

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



**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS
FRACCIONES OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA
(*n*- HEXANO: AcOEt 10%, 30% Y 50%) PROCEDENTES DEL EXTRACTO
DICLOROMETÁNICO DE LA GOMA-RESINA DE *Eucalyptus citriodora*
(EUCALIPTO)**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
MIRNA DEL CARMEN ALAS GALDAMEZ
JOSÉ ANGELINO PINTO FLORES**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA**

JUNIO 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. Maria 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

Coordinación General

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Área de Aprovechamientos de Recursos Naturales

Licda. Arely Cáceres Magaña

Asesora de Área de Microbiología

MSc. Coralia González de Díaz

Docentes Directores

Dr. Marvin J. Núñez

MSc. Maria Evelyn Sánchez de Ramos

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de graduación no sería hoy en día una realidad sin la ayuda desinteresada y el trabajo de muchas personas, a las que queremos agradecer sinceramente su colaboración. A nuestros docentes directores, Dr. Marvin J. Núñez, MSc. Maria Evelyn Sánchez de Ramos e Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda, por toda la ayuda, paciencia, tiempo y apoyo. Por brindarnos la oportunidad de trabajar con ellos, de compartir sus conocimientos científicos y su amistad. A la coordinadora general y coordinadoras de área, Licda. Maria Odette Rauda, Licda. Arely Cáceres y MSc. Coralia de Díaz, por ser objetivas en sus evaluaciones, por su tiempo y dedicación en el desarrollo y culminación del presente trabajo. Damos también las gracias a la Lic. Sulimar Girón Ramos, Zandra de Fuentes y compañeras por la ayuda prestada en los instantes iniciales de esta tesis, asimismo queremos agradecer a Licda. Amy Morán, Licdo. Raúl Rodríguez, Juan José Rivas, Licda. Doris Gomes, Licdo. Omar Aguilar, por los consejos brindados sobre algunas técnicas de laboratorio utilizadas, así como también Ing. Mario Rivera, por sus consejos, ánimos, ayuda y conocimientos en el área de sistemas. A los amigos (as) que hemos conocido en todos estos años y con los que hemos compartido trabajo y amistad. Y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron en esta investigación. Nuestros más sinceros agradecimientos.

Mirna y José

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN MARIA: por haberme brindado la sabiduría y entendimiento durante todos estos años, colmado de muchas bendiciones y permitido culminar una meta más en mis estudios.

A MI MADRE ALICIA VIUDA DE ALAS: por el sacrificio de todos estos años, por ser siempre mi apoyo, por darme su amor, comprensión y preocupación para que pudiera llegar este momento.

A MI ESPOSO ENRIQUE: por su amor, paciencia y apoyo incondicional, por ser la persona que supo motivarme en mis momentos de flaqueza para seguir adelante y para alcanzar mis metas.

A MIS HERMANOS: Marlene, Martha y Alfonso, a ellos muchas gracias por toda la ayuda y apoyo que siempre me han brindado.

A MI COMPAÑERO: José Pinto por su amistad, por toda la paciencia, apoyo y ayuda en la realización de este trabajo.

A TODOS MIS FAMILIARES Y AMIGOS (AS): que de una u otra forma estuvieron conmigo apoyándome y ayudándome.

SINCERAMENTE: Mirna Alas Galdámez

DEDICATORIA

El temor de Jehová es el principio de la Sabiduría. Y el conocimiento del Santísimo es la inteligencia. Proverbios 9: 10

PRIMERO A DIOS: en quien todo es posible, en Él encontré la sabiduría y entendimiento, fue Él quien me dio la fortaleza y paciencia, para poder culminar mi carrera.

A MI MADRE ROSA ELVIA FIGUEROA PINTO: por estar allí con sus consejos oportunos, su amor incondicional y sus oraciones que han llegado a rasgar la misericordia de Dios.

A MIS HERMANOS: MARISOL, ERNESTO, MARÍA LUISA por su respeto, cariño, apoyo y comprensión que cada uno me ha brindado de corazón.

A mi compañera MIRNA ALAS por formar parte elemental en la realización de esta tesis, así como también por su apoyo y amistad.

A MIS HIJOS: STEVEN ERNESTO, MARÍA GABRIELA, XIOMARA CAROLINA, que han sido un motor en mi vida para luchar y nunca darme por vencido.

Personas importantes: que fueron parte esencial para realizar este trabajo: ABUELITA, TIOS Y TIAS, ALBA BEATRIZ CARRANZA y a cada uno de los docentes que formaron parte activa en mi formación académica, además a todo el personal administrativo y no administrativo de la facultad de QQ.FF. y demás personas, amigos(as) compañeros(as) que colaboraron con mi persona directa o indirecta. Gracias.

José Angelino Pinto Flores.

INDICE

	Páginas
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xviii
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	20
CAPITULO III	
3.0 Marco teórico	22
3.1 Generalidades del <i>Eucalyptus citriodora</i>	22
3.2 Exudados vegetales	30
3.3 Generalidades de los metabolitos secundarios	33
3.3.1 Antraquinonas	33
3.3.2 Flavonoides	35
3.3.3 Terpenos	37
3.3.3.1 Monoterpenos	38
3.3.3.2 Sesquiterpenos	39
3.3.3.3 Diterpenos	40
3.3.3.4 Triterpenos	40
3.3.4 Ácidos fenólicos	41

3.4 Generalidades de Resonancia Magnética Nuclear de Protón	44
3.5 Fraccionamiento Bioguiado	53
3.6 Generalidades de las cepas sometidas a bioensayo	54
3.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	54
3.6.2 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	56
3.6.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	58
3.7 Generalidades sobre cromatografía	60
3.7.1 Cromatografía en columna	62
3.8 Método de Difusión en Placa	64
CAPITULO IV	
4.0 Diseño metodológico	66
4.1 Tipo de estudio	66
4.2 Investigacion bibliográfica	66
4.3 Investigación de campo	67
4.4 Investigación de laboratorio	67
4.4.1 Características organolépticas	67
4.4.2 Parte experimental	67
4.4.2.1 Obtención del extracto etanólico	67
4.4.2.2 Obtención del extracto diclorometánico	68
4.4.2.3 Cromatografía en columna	68

4.4.3 Ensayos microbiológicos	70
4.4.3.1 Pruebas de identificación microbiológicas	70
4.4.3.2 Determinación del potencial de inhibición	72
4.4.3.3 Método cilindro en placa	72
4.4.3.4 Preparación de suspensión de microorganismo	72
4.4.3.5 Inoculación de placas	73
4.4.3.6 Inoculación con la solución prueba	73
CAPITULO V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	76
CAPITULO VI	
6.0 Conclusiones	123
CAPITULO VII	
7.0 Recomendaciones	126
8.0 Bibliografía	127
Glosario	131
Anexos	132

INDICE DE FIGURAS

Figura N°

- 1 Fotografía del árbol de *Eucalyptus citriodora*.
- 2 Metabolitos secundarios aislados de las hojas de *Eucalyptus citriodora*.
- 3 Metabolitos secundarios aislados de la corteza de *Eucalyptus citriodora*.
- 4 Fotografía de *Staphylococcus aureus*.
- 5 Fotografía de *Pseudomona aeruginosa*.
- 6 Fotografía de *Streptococcus pneumoniae*.
- 7 Fotografía de columna cromatográfica.
- 8 Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 10%.
- 9 Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30% de flavonoides (flavononas).
- 10 Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30% de flavonoides (chalconas).
- 11 Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30% de Triterpenos.
- 12 Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% de flavonoides (flavononas).
- 13 Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% de flavonoides (chalconas).
- 14 Fotografía de *Staphylococcus aureus* en Agar Bair-Parker.
- 15 Fotografía de *Staphylococcus aureus* en Agar Chapman.
- 16 Fotografía de *Staphylococcus aureus* en coloración al Gram.

- 17 Prueba de catalasa.
- 18 Prueba de coagulasa.
- 19 ***Pseudomona aeruginosa*** en Agar Cetrimide.
- 20 ***Pseudomona aeruginosa*** en coloración al Gram.
- 21 Prueba de Citrato.
- 22 ***Streptococcus pneumoniae*** en Agar Sangre.
- 23 ***Streptococcus pneumoniae*** en coloración al Gram.
- 24 Prueba de discos de Optoquin.
- 25 Resultados de la evaluación microbiológica de Kirby Bauer Modificado de ***Staphylococcus aureus***.
- 26 Resultados de la evaluación microbiológica de Kirby Bauer Modificado de ***Pseudomona aeruginosa***.
- 27 Resultados de la evaluación microbiológica de Kirby Bauer Modificado de ***Streptococcus pneumoniae***.
- 28 Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones de las fracciones de la goma-resina de ***Streptococcus pneumoniae***.
- 29 Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones de las fracciones de la goma-resina de ***Staphylococcus aureus***.
- 30 Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones de las fracciones de la goma-resina de ***Pseudomona aeruginosa***.
- 31 Árboles de ***Eucalyptus citriodora***.
- 32 Exudados de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora***.

- 33 Aparato soxhlet.
- 34 Aparato evaporador.
- 35 Diagrama de la metodología general del trabajo.
- 36 Esquema del fraccionamiento bioguiado.
- 37 Fotografía de fracciones obtenidas de la columna cromatográfica.
- 38 Fotografía de Diluciones.
- 39 Método de extensión.
- 40 Prueba rojo de metilo.
- 41 Prueba de Indol.
- 42 Prueba TSI.
- 43 Prueba de movilidad.
- 44 Prueba de Citrato.
- 45 Prueba de Oxidasa.
- 46 Prueba de Voges-Proskauer.
- 47 Preparación del Estándar Mac Farland.
- 48 Esquema del método Kirby Bauer Modificado.

INDICE DE CUADROS

Cuadros N°

- 1 Metabolitos secundarios aislados del *Eucalyptus citriodora*.
- 2 Desplazamiento químico a lo largo del espectro de RMN-¹H.
- 3 Desplazamiento más frecuentes de los protones de Antraquinonas.
- 4 Desplazamiento más frecuentes de los protones de Flavonoides.
- 5 Desplazamiento más frecuentes de los protones de Sesquiterpenos.
- 6 Desplazamiento más frecuentes de los protones de Triterpenos.
- 7 Desplazamiento más frecuentes de los protones de Diterpenos.
- 8 Desplazamiento más frecuentes de los protones de Ácidos cinámicos.
- 9 Morfología microscópica.
- 10 Pruebas de identificación microbiológicas.
- 11 Características organolépticas del extracto diclorometánico.
- 12 Datos de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 10%.
- 13 Datos de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30%.
- 14 Datos de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50%.
- 15 Pruebas de identificación del *Staphylococcus aureus*.
- 16 Características macroscópicas y microscópicas de *Pseudomona aeruginosa*.
- 17 Pruebas de identificación y diferenciación de *Pseudomona aeruginosa*.
- 18 Pruebas de identificación de *Streptococcus pneumoniae*.

- 19 Resultados de la evaluación microbiológica de ***Staphylococcus aureus***.
- 20 Resultados de la evaluación microbiológica de ***Pseudomona aeruginosa***.
- 21 Resultados de la evaluación microbiológica de ***Streptococcus pneumoniae***.
- 22 Características microscópicas de los microorganismos.
- 23 Pruebas de identificación y diferenciación de ***Staphylococcus aureus***.
- 24 Pruebas bioquímicas de ***Pseudomona aeruginosa***.
- 25 Pruebas de identificación y diferenciación del ***Streptococcus pneumoniae***.
- 26 Parámetros de referencia de los halos de inhibición.

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Fotografía del árbol de *Eucalyptus citriodora*.
- 2 Árbol de *Eucalyptus citriodora* exudando goma-resina.
- 3 Metodología general del trabajo.
- 4 Fraccionamiento bioguiado.
- 5 Fotografía de fracciones y diluciones obtenidas en la columna cromatográfica.
- 6 Pruebas microscópicas.
- 7 Características microscópicas de los microorganismos.
- 8 Pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus*.
- 9 Pruebas bioquímicas de *Pseudomona aeruginosa*.
- 10 Resultados de las pruebas bioquímicas de *Pseudomona aeruginosa*.
- 11 Pruebas de identificación y diferenciación *Streptococcus pneumoniae*.
- 12 Preparación del Estándar Mac Farland.
- 13 Método Kirby Bauer Modificado.
- 14 Normatizaciones interpretativas de los diámetros de las zonas de inhibición.
- 15 Preparación de medios de cultivo.
- 16 Preparación de las diluciones de las fracciones.
- 17 Materiales, equipo, reactivos y solventes

RESUMEN

El *Eucalyptus citriodora*, es una especie vegetal que posee diferentes usos, entre ellos y quizás uno de los mas importantes, es en la industria farmacéutica. Este árbol exuda una goma-resina a través de su tronco, está posee la propiedad antibacteriana, lo que promovió a continuar investigándola. Para ello se utilizó el equipo soxhlet, con el que se obtuvo el extracto etanólico de la goma-resina del eucalipto, del cual se parte para realizar la partición agua/diclorometano, el cual se utiliza para someterlo a una columna cromatográfica, en donde se obtienen las fracciones de 10%, 30% y 50%, con las cuales se determina la presencia de los metabolitos secundarios mediante Resonancia Magnética Nuclear de Protón.

Además se determinó la actividad antibacteriana de las diluciones de cada una de las fracciones, mediante el método microbiológico Kirby Bauer Modificado, utilizando las cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*.

Así mismo se utilizaron discos de antibióticos como patrones de comparación. De acuerdo a los resultados obtenidos se confirma la actividad antibacteriana del extracto diclorometano de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En la flora salvadoreña existe gran variedad de especies vegetales con propiedades antibacterianas, que son utilizadas por la población como una alternativa terapéutica. En el presente trabajo se tratará de contribuir a la investigación de las propiedades antibacteriana de la goma-resina exudada por el *Eucalyptus citriodora*, dándose continuidad al trabajo de graduación realizado sobre la “Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto diclorometano de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*”.

Para ello se realizó el método cromatográfico de columna, en donde se obtuvieron fracciones de 10%, 30% y 50%, a las cuales se les analizaron sus metabolitos secundarios, por medio de la interpretación de los espectros de RMN-¹H y se comprobará a través de ensayos *in Vitro*, la actividad antibacteriana, utilizando *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*, por medio del método microbiológico Kirby Bauer Modificado y así determinar la concentración inhibitoria a la cual actúa el extracto.

La importancia de dicha investigación radica en justificar la utilización de preparados vegetales y contribuir a la investigación de la flora medicinal en el país, fomentando así, el uso de esta especie vegetal como alternativa terapéutica en los casos de infecciones respiratorias y cutáneas causadas por dichos microorganismos y así aportar a la investigación científica en la búsqueda de nuevos fármacos antibacterianos.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna (*n*-hexano: AcOEt 10%, 30% y 50%) procedentes del extracto diclorometánico de la goma resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto).

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- 2.2.1. Obtener el extracto etanólico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***.
- 2.2.2. Realizar la partición líquida-líquida agua/diclorometano de la goma-resina de ***E. citriodora***.
- 2.2.3. Analizar e interpretar los espectros de RMN-¹H de las fracciones a ensayar.
- 2.2.4. Comprobar la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico por el Método Microbiológico Kirby Bauer Modificado, utilizando las bacterias ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0. MARCO TEÓRICO

3.1. GENERALIDADES DEL EUCALIPTO

Nombre común: Eucalipto limón.

Nombre científico: *Eucalyptus citriodora*.

Familia: Myrtaceae.

Subfamilia: Leptospermoideae.



Figura N°. 1. Árbol de *Eucalyptus citriodora*

Árbol de 25 a 40 metros de altura, con corteza que descama en largas láminas dejando al descubierto un tronco blanco o con ligera tonalidad azulada. Hojas juveniles opuestas, un poco peltadas, pecioladas, de oblongas a oblongo-lanceoladas con pilosidad abundante. Hojas adultas alternas, pecioladas, estrechamente lanceoladas y de 10-16 cm de longitud, 1-2 cm de anchura, las cuales se caracterizan por que al tocarlas poseen un agradable olor alimonado. Inflorescencias terminales corimbosas formadas por umbelas de 3-5 flores. Pedúnculos cilíndricos, opérculo hemisférico; ligeramente rostrado, más corto

que el tubo del receptáculo. Cápsula urceolada, pedicelada de 8-10 mm de diámetro, con valvas sin sobresalir. ⁽²⁷⁾

USOS

Antiséptico y antifúngico, tiene acción antiinflamatoria, antiespasmódica y antidiabética, se utiliza en los tratamientos de artritis inflamatoria y reumatoide. También es recomendado en caso de fiebre, tos, heridas y picaduras de insectos. ⁽¹⁵⁾

Las hojas se emplean como sudorífico, espasmódico, contra la gripe, los resfriados y procesos pulmonares como asma y bronquitis.

Aplicada externamente tiene efecto rubefaciente, antálgico, fungicida y repelente de mosquitos. ⁽²⁷⁾

OTROS USOS

Se utiliza la madera por ser fuerte, dura y tenaz en carruajes, tarimas, carpintería, etc. de la leña se prepara carbón industrial y se utiliza para obtener celulosa y pulpa de papel. Las hojas producen un aceite esencial el cual es rico en citronelol y muy utilizado en perfumería. ⁽²⁷⁾

TOXICIDAD

El citroneal encontrado en el *Eucalyptus citriodora* se reporta que es mutagénico. ⁽⁴⁵⁾



CONTENIDO QUÍMICO

CUADRO N^o. 1 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DEL *Eucalyptus citriodora*.⁽²⁶⁾

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

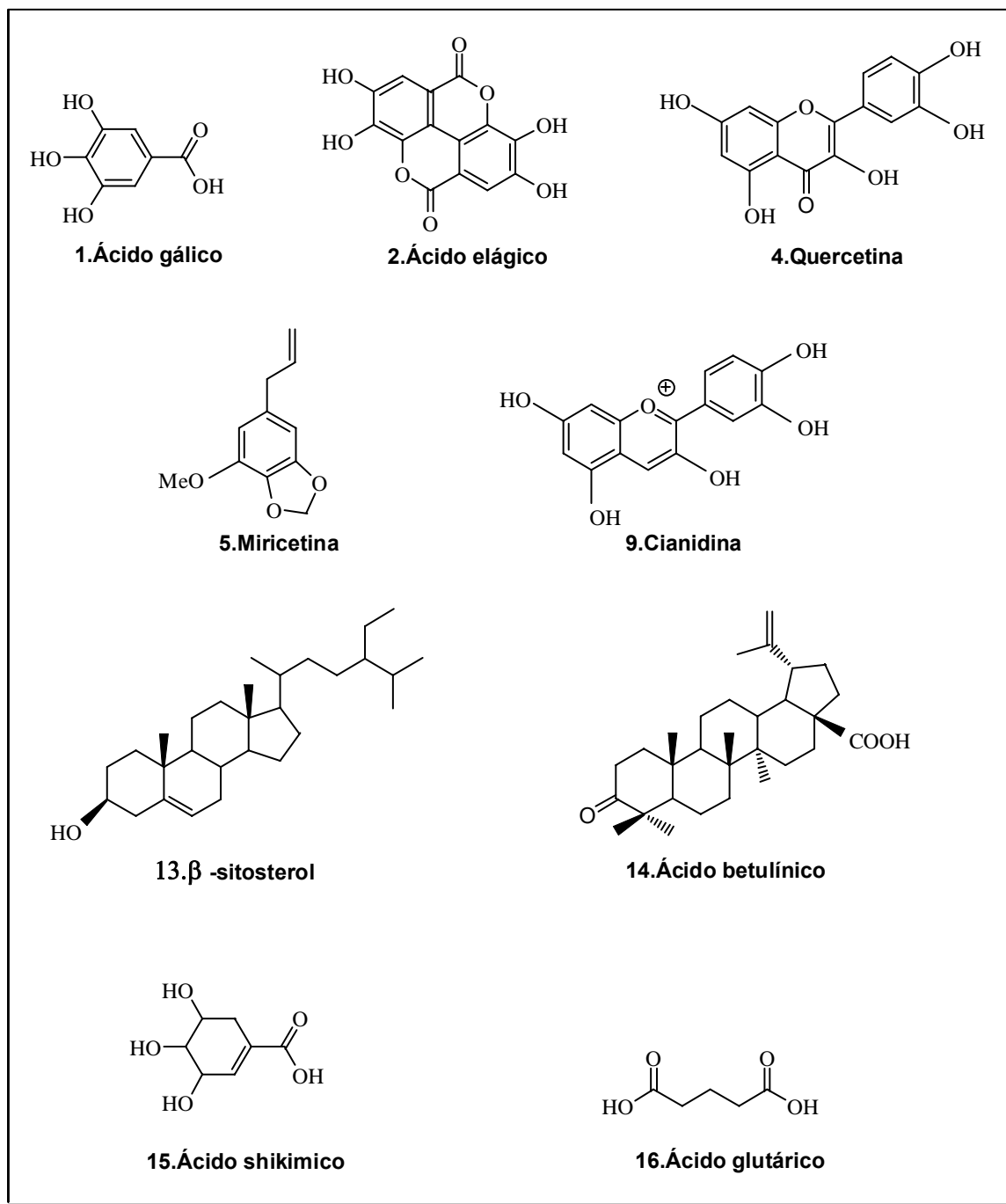


FIG. N^o 2 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS HOJAS DE *Eucalyptus citriodora*. (28)

