principios activos son producidos por tejidos de semillas, tallos, flores o raíces.

La extracción propiamente dicha envuelve la separación de porciones biológicamente activas de los componentes inertes o inactivos, a partir de la utilización de un solvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado.

Dependiendo del tipo de principios activos a aislar, se elegirá un método u otro de extracción, estos pueden ser:

Maceración

Percolación

Extracción por Soxhlet

#### 3.3.1 Extracción con Soxhlet

El aparato Soxhlet consta de tres partes que son:

Matraz: un balón en donde se hace ebullición del disolvente apropiado, sus vapores se condensan encima de la muestra colocada en dedal.

Dedal: donde se coloca la muestra en un cartucho de papel de filtro, con el material vegetal.

Refrigerante: donde se condensa el disolvente que por efecto de un sifón cae por gravedad al dedal y a su vez al Matraz.

Esta operación se repite sucesivamente, con lo cual la solución contenida en el Matraz se va enriqueciendo con los principios aislados. (Ver Anexo 8)

### 3.4 GENERALIDADES DE LAS CEPAS SOMETIDAS A BIOENSAYO

#### 3.4.1 *Aspergillus niger*

Es una de las especies muy común y fácilmente identificable del género *Aspergillus*, sus colonias están inicialmente cubiertas con un micelio aéreo blanco, veloso. A medida que la colonia madura se observa un efecto de sal y pimienta, con la superficie finalmente cubierta con esporas negras. El reverso de la colonia permanece con un color tostado claro, lo que diferencia *Aspergillus niger* de los hongos dermatiáceos. <sup>(1)</sup>

Las colonias maduras se forman entre 3 a 5 días en medios de cultivo que no posee antibióticos; se usa como medio de cultivo agar papa dextrosa, se incuba a temperatura ambiente (25 ° C). <sup>(9)</sup>

Este hongo se asocia a menudo con aspergillosis pulmonar invasor, también a menudo es el agente causal del aspergilloma y con más frecuencia agente causal de la otomicosis. <sup>(21)</sup>

### 3.5 GENERALIDADES SOBRE LAS TINTURAS

Las tinturas son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas preparadas a partir de materiales vegetales o sustancias químicas. Las sustancias contenidas en las drogas se ponen en solución mediante el disolvente y están presentes en las tinturas en diferentes concentraciones. La composición del complejo extractivo se rige por la solubilidad de cada uno de las sustancias en el disolvente. La solubilidad de los sólidos crece a medida aumenta la temperatura, por lo que en la preparación debe tenerse en cuenta esto.

Los procedimientos de extracción usuales para la preparación de tinturas son tres: maceración, por percolación y la turbo extracción (8). La maceración consiste en remojar la droga, debidamente fragmentada en un menstuo hasta que éste penetre en la estructura celular ablandando y disolviendo las porciones solubles. Se puede utilizar un recipiente de vidrio con tapa en este se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado, se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra y se exprime el residuo. La precolación consiste en tratar la droga pulverizada por un solvente que pasa a través en forma continua y descendente por gravitación. El líquido de extracción se introduce de forma continua por la parte superior y circula lentamente a través de la droga por lo general esta groseramente pulverizada. Renovando constantemente el líquido se consigue un agotamiento total de la droga, por lo es posible la extracción total. El tipo de percolación que utilizaremos para realizar la investigación será con el método Soxhlet, este

consiste en colocar la droga en un cartucho (de papel, tela, etc.) en el interior de un extractor (percolador) de vidrio, este recipiente de vidrio que contiene el cartucho está intercalado entre un matraz de destilación y un refrigerante de reflujo conectado al matraz a través de un sifón. El matraz contiene el disolvente que se evapora y pasa a través del sifón hasta el refrigerante, donde se condensa y gotea sobre el material disolviendo y arrastrando las sustancias. La turbo extracción consiste en un extractor de alta presión, una válvula de reducción, un separador de baja presión y una bomba para elevar la presión del solvente reciclado. El tiempo de esta extracción se acorta muchísimo debido al tipo de movimiento de agitación que se utiliza así como trabajar a temperaturas hasta de 20°C por sobre la ambiente. Este aumento de temperatura lleva a la obtención de sustancias activas más impuras. (20)

Las tinturas deben exhibir el contenido prescrito en etanol. Deben ser transparentes y ser almacenadas en un lugar fresco y protegido de la luz. (13)

CAPITULO IV  
DISEÑO METODOLOGICO

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.0 TIPO DE ESTUDIO:

La presente investigación fue de carácter retrospectivo-prospectivo. Retrospectivo porque se realizó una medición actual y se comparó con datos obtenidos en el pasado; prospectivo porque se basó en datos obtenidos actualmente de los cuales se obtuvieron conclusiones para proyectarla a futuro. Fue también analítico-experimental ya que se obtuvieron datos interpretables, que condujeron a conclusiones más claras y pudo aplicarse instrumentos para medirlos, que permitieron explicar fenómenos en estudio.

La investigación realizada se llevo a cabo en tres etapas: Investigación bibliográfica, investigación de campo, investigación en el laboratorio.

### 4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La comprendió la consulta de libros, trabajos de graduación, revistas, manuales etc. En las bibliotecas de las Facultades de Química y Farmacia y la de Ciencias Naturales y Matemáticas, de la Universidad de El Salvador, así como también investigaciones en Internet.

### 4.3 METODOLOGÍA DE CAMPO

Se realizó una búsqueda del material vegetal dentro de la amplia vegetación presente en la zona de recolección, procediéndose a la identificación de la

planta *Pereskia autumnalis* (Matial) que se llevó a cabo en la zona del Lago de Ilopango, cantón Changayo, del municipio de Ilopango, San Salvador. Es un arbusto profusamente ramificado con un tronco principal y los viejos densamente cubiertos de espinas, sus hojas elípticas, agudas apicalmente, anchamente obtusas en la base y muy carnosas. Dicha recolección se realizó en la época seca ya que es más recomendable por encontrarse libre de humedad.

Luego de haber identificado el material vegetal se procedió a su recolección, la cual se hizo manualmente, se usó para ello sacos con el objeto de transportarlo; el material se limpió y se almacenó en sobres de papel a temperatura ambiente hasta el momento en el cual se pretendió utilizarlo.

#### 4.4 METODOLOGÍA DE LABORATORIO

##### 4.4.1 Obtención de los Extractos Acuoso, Clorofórmico y Acetato de Etilo.

Se partió del las hojas, corteza y tallo del Matial, luego se limpió y se fraccionó cuidadosamente, este material se secó en una estufa a temperatura de 60 °C por un espacio de 6 horas, para luego hacerlo pasar por un molino.

Luego este material seco se sometió a una extracción en el equipo Soxhlet con etanol al 90%, El material se colocó en un cartucho de papel filtro en el dedal del equipo, luego se le hizo pasar etanol frío para que realice la primera extracción, posteriormente se llevó a temperatura controlada. El material vegetal se sometió a varios arrastres, se suspendió la extracción cuando el

solvente que se encuentra en el dedal presentó un color tenue lo que indicó que ya no se extrajo más sustancias de la planta; inmediatamente el extracto etanólico se hizo pasar por un rotavapor (Flash Evaporator) para obtener un extracto seco, luego se le realizó una extracción líquida-líquida con los solventes de cloroformo y acetato de etilo que también se hizo pasar por un rotavapor y se obtuvieron de cada uno un extracto seco.