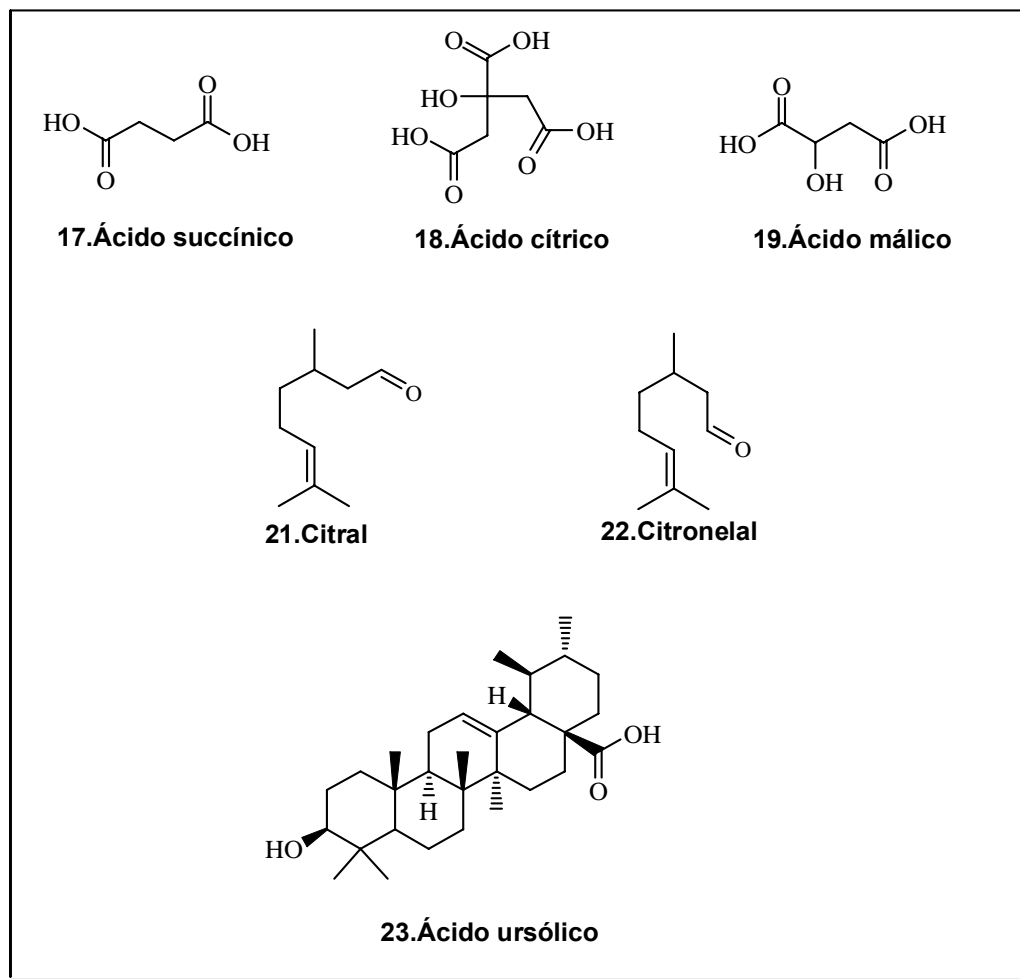


FIG. N^o 2 CONTINUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS HOJAS DE *Eucalyptus citriodora*. (28)

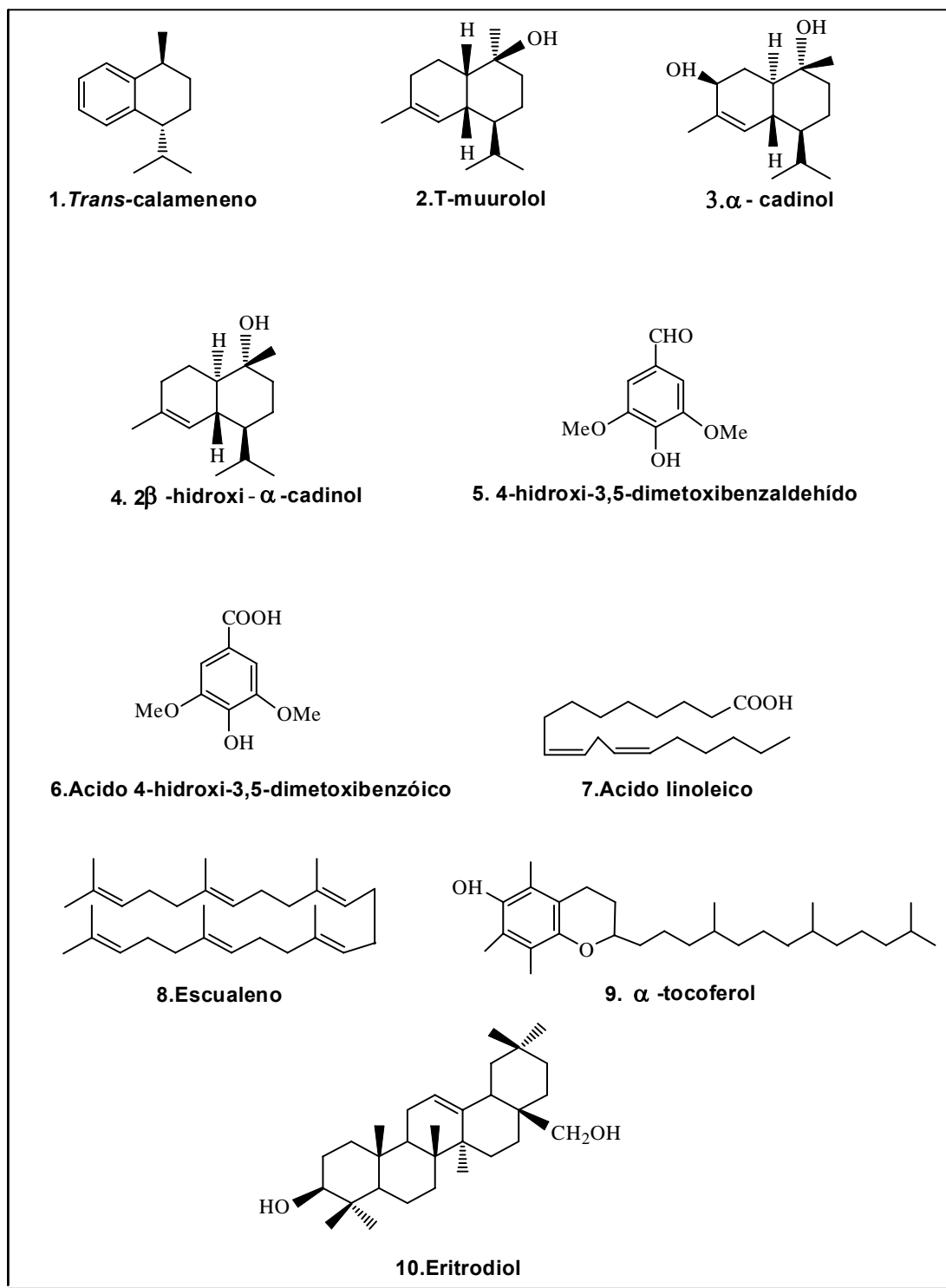


FIG. N^o 3 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE *Eucalyptus citriodora*. (28)

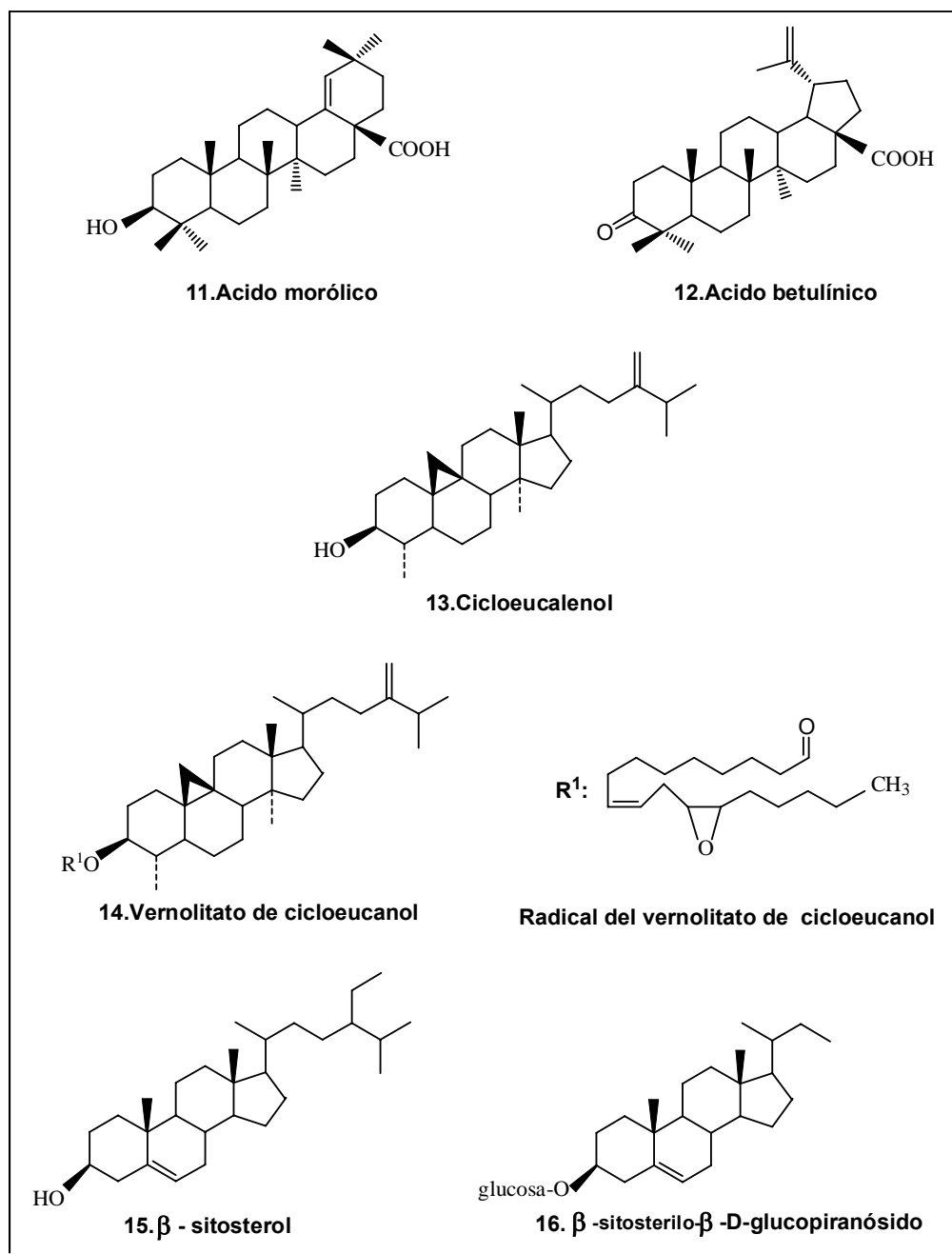


FIG. N^o 3 CONTINUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE *Eucalyptus citriodora*. ⁽²⁸⁾

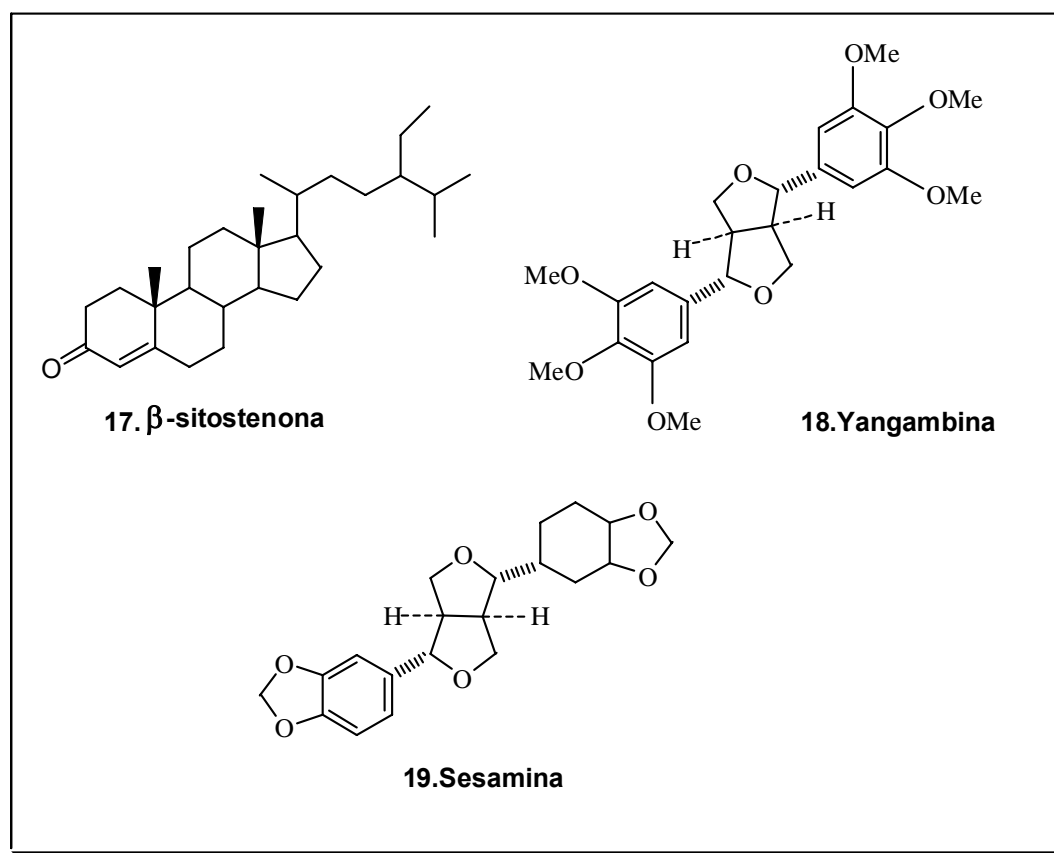


FIG. N^o 3 CONTINUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE *Eucalyptus citriodora*. ⁽²⁸⁾

3.2. EXUDADOS VEGETALES

Los exudados vegetales son producidos por células y liberados sobre las superficies de las plantas, usualmente como resultados de daños o infecciones de los tejidos vegetales incluyendo accidentes tales como rayos, incendios o condiciones ambientales extremas. ⁽³⁸⁾

Estos se han utilizado como aglutinantes en materiales de construcción, como lubricantes en instrumentos quirúrgicos, como estabilizador de vinos, como adhesivos dentales, como resina para cuerda de algunos instrumentos musicales o simplemente como objetos de belleza en joyería.

Los exudados incluyen a las resinas, gomas, goma-resina y látex.

RESINAS: Son mezclas naturales complejas, más o menos sólidas, amorfas, translúcidas y de fractura vítrea; se ablandan por calentamiento hasta fundirse. Son insolubles en agua y generalmente insolubles en éter de petróleo, solubles en etanol, cloroformo y éter etílico. Es frecuente encontrarlas mezcladas con aceites esenciales, oleorresinas y gomas. Están distribuidas en la familia de las Pináceas, Fabáceas, Apiáceas y Burseráceas. Histológicamente se encuentran localizadas en los canales secretores liberianos.

Las resinas son productos fisiológicos previamente formados, incrementándose su producción en el vegetal mediante lesiones de distinto tipo, siendo así su origen patológico.

Químicamente son mezclas complejas, muy heterogéneas, sin que exista una estructura general de grupo, puesto que los benzoatos, ácido cinámico, alcohol coniferilico, etc., además de los derivados diterpenicos.

El uso de las resinas en farmacia es bastante limitado, siendo de mayor interés a nivel industrial, se utiliza como laxante, antiséptico y expectorante, a nivel industrial se usa como fijador de perfumes.

GOMAS: Son mezclas de polisacáridos de alto peso molecular, están constituida por unidades de azúcar y ácido urónico. Estos complejos resultan de la unión de anhídridos condensados (xilana) con ácidos fermentos (oxidasa) y sustancias minerales (magnesio). Son insolubles en alcohol y se disuelven o hinchan en agua.

Las gomas son producidas por células parenquimáticas que provienen del cambium de las familias Fabáceas y Esterculiáceas. Su principal componente son los carbohidratos presentes como oligoelementos o polisacáridos. Normalmente no se encuentran componentes de hidrocarburos (terpenos). Generalmente se han utilizado en la industria alimenticia y como adhesivo.

Se concentran por desecación y son insolubles en disolventes orgánicos, lo que las diferencia de las resinas. ⁽³⁸⁾

GOMA–RESINA: Son mezclas de productos naturales, que contienen tanto componentes terpenoides como carbohidratos. Se obtienen por exudaciones espontáneas, incisiones o desecaciones. Son comúnmente producidas por la familia de la Umbelífera, Terebintáceas y Mirtáceas. Son parcialmente solubles en agua, alcohol, éter y cloroformo. Presenta a la vez las propiedades de las gomas y las resinas.

LÁTEX: Usualmente son fluidos lechosos, de color blanco que contienen en pequeñas gotas compuesto orgánico (poliisoprenos) suspendidos o dispersos en medio acuoso. El látex es producido de forma natural por medio de la goma elástica o caucho , que proviene de la especie ***Castilla elastica***, el cual es procesado como hule, que mediante enlaces cruzados con átomos de azufre genera un material más elástico y fuerte. Se encuentra constituido químicamente por agua, minerales, glúcidos, fenoles, taninos y grasas.

Son producidos por las células lactíferas de el parénquima y floema secundario de la familia Apocináceas, Asclepiadáceas, Euforbiáceas y Sapotáceas entre otras. ⁽³⁸⁾

3.3 GENERALIDADES SOBRE METABOLITOS SECUNDARIOS

3.3.1. ANTRAQUINONAS

Los compuestos antraquinónicos derivan del antraceno, núcleo formado por tres anillos bencénicos condensados en forma lineal. Desde el punto de vista Farmacognóstico el grupo más importante lo constituyen las antraquinonas, de estas derivan una serie de compuestos, de los cuales algunos de ellos poseen propiedades antimicrobianas, laxante y colorantes. Los derivados antraquinónicos se forman por la condensación de cabeza-cola de unidades de acetato, previa formación de un intermediario, el ácido poli- β -cetometileno, tras las correspondientes condensaciones intramoleculares. En la naturaleza los compuestos antraquinónicos se encuentran generalmente, en forma de heterósidos, siendo mínima la presencia de geninas. De acuerdo a la genina que presentan se pueden clasificar :

Monómeros: geninas oxidadas (antraquinonas) y geninas reducidas (antronas), que se encuentran como heterósidos.

Dímeros (diantronas): homodiantronas (formadas por dos moléculas iguales de antronas) y heterodiantrona (formada por dos moléculas diferentes de antronas).

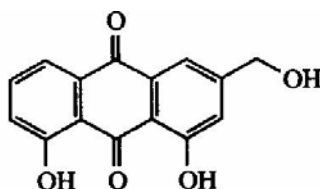
Los heterósidos son compuestos cristalinos de coloración rojo-anaranjado, no sublimables, soluble en agua y mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. Existen dos tipos de heterósidos, los O-heterósidos, que por hidrólisis originan geninas di, tri o tetraquinónicas y los

C-heterósidos, los cuales se hidrolizan con cloruro férrico. Se encuentran localizados en la familia de las Dicotiledóneas, Papilionáceas ,etc., sobre todo en la raíz, corteza y frutos.

Las geninas son compuestos cristalinos de color amarillo-anaranjado, sublimables, solubles en los disolventes orgánicos apolares e insolubles en agua. Se obtienen por la hidrólisis de los heterósidos y se encuentran en forma oxidada y reducida. Las antraquinonas se identifican por reacciones coloreadas como la de Bornträger.

Presentan actividad antibacteriana frente a ***Staphylococcus aureus***, ya que interfiere en la síntesis de RNA dependiente de el ADN. Además presentan actividad algunos derivados antracenicos contra hongos patógenos.

Los O-heterósidos y C-heterósidos presentan acción laxante, estimulan la musculatura lisa del intestino, produciendo peristaltismo, estos compuestos al llegar al colon son hidrolizados y reducidos a monoantronas por los β -glucosidasa y reductasa producidas por la flora intestinal. Además presentan propiedades colorantes , las cuales dependen de la posición que ocupen los grupos OH en su estructura antraquinonica: como el ácido carminico, ampliamente utilizado como colorante rojo. ⁽⁴⁵⁾



ALOE-EMODIN
Actividad laxante
Aloe vera

3.3.2. FLAVONOIDES

Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos entre ellos los flavonoides. Estos compuestos son productos de la ruta biosintética del ácido shikímico y acetato. Intervienen en los vegetales en la formación de pigmentos, en la defensa durante la interacción planta-patógeno, además causan la activación de los genes bacterianos implicados en la formación de nódulos y en la transformación de plantas.

Desde el punto de vista químico, los flavonoides son fenoles de tipo diarilpropano ($Ar-C_3-Ar$) unidos, la mayoría, a una cadena de azúcar; están constituidos por un anillo bencénico condensado a una γ -pirona, sustituida en posición 2(3) por un radical fenilo.

Dependiendo del grado de oxidación del anillo piránico central, pueden diferenciarse varios tipos: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas y auronas, entre otros. Dependiendo de las posiciones de los grupos hidroxilos, los flavonoides pueden estar libres o unidos a azúcares (L-ramnosa D-glucosa, etc.), siendo en su mayoría, O-heterósidos. También pueden

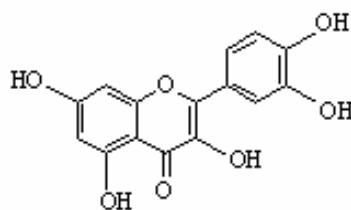
encontrarse como C-heterósidos, en cuyo caso el enlace se establece entre el carbono anomérico de el azúcar y el C₆ o C₈ de la genina.

Todos los flavonoides derivan sus esqueletos carbonados de dos compuestos básicos procedentes del metabolismo de los hidratos de carbono malonil CoA y un ester de CoA con un ácido hidroxicinámico (generalmente el 4-cumaroil CoA). Su formación tiene lugar por condensación de tres moléculas de malonil CoA con el 4-cumaroil CoA, catalizado por una chalcona sintetasa, el compuesto resultante (4,2,4,6-tetrahidroxichalcona), constituye el intermediario común de todos los flavonoides. La acción estéreo-específica de una chalcona isomerasa da lugar al primer flavonoide, una (2S)-flavanona.

Los flavonoides están ampliamente extendidos en todo el reino vegetal, constituyendo la mayoría los pigmentos amarillos, rojos y azules de flores y algunos frutos. Son particularmente abundantes en las plantas vasculares, principalmente en la familia de Asteráceae, Rutáceae, Fabáceae, Umbelliferae, entre otras. Se encuentran sobre todo en los órganos aéreos, hojas y flores donde se acumulan en altas concentraciones y en las vacuolas de las células epidérmicas.

Los flavonoides son sólidos cristalinos, solubles como heterósidos en agua y alcohol e insolubles en disolventes orgánicos apolares; las geninas son solubles en éter, acetato de etilo, metanol e insolubles en agua. Los heterósidos y las geninas más polares, tales como flavonas hidroxiladas, flavonoles, auronas y chalcona son generalmente aisladas a partir del material vegetal por extracción

con acetona, alcohol y agua. Los flavonoides presentan actividad a nivel vascular, sobre la pared de los capilares, disminuyendo su permeabilidad y fragilidad, aumentando su resistencia. Además muestran actividad frente a la úlcera péptica, reduciendo el índice de ulceración y la intensidad del daño mucosal. Otras propiedades atribuidas es la de antibacterianos antiagregante, plaquetarios, antialérgico, antihepático entre otras. ⁽⁴⁵⁾



QUERCETINA
Actividad antioxidante
Rutáceas

3.3.3. TERPENOS

Son metabolitos secundarios formados a través de la ruta del mevalonato, en donde se incorporan unidades de cinco carbonos, el término terpenoide se refiere a un grupo de sustancias que presentan un origen biosintético común y que siguen la llamada “Regla de Isopreno”. Se clasifican según el número de unidades de isopreno:

Hemiterpenos: C_5 , de escaso interés farmacológico.

Monoterpenos: C_{10} (dos unidades de isopreno), se subdividen en regulares e irregulares.

Sesquiterpenos : C_{15} , se encuentran libres, formando parte de los aceites esenciales o como lactonas sesquiterpénicas.

Diterpenos: C_{20} , se subdividen en bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos.

Sesterpenos: C_{25} (pocos habituales en la naturaleza).

Triterpenos: C_{30} .

Tetraterpenos: C_{40} (carotenoides)

3.3.3.1 MONOTERPENOS

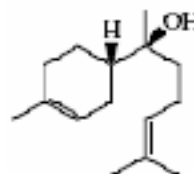
Se forman por el acoplamiento de dos unidades isoprenicas, son los constituyentes más sencillos de la serie terpenica; los denominados terpenos regulares son constituyentes habituales de los aceites esenciales y oleorresinas; los irregulares dan lugar a la piretrinas, la cual presenta actividad insecticida. La ciclación en derivados metilciclopentánicos dan origen a los iridoides. En general se encuentran en estado libres, a excepción de los iridoides, los cuales se encuentran en forma heterosídica. ⁽⁴⁵⁾



MENTOL
Actividad antiséptico
Menta piperita

3.3.3.2 SESQUITERPENOS

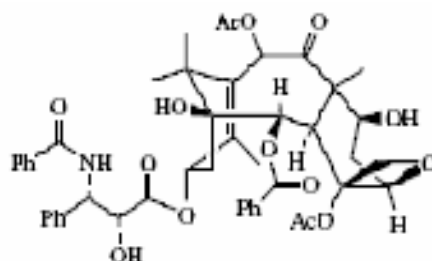
Constituyen un amplio conjunto de derivados en C₁₅ del ácido mevalónico, que dan lugar, mediante oxidaciones, reagrupamientos, ciclaciones adicionales, etc., aun alto número de derivados. Son constituyentes habituales de los aceites esenciales. Uno de los derivados sesquitérpenicos son las lactonas sesquiterpénicas, las cuales se comportan en los vegetales como reguladores del crecimiento; en otros casos atraen a los insectos o actúan contra ellos. Además poseen actividad antibacteriana y antiinflamatorias. ⁽⁴⁵⁾



α -BISOBOLOL
Actividad antibacteriana, antiinflamatoria
Matricaria chamomilla

3.3.3.3 DITERPENOS

Comprenden un amplio grupo de compuestos, formados por la unión de cuatro unidades isoprenicas, que pueden presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas y ácidos carboxílicos. Son procedentes del metabolismo del geranil-geranil-pirofosfato, se encuentran en forma aciclicas, mono, bi, tri y tetracíclicas. ⁽⁴⁵⁾



TAXOL
Actividad anticancerígeno
Taxus brevifolia

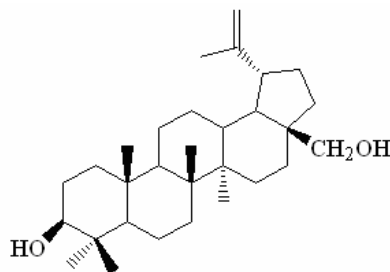
3.3.3.4 TRITERPENOS

Son compuestos de 30 átomos de carbono, producidos por la ciclación del esculeno. Son de estructura compleja, generalmente tetracíclicos o pentacíclicos, además pueden contener grupos hidroxilo, cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos. Muchos se encuentran como glucósidos formando la llamadas saponinas triterpenoides.

Los esteroides, en particular los fitosteroles, se consideran como un tipo especial de terpenoides, con un esqueleto ciclopentano-perhidrofenantreno dotado de una cadena alquímica en el C₁₇, dos metilos en C₁₀ y C₁₃; carecen de las sustituciones en 4 (gem-dimetil) y 14 (metil), características de los tritérpenos en general .

Los tritérpenos y fitosteroles forman parte de la fracción lípofila insaponificable y se extraen, tanto con los disolventes halógenados como con los alcoholes.

Presentan actividad hipolipemiante, antibacteriana (como ácido fusídico), acción antineoplásica y antiinflamatoria. ⁽⁴⁵⁾



BETULINA
Actividad bacteriostática

Tripterygium wilfordii

3.3.4. ÁCIDOS FENÓLICOS

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentan en común un anillo bencénico que puede estar unido a grupos hidroxilos libres o combinados , en forma de ester, éter, heterosídico, etc. En general se considera que para la biosíntesis de los ácidos cinámicos y derivados (ácido benzoico,

fenoles simples, cumarinas, lignanos), son los carbohidratos los compuestos precursores de su formación. Son compuestos derivados del ácido skímico, cuya primera reacción es la condensación de el fosfoenol piruvato con la eritrosa-4-fosfato, para formar un compuesto intermediario: la 3-desoxi-*D*-arabino heptulosanato-7-fosfato (DAHP), cuya ciclación en 3-dihidroquinato y posterior deshidratación originará el skimato. Este compuesto sufre una fosforilación y eliminación vía 1-4*trans*, para originar el corismato, a partir de el ácido corísmico, vía prefenato y fenilpiruvato se origina la finilalanina, que posteriormente sufre una desaminación transformándose en ácido cinámico, este compuesto es fundamental en la formación de los ácidos fenólicos. ⁽⁴⁵⁾

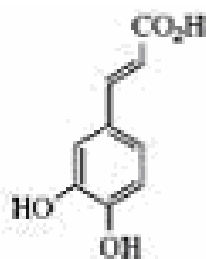
El ácido cinámico y benzóico constituyen el centro del metabolismo de las plantas fenólicas, pudiendo sufrir distintas reacciones (oxidaciones, conjugaciones, degradaciones, etc.), dando lugar a diferentes compuestos muy importantes en la vía de los vegetales.

Ácidos fenólicos: son compuestos orgánicos que tienen al menos una función carboxílica y un grupo fenólico; esta denominación se da a los derivados del ácido benzóico y cinámico

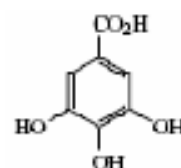
Ácidos fenólicos derivados del ácido benzóico, se encuentran distribuidos en la familia de Gimnospermas, Angiosperma, pudiéndose encontrar libres o combinados, en forma de heterósido o esteres. Algunos de ellos como el ácido gálico, juegan un papel importante en la constitución de los taninos hidrolizables.

Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico, se encuentran prácticamente en todos los vegetales, como ácido sinápico, caféico, ferúlico y *p*-cumárico, siendo el más frecuente este último. Aparecen en forma de esteres de alcoholes alifáticos. También pueden esterificar azúcares (generalmente la glucosa) y grupos hidroxilos de algunos metabolitos secundarios. Pueden presentarse en forma de amidas derivadas de la tiramina.

Los ácidos fenólicos son compuestos muy inestables que se oxidan fácilmente en medio alcalino. Las dos acciones más importantes de estos ácidos que presentan es la actividad antimicrobiana, preferentemente frente a bacterias grampositivas, utilizándose como antiséptico y desinfectante, además presenta actividad antiinflamatoria, tales como ácido gálico, salicílico y *p*-metoxicinámico. Así como también acción colerética y antitumoral como el ácido caféico. ⁽⁴⁵⁾



ÁCIDO CAFÉICO
Actividad antitumoral y colerética
Rutáceas



ÁCIDO GÁLICO
Actividad antiinflamatorio
Gramináceas

3.4. GENERALIDADES DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE PROTON (RMN-¹H)

Uno de los más importantes avances en la Química es la utilización de métodos físicos y técnicas, mediante las cuales se pueden efectuar estudios con cantidades de muestras cada vez menores. Una de las técnicas más empleadas es la de RMN-¹H, aunque posiblemente sea la más reciente, sus aplicaciones son ya extraordinariamente numerosas.

Los instrumentos utilizados en RMN-¹H son llamados espectrómetros, estos permiten cuantificar la absorción de energía por parte de los núcleos de hidrógeno. Estos instrumentos utilizan magnetos muy poderosos e irradian la muestra con radiaciones electromagnéticas en la región de frecuencias de la radio.

Por lo general, los espectrómetros de RMN-¹H, se diseñan de manera que irradian al compuesto con energía electromagnética de una frecuencia constante, mientras se hace variar la fuerza del campo magnético.

Cuando dicho campo llega a la fuerza correcta, los núcleos absorben energía y ocurre la resonancia. Esto ocasiona el flujo de una pequeñísima corriente eléctrica en una antena espiral que rodea a la muestra. El instrumento amplifica luego esa corriente y la representa como una señal de un pico o varios picos, sobre una tira de papel calibrado. ⁽¹⁹⁾

Átomo de hidrógeno: este presenta propiedades magnéticas, debido a que está compuesto por un núcleo central pesado que contiene una partícula con carga eléctrica positiva llamado protón y en torno de la cual gira una partícula menor con carga negativa llamado electrón y entre las cargas de signos opuestos se genera un campo eléctrico, el cual ejerce fuerzas sobre elementos externos a él.

La gran sensibilidad magnética que muestran los núcleos y electrones en una molécula a su entorno hace que la RMN-¹H sea muy eficaz, en la determinación de estructuras moleculares. Los electrones protegen al núcleo creando un campo magnético que cubre al protón, produciéndose una disminución del campo inducido, dándose una protección diamagnética, apareciendo las señales en un campo más alto, hacia la derecha acercándose al TMS o cero ppm. Pero si lo desprotegen se da un aumento del campo inducido, creando un efecto paramagnético y las señales aparecen a campo más bajo, hacia la izquierda alejándose del TMS de referencia.

La densidad electrónica es afectada por la electronegatividad de los átomos unidos al protón; algunos núcleos de hidrógeno se localizan en regiones de mayor densidad electrónica, que otros y debido a eso los protones absorben energía en fuerzas ligeramente diferentes a la del campo magnético. ⁽¹⁹⁾

La fuerza de campo en el que tiene lugar la absorción depende en gran parte de el ambiente magnético en el que está cada protón y a su vez éste depende de dos factores: los campos magnéticos generados por electrones circulantes y los producidos por la presencia de otros núcleos cercanos. La fuerza del campo magnético se mide a lo largo de la parte inferior de los espectros en un escala delta (δ) llamado desplazamiento químico, cuyas unidades son partes por millón (ppm) y a lo largo de la parte superior en Hertz (ciclos por segundo).

En los espectros aparece una señal pequeña con un valor de desplazamiento químico de cero ppm que corresponde al TMS, el cual se utiliza como patrón de referencia para calibrar el equipo. El número de señales que aparecen en el espectro, esta relacionado con el número de tipos diferentes de hidrógenos en cada compuesto. ⁽¹⁹⁾

Desplazamiento químico: es la frecuencia de resonancia exacta de un tipo de núcleo determinado, depende en una forma característica de su entorno o grupos vecinos. La posición de las absorbancia en RMN- ^1H no se pueden definir mediante una escala absoluta de frecuencia o de campo aplicado, en lugar de ello la posición de la señal se establece respecto a un compuesto de referencia, el tetrametilsilicio (TMS). El desplazamiento químico es la distancia entre la señal de el TMS y la señal del protón en estudio.

Es una magnitud, característica para el núcleo y su entorno, e independiente de la frecuencia de medida y la intensidad del campo magnético. ⁽¹⁹⁾

Acoplamiento espín-espín: las señales en los espectros aparecen frecuentemente como estructuras finas, las cuales pueden aparecer como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (c) , etc. La causa de ello es la interacción con los núcleos vecinos que poseen un momento magnético . Este acoplamiento espín-espín aparece entre núcleos del mismo tipo (homo nuclear) y entre los núcleos de elementos diferentes (heteronuclear), lo que significa que la orientación de el espín de un núcleo "A" influye en el magneto local que actúa sobre el núcleo acoplado "B" y viceversa. ⁽¹⁹⁾

Magnitud de desdoblamiento: se describe mediante la constante de acoplamiento (J), la cual se puede obtener directamente a partir de la separación de las dos líneas de "A" o bien a partir de la distancia equivalente entre las dos líneas de "A" en la escala de Hertz.

Para el acoplamiento protón-protón, las constantes se encuentra aproximadamente entre ± 20 Hz y son independientes de la magnitud del campo magnético externo aplicado. Por lo general existen acoplamientos de tipo escalar, directo, geminal y vecinal, estos se dan a través de los enlaces de la molécula. Cuando son dos o tres los enlaces que transmiten el acoplamiento, la J (H,H) disminuye por lo general al aumentar el numero de enlaces entre dos núcleos o distancias de enlaces. La magnitud relativa de dos picos o señales, está dada por el área bajo de cada pico, éstas áreas, si se calculan con precisión, son proporcionales al número de hidrógenos que provocan la señal.

CUADRO N° 2 DESPLAZAMIENTO QUÍMICO FRECUENTES.⁽⁸⁾

PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)	PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)
$\text{CH}_3 - \text{C}$	0,9	$\text{CH} - \text{Ar}$	3.0
$\text{CH}_3 - \text{C} - \text{C} = \text{C}$	1,1	$\text{C} - \text{CH} - \text{O} - \text{R}$	3.7
$\text{CH}_3 - \text{C} - \text{O}$	1,4	$\text{C} - \text{CH} - \text{O} - \text{H}$	3.9
$\text{CH}_3 - \text{C} = \text{C}$	1.6	$\text{C} - \text{CH} - \text{N}$	2.8
$\text{CH}_3 - \text{Ar}$	2.3	$\text{C} = \text{CH}_2$	5.4
$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{R}$	2.2	$\text{C} = \text{CH} -$	5.1
$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{Ar}$	2.6	$\text{C} = \text{CH} -$ (ciclico)	5.3
$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{OR}$	2.0	$\text{C} = \text{CH} - \text{CO}$	5.9
$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{O} - \text{Ar}$	2.4	$\text{Ar} - \text{CHO}$	9.9
$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{N} - \text{R}$	2.0	$\text{R} - \text{CHO}$	9.9
$\text{CH}_3 - \text{O} - \text{R}$	3.3	$\text{H} - \text{CO} - \text{O}$	8.0
$\text{CH}_3 - \text{O} - \text{Ar}$	3.8	$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{R}$	3.4
$\text{CH}_3 - \text{O} - \text{CO} - \text{R}$	3.7	$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{H}$	3.6
$\text{CH}_3 - \text{N}$	2.3	$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{Ar}$	4.3
$\text{CH}_3 - \text{S}$	2.1	$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{N}$	2.5
$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{C}$	1.3	$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{S}$	2.4
$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{O}$	1.9	$\text{C} - \text{CH} - \text{C}$	1.5
$\text{C} - \text{CH}_2 - \text{Ar}$	2.7	$\text{C} - \text{CH} - \text{C} - \text{O}$	2.0

CUADRO N°. 3 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS MÁS FRECUENTES DE
LOS PROTONES DE ANTRAQUINONAS ⁽⁶⁾

PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)
<u>H</u> -2	6.72 - 7.08
<u>H</u> -3	7.56 - 7.68
<u>H</u> -4	6.94 - 7.61
<u>H</u> -6	7.66 - 7.64
<u>H</u> -7	6.66 - 7.25
OH	12.10 - 12.57
O <u>C</u> H ₃	3.70 - 3.90
<u>C</u> H ₃ -	2.44
<u>H</u> O-C=C	7.0 - 7.10

CUADRO N°. 4 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS MÁS FRECUENTES DE LOS PROTONES DE FLAVONOIDES⁽⁸⁾

PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)
$-\text{CH}_2 - \text{CH} = \text{C}(\underline{\text{CH}}_3)$	3.50 - 5.20
$\text{OCO}\underline{\text{CH}}_3$	2.10
$=\text{C} - \underline{\text{CH}}_3$	2.00
$\text{O}\underline{\text{CH}}_3$	3.70 - 4.10
$\text{Ar}-\underline{\text{H}}$	6.70 - 7.80
$\text{O}-\underline{\text{CH}}_2-\text{O}$	6.00
$\text{C}-\underline{\text{H}}$ (de azúcares)	3.50 - 4.00

CUADRO N°. 5 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS MÁS FRECUENTES DE LOS PROTONES DE SESQUITERPENOS⁽⁸⁾

PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)
$\underline{\text{H}}-1$	5.18
$\underline{\text{H}}-5$	5.04
$\underline{\text{H}}-14$	1.20
$\underline{\text{H}}-15$	1.72
$\text{O}\underline{\text{CH}}_2-\text{CH}_3$	4.10
$\text{OCH}_2-\underline{\text{CH}}_3$	1.24

CUADRO N.º. 6 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS MÁS FRECUENTES DE LOS PROTONES DE TRITERPENOS ⁽⁸⁾

PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)
<u>CH</u> ₂ -OH	3.54 - 3.63
<u>H</u> -OH (geminal)	3.12 - 3.54
H- <u>O</u> H	1.42
<u>CH</u> ₃ -C-O-CH ₃	2.04
<u>H</u> -1	7.62
<u>H</u> -19	2.38
Me-26	1.02
CHO	9.38
<u>CH</u> ₃ - <u>CH</u> ₂ - <u>CH</u> -	1.20 - 0.70
<u>H</u> C=C-O	5.23
CH ₃ -C-O- <u>CH</u> ₃	4.53
<u>H</u> -4 (Anillo aromático)	6.82
<u>H</u> -5 (Anillo aromático)	7.03
<u>O</u> H (Fenólico)	5.90
CH ₂ = <u>CH</u> -	5.20 - 5.50
<u>H</u> -19 β (Lupenilo)	2.38 - 2.40

CUADRO N.º. 7 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS MÁS FRECUENTES DE LOS PROTONES DE DITERPENOS⁽⁸⁾

PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)
<u>H</u> -1	1.75
<u>H</u> -2	1.57
<u>H</u> -3	3.65
<u>H</u> -8	1.50
O <u>C</u> H ₃	3.70 - 3.90
O <u>C</u> H ₂ -CH ₃	3.71
OCH ₂ - <u>C</u> H ₃	1.21
<u>O</u> H	7.13

CUADRO N.º. 8 DESPLAZAMIENTOS QUÍMICO MÁS FRECUENTES DE LOS PROTONES DE ÁCIDOS CINÁMICOS⁽⁸⁾

PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (δ ppm)
Cis, <u>H</u>	6.40 - 7.60 J (~ 11Hz)
Trans, <u>H</u>	6.40 - 4.60 J (~ 14Hz)
Ar- <u>H</u>	6.40 - 7.80
O <u>C</u> H ₃	3.70 - 3.90
H-O <u>H</u>	3.50 - 3.80
<u>H</u> -OH	3.30 - 3.50

3.5. FRACCIONAMIENTO BIO-GUIADO

Es una técnica cuyo objetivo es ser guía para el descubrimiento de nuevos fármacos a partir de fuentes naturales. Los extractos son preparados a partir de varias fuentes (vegetal, animal, microorganismo etc.). Estos extractos son probados frente a diferentes actividades biológicas (antimicrobiana, citotóxica, etc.). El próximo paso es el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad descubierta.

Este proceso es impedido por la falta de conocimientos de las propiedades químicas de los compuestos. El proceso de aislamiento debe por lo tanto ser monitoreado por pruebas de todas las fracciones aisladas para la determinación de la actividad. Solo las fracciones que den un resultado positivo a la prueba estarán sujetas a más pasos de separación y eventualmente la actividad de los compuestos puros será obtenida. Este proceso es llamado FRACCIONAMIENTO BIO-GUIADO. Cuando se comienza un fraccionamiento bio-guiado a partir de un extracto, no se conoce ninguna de las propiedades químicas de el o los compuestos causantes del efecto farmacológico, demostrado en el sistema de prueba usado. Es por tanto importante obtener alguna información preliminar acerca de la polaridad, carga, peso molecular y estabilidad de los compuestos activos a fin de diseñar un proceso de aislamiento adecuado. Los métodos descritos también pueden ser usados para adquirir los conocimientos deseados probando todas las fracciones obtenidas por actividad en el sistema de pruebas farmacológicas escogidas. ⁽³⁴⁾

3.6. GENERALIDADES DE LAS CEPAS SOMETIDAS A ENSAYO

3.6.1. *Staphylococcus aureus*

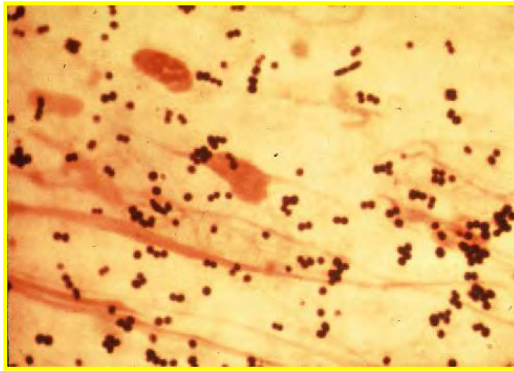


Figura N° 4. Morfología de la cepa *Staphylococcus aureus*

Morfología Y Fisiología: Son células esféricas, grampositivas, β -hemolítico, cuyo diámetro varía de 0.5 a 1.5 μm en frotis teñido, aparecen en grupos irregulares en forma de racimos, crecen en condiciones aeróbicas, no son móviles y no forman esporas. En frotis normal también se encuentran células aisladas en parejas y tétradas. Son resistentes al calor, al cloruro de sodio al 9% y a la desecación, pueden permanecer infecciosos en el medio ambiente durante largos períodos. ⁽²²⁾

Las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes, la pigmentación de las colonias va desde un gris, amarillo al amarillo dorado intenso. Generalmente forman colonias de 2 a 3 mm después de 24 horas de incubación a 35 °C o hasta de 7 mm después de 48 a 72 horas de incubación. Dan prueba positiva con catalasa y coagulasa, además fermentan el manitol.