#### 4.4.2 Análisis Fitoquímicos Preliminares.

Se realizó pruebas fitoquímicas a los extractos secos obtenidos, para identificar la presencia de los principios activos: <sup>(7)</sup>

Glicósidos Saponínicos: Liebermann-Buchard, Salkowski y prueba de espuma.

Glicósidos Flavonoides: Shinoda.

Glicósidos Antraquinónicos: Borntrager

Glicósidos Cardiotónicos: Keller Killiani, kedde y Legal.

Taninos: Cloruro férrico, subacetato de plomo, solución de gelatina, dicromato de potasio, sulfato de atropina, agua de bromo, solución de cafeína y clorhidrato de quinina.

Sesquiterpenlactonas: Baljet, y Legal.

Alcaloides: Dragendorff, Reactivo de Mayer y Reactivo de Wagner.

Carbohidratos: Prueba de Fehling y Prueba de Benedict.

#### 4.4.3 Elaboración de las Tinturas (5%, 15% y 30%)

Luego de haber realizado las pruebas fitoquímicas se procedió a elaborar las tinturas (5%, 15% y 30%) utilizando únicamente el extracto seco que dió positiva las pruebas fitoquímicas. (Ver Anexo 7)

#### 4.4.4 Ensayos Microbiológicos

##### 4.4.4.1 Identificación del Hongo *Aspergillus niger*

La cepa original de *Aspergillus niger* proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, se resembró en medio de Agar Sabouraud para obtener un mayor crecimiento, de este se hicieron las pruebas de identificación: (ver anexo 4).

-Características microscópicas.

-Características macroscópicas

Se realizó una nueva resiembra del hongo para evitar su muerte.

##### 4.4.4.2 Ensayos de Susceptibilidad Antifúngica

El método de Kirby Bauer Modificado se basa en la difusión del antimicótico desde un cilindro vertical hacia el agar solidificado en la caja de petri, en el que se observa que el crecimiento del hongo es inhibido enteramente en un área circular alrededor del cilindro conteniendo la solución. (Ver Anexo 6)

a) Preparación de las placas de cultivo

El agar se preparó de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Después de realizar la esterilización en autoclave del medio de cultivo, a 121° C por 15 minutos, inmediatamente se dejó enfriar en un baño de agua hasta una temperatura de 45-50 ° C. Se vertió el agar fundido en las cajas de petri previamente esterilizadas, de manera que la superficie horizontal debe tener una profundidad uniforme de 4 mm aproximadamente. El medio de cultivo se dejó solidificar a temperatura ambiente, y se almacena en un refrigerador (2-8 ° C) en caso de utilizarlo posteriormente.

Las placas pueden ser usadas después de siete días de haber sido preparadas.

b) Preparación de la suspensión del hongo (*Aspergillus niger*)

Del cultivo del hongo *Aspergillus niger* mantenido en Agar Sabouraud se transfirió cierto número de colonias a un tubo de ensayo usando un asa bacteriológica estéril; el tubo contiene 10 mL de caldo nutritivo. Este procedimiento se repitió hasta obtener una turbidez equivalente al patrón nefelométrico Mac Farland, el cual se prepara: 0.1 mL de BaCl<sub>2</sub> 1% + 9.9 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Obteniéndose una densidad celular aproximada de  $3.0 \times 10^8$  mo/mL (microorganismo/mililitro).

c) Siembra del microorganismo de prueba.

Sembrar el microorganismo por la técnica de hisopado en placas de petri con agar Sabouraud, humedeciendo el hisopo estéril en la suspensión previamente preparada y extendiendo el líquido por toda la placa.

d) Inoculación con la solución de Prueba.

Se colocaron 4 cilindros de acero inoxidable en cada placa de petri, a intervalos de 90° entre cada uno, y se llenaron con las tinturas de prueba utilizando una micropipeta.

El número total de placas fue de 10 placas por cada concentración de Tintura siendo un total de 30 placas.

Se utilizó como patrón de comparación la Tintura de Yodo al 2%. Se llevó también un blanco que es alcohol etílico al 90%.

e) Incubación y Lectura

Se incubaron las placas a temperatura ambiente por cinco días. Posteriormente se observó la formación de halos de inhibición alrededor de los cilindros, se miden los halos con regla milimétrica, determinando si es sensible o resistente.

## CAPITULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 5.1 Resultados del análisis fitoquímico del extracto de Acetato de Etilo.

Tabla N° 1. Resultado del análisis organoléptico del extracto de Acetato de Etilo de las hojas, corteza y parte mucilaginoso del tallo de la *Pereskia autumnalis* (Matial)

COLOR	OLOR	APARIENCIA
Amarillo pálido	Dulce	Viscosa

Tabla N° 2. Pruebas fitoquímicas preliminares realizadas en el extracto de Acetato de Etilo de las hojas, corteza y parte mucilaginoso del tallo de la *Pereskia autumnalis* (Matial).

SUSTANCIA	PRUEBA	RESULTADO
Glicósidos Saponínicos	Lieberman-Burchard	+
	Salkowski	-
	Prueba de la espuma	+
Glicósidos Flavonoides	Shinoda	-
Glicósidos Antraquinónicos	Borntrager	-
Glicósidos Cardiotónicos	Kéller Killiani	-
	Kedde	-
	Legal	-
Taninos	Cloruro férrico 5%	+
	Subacetato de plomo 5%	+
	Solución de Gelatina 2%	+
	Dicromato de Potasio 5%	+
	Sulfato de Atropina 5%	+
	Agua de Bromo 2%	+
	Solución de Cafeína 10%	-
	Clorhidrato de Quinina 5%	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet	-
	Legal	-
Alcaloides	Dragendorff	-
	Reactivo de Mayer	-
	Reactivo de Wagner	-
Carbohidratos	Prueba de Fehling	+
	Prueba de Benedict	+

+: prueba positiva

-: prueba negativa

Para los Glicósidos Saponínicos: las pruebas químicas de Salkowski y Liebermann-Burchard se obtuvo un resultado positivo, ambas pruebas identificaron la porción esferoidal que poseen las saponinas, otras de las pruebas realizadas fue la prueba de espuma la cual resultó positiva, indicando que en el extracto de acetato de etilo de la especie vegetal ***Pereskia autumnalis*** (Matial) se encuentran presentes sustancias como las saponinas.

Para los Taninos en todas las pruebas se obtuvo los resultados esperados ya sea de precipitación o de coloración, exceptuando la prueba de la solución de cafeína que dio negativa, nos indicaron la presencia de este tipo de sustancias en el extracto de acetato de etilo de la especie vegetal ***Pereskia autumnalis*** (Matial).

En la determinación de Carbohidratos: las pruebas de Benedict y Fehling resultaron positivas, lo que identificaron la presencia de azúcares reductores.

Los otros extractos no se utilizaron ya que dieron negativas las pruebas fitoquímicas esto se debe a que la parte que más se utilizó fue la parte mucilaginosa de la planta.

Las pruebas fitoquímicas preliminares se realizaron para determinar que extracto se utilizaría para elaborar las tinturas a las diversas concentraciones, y comprobar la actividad antifúngica de la tintura que será más efectiva.