Cuando son cultivados en agar sangre las colonias aparecen redondas con una zona de β -hemólisis.

Son sensibles a la acción bacteriostática de los colorantes trifenilmetano y son susceptible a los antibióticos eficaces contra bacterias grampositivos incluyendo a los de amplio espectro. ⁽²¹⁾

Tienden a fermentar muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas y su actividad proteolítica varía de una cepa a otra.

Las enzimas más importantes que producen es la coagulasa, hialuronidasa y estafiloquinasa. La coagulasa estafilococica presenta un alto grado de correlación con la virulencia, ayuda en la protección contra la destrucción intraleucocítica inhibiendo la fagocitosis y antagonizan la actividad bactericida del suero normal.

En la coagulación del plasma, la coagulasa reacciona como un factor de plasma similar a la protrombina formando un complejo constituido por coagulasa que presenta una actividad enzimática semejante a la de la protrombina desdoblado al fibrinógeno y produciendo un coágulo de fibrina, lo cual es utilizada como prueba de identificación de ***Staphylococcus aureus***.

Son cepas patógenas que se encuentran en el ambiente externo y en pliegues cutáneos como axilas. Aunque ésta cepa suele formar parte de la microflora humana normal y pueden producir infecciones oportunistas importantes en las condiciones apropiadas. ⁽³⁶⁾

El prototipo de infección estafilococcica es el furúnculo o cualquier absceso localizado. Algunas de las enfermedades más comunes producidas por ésta cepa son la Neumonía estafilococcica, Síndrome de la piel escaldada, Síndrome de shock tóxico y otras enfermedades respiratorias.

3.6.2. *Pseudomona aeruginosa*

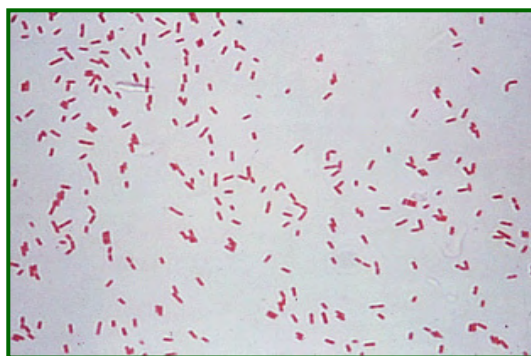


Figura N° 5 Morfología de la cepa *Pseudomona aeruginosa*

Morfología y Fisiología: Aparecen como bastones delgados, pequeños de 1.5 a 3 μm de largo y de 0.5 a 0.8 μm de ancho, frecuentemente unidos a pares y en cadena corta. Tienen uno a tres flagelos polares; la bacteria tiene movimientos muy activos, no forma cápsula ni esporas. Las colonias son grandes y diseminadas, de bordes irregulares y consistencia grasosa. Estos bacilos se tiñen fácilmente con los colorantes analíticos usuales; son gramnegativos.

Se desarrolla fácilmente en todos los medios de cultivo ordinario, más rápidamente a temperatura de 30 a 37 °C. Requiere condiciones aerobias, produce sulfuro de hidrógeno, no forma Indol y su capacidad fermentativa es muy limitada; produce ácido a partir de la glucosa pero no ataca a otros

carbohidratos. En leche tornasolada produce reacción alcalina; forma un coágulo blando seguido de peptonización rápida. Los cultivos de ***Pseudomona aeruginosa*** en general tienen olor a uvas. ⁽³⁶⁾

Una de las características más especiales de ésta cepa es la producción de pigmento soluble verde azulado que no tiñe las colonias u otras masas en desarrollo si no que se difunde en el medio; éste pigmento llamado piocianina es fenazínico hidrosoluble, es un agente ciliostático que ayuda a la ***Pseudomona*** a competir por el hierro al reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Este pigmento puede extraerse de la solución acuosa mediante cloroformo. Además produce otro pigmento fluorescente verde amarillento soluble en agua pero no en cloroformo. Ambos son productos de oxidación de precursores incoloros. ⁽²¹⁾

La piocianina solo es formada por ***P. aeruginosa*** y el pigmento fluorescente es formado por muchas otras especies de ***Pseudomonas***. Los pigmentos pueden presentarse aislados o juntos.

Las cepas aisladas suelen ser resistente a fármacos múltiples y en ocasiones producen lactamasas beta que degradan o inactivan las cefalósporinas de tercera generación.

Es un patógeno oportunista que ocasiona enfermedades en pacientes con sondas y en personas con deficiencias inmunitarias, además es omnipresente que se encuentra en agua, tierra y plantas. Se encuentran por lo general en la

piel, aparato digestivo y la garganta; tienden a persistir en el medio hospitalario por su capacidad para resistir la actividad de diversos antibióticos. ⁽²²⁾

Las infecciones por ***Pseudomonas*** son difíciles de tratar por la resistencia que presentan ante los antibióticos.

3.6.3. ***Streptococcus pneumoniae***

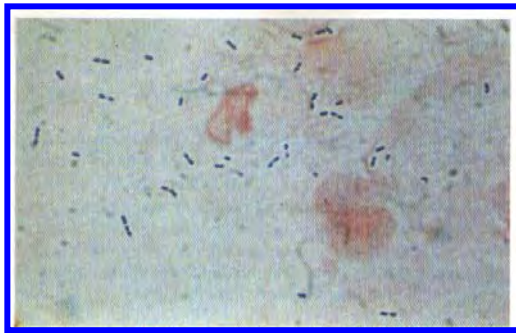


Figura N° 6 Morfología de la cepa ***Streptococcus pneumoniae***

Morfología y Fisiología: Son diplocos grampositivos, lanceolados y agrupados en cadena, poseen una cápsula. Las células individuales miden de 0.5 a 1.25 micrómetros en diámetro, no forman esporas y fermentan la glucosa en ácido láctico. Con la edad se vuelven gramnegativos y tienden a lisarse espontáneamente. Las cepas virulentas con abundante polisacárido producen colonias transparentes, mucoides, húmedas. Las cepas pobremente encapsuladas producen colonias traslúcidas, pequeñas, redondas que en principio son convexas que con el tiempo desarrollan una depresión central debido a la autólisis. ⁽²²⁾

Una zona de α -hemólisis de 2–3 mm de color verde rodea casi siempre a las colonias en medio agar sangre, el crecimiento se intensifica en presencia de CO₂ a 5–10%.

La virulencia de la cepa se debe a su cápsula la cual esta integrada por polisacáridos que envuelven totalmente las células pneumococcal. Además presenta una pared celular de seis capas gruesas que se compone de peptidoglucano, ácido teicoico el cual es químicamente idéntico al ácido teicoico, pero esta unido a la membrana de la célula.

El ácido teicoico y lipoteicoico contienen cloruros fosfóricos los cuales son esenciales para la vida de los *Streptococcus pneumoniae* puesto que estos cloruros se adhieren específicamente a los cloruros receptores que atan y están situados en todas las células humanas.

Las sales biliares al igual que el clorhidrato de etilhidroxocupreína (optoquin) lisan selectivamente las colonias de *Streptococcus pneumoniae*.⁽²²⁾

Los neumococos producen neumonía, la cual reproduce en los tejidos provocando exudaciones del edema fibrinoso hacia los alvéolos, seguido de eritrocitos y leucocitos polimorfo nucleares. Lo cual da como resultado la consolidación de porciones del pulmón, este exudado es rico en neumococos que pueden llegar al torrente a través del drenaje linfático de los pulmones. Se acompaña de escalofríos, dolor pleural agudo y de esputo sanguinolento.

La neumonía se puede dividir en dos formas: bronquial y lobar, la primera es la más prevalente en niños, jóvenes y adultos envejecidos, e implica los alvéolos

contiguo a los bronquiolos más grandes del árbol bronquial. La neumonía lobar es más propensa a ocurrir en adultos más jóvenes e implica todo el lóbulo de los pulmones. ⁽²¹⁾

3.7. GENERALIDADES DE CROMATOGRAFÍA

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

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

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original.

La cromatografía se emplea para conocer y separar los componentes por diferencia de polaridad de una mezcla y su identificación. ⁽⁴⁵⁾

TIPOS DE CROMATOGRAFÍA

a) Dependiendo de la naturaleza de la fase móvil y la estacionaria se clasifican:

1. **Cromatografía sólido-líquido:** la fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.
2. **Cromatografía líquido-líquido:** la fase estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido y la fase móvil es un líquido.
3. **Cromatografía líquido-gas:** la fase estacionaria es un líquido no volátil impregnado en un sólido y la fase móvil es un gas.
4. **Cromatografía sólido-gas:** la fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.

b) Clasificación según el mecanismo de separación:

1. **Cromatografía de adsorción:** la separación se basa fundamentalmente en las distintas afinidades de adsorción de los componentes de la muestra hacia la superficie de un sólido activo.
2. **Cromatografía de reparto:** la separación se basa fundamentalmente en las diferencias de solubilidad de los componentes de la muestra en la fase estacionaria o en las diferencias de solubilidad de los componentes en la fase móvil y en la estacionaria.
3. **Cromatografía de intercambio iónico:** la separación se basa fundamentalmente en la distinta susceptibilidad para el intercambio de iones de los componentes de la muestra.
4. **Cromatografía de exclusión:** la separación se basa en los efectos de exclusión tales como diferencias en el tamaño de las moléculas, en su forma o en su carga.

5. **Cromatografía de afinidad:** La separación se basa en una interacción biológica específica entre el analito y la fase.
6. **Cromatografía de capa fina:** La separación se basa en una capa de adsorbente de espesor uniforme que se deposita sobre una placa de vidrio, aluminio o plástico.
7. **Cromatografía en columna:** La fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo angosto y la fase móvil es forzada a pasar a través del tubo bajo presión o por gravedad. ⁽⁴⁵⁾

3.7.1. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Es el método más general para la separación y purificación de compuestos orgánicos, sólidos o líquidos a escala preparativa. La fase estacionaria se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina en un estrechamiento con una llave y se impregna con la fase móvil (eluyente). La mezcla a separar se deposita sobre la parte superior de la fase estacionaria y la fase móvil atraviesa el sistema. Los compuestos eluidos, disueltos en la fase móvil, van saliendo de la columna y se recogen en fracciones. Los menos polares, que son los que se retienen poco en el adsorbente, son los primeros en salir, los polares quedan más retenidos y para su elusión generalmente es necesario incrementar la polaridad del disolvente.

El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna se llama tiempo de retención, es característico para cada compuesto.

El adsorbente más utilizado para cromatografía en columna es la gel de sílice. La elusión de la cromatografía puede realizarse por gravedad o por presión, en éste último caso se conecta la cabeza de la columna a un compresor de media presión o a una línea de aire comprimido.

Antes de llevar a cabo la cromatografía en columna, es necesario elegir el disolvente adecuado, para optimizar la separación de los componentes de la mezcla, esto se lleva a cabo mediante cromatografía analítica en capa fina de la muestra a analizar. El disolvente tiene que conducir a una buena separación de los componentes de la mezcla en la placa ($R_f > 0.1$) y situar el componente menos polar en un R_f aproximado de 0.3. La separación de una mezcla en una columna será poco eficaz, si se utiliza un disolvente que situé los compuestos a separa a un valor de R_f superior a 0.3.

La cromatografía se inicia con una mezcla de disolventes de polaridad adecuada para separar el componente de mayor R_f y una vez que este se ha recogido, se aumenta gradualmente la polaridad, para ir separando los componentes más polares. Si al inicio de la cromatografía se utilizan disolventes excesivamente polares, los componentes de la mezcla eludirían juntos y la separación no tendría lugar. Una de las mezclas más utilizadas es el *n*-hexano/acetato de etilo, diclorometano, entre otras. ⁽⁴⁵⁾

3.8. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA

Es la técnica de ensayo más utilizada, conocida también como método de Kirby Bauer Modificado, es la más adecuada para la valoración de soluciones obtenidas por extracción con disolventes orgánicos.

El método consiste en inocular uniformemente toda la superficie de una placa de petri, que contiene un medio con agar, con una cantidad normalizada de microorganismos a ensayar. A continuación se colocan cilindros de acero inoxidable con una ligera presión sobre la superficie del agar, se llena cada uno de los cilindros con la solución prueba por medio de una micro pipeta. Si la solución prueba es eficaz se formará un halo de inhibición que rodea al cilindro y puede medirse el diámetro de ese halo. El diámetro obtenido dependerá de la sensibilidad del microorganismo, del espesor de la capa de agar, su pH, la temperatura y la fase de crecimiento del inóculo.

Este método es la técnica actualmente utilizada para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, además está indicada para cualquier microorganismo, contribuyendo así a orientar en el tratamiento terapéutico de proceso infecciosos. ⁽⁴¹⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación tiene un tipo de estudio retrospectivo, prospectivo y experimental, debido a que dicha investigación se basa en estudios realizados anteriormente y a la vez propone una nueva alternativa mediante datos obtenidos experimentalmente, además es hipotético–deductivo ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permite formular la siguiente hipótesis: Las fracciones 10%, 30% y 50% procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* obtenidas, a partir de una columna cromatográfica poseen actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*.

La investigación del presente estudio se divide en tres etapas:

4.2. INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizaron consultas de libros, trabajos de graduación, manuales etc. en la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

- Revistas científicas
- Scifinder scholar (base de datos mundial)
- Internet.

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

La recolección de la goma-resina del árbol de Eucalipto se realizó en el Campus Universitario, en la Facultad de Química y Farmacia y la Facultad de Ciencias Agronómicas durante la época seca. Se recolectó aproximadamente 2,000 gramos de la muestra en frascos de vidrio color ámbar con tapadera de metal y se almacenó en lugar fresco y seco.

4.4. INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO

4.4.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS

Se determinaron las características organolépticas del extracto diclorometánico: color, olor, sabor y consistencia.(Cuadro N° 11)

4.4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.4.2.1. Obtención del extracto etanólico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

La muestra de la goma-resina seca y cristalizada se pulverizó en un mortero, luego se pesó y se le realizó la extracción con etanol al 95% en Soxhlet, hasta observar un color tenue en el dedal (aproximadamente 180 horas), lo que indica que la muestra se encuentra agotada. Posteriormente se concentró el extracto etanólico a sequedad usando el rotaevaporador. (Anexo N° 2)

4.4.2.2 Obtención del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

Al extracto etanólico concentrado, se le realizó la partición líquida-líquida agua/diclorometano en una ampolla de separación, formándose una fase acuosa y orgánica, siendo esta última la que se sometió a un rotaevaporador, hasta eliminar el disolvente, obteniéndose así el extracto diclorometánico. (Anexo N° 4)

4.4.2.3. Cromatografía en columna.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Preparación y relleno de la columna

Se seleccionó una columna de diámetro adecuado a la muestra. Se realizó una mezcla de *n*-hexano y sílice gel, la cual se incorporó en el interior de la columna y se dejó compactar a media presión (cromatografía flash). Una vez depositado el adsorbente en el fondo de la columna, se colocó 2.0 cm de algodón para proteger el frente del adsorbente, quedando el disolvente a la altura del nivel de el algodón. (Fig. N° 7)

Preparación de la muestra

Se disolvió la muestra en una mínima cantidad de diclorometano y se añadió una cantidad de sílice gel proporcional a la cantidad de muestra. Posteriormente

se eliminó el disolvente en el rotaevaporador, obteniéndose una mezcla homogénea, pulverulenta y exenta de disolvente, la cual se incorporó por medio de un embudo sobre los 2.0 cm algodón de la columna (Preparación de la cabeza).

Elución de las fracciones

Llenar la columna de disolvente *n*-hexano (aproximadamente 500 mL), dejándolo caer por la pared. Conectar la cabeza de la columna a un compresor de aire y hacer pasar el disolvente a través de la sílice gel para que se compacte. El volumen inicial del disolvente que se recogió corresponde al volumen muerto de la columna, el cual no contiene ningún producto, por lo que se despreció. Continuar la operación, añadiendo una segunda alícuota de igual volumen de *n*-hexano/acetato de etilo en proporciones de (90:10), la cual correspondió a la fracción del 10%. Luego se adicionó una tercera y cuarta alícuota en proporciones de (70:30) y (50:50), obteniéndose las fracciones del 30% y 50% respectivamente.(Anexo N° 4)



Fig. N° 7 Columna cromatográfica

Análisis de las fracciones

Las fracciones obtenidas se analizaron e interpretaron por RMN-¹H, en busca de la presencia de metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana.

4.4.3. ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

4.4.3.1. Pruebas de identificación microbiológicas

A los microorganismos de ensayo se les realizaron tres clases de pruebas:

Pruebas macroscópicas

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

CUADRO N^o. 9 MORFOLOGIA MACROSCÓPICAS

CEPAS	MEDIO DE CULTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 259230)	Agar Chapman Agar Bair Parker
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	Agar cetrimide
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC 49619)	Agar sangre

Pruebas microscópicas (Anexo N° 5)

Se utilizó el método de coloración al Gram, para observar la morfología de los microorganismos a ensayar.

Pruebas de identificación (Anexo N° 6, 7, 8)

Para identificación y diferenciación de las bacterias utilizadas en estudio se realizaron las siguientes pruebas:

CUADRO N°. 10. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

CEPAS	PRUEBAS DE IDENTIFICACION
<i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa, coagulasa.
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Pruebas bioquímicas: Agar triple azúcar y hierro (TSI), citrato, indol, rojo de metilo, movilidad, voges-proskauer y oxidasa.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Discos de optoquin.

Para conservar las cepas, se hicieron resiembras semanales en placas Tripticasa soya agar (TSA), a excepción de *Streptococcus pneumoniae*, que se resembró en Agar sangre, se mantuvieron en refrigeración a menos de 30 °C en caldo de BHI y leche descremada (Anexo N° 12)

4.4.3.2. Determinación del potencial de inhibición

Para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a una sustancia antibacteriana en particular, existen varios métodos; el más comúnmente empleado es el método de Cilindro en Placa. Alternativamente, el agente antibacteriano puede colocarse en cilindros de vidrio, porcelana o acero inoxidable sobre la superficie del medio, en lugar de discos de papel absorbentes (Método de Kirby Bauer Modificado). Este método es el que se utilizó para el desarrollo el presente estudio.

4.4.3.3 Método cilindro en placa (Método de Kirby Bauer Modificado)

El fundamento de este método se basa en la difusión de la sustancia en investigación, colocada en un cilindro vertical sobre una capa de agar (Müller-Hinton) solidificado, que contiene en la superficie el microorganismo de prueba, de tal manera, que si es susceptible, se formará un halo de inhibición alrededor del cilindro. ⁽²²⁾

4.4.3.4 Preparación de la suspensión de microorganismos

Del cultivo de *Staphylococcus aureus* mantenido en la placa de agar TSA: se transfiere cierto número de colonias en un tubo de ensayo utilizando una asa bacteriológica. El tubo contiene 10 mL de solución salina isotónica estéril

0.85%. Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvo una turbidez equivalente al estándar Mc Farland de 0.5%, el cual se prepara adicionando 0.05 mL de BaCl₂ al 1% + 9.95 mL de H₂SO₄ al 1%, obteniéndose una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 MO/mL. De igual manera se realizó para ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***. (Anexo N° 9)

4.4.3.5 Inoculación de las placas

Por el método del extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión de microorganismo equivalente a 1.5×10^8 MO/mL se inoculó uniformemente la superficie del medio Agar Müller-Hinton para cada una de las cepas. Para el ***Streptococcus pneumoniae*** el medio Agar Müller-Hinton se modifica añadiéndole 7% de sangre, con la finalidad de cubrir los requerimientos de dichas bacterias. El medio se deja secar con la suspensión de microorganismo durante 10 minutos a temperatura ambiente en condiciones estériles. (Anexo N° 10)

4.4.3.6 Inoculación de la solución prueba

Se colocaron sobre la superficie del medio inoculado cuatro cilindros de acero inoxidable, a intervalos de 90° entre cada uno; luego se llenaron con una micropipeta con la solución de prueba y se incubaron a 37 °C por 24 y 48 horas. Los diámetros de inhibición se midieron con medidor Vernier. Las pruebas se realizaron por duplicado para cada dilución de cada fracción, se colocaron

discos de Penicilina para ***Staphylococcus aureus***, de Gentamicina para ***Pseudomona aeruginosa*** y de Ampicilina para ***Streptococcus pneumoniae***, los cuales sirvieron como parámetro de referencia, para comparar la eficiencia de las fracciones del extracto diclorometánico. Además de los parámetros antes mencionados, se agregaron otros que contenían en los cilindros únicamente alcohol etílico al 70%, yodo al 2%, además de los controles positivos y negativos, en presencia de microorganismos inoculados en las placas. (Anexo N° 10)

Como parámetros de referencia de los halos de inhibición, se utilizaron normatizaciones interpretativas de los diámetros de las zonas, basados en el método de Kirby Bauer Modificado (Anexo N°. 11)

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Caracterización organoléptica del extracto diclorometánico de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*.

La goma-resina del *Eucalyptus citriodora* sin haber recibido ningún tratamiento, posee una consistencia pastosa o quebradiza al haber estado expuesta a la luz solar.

Al extracto diclorometánico de la goma-resina obtenido por medio de la partición líquido-líquido agua/diclorometano, se le determinaron las características organolépticas.

CUADRO N° 11 Características organolépticas del extracto diclorometánico de la goma-resina deL *Eucalyptus citriodora*

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS	CARACTERÍSTICAS FISICAS
Color	Amarillo
Olor	Desagradable
Consistencia	sólido

5.2 Análisis Espectroscópico realizado por medio de RMN-¹H de las fracciones 10%, 30% y 50% de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

5.2.1 Análisis y discusión del espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano: AcOEt 10%.

En el espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz), se observaron señales para metilenos a δ_H 1.27 (sa) y metilos terminales como triplete a δ_H 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz), característica de una cadena *n*-alquíllica₍₃₃₎. Además se observaron señales de metilenos en posición β y α al grupo ácido a δ_H 2.0 (t, $J = 5.5$ Hz) y 2.29 (c, $J = 7.5$ Hz).

El espectro de RMN-¹H mostró señales a δ_H 6.44 y 7.68 (d, $J = 15.9$ Hz), correspondientes a los protones H₈ y H₇ del sistemas *trans* de doble enlace del cafeato₍₃₃₎ (Fig. N° 8).

El análisis detallado de las señales observadas en el espectro de RMN-¹H de la fracción del 10% se representa en el cuadro N° 12.

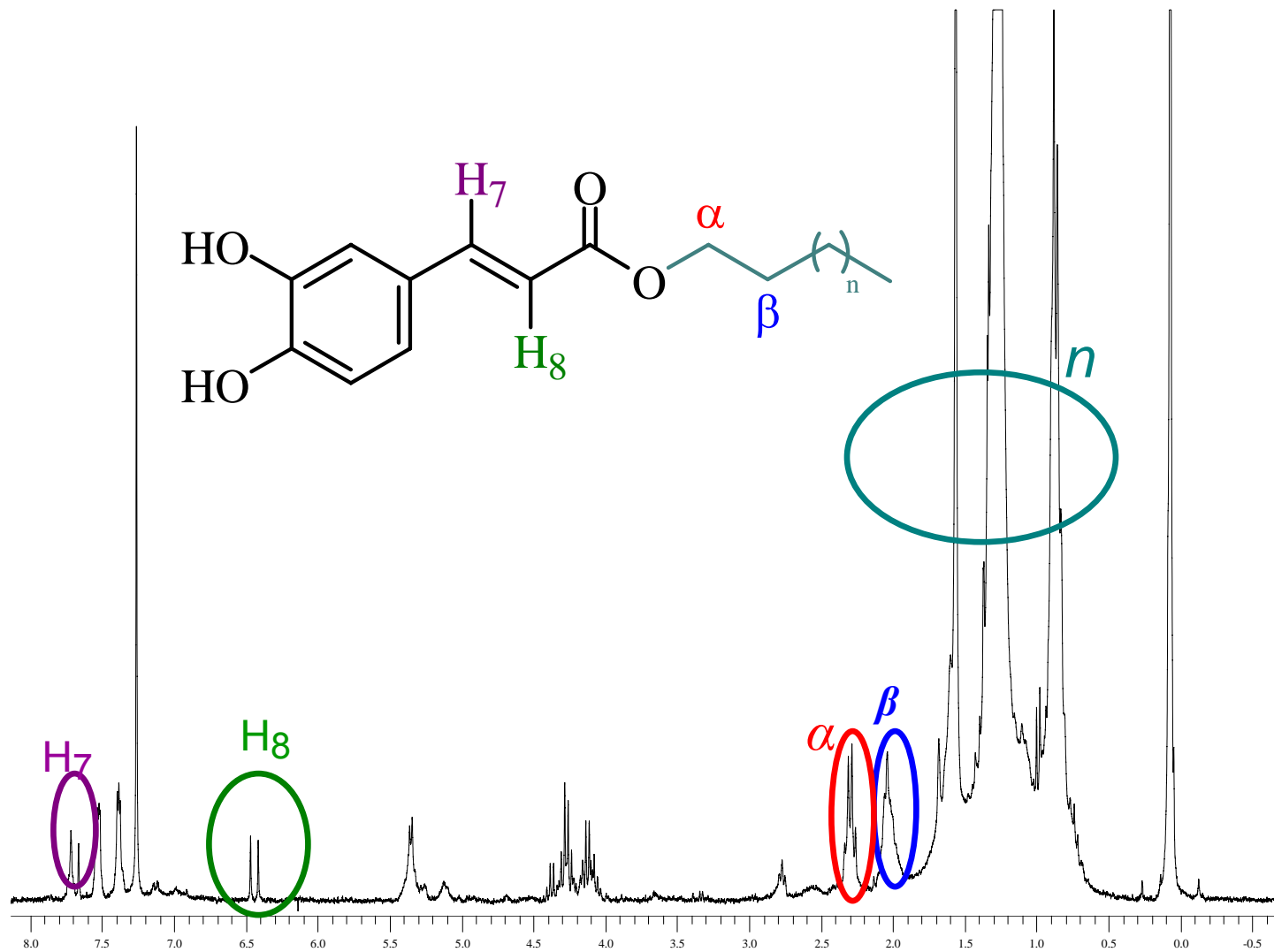


Fig. N° 8. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 10 %

CUADRO N° 12. Datos de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 10%

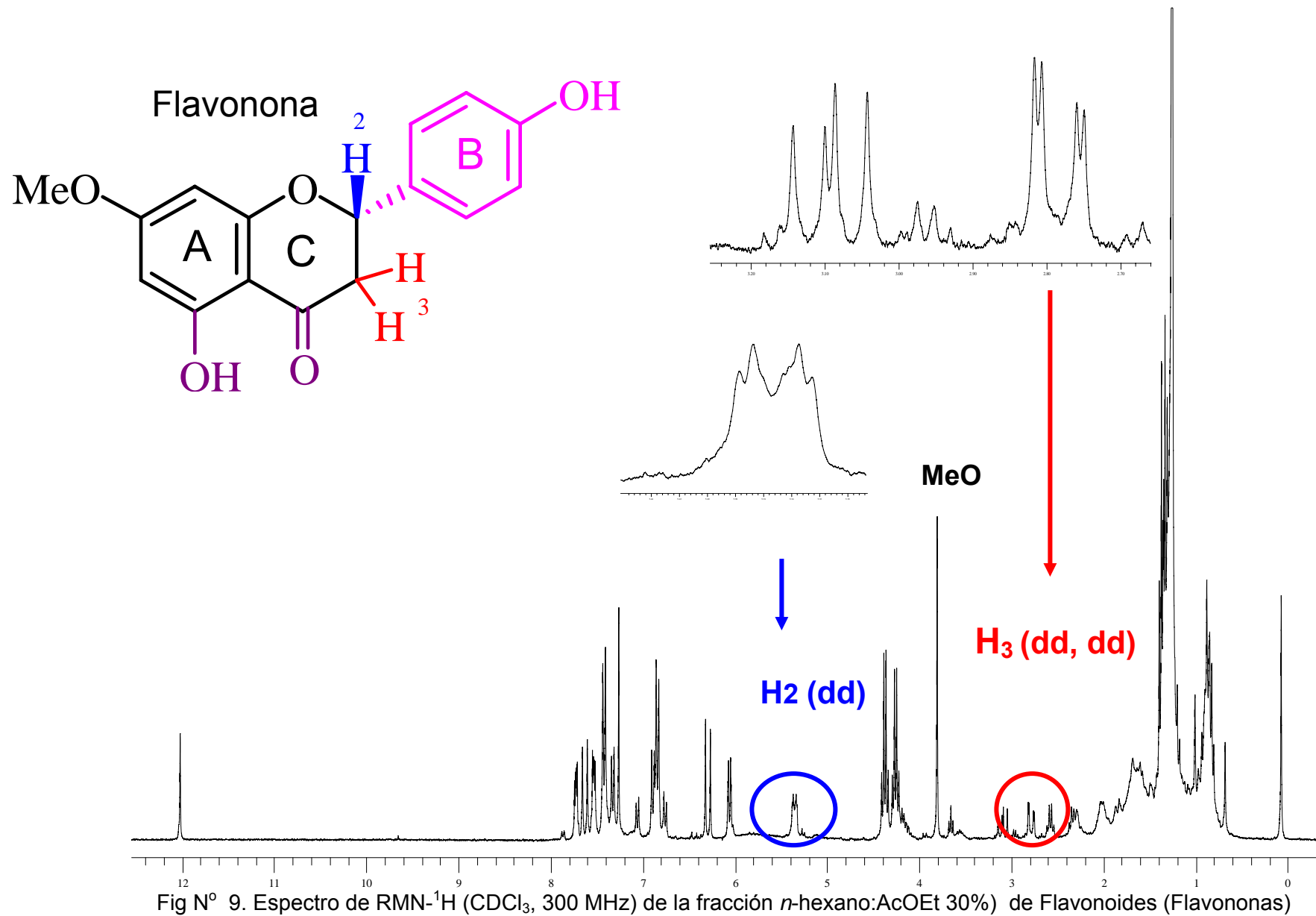
Tipo de protón (Metabolitos secundarios)	δ (ppm)	J (Hz)
CH₃- (Cadena <i>n</i> -alquilica)	0.88 (t)	7.3
-CH₂- (Cadena <i>n</i> -alquilica)	1.27 (sa)	-
H α (Cadena <i>n</i> -alquilica)	2.29 (c)	7.5
H β (Cadena <i>n</i> -alquilica)	2.00 (t)	5.5
H₈ (Sistemas <i>trans</i> del cafeato)	6.44 (d)	15.9
H₇ (Sistemas <i>trans</i> del cafeato)	7.68 (d)	15.9

5.2.2 Análisis y discusión del espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30%.

En el espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) se observan señales a δ_H 2.78 (H-3, dd, $J = 2.8$ Hz, 17.1 Hz) y 3.1 (H-3, dd, $J = 12.8$ Hz, 17.0 Hz) correspondientes a dos protones metilénicos de flavononas sobre la posición 3, así como también la presencia de un protón bencílico de flavonona en H₂ a δ_H 5.35 (H-2, dd, $J = 2.8$ Hz, 2.8 Hz), además de un grupo MeO a δ_H 3.80 (s) (Fig. N° 9). También se observan señales para dos protones vinílicos H₃ y H₂ que indican sistemas *trans* de dobles enlaces de chalconas a δ_H 6.30 (H-3, d, $J = 15.9$ Hz) y 7.62 (H-2, d, $J = 15.9$ Hz) (Fig. N° 10).

Además el análisis del espectro mostró señales de flavonoides en posición *orto* Ha y Hb a δ_H 6.84 (d, $J = 8.4$ Hz) y 6.88 (d, $J = 8.5$ Hz) (Fig. N° 10). También se observó un OH quelatado de flavonoides ubicados sobre el C₅ del anillo aromático a δ_H 12.02 (s) (Fig. N° 4). Cabe mencionar la presencia de protones metílicos y metilénicos característicos de los triterpenos₍₃₃₎ a δ_H 0.88 (t, $J = 7.3$ Hz) y 1.27 (m) (Fig. N° 11).

El análisis detallado de las señales observadas en el espectro de la fracción del 30% se muestra en el cuadro N° 13.



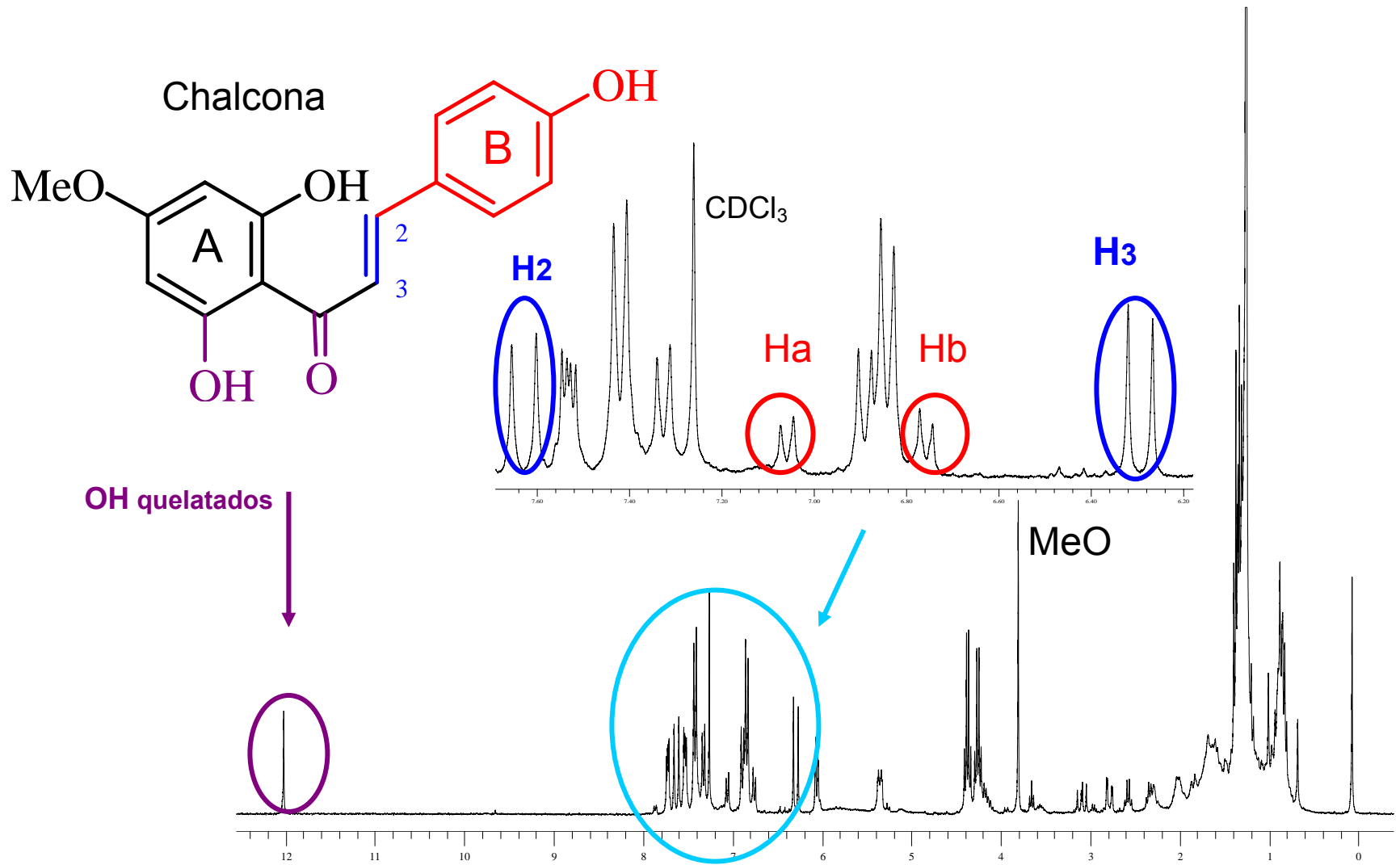


Fig N° 10 Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30% de Flavonoides (Chalconas)

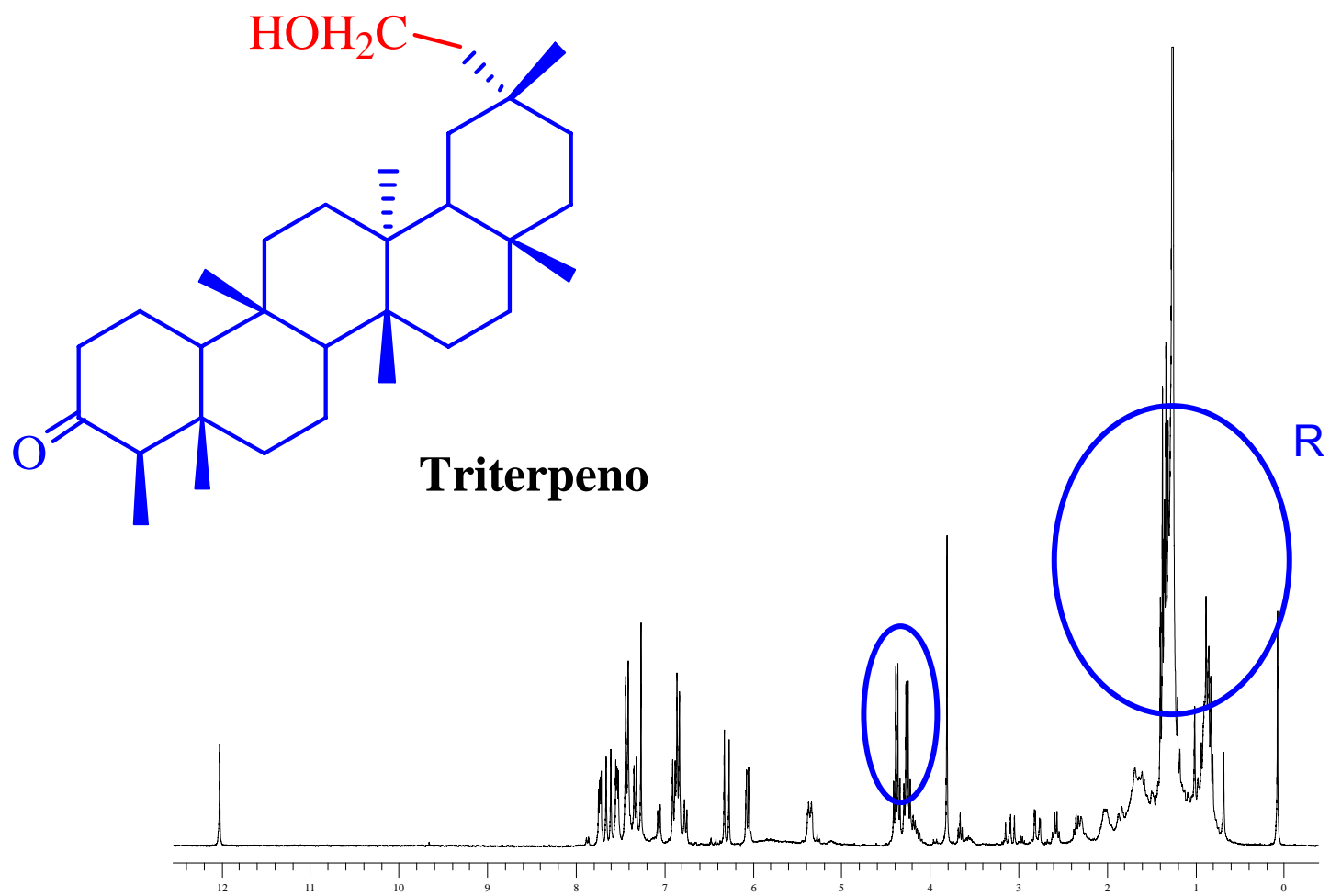


Fig N° 11. Espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30% de Triterpenos

CUADRO N° 13. Datos de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 30%.

Tipo de protón (Metabolitos secundarios)	δ (ppm)	J (Hz)
H3 (Metileno de flavonona)	2.78 (dd)	2.8 17.1
H3 (Metileno de flavonona)	3.10 (dd)	12.8 17.0
H2 (Bencílico de flavononas)	5.35 (dd)	2.8 2.8
H2 (<i>trans</i> de chalconas)	7.62 (d)	15.9
H3 (<i>trans</i> de chalconas)	6.30 (d)	15.9
Ha (Flavonoides)	6.84 (d)	8.4
Hb (Flavonoides)	6.88 (d)	8.5
OH (Flavonoides)	12.02 (s)	-
OMe	3.8 (s)	-
CH₃ - (Triterpenos)	0.88 (t)	7.3
-CH₂ - (Triterpenos)	1.27 (m)	-

5.2.3 Análisis y discusión del espectro de RMN-¹H de la fracción

n-hexano:AcOEt 50%

En el espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) se observaron señales de dos protones metilénicos de flavonoides en H₃ a δ_H 2.78 (H-3, dd, $J = 2.8$ Hz, 17.1 Hz) y 3.10 (H-3, dd, $J = 12.8$ Hz, 17.0 Hz), así como también la presencia de un protón bencílico de flavonona en H₂ a δ_H 5.35 (H-2, dd, $J = 2.8$ Hz, 2.8 Hz), además de un grupo MeO a δ_H 3.80 (s) (Fig. N° 12).

También el espectro mostró dobles enlaces *trans* de chalconas en H₃ y H₂ a δ_H 6.30 (H-3, d, $J = 15.9$ Hz) y 7.62 (H-2, d, $J = 15.9$ Hz) (Fig. N° 13).

Cabe mencionar la presencia de 9 señales de protón pertenecientes a OH quelatados de flavonoides a δ_H 11.20, 11.27, 11.40, 11.80, 12.02, 12.05, 12.17, 12.18 y 12.21 ppm, todos como singuletes (Fig. N° 12).

El análisis detallado de las señales observadas en el espectro de RMN-¹H de la fracción antes mencionada, confirma la presencia de flavononas, chalconas y flavonoides quelatados y estos se muestran en el cuadro N° 14.