Con ellas comprobamos la presencia de sustancias como lo son: Glicósidos Saponínicos, Taninos y Carbohidratos.

5.2 Determinación de la cantidad de sólido (extractos secos) obtenido de la evaporación del extracto de acetato de etilo para elaborar las tinturas a las diversas concentraciones (5%, 15% y 30%).

La cantidad obtenida de sólido (extractos secos) a partir de la evaporación del solvente por medio del equipo de rotavapor (dato obtenido del Extracto de Acetato de Etilo) fue: 7.5235g de muestra.

Expresar en gramo por mililitro de extracto:

$$\left[ \right] = \frac{7.5235g}{25ml} = 0.30094g/mL \approx 0.30g/mL$$

$$\begin{aligned} 0.30g &\rightarrow 1mL \\ x &\rightarrow 100mL \end{aligned}$$

$$x = 30 \% \text{ (porcentaje peso / volumen)}$$

por lo tanto:

7.5235 g están disueltos en 25 ml de alcohol 90%

Esta tintura estaría al 30% que se tomara como tintura madre de la cual se partirá para preparar las tinturas 15% y 5% mediante la siguiente formula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

### Preparación de la tintura al 15%

Datos:

$$C_1 = 30\%$$

$V_1 = x$  (Volumen necesario de la tintura madre para preparar la tintura al 15%)

$$C_2 = 15\%$$

$$V_2 = 20.0 \text{ ml}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(15\%)(20\text{mL})}{(30\%)} = 10\text{mL} \text{ de tintura madre}$$

llevar a volumen de 20.0 ml aforando con etanol 90%

### Preparación de la tintura al 5%

Datos:

$$C_1 = 15\%$$

$V_1 = x$  (Volumen necesario de la tintura al 15% para preparar la tintura al 5%)

$$C_2 = 5\%$$

$$V_2 = 20.0 \text{ ml}$$

$$V_1 = \frac{(5\%)(20\text{mL})}{(15\%)} = 6.6 \approx 7\text{mL}$$

llevar a volumen de 20.0 ml con etanol 90%

Este método se basa en conocer la concentración de la tintura madre de la cual se toman alícuotas para preparar las tinturas deseadas. En nuestro caso la tintura madre es al 30% tomando de esta solución una alícuota para preparar la tinturas al 15% y 5%, mediante la fórmula de Dilución  $C_1V_1=C_2V_2$  en donde:

$C_1$ = concentración de la tintura madre.

$V_1$ = Volumen que se necesita de tintura madre para preparar la tintura al 15%.

$C_2$ = concentración de la tintura a la que se quiere llegar (tintura al 5%).

$V_2$ = Volumen deseado.

### 5.3 Resultados de la evaluación antifúngica.

#### 5.3.1 Pruebas de identificación del hongo *Aspergillus niger*

Tabla N° 3. Morfología Macroscópica y Microscópica del hongo *Aspergillus niger* (Ver Anexo 2).

PRUEBA	RESULTADO
Características microscópicas	Las vesículas están cubiertas con una bola gruesa de esporas que surgen de toda la superficie Prueba ( + )
Características macroscópicas	En Agar Sabouraud: las colonias se observan con un efecto de sal y pimienta, con la superficie cubierta con esporas negras. El reverso de la colonia permanece con un color tostado claro, lo que diferencia al <i>Aspergillus niger</i> de los demás hongos Prueba ( + )

Las dos pruebas de identificación realizadas resultaron positivas. En base a la morfología de las colonias, se puede comprobar la identificación del hongo *Aspergillus niger* no se detectó la presencia de otro hongo dentro de las placas, por lo que se afirma que la cepa analizada es pura.

### 5.3.2 Resultado de la evaluación antifúngica, método de Kirby Bauer.

Tabla N° 4. Resultado de la Evaluación Antifúngica de la Tintura al 30% del Extracto de Acetato de Etilo del Matial en el hongo ***Aspergillus niger***

Concentración de la Tintura	Lectura de las placas
Tintura al 30%	Hay formación de halos definidos hay inhibición del hongo. MO Sensible (25 mm-29 mm)
Tintura al 15%	No hay formación de halos definidos no hay inhibición del hongo. MO Resistente
Tintura al 5%	No hay formación de halos definidos no hay inhibición del hongo. MO Resistente
Patrón : Tintura yodo 2 %	Inhibición en toda la placa. MO Sensible
Blanco : Alcohol etílico al 90%	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO Resistente

En la evaluación antifúngica por el método de Kirby Bauer Modificado, se observó que el hongo es sensible en las placas donde se encontraba la tintura al 30% preparada a partir del extracto de acetato de etilo, ya que se observó la formación de halos definidos de 25 a 29 mm con el tamaño requerido para afirmar que el hongo es sensible a esta concentración, no así las tinturas cuyas

concentraciones de 15% y 5% que no inhibieron al hongo ***Aspergillus niger*** , se observó resistencia por parte del hongo por el crecimiento en toda la placa y no hubo formación de ningún halo de inhibición.

Se llevó al mismo tiempo un blanco con el objetivo de asegurar que no es el alcohol al 90% el que ejerce el efecto inhibitorio en el hongo; se observó un crecimiento en toda la placa.

El patrón se hizo con el objetivo de compararlo con las tinturas en prueba, se observó una inhibición del hongo en toda la placa.

Resultados de la evaluación antifúngica de las tinturas preparadas a partir del extracto de Acetato de Etilo