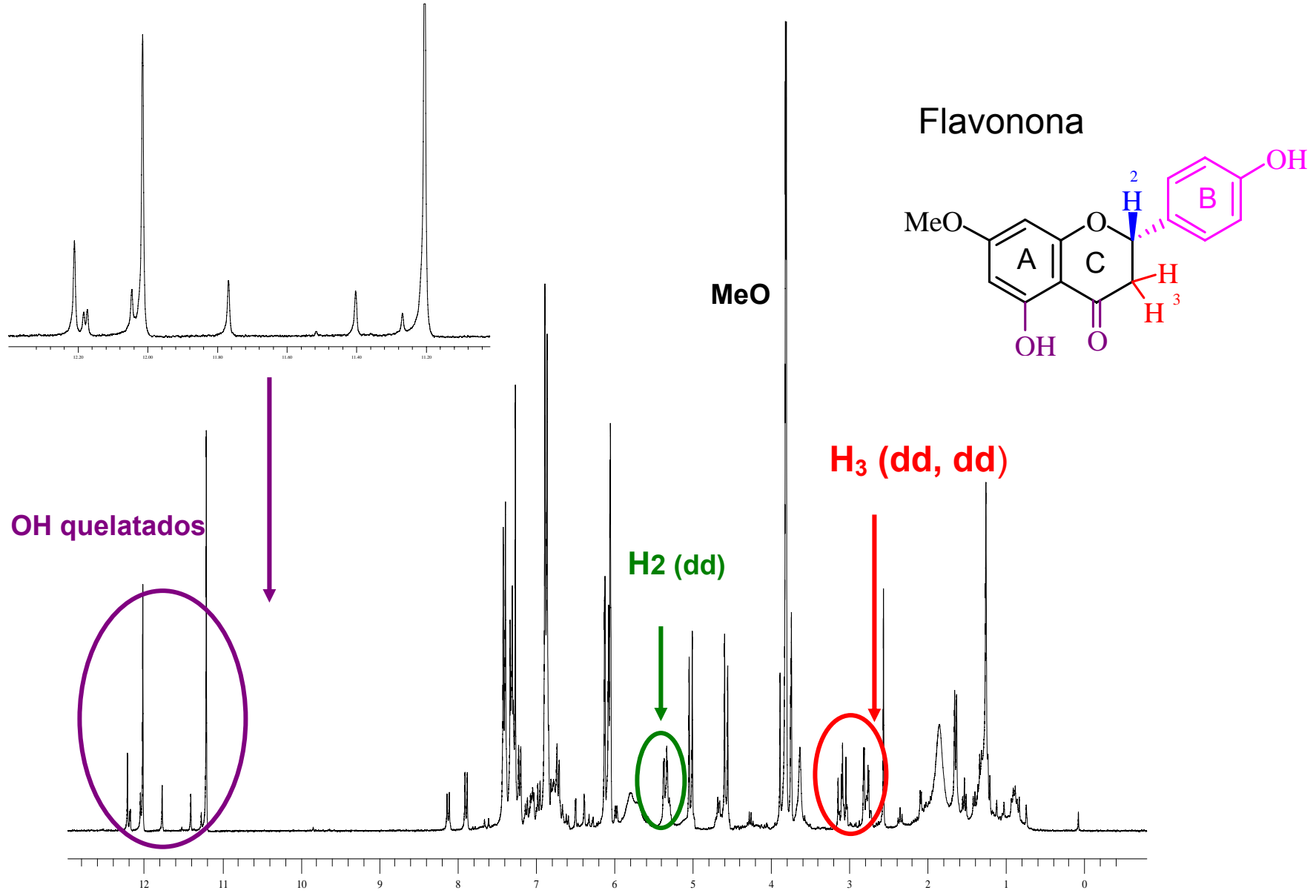


Fig N° 12 Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% de Flavonoides (Flavononas)

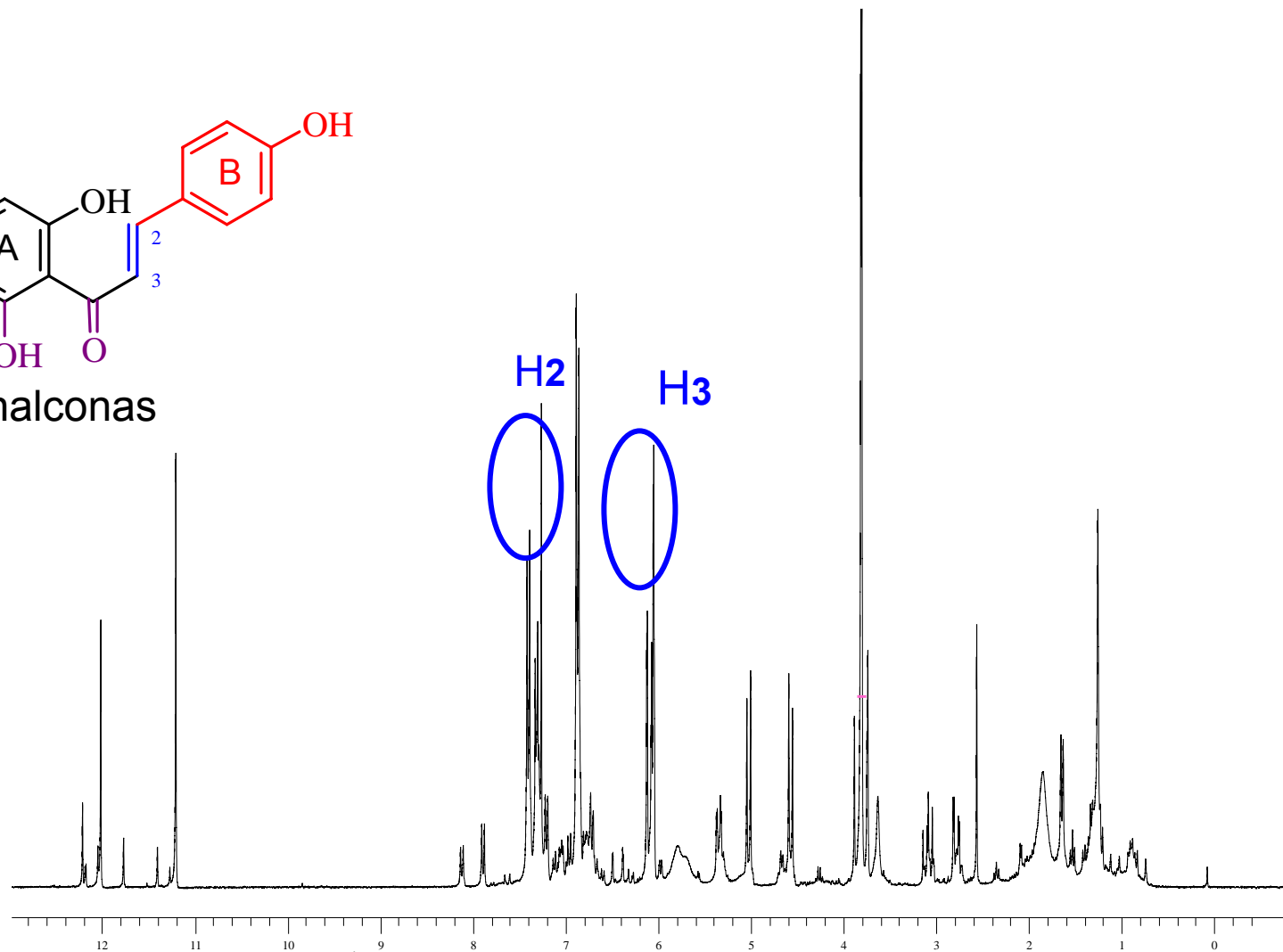
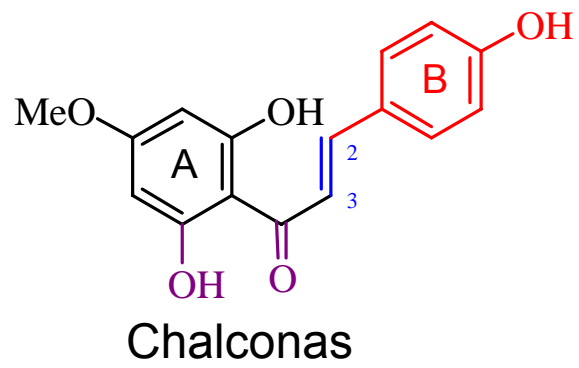


Fig N° 13. Espectro de RMN-¹H (CDCl₃, 300 MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50% de Flavonoides (Chalconas)

CUADRO N° 14. Datos de RMN-¹H (CDCL₃, 300 MHz) de la fracción *n*-hexano:AcOEt 50%.

Tipo de protón (Metabolitos secundarios)	δ (ppm)	J (Hz)
H₃ (Metileno de flavonona)	2.78 (dd)	2.8 17.1
H₃ (Metileno de flavonona)	3.10 (dd)	12.8 17.0
H₂ (Bencílico de flavononas)	5.35 (dd)	2.8 2.8
H₂ (<i>trans</i> de chalcona)	7.62 (d)	15.9
H₃ (<i>trans</i> de chalconas)	6.30 (d)	15.9
OH (Quelatos de flavonoides)	11.20(s),11.27(s),11.40(s), 11.80(s),12.02(s),12.05(s), 12.17(s),12.18(s),12.21 (s).	-
OMe	3.8 (s)	-

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

Se realizaron cuatro extracciones con etanol al 95% a partir del *Eucalyptus citriodora*.

Cantidad de muestra = 2,102.88 g

Cantidad de extracto etanólico obtenido = 2,097.40 g

Porcentaje de rendimiento = 99.75 %

$$2,102.88 \text{ g} \quad \text{_____} \quad 100 \%$$

$$2,097.40 \text{ g} \quad \text{_____} \quad X$$

$$X = 99.75 \%$$

De igual manera se realizaron cuatro particiones agua/diclorometano a partir del extracto etanólico obtenido.

Cantidad de extracto etanólico = 2,097.40 g

Cantidad de extracto diclorometánico obtenido = 158.10 g

Porcentaje de rendimiento = 7.54 %

$$2,097.40 \text{ g} \quad \text{_____} \quad 100 \%$$

$$158.10 \text{ g} \quad \text{_____} \quad X$$

$$X = 7.54 \%$$

Se realizó una columna cromatográfica con 94.60 g de extracto diclorometánico, obteniéndose la cantidad de:

Fracción 10% : 2.75 g

Fracción 30% : 2.55 g

Fracción 50% : 3.55 g

TOTAL: 8.85 g

Para la obtención del extracto etanólico se realizaron cuatro extracciones con 3 equipo soxhlet durante cuatro semanas, el porcentaje de rendimiento practico obtenido fue de 99.75%. En cuanto a la obtención del extracto diclorometánico, se realizaron cuatro extracciones en dos ampollas de separación durante cuatro semanas, en este caso se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 7.54%, debido a que hay más sustancias polares presentes en la goma-resina del ***E. citriodora***, que se van a la fase acuosa al realizar la separación, obteniéndose así una mayor purificación de los metabolitos secundarios deseados.

Además se realizó una columna cromatográfica con 94.60 g de extracto diclorometánico durante una semana, obteniéndose las fracciones las cuales se dejaron evaporar a temperatura ambiente por dos semanas, obteniéndose las cantidades de 2.75 g, 2.55 g y 3.55 g para las fracciones de 10%, 30% y 50% respectivamente.

5.4 Preparación de las diluciones de las fracciones 10%, 30% y 50% de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* .

La obtención de la dilución de la solución patrón se realizó basándonos en el trabajo de graduación de Méndez R. y otros “Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto)”, tomando como referencia las diluciones realizadas en dicha investigación, en la cual se partió de una solución de patrón.

Se pesaron en una balanza analítica exactamente 750 mg de cada una de las fracciones y se diluyeron con alcohol etílico al 70% hasta llevar a volumen en un balón volumétrico de 25 mL, luego se homogeniza la solución así como el resto de las diluciones que se elaboraron. Se realizaron utilizando pipetas volumétricas, tomando una determinada alícuota y llevando a volumen en un balón volumétrico, homogenizar la solución y así sucesivamente para cada una de las diluciones. (Anexo N° 13)

5.5 Resultados de la evaluación microbiológica

5.5.1 Pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*.

CUADRO N^o 15. Pruebas de identificación del *Staphylococcus aureus*

PRUEBAS	RESULTADOS
Características microscópicas	Coloración al Gram: microorganismos grampositivos. Se observan en forma de cocos, unidos en pares y en racimos, color azul.
Características macroscópicas	En medio selectivo de agar Chapman se observan colonias color amarillo dorado. En medio agar Bair-Parker se observan colonias de color negro lustroso. Pruebas positivas (+).
Identificación y diferenciación	Catalasa: al colocar H ₂ O ₂ se produce una efervescencia rápida. Prueba positiva (+) Coagulasa: se observa una coagulación total de plasma. Prueba positiva (+)

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS

IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

Morfología Macroscópica: la cepa después de sembrarse en medio selectivo de Agar Chapman mostró colonias de color amarillo dorado intenso, además se sembró en Agar Bair-Parker en donde se observaron colonias negras,

lustrosas, redondas, con bordes convexos estrechos blanquecinos, rodeados por un halo claro.

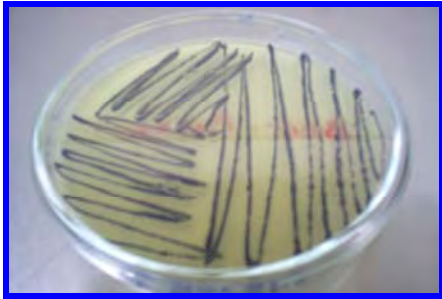


Fig. N° 14 *Staphylococcus aureus*
en Agar Bair-Parker



Fig. N° 15 *Staphylococcus aureus*
en Agar Chapman

Morfología Microscópica: al realizar la tinción al Gram a la cepa, se observan en el microscopio bacterias esféricas, en forma de cocos unidos en pares y en racimos, de color azul oscuro, lo que indica que es Grampositivo.



Fig. N° 16 *Staphylococcus aureus*
en coloración al Gram

Pruebas de identificación y diferenciación: las pruebas de catalasa y la coagulasa resultaron positiva, asegurando así la identificación del *Staphylococcus aureus*, ya que indican genero y especie respectivamente.



Fig. N° 17 Prueba de Catalasa Positivo (+)



Fig. N° 18 Prueba de Coagulasa Positivo (+)

CUADRO N° 16. Morfología microscópica y macroscópica de la *Pseudomona aeruginosa*.

PRUEBAS	RESULTADOS
Características Microscópicas	Coloración al Gram: se observan bacterias en forma de bacilos, color rosados. Grampositivos
Características Macroscópicas	En medio selectivo agar cetrimide, se observan colonias grandes, con pigmento verde-azulado. Prueba positiva (+).

CUADRO N° 17. Pruebas de identificación y diferenciación de *Pseudomona aeruginosa* (Anexo N° 7)

PRUEBAS BIOQUIMICAS	RESULTADOS
TSI	K/K
Citrato	+
Indol	-
Rojo de metilo	-
Voges Proskauer	-
Movilidad	+
Oxidasa	+

K/K = Pico de flauta alcalina / profundidad alcalina

(+) = Positivo (-) = Negativo

IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomona aeruginosa*

Morfología macroscópica: la bacteria luego de sembrarse en medio selectivo de Agar Cetrimide mostró colonias grandes diseminadas de bordes irregulares y consistencia grasosa, con formación de pigmento verde-azulado (Piocianina).

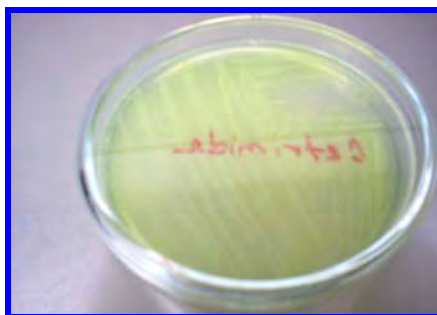


Fig.N° 19. *Pseudomona aeruginosa* en Agar Cetrimide

Morfología microscópica: al realizar la coloración al Gram de la cepa, en el microscopio se observaron bacterias en forma de bastones delgados pequeños, unidos en pares y cadenas cortas, de color rosado, lo que indica que es Gramnegativo.



Fig. N° 20 *P. aeruginosa* en tinción Gram

Pruebas de identificación y diferenciación: se realizaron las pruebas bioquímicas, resultando positivas: la prueba de TSI presentó K/K bisel alcalino y fondo alcalino, lo que indica que la bacteria no fermenta los azúcares, la prueba de movilidad indica la presencia de flagelos, la prueba de citrato confirma que la cepa a utilizado el citrato como fuente de carbono y la prueba de oxidasa determina la presencia de dicha enzima, siendo estas pruebas características de la *Pseudomonas aeruginosa*, y a la vez se confirma que la bacteria analizada se encuentra en óptimas condiciones y sin contaminación de otro microorganismo.

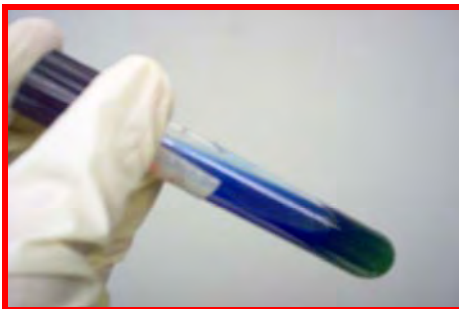


Fig. N° 21 Prueba de citrato
Positiva (+)

CUADRO N° 18. Pruebas de identificación del *Streptococcus pneumoniae*

PRUEBAS	RESULTADOS
Características microscópicas	Coloración al Gram: se observan bacterias en forma lanceolada, con cápsulas. Grampositivo
Características macroscópicas	En medio Agar Sangre, se observan colonias de color verde, en forma de cadenas, de color verde. Prueba positiva (+)
Identificación y diferenciación	En una placa de Agar Sangre, se colocan discos de Optoquin, el cual presenta zona de inhibición alrededor de éste. Prueba positiva (+) Catalasa: al colocar H ₂ O ₂ no se produce una efervescencia rápida. Prueba negativa (-)

IDENTIFICACIÓN DE *Streptococcus pneumoniae*

Morfología macroscópica: las bacterias después de sembrarse en medio selectivo de Agar sangre, mostró colonias grandes, de color verde rodeado de una zona de α -hemólisis.



Fig. N° 22. *Streptococcus pneumoniae*
en Agar Sangre

Morfología microscópica: al realizar la coloración al Gram de la bacteria, en el microscopio se observan bacterias en forma de diplocos, lanceolados, unidos en cadenas, con cápsulas y de color azul oscuro, lo que indica que es grampositivo.

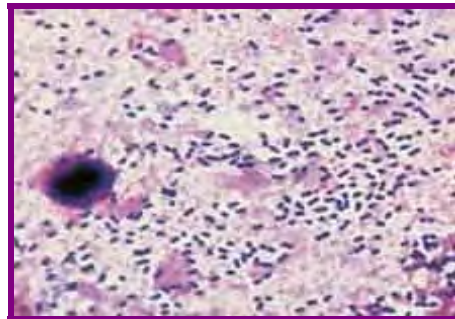


Fig. N° 23. *E. pneumoniae* en tinción Gram.

Prueba de identificación y diferenciación: se realizó la prueba de disco de Optoquin, el cual se considera positiva ya que hay inhibición alrededor del desarrollo bacteriano alrededor de dicho disco.



Fig. N° 24. *E. pneumoniae* en discos de Optoquin

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN

CUADRO N^o 19. Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30% y 50%) de la goma-resina por el método de Kirby Bauer Modificado para *Staphylococcus aureus*

FRACCIONES	DILUCIONES	RESULTADO
10%	0.5%	Formación de halos de 9 mm de diámetro. MO resistente
	1.0%	Formación de halos de 11 mm de diámetro. MO resistente
	2.0%	Formación de halos de 12 mm de diámetro. MO resistente
	3.0%	Formación de halos de 13 mm de diámetro. MO intermedio
30%	0.5%	Formación de halos de 16 mm de diámetro. MO susceptible
	1.0%	Formación de halos de 14 mm de diámetro. MO susceptible
	2.0%	Formación de halos de 16 mm de diámetro. MO susceptible
	3.0%	Formación de halos de 18 mm de diámetro. MO susceptible
50%	0.5%	Formación de halos de 14 mm de diámetro. MO susceptible
	1.0%	Formación de halos de 17 mm de diámetro. MO susceptible
	2.0%	Formación de halos de 18 mm de diámetro. MO susceptible
	3.0%	Formación de halos de 19 mm de diámetro. MO susceptible

BLANCO: ETANOL AL 70%	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa. MO resistente
PATRON: YODO AL 2%	Formación de halos grandes. No hay crecimiento en toda la placa. MO susceptible
PATRON: DISCO DE ANTIBIÓTICO DE PENICILINA 10 unidades	Formación de halos de 39 mm de diámetro. MO susceptible
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa.

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halos de inhibición alrededor del cilindro

RESISTENTE: no hay formación de halos de inhibición alrededor del cilindro.

Resultados de la evaluación microbiológica, de las fracciones de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), por el método de Kirby Bauer Modificado con *Staphylococcus aureus*.

Según los resultados obtenidos se considera la cepa resistente a las diluciones (0.5%, 1.0%, 2.0% y 3.0%) de la fracción del 10% y susceptible a las fracciones del 30% y 50%, ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición.

Se llevó un blanco con alcohol etílico al 70%, presentando la bacteria un crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, lo que significa que el efecto antibacteriano se debe a las diluciones de las fracciones y no a dicho solvente.

Se realizó una comparación entre las diluciones de las fracciones y sustancias de actividad antimicrobiana conocida, como la solución de yodo al 2% y discos de antibiótico de penicilina, en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antimicrobiana del yodo y de la penicilina, en comparación a las diluciones de las fracciones.

Se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, con el fin de determinar la presencia de la cepa, a través de su crecimiento uniforme y abundante y la no contaminación de bacterias del medio respectivamente (Cuadro N° 19).