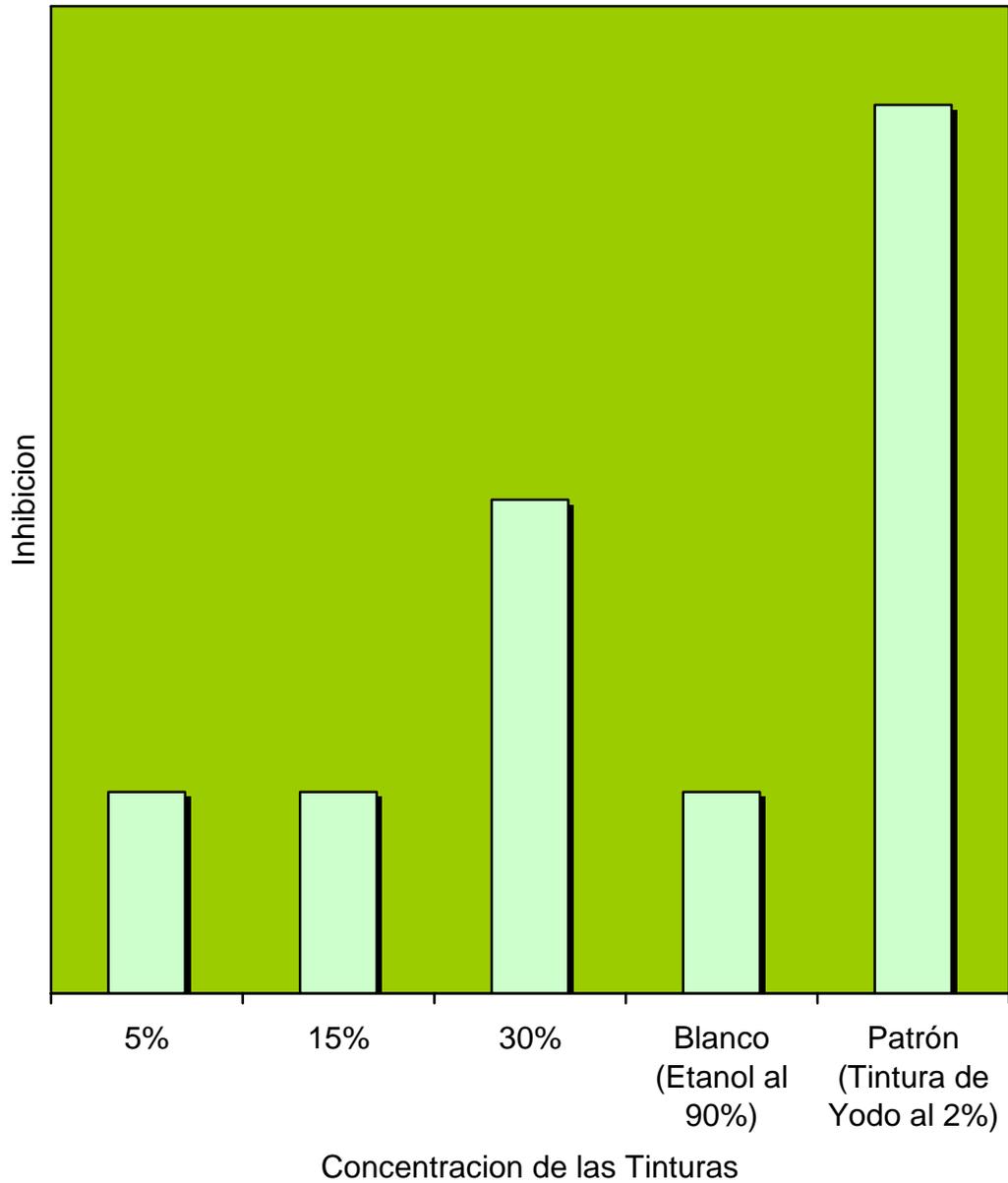


Figura N<sup>a</sup> 3. Gráfico de los resultados de la evaluación antifúngica de las tinturas preparadas a partir del acetato de etilo.

CAPITULO IV  
CONCLUSIONES

## 6.0 CONCLUSIONES

1. En los análisis fitoquímicos preliminares de color y precipitación realizados al extracto acuoso, clorofórmico y acetato de etilo de la especie vegetal *Pereskia autumnalis* (Matial), se determinó la presencia de: Glicósidos Saponínicos, Carbohidratos y Taninos.
2. En la evaluación microbiológica de las tinturas preparada a partir del extracto de acetato de etilo, resulta sensible la tintura al 30% obteniéndose mayores halos de inhibición, siendo esta la más efectiva por encontrarse en mayor cantidad los principios activos.
3. El efecto antifúngico del extracto del Matial se debe a que este contiene Saponinas, Taninos y Carbohidratos, estas sustancias ejercen un sinergismo para poder llevar a cabo la actividad antimicótica.
4. El hongo *Aspergillus niger* resulta resistente frente al blanco lo que indica que el efecto antifúngico es debido a las sustancias extraídas del Matial y no al alcohol etílico 90 %.
5. Los datos obtenidos en la investigación permiten hacer una contribución en el área de la Salud Pública, específicamente en Atención Primaria en

Salud, debido a que puede ser utilizado como materia prima para fabricar preparaciones farmacéuticas a partir de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial), dando así una alternativa a la población, para el tratamiento de patologías causadas por este hongo que se han estudiado.

6. Los extractos clorofórmico y acuoso se descartaron debido a que las pruebas fitoquímicas preliminares no dieron resultados positivos, por lo tanto no se prepararon las tinturas a partir de estos extractos y no se realizó las pruebas microbiológicas.

CAPITULO VII  
RECOMENDACIONES

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones Fármaco-Toxicológicas así como también análisis cuantitativos y cualitativos del extracto de acetato de etilo de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial) para poder utilizarse como materia prima y formular un producto farmacéutico de buena calidad que brinde beneficios a la población.
2. Fomentar el cultivo de esta especie vegetal debido a que esta posee un gran potencial agroindustrial y es fuente de compuestos químicos que puedan ser materia prima en la elaboración de nuevos productos farmacéuticos.
3. Ampliar la investigación del extracto acetato de etilo de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial) sobre otros hongos de interés clínico y así poder ampliar su utilización para diferentes afecciones.
4. Investigar nuevas propiedades del extracto de acetato de etilo de la ***Pereskia autumnalis*** (Matial), debido a que se encontraron importantes sustancias: Saponinas, Taninos y Carbohidratos.

5. Separar y purificar los componentes del extracto que proporcionan la actividad antifúngica, además de caracterizar la estructura de los compuestos activos mediante técnicas espectrofotométricas.
  
6. Emplear el extracto etanólico del Matial obtenida directamente del Soxhlet, ya que hay mayor concentración de metabolitos.
  
7. Aplicar un método en frío de extracción para que los metabolitos de la planta en investigación no se degraden, un ejemplo de ello, la maceración.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Branson, D. 1976. Métodos en Bacteriología Clínica. Buenos Aires. Argentina. Editorial Médica Panamericana. 104-105 p.
2. Contreras L. 1996. Evaluación Microbiológica de Desinfectantes Elaborados en El Salvador y comercializados en el Área Metropolitana; por los Métodos Fenólico y Kirby Bauer Modificado. Trabajo de Graduación Química y Farmacia. San Salvador. El Salvador. Universidad de El Salvador. 54,56 p.
3. Domínguez, X. A. 1963 "Métodos de Investigación Fitoquímica". primera Edición. Editorial Limusa. México D.F. 149-153p.
4. Evans, W. C. Trease, G. E. 1991. Farmacognosia.13 Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. 519-540 p.
5. Flores, J. S. 1980. Tipos de Vegetación de El Salvador y su estado actual (Un Estudio Ecológico). 1ª edición. Editorial Universitaria. Universidad de El Salvador. 220 p.
6. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada III. Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental. Universidad de El Salvador. 2002
7. Facultad de Química y Farmacia. Manual para Laboratorio de Farmacognosia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. 2003.

8. Gennaro, R., Alfonso.1998. Remington. Tomo 2. 19 ed. Buenos Aires. Argentina. Editorial Medica Panamericana. 2333-2335 p.
9. Koneman, E. W. 1997. Diagnóstico Microbiológico. 3 Edición. Editorial Médica Panamericana. México D. F. 690p.
10. Lewenberger, B. E. 1986. Memoris of the New York Botanical Garden. Volumen 41. primera edición. Editorial The New York Botanical Garden. Bronx, New York. 76-83 p.
11. Lozano, C. y otros. 1981. Estudio Etnobotánico y Farmacognóstico de 15 especies medicinales de la Flora Salvadoreña de la zona Occidental del país. Trabajo de Graduación Química y Farmacia. San Salvador. El Salvador. Universidad de El Salvador. 73-77 p.
12. Merck. 1994. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt. Alemania. 144 p.
13. Moran R., J. C. 1989. Farmacotecnia y Galénica. 163-164,169-172 p.
14. Organización de los Estados Americanos (OEA)/ Universidad de El Salvador (UES)/ Ministerio de Salud Pública Y Asistencia Social (MSPAS). Obtención y Aprovechamiento de Extractos de Vegetales de La Flora Salvadoreña. Planter. Volumen 1. 1989. Editorial Universitaria, Universidad de El Salvador. 130 p.
15. Organización Mundial de la Salud. 1993 Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriología Clínica. Ginebra. Suiza. 125 p.
16. Ramos, A. 2003. Aspergilosis, invasión peligrosa en los pulmones. El Diario de Hoy, San Salvador, E.S. Marzo 30:38.