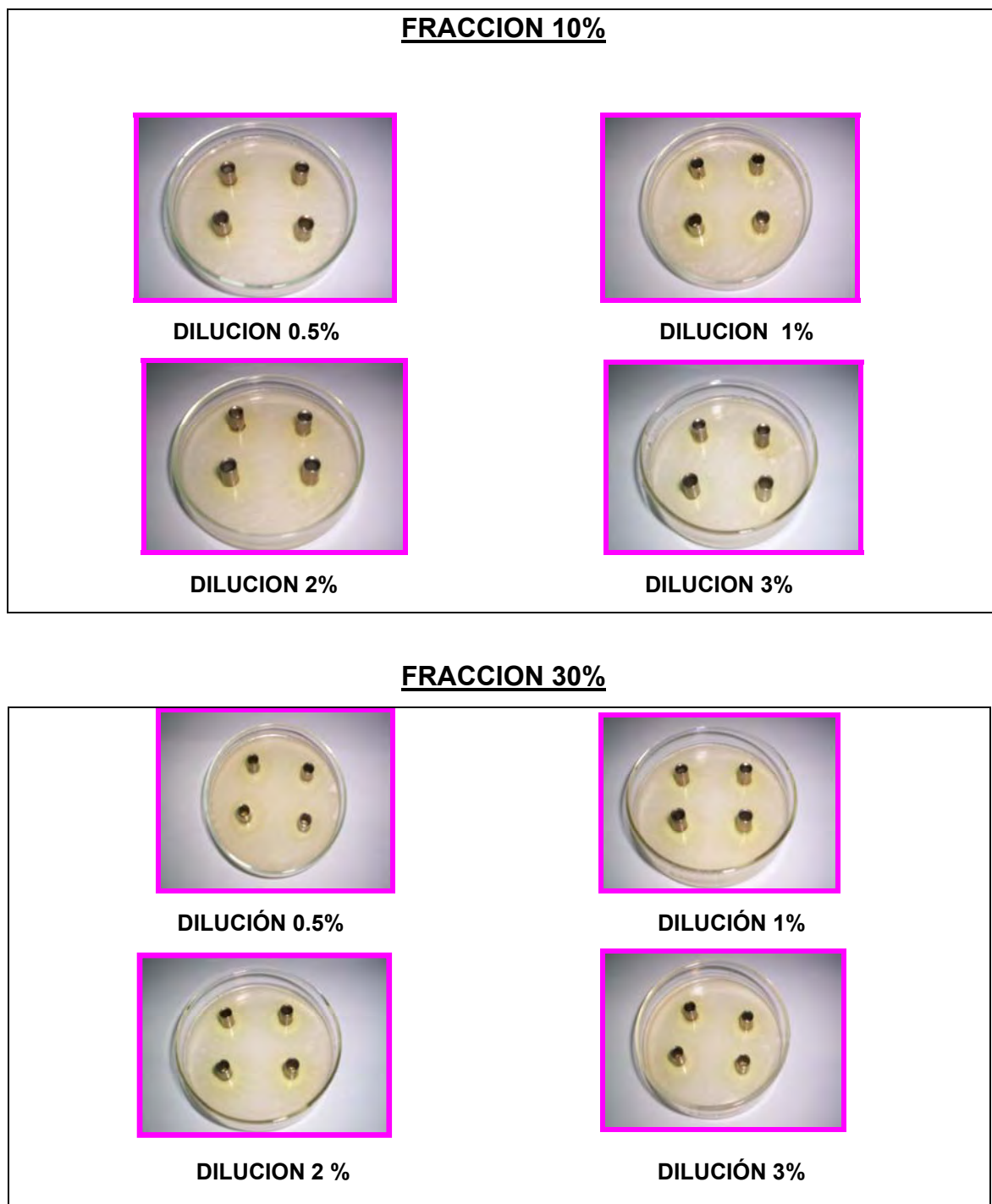


Fig N° 25 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*

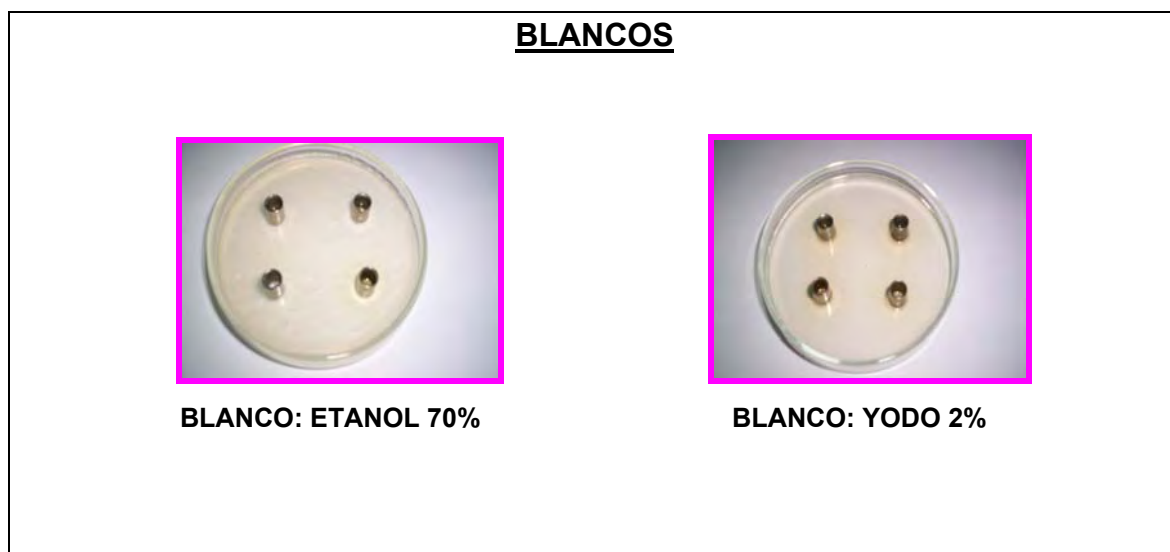
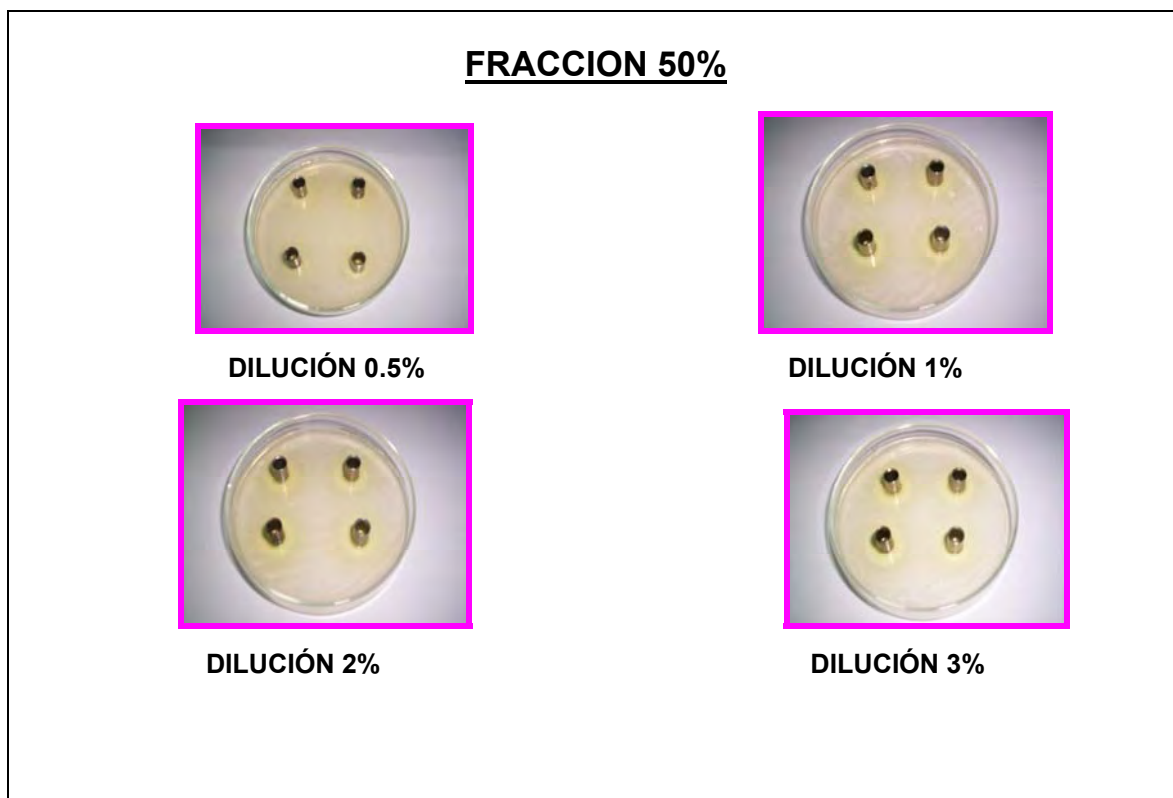


Fig N° 25 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*

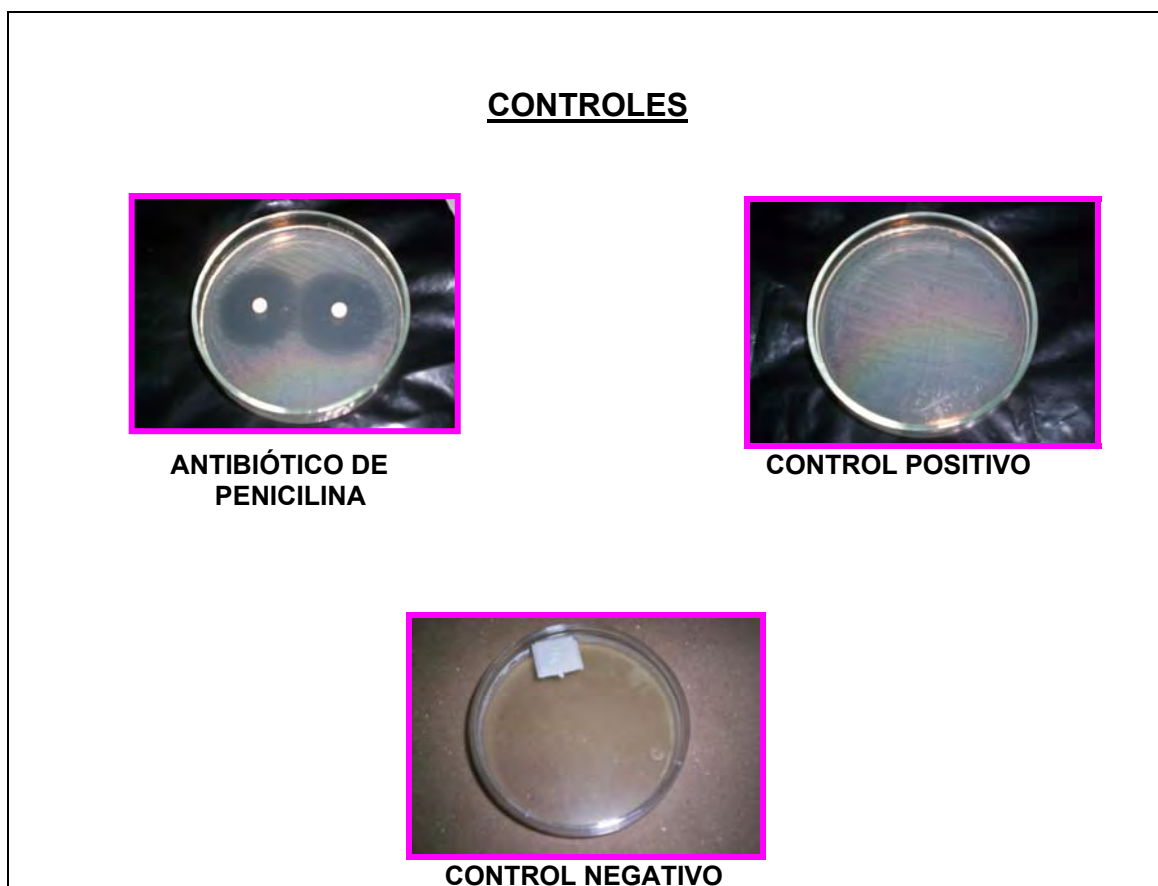


Fig N° 25 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN

CUADRO N° 20. Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes

diluciones de las fracciones (10%, 30% y 50%) de la goma-

resina por el método de Kirby Bauer Modificado para

Pseudomona aeruginosa

FRACCIONES	DILUCIONES	RESULTADO
10%	0.25%	Formación de halos de 20 mm de diámetro. MO susceptible
	0.5%	Formación de halos de 16 mm de diámetro. MO susceptible
	0.75%	Formación de halos de 30 mm de diámetro. MO susceptible
	1.0%	Formación de halos de 21 mm de diámetro. MO susceptible
30%	0.25%	Formación de halos de 22 mm de diámetro. MO susceptible
	0.5%	Formación de halos de 20 mm de diámetro. MO susceptible
	0.75%	Formación de halos de 32 mm de diámetro. MO susceptible
	1.0%	Formación de halos de 23 mm de diámetro. MO susceptible
50%	0.25%	Formación de halos de 21 mm de diámetro. MO susceptible
	0.5%	Formación de halos de 20 mm de diámetro. MO susceptible
	0.75%	Formación de halos de 33 mm de diámetro. MO susceptible
	1.0%	Formación de halos de 22 mm de diámetro. MO susceptible

BLANCO: ETANOL AL 70%	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa. MO resistente
PATRON: YODO AL 2%	Formación de halos de 24 mm. MO susceptible
PATRON: DISCO DE ANTIBIÓTICO DE GENTAMICINA 10 unidades	Formación de halos de 19 mm de diámetro. MO susceptible
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa.

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halos de inhibición alrededor del cilindro

RESISTENTE: no hay formación de halos de inhibición alrededor del cilindro.

Resultados de la evaluación microbiológica, de las fracciones de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), por el método de Kirby Bauer Modificado con *Pseudomonas aeruginosa*.

Según los resultados obtenidos se considera la cepa susceptible a las diluciones (0.25%, 0.5%, 0.75% y 1.0%) de las fracciones de 10%, 30% y 50%, ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición.

Se llevó un blanco con alcohol etílico al 70%, presentando la bacteria un crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, lo que significa

que el efecto antibacteriano se debe a las diluciones de las fracciones y no a dicho solvente.

También se realizó una comparación entre las diluciones de las fracciones y sustancias de actividad antimicrobiana conocida, como la solución de yodo al 2% y discos de antibiótico de gentamicina, en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antimicrobiana del yodo y de la gentamicina, en comparación a las diluciones de las fracciones.

Además se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, con el fin de determinar la presencia de la cepa, a través de su crecimiento uniforme y abundante y la no contaminación de bacterias del medio respectivamente (Cuadro N° 20).

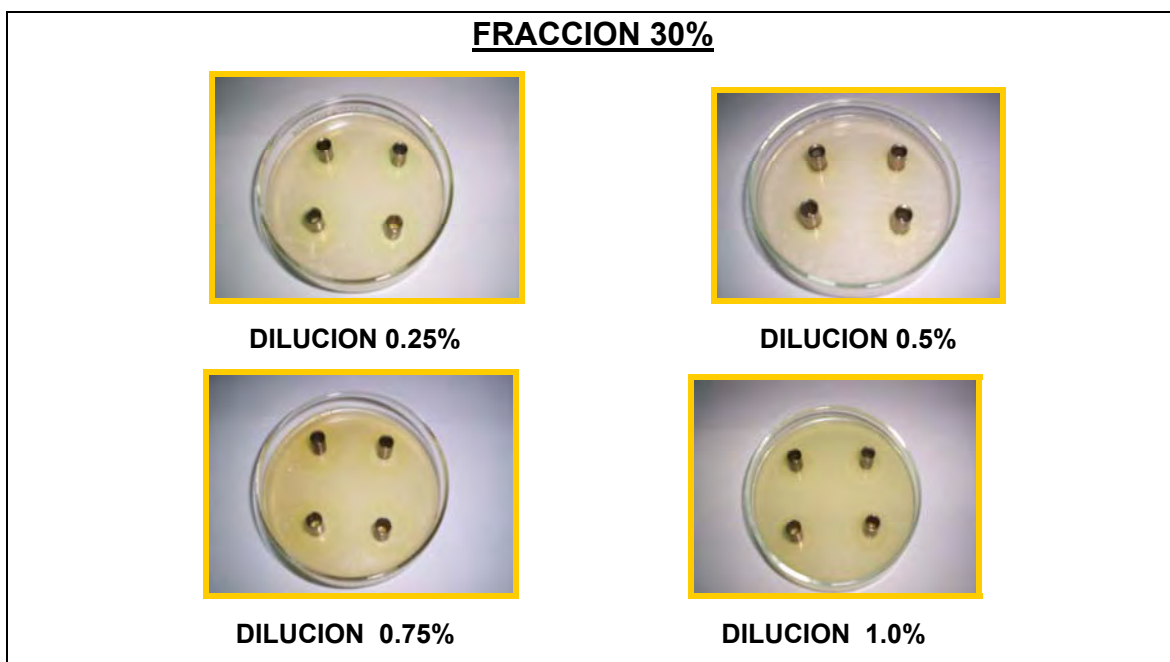
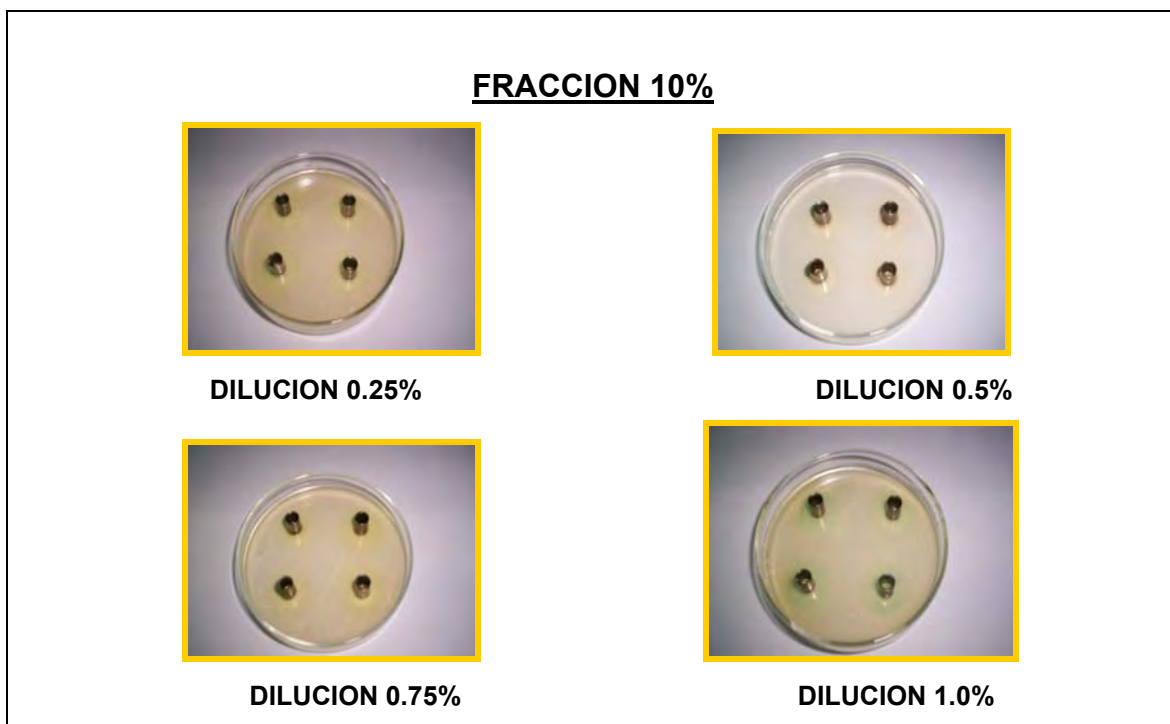


Fig N° 26 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Pseudomonas aeruginosa*

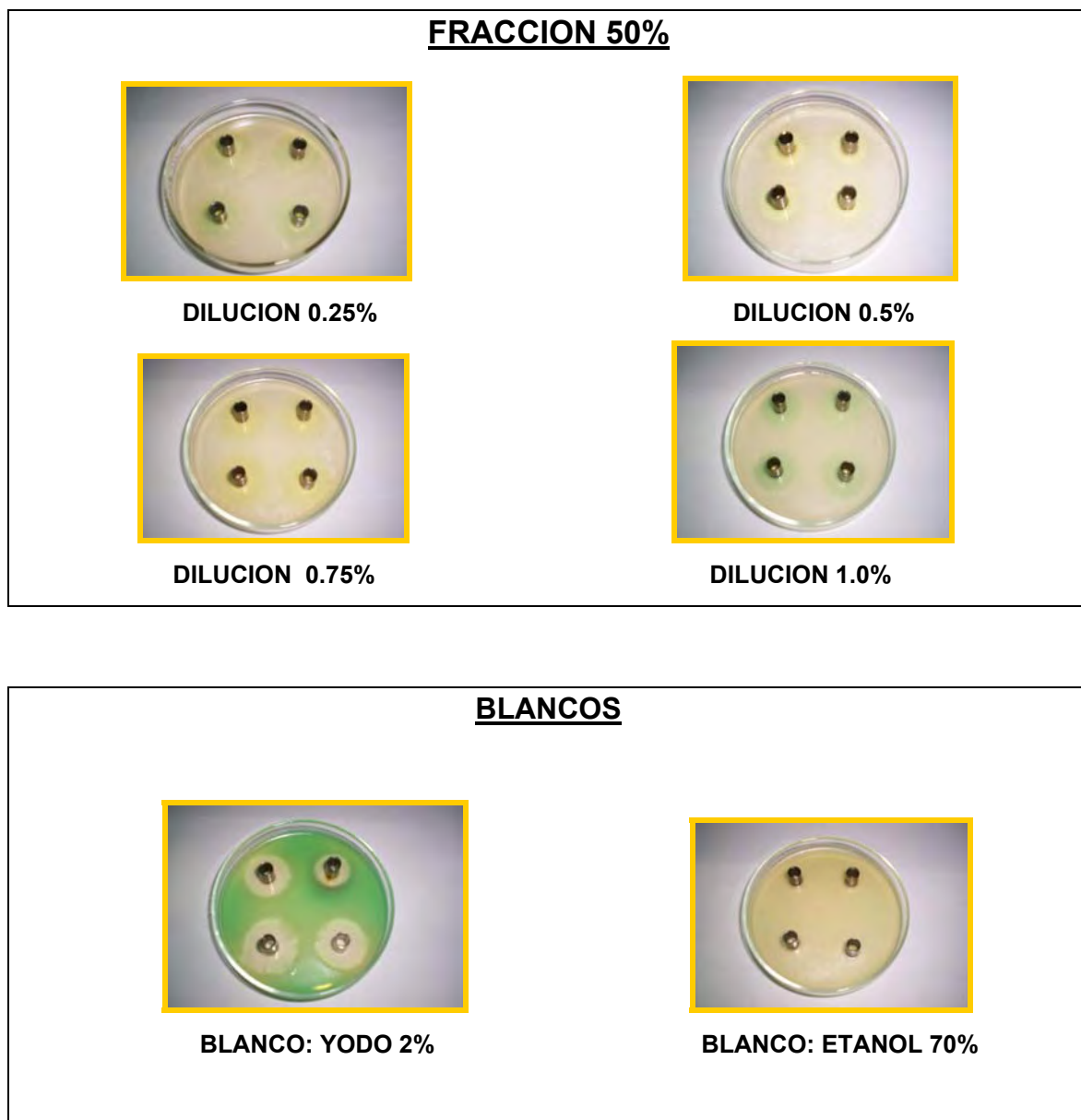


Fig N° 26 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Pseudomonas aeruginosa*