17. [bilbo.edu.uy](http://bilbo.edu.uy)
18. [www.microbe.org](http://www.microbe.org)
19. [www.sameens.dia.uned.es](http://www.sameens.dia.uned.es)
20. [www.tecnologiarossi.com.ar](http://www.tecnologiarossi.com.ar)
21. [www.seimc.org/control/revi\\_Mico/asperguillus](http://www.seimc.org/control/revi_Mico/asperguillus)
22. [www.univalle.edu/investigaci3n/journal2/pag10](http://www.univalle.edu/investigaci3n/journal2/pag10)
23. [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)
24. [www.sciencedirect.com/science](http://www.sciencedirect.com/science)

ANEXOS

ANEXO N° 1

HOJA Y TALLO



FLOR

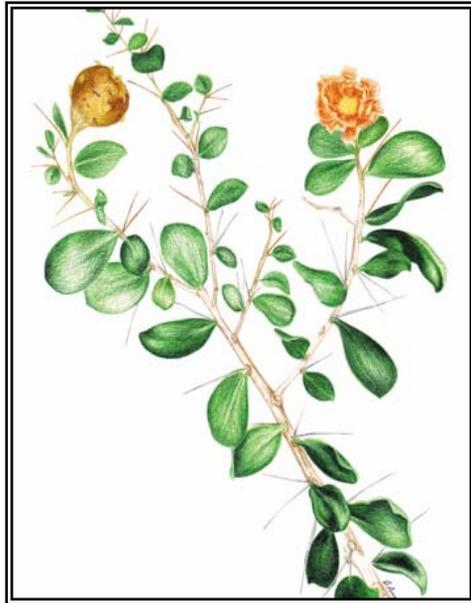


Figura N° 4 Fotografías de la *Pereskia autumnalis* (Matial)

ANEXO N° 2

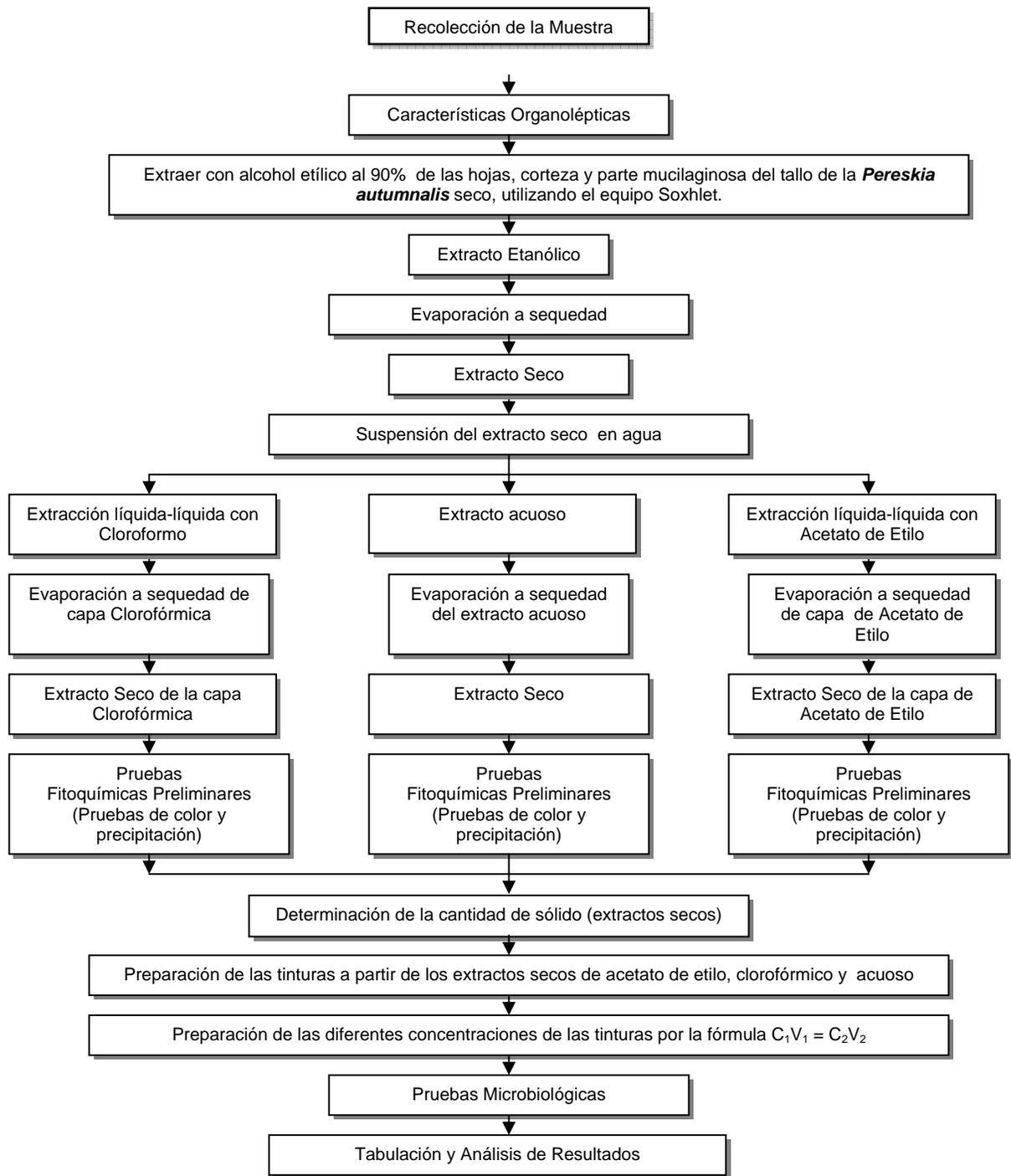


Figura N° 5 Técnica General de Trabajo

ANEXO Nº 3

EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS  
ACUOSO, CLOROFÓRMICO Y ACETATO DE ETILO



Figura N° 6

Aparato Soxhlet

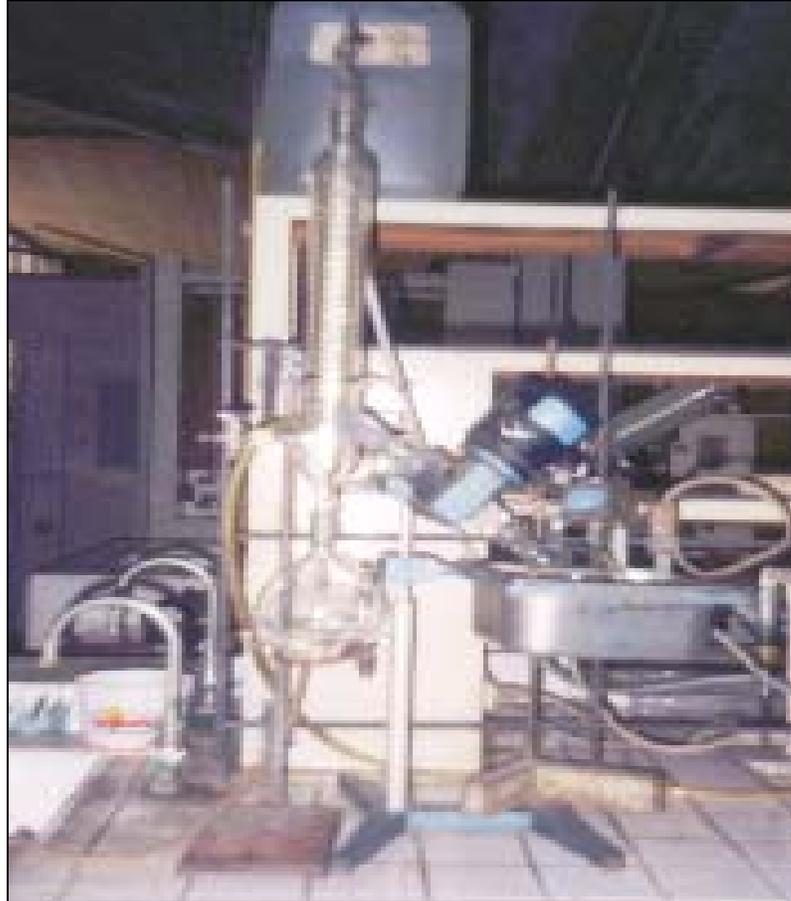


Figura Nº 7

Aparato de Rotavapor

ANEXO N° 4

CUADRO N° 1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL

HONGO *Aspergillus niger*

MORFOLOGIA MACROSCOPICA	MORFOLOGIA MICROSCOPICA
<p>Las colonias inicialmente están cubiertas con un micelio aéreo blanco, velloso. A medida que la colonia madura, se observa un efecto de sal y pimienta, con la superficie finalmente cubierta con esporas negras. El reverso de la colonia permanece con un color tostado claro, lo que diferencia al <i>Aspergillus niger</i> de los demás hongos.</p> 	<p>Las hifas son hialinas y con tabiques netos. Los conidióforos son largos y habitualmente no se observan las vesículas porque están cubiertas con una bola gruesa de esporas que surgen de toda la superficie. Cuando las vesículas pueden observarse, la posición inferior de la superficie es cóncava, como un hongo. Las esporas son esféricas de 2<math>\mu</math> a 3<math>\mu</math> de color negro.</p> 

ANEXO N° 5

CUADRO Nº 2 PRUEBAS FITOQUIMICAS

Sustancia	Prueba	Procedimiento	Resultado
Glicósidos saponínicos	Prueba de Liebermann Buchard	10 ml de extracto + 5 ml H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluido. Hervir 10 min. y enfriar. Extracto + 20 ml CHCL <sub>13</sub> y agitar. Concentrar hasta 2 ml el extracto clorofórmico y agregar 1 ml de anhídrido acético + 3 gotas H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [ ]	Saponinas esferoidales: coloración violeta. Saponinas triterpenoides: coloración verdosa
	Prueba de Salkowski	3 ml de extracto + 5 gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> [ ] gota a gota por las paredes	Cambio se color inmediato o gradual. Formación de un anillo de color rojo
	Método de la espuma	1 gramo de muestra + 5 ml de H <sub>2</sub> O destilada. Agitar 30 min. y dejar reposar	Formación de espuma de 3 cm arriba de la superficie del líquido que persiste por más de 10 min.
Glicósidos flavonoides	Prueba de Shinoda	5 ml de extracto + trocito de Mg + 1 ml HCl [ ]	Coloración anaranjada-roja, roja o azulosa
Glicósidos antraquinónicos	Prueba de Borntrager	Evaporar a sequedad 15 ml de extracto + 30 ml de H <sub>2</sub> O destilada. Filtrar. Extracto + 10 ml Benceno. Agitar. Tomar capa bencénica y agregar 5 ml de amoníaco	Coloración roja, rosa o violeta

CUADRO N° 2 CONTINUACION

Sustancia	Prueba	Procedimiento	Resultado
Taninos	Cloruro férrico	2 ml de extracto + 3 gotas de cloruro férrico	Coloración negro azulado o verdoso
	Solución de gelatina	2 ml de extracto + 2 ml de solución de gelatina	Precipitado beige
	Solución de cafeína	2 ml de extracto + 2ml de solución de cafeína	Turbidez
	Subacetato de plomo	2 ml de extracto + 2ml de subacetato de plomo	Precipitado coloidal beige
	Dicromato de potasio	2 ml de extracto + 2ml de Dicromato de potasio	Precipitado café pardo
	Clorhidrato de quinina	2 ml de extracto + 2ml de clorhidrato de quinina	Precipitado beige
	Agua de bromo	2 ml de extracto + 3 gotas de agua de bromo	Pirogalotaninos no precipitan. Catecólicos si precipitan
Sesquiterpenlactonas	Prueba de legal	2 ml de extracto + 3 gotas de piridina + 5 gotas de nitroprusiato de sodio al 0.5% + 5 gotas de NaOH 2N	Coloración rosa
	Prueba de Beljet	2 ml de extracto + 4 gotas de reactivo formado por volúmenes iguales de solución A (ácido pícrico en Sln. Etanólica) y solución B (hidróxido de sodio en Sln. Acuosa)	Coloración anaranjada o rojo oscuro

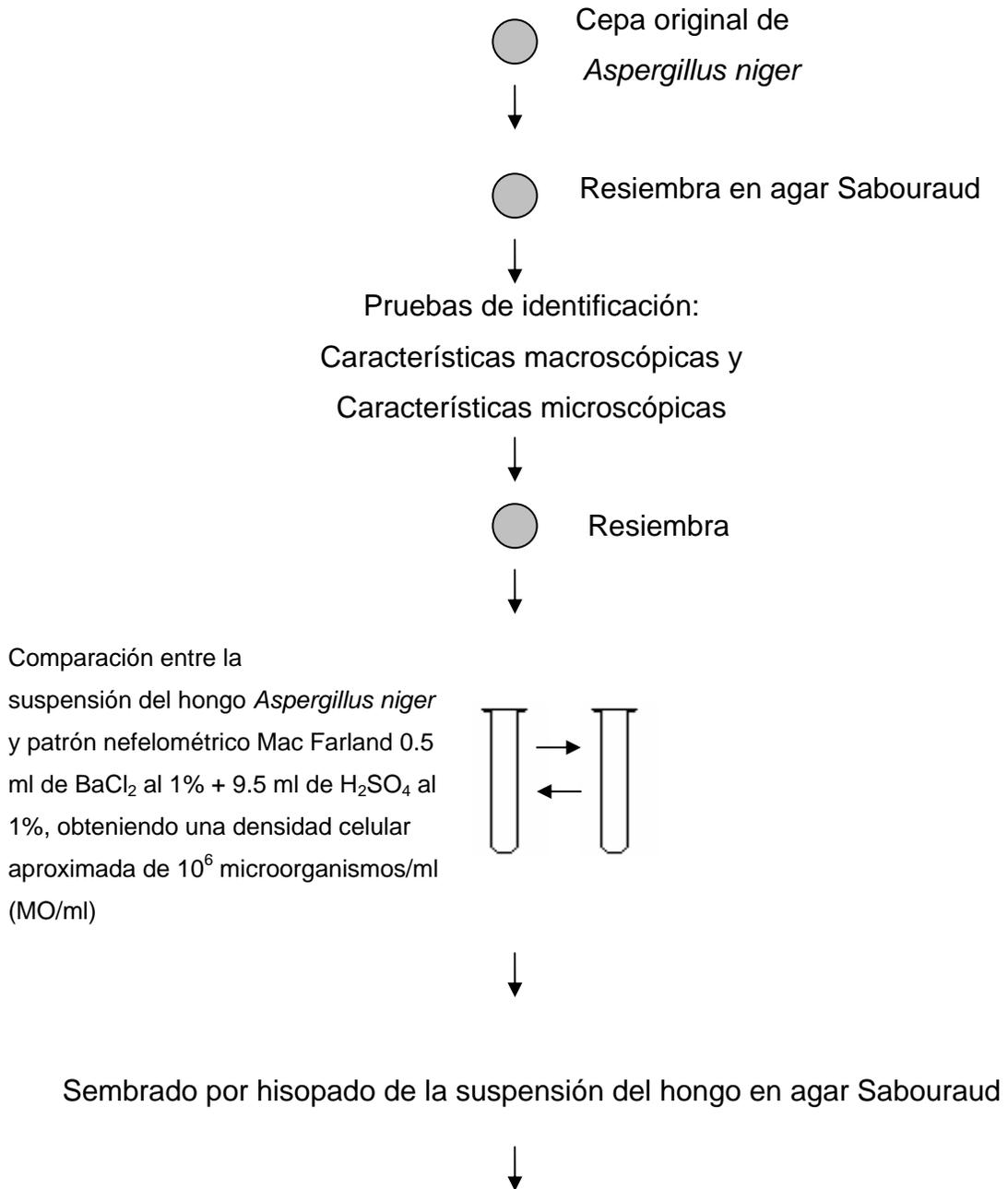
CUADRO N° 2 CONTINUACION

Sustancia	Prueba	Procedimiento	Resultado
Carbohidratos	Prueba de Fehling	2 ml de Extracto + 2 ml de Fehling A + 2 ml de Fehling B y calentar suavemente	Coloración anaranjada rojiza
	Prueba de Benedict	2 ml de extracto + 2 ml de reactivo de Benedict	precipitado amarillo
Glicósidos cardiotónicos	Prueba de Legal	Llevar a sequedad 1-3 ml de extracto. Agregar 3 gota de Piridina, 2 gotas de nitoprusiato de sodio al 0.5% y 3 gotas de NaOH 2N	Color rojo intenso
	Prueba de Keller Killiani	Evaporar a sequedad 2 ml de extracto. Agregar 2 ml de reactivo de Keller y con cuidado gotas del reactivo de Killiani	Coloración roja
	Prueba de Kedde	Evaporar en baño de maría 2 ml de extracto agregar 2 ml de alcohol, 1 ml de sln alcohólica de NaOH 1N y 2 ml de sln de ácido 3,5-dinitrobenzoico en etanol al 2%	Coloración púrpura
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	Agregar gotas del reactivo de Dragendorff a 2 ml del extracto	Coloración anaranjada
	Reactivo de Mayer	Agregar gotas del reactivo de Mayer a 2 ml del extracto	Coloración púrpura
	Reactivo de Wagner	Agregar gotas de reactivo de Wagner a 2 ml del extracto	Coloración marrón

ANEXO N° 6

# ESQUEMA DEL METODO KIRBY BAUER MODIFICADO

## PROCEDIMIENTO PARA LAS TINTURAS



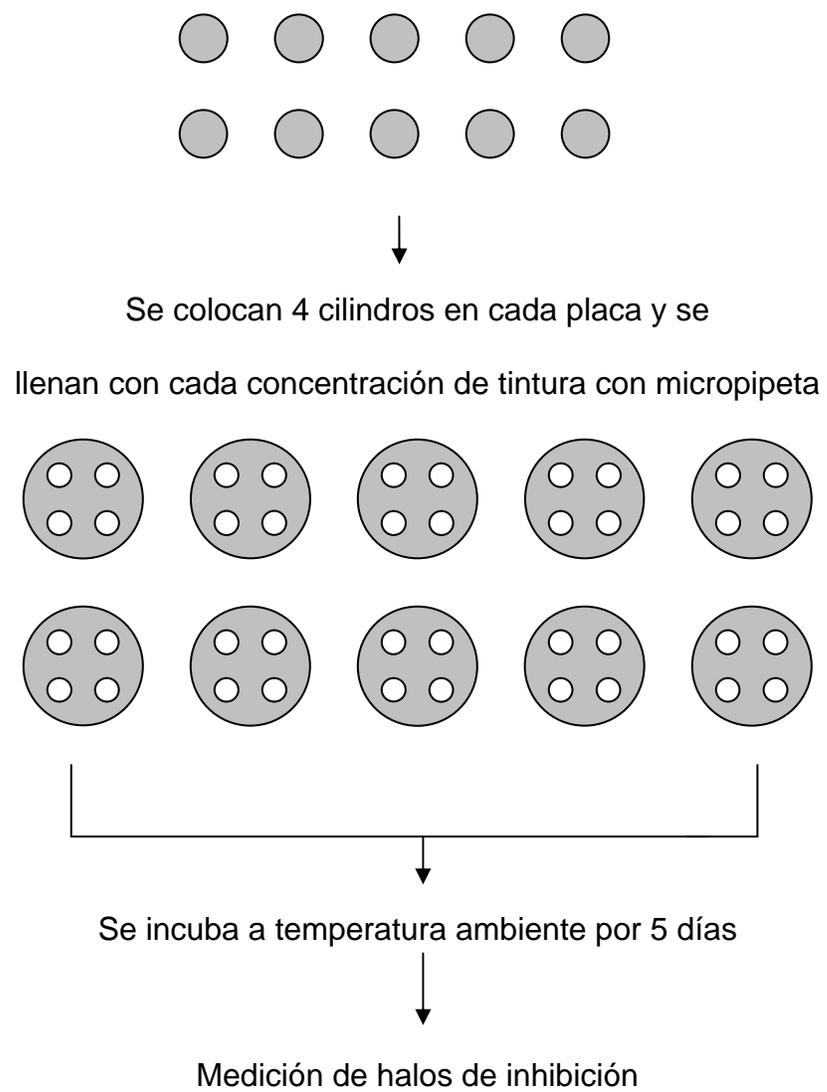
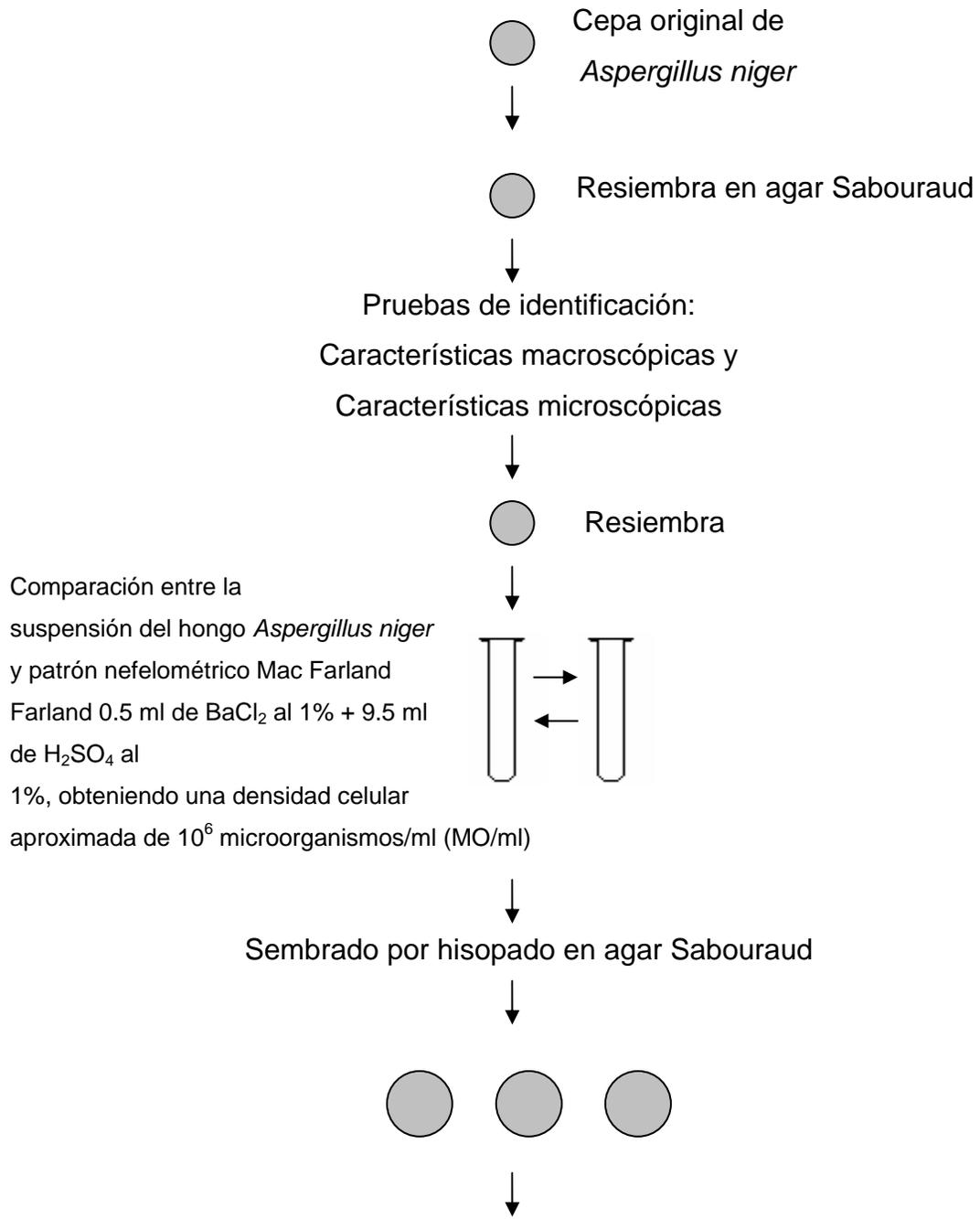


Figura Nº 8 Esquema del Método Kirby Bauer Modificado, para las tinturas

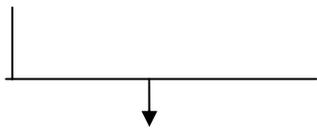
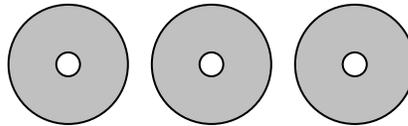
## PROCEDIMIENTO PARA EL PATRÓN Y EL BLANCO



Se coloca un cilindro en el centro de la placa.



Se llena con tintura de Yodo al 2% y  
en otras tres placas con el blanco de Alcohol.



Incubación a temperatura ambiente por 5 días



Medición de los halos de inhibición

Figura N° 9 Esquema del Método Kirby Bauer Modificado, para el patrón y el blanco.

ANEXO N° 7

## ESQUEMA DE PREFORMULACION DE TINTURAS

Sólido obtenido del extracto de Acetato de Etilo  
mediante el Rotavapor que se disuelve en alcohol al 90%  
(Tintura Madre 30%)



Se toma una alícuota de la tintura Madre para preparar las Tinturas al 15% y  
5% a partir de la formula

$$C_1V_1 = C_2V_2$$



$C_1$ = Tintura Madre 30%  
 $V_1$ = x (Volumen necesario  
de la Tintura Madre)  
 $C_2$ = Concentración Tintura  
al 15%  
 $V_2$ = Volumen deseado de la  
Tintura al 15% para  
realizar las pruebas  
microbiológicas

$C_1$ = Tintura al 15%  
 $V_1$ = x (Volumen necesario  
de la Tintura al 15%)  
 $C_2$ = Concentración Tintura  
al 5%  
 $V_2$ = Volumen deseado de la  
Tintura al 5% para  
realizar las pruebas  
microbiológicas

Figura N° 10 Esquema de Preformulación de Tinturas.

ANEXO N° 8



Figura N° 11

Comprobación antifúngica de la tintura al 30 % de Acetato de Etilo (formación de halos de inhibición hongo sensible)

ANEXO N° 9

## Material

- \* Cajas de petri
- \* Erlenmeyer
- \* Pipetas Morh
- \* Pipeteadores
- \* Pinzas
- \* Micropipetas
- \* Hisopos estériles
- \* Gradilla para tubos de ensayo
- \* Cilindros de acero inoxidable
- \* Beakers
- \* Tubos de ensayo
- \* Agitadores
- \* Mortero y pistilo
- \* Vidrio de reloj
- \* Kitasato
- \* Tubos de ensayo con rosca estériles
- \* Termómetro
- \* Embudo de separación
- \* Soporte

- \* Pinzas de sostén
- \* Pinzas de extensión
- \* Aro metálico
- \* Malla de asbesto

### Equipo

- \* Hot Plate Fisher : modelo – 75h , serie 57101947
- \* Estufa Thelco: modelo 3542, serie 21 – AF – 10
- \* Molino eléctrico
- \* Flash Evaporator. Buchler, instrument, modelo 50 – 60 cy, serie 4865445
- \* Xoxhlet
- \* Autoclave: de vapor húmedo, webeco 1978, serie 72244. de aire seco, presión, modelo 25EG, serie 9903 – 005.
- \* Balanza Analítica Mettler : modelo PM 400, serie SNR 1243297

### Reactivos

- \* Ácido sulfúrico diluido
- \* Ácido sulfúrico concentrado
- \* Cloroformo
- \* Acetato de etilo
- \* Alcohol etílico

- \* Benceno
- \* Amoníaco
- \* Cloruro férrico al 5%
- \* Subacetato de plomo al 5%
- \* Dicromato de potasio al 5%
- \* Clorhidrato de quinina al 5%
- \* Agua de bromo al 2%
- \* Piridina
- \* Nitroprusiato de sodio 0.5%
- \* Hidróxido de sodio 1N
- \* Ácido clorhídrico concentrado
- \* Fehling A
- \* Fehling B
- \* Benedict
- \* Keller Killiani
- \* Solución de ácido 3,5-dinitrobenzoico
- \* Dragendorff
- \* Meyer
- \* Wagner
- \* Baljet
- \* Solución de gelatina al 2%
- \* Solución de cafeína al 10%
- \* Tiras de Magnesio