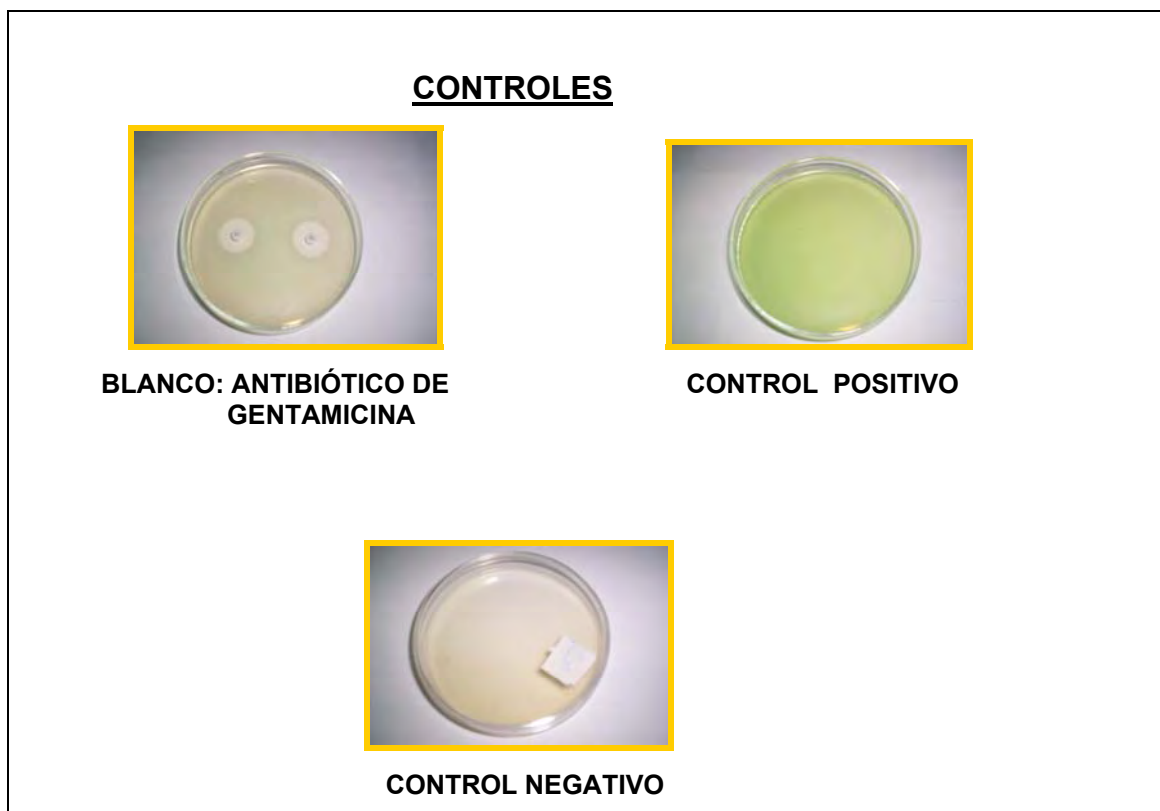


Fig N° 26 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Pseudomonas aeruginosa*

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN
CUADRO N° 21. Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes diluciones de las fracciones (10%, 30% y 50%) de la goma-resina por el método de Kirby Bauer Modificado para *Streptococcus pneumoniae*.

FRACCIONES	DILUCIONES	RESULTADO
10%	0.5%	Formación de halos de 9 mm de diámetro. MO resistente
	0.75%	Formación de halos de 9 mm de diámetro. MO resistente
	1.5%	Formación de halos de 12 mm de diámetro. MO resistente
	3.0%	Formación de halos de 16 mm de diámetro. MO resistente
30%	0.5%	Formación de halos de 11 mm de diámetro. MO resistente
	0.75%	Formación de halos de 12 mm de diámetro. MO resistente
	1.5%	Formación de halos de 12 mm de diámetro. MO resistente
	3.0%	Formación de halos de 16 mm de diámetro. MO resistente
50%	0.5%	Formación de halos de 11 mm de diámetro. MO resistente
	0.75%	Formación de halos de 14 mm de diámetro. MO resistente
	1.5%	Formación de halos de 13 mm de diámetro. MO resistente
	3.0%	Formación de halos de 10 mm de diámetro. MO resistente

BLANCO: ETANOL AL 70%	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa. MO resistente
PATRON: YODO AL 2%	Formación de halos de 40 mm. MO susceptible
PATRON: DISCO DE ANTIBIÓTICO DE AMPICILINA 10 unidades	Formación de halos de 38 mm de diámetro. MO susceptible
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa.

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halos de inhibición alrededor del cilindro

RESISTENTE: no hay formación de halos de inhibición alrededor del cilindro.

Resultados de la evaluación microbiológica, de las fracciones de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto), por el método de Kirby Bauer Modificado con *Streptococcus pneumoniae*.

Según los resultados obtenidos se considera la cepa resistente a las diluciones (0.5%, 0.75%, 1.5% y 3.0%) de las fracciones de 10%, 30% y 50%, ya que no hay formación de halos con medidas considerables de inhibición.

Se llevó un blanco con alcohol etílico al 70%, presentando la bacteria un crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, lo que significa que el *Streptococcus pneumoniae*, es resistente a dicho solvente. Se

realizó una comparación entre las diluciones de las fracciones y sustancias de actividad antimicrobiana conocida, como la solución de yodo al 2% y discos de antibiótico de ampicilina, en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antimicrobiana del yodo y de la ampicilina, en comparación a las diluciones de las fracciones.

Se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, con el fin de determinar la presencia de la cepa, a través de su crecimiento uniforme y abundante y la no contaminación de bacterias del medio respectivamente (Cuadro N° 21).

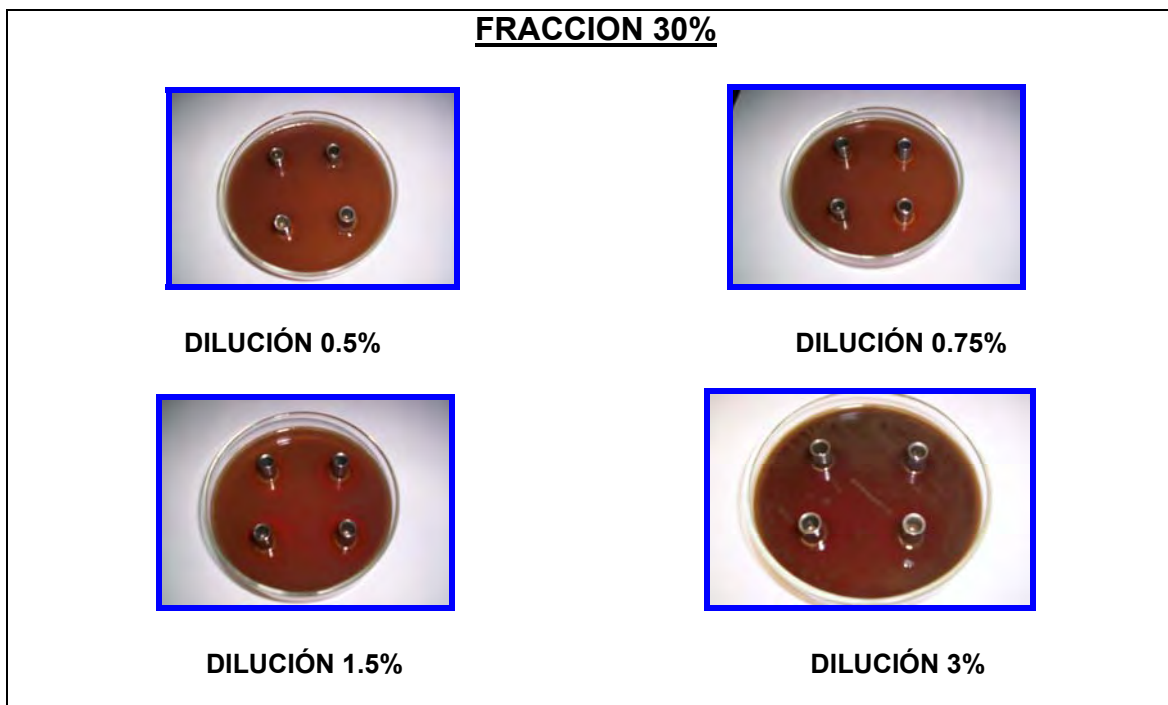
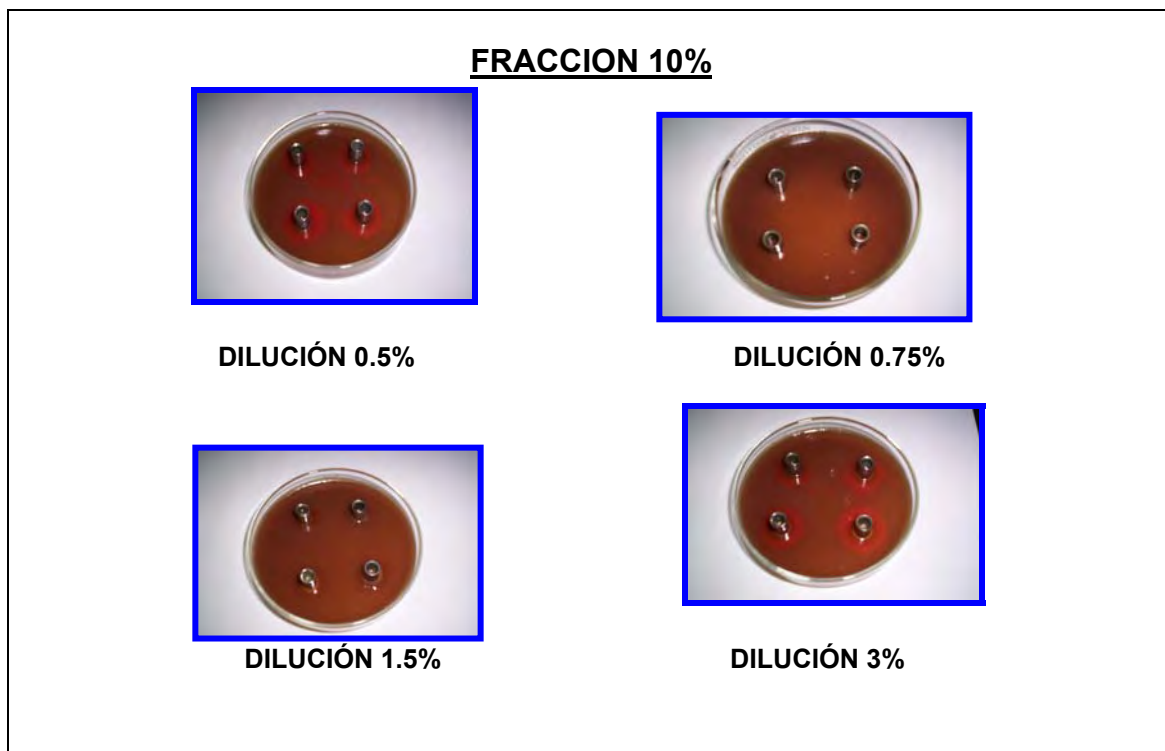


Fig N° 27 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pneumoniae*

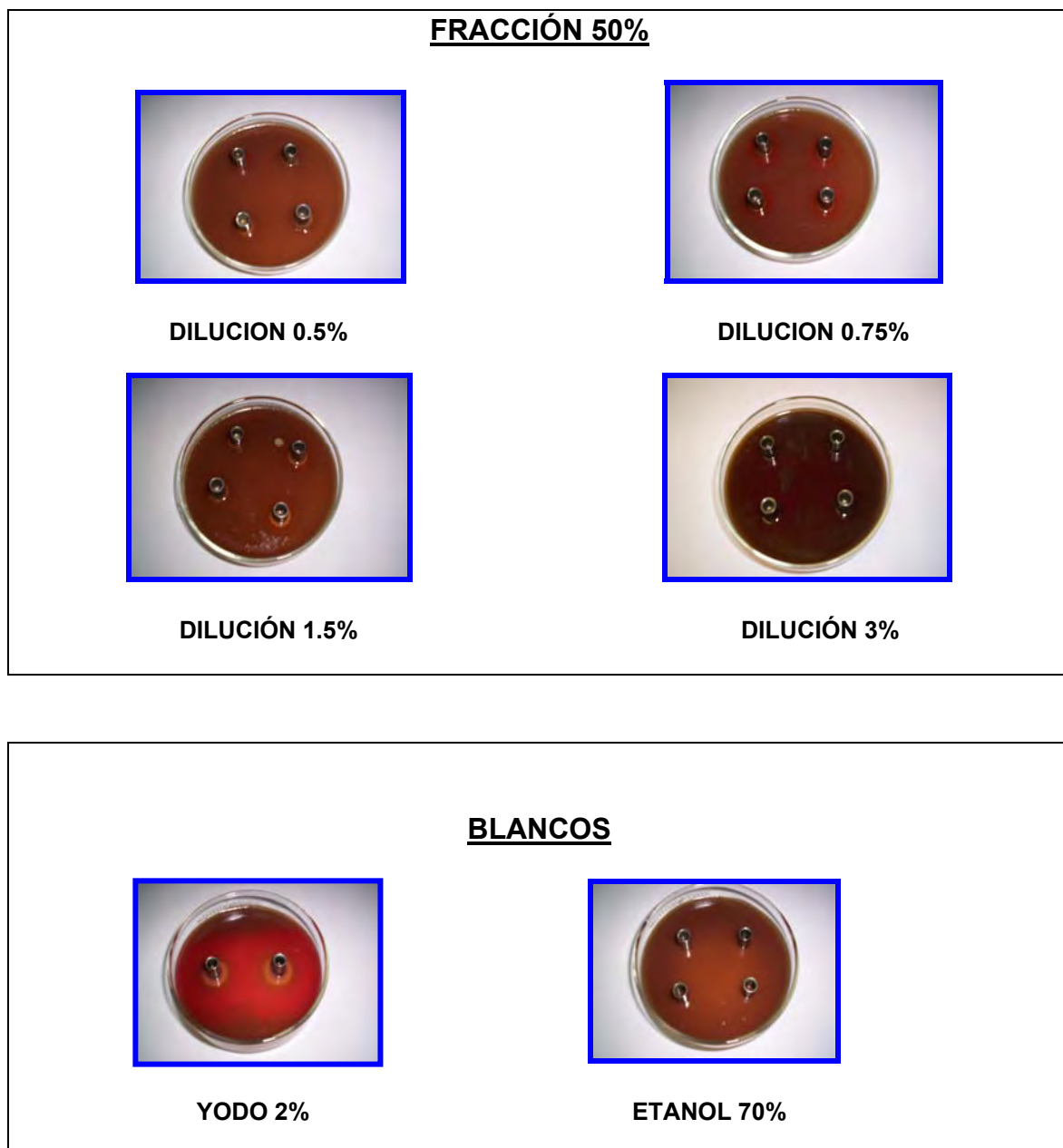


Fig N° 27 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pneumoniae*

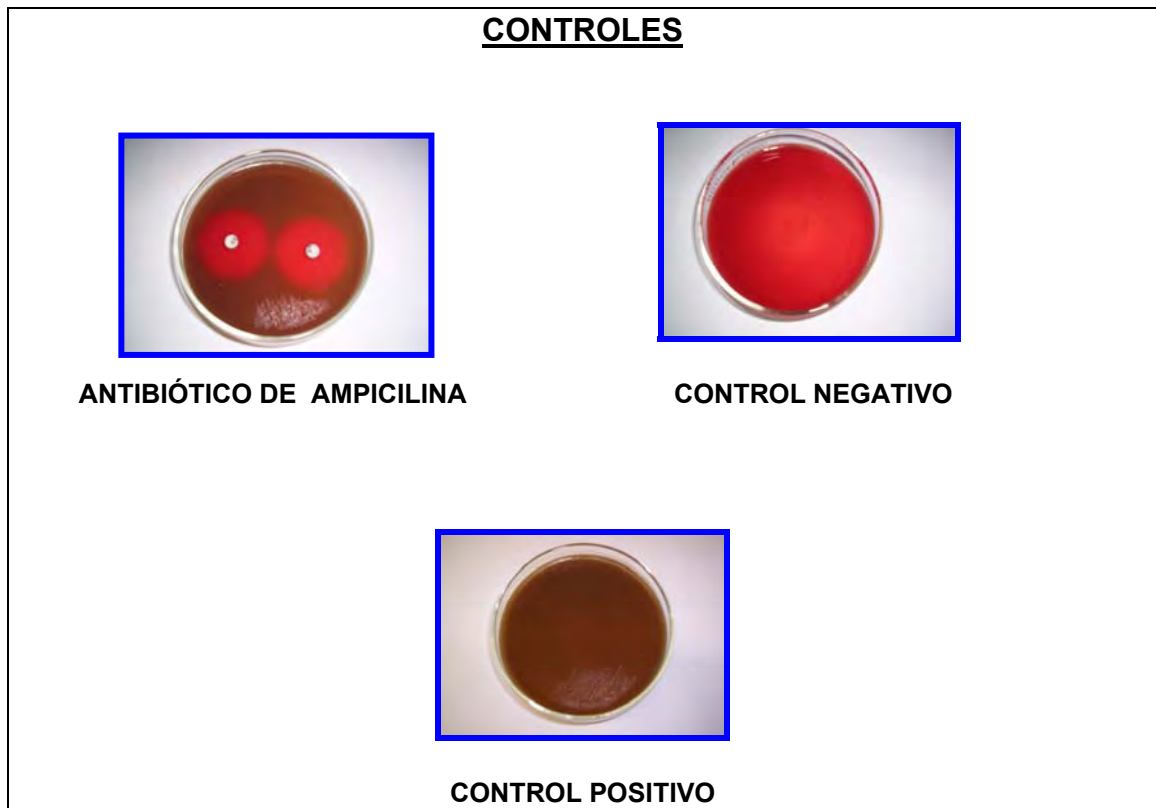


Fig N° 27 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pneumoniae*

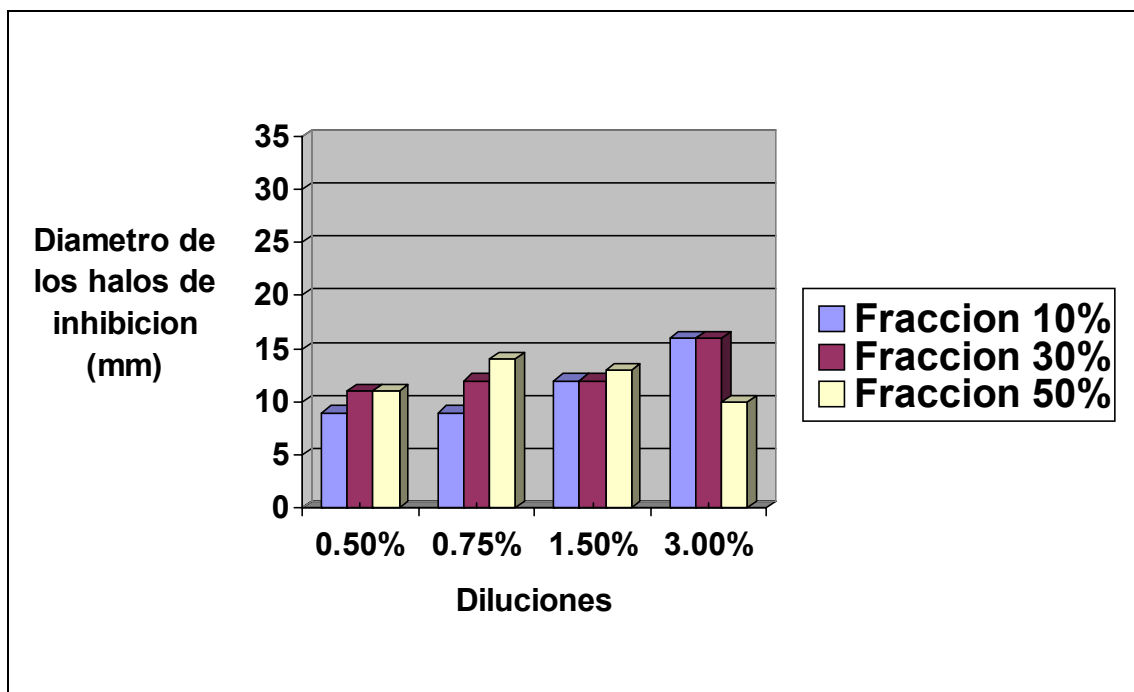


Figura N° 28. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones de las fracciones de la goma-resina de el *Eucalyptus citriodora* en el *Streptococcus pneumoniae*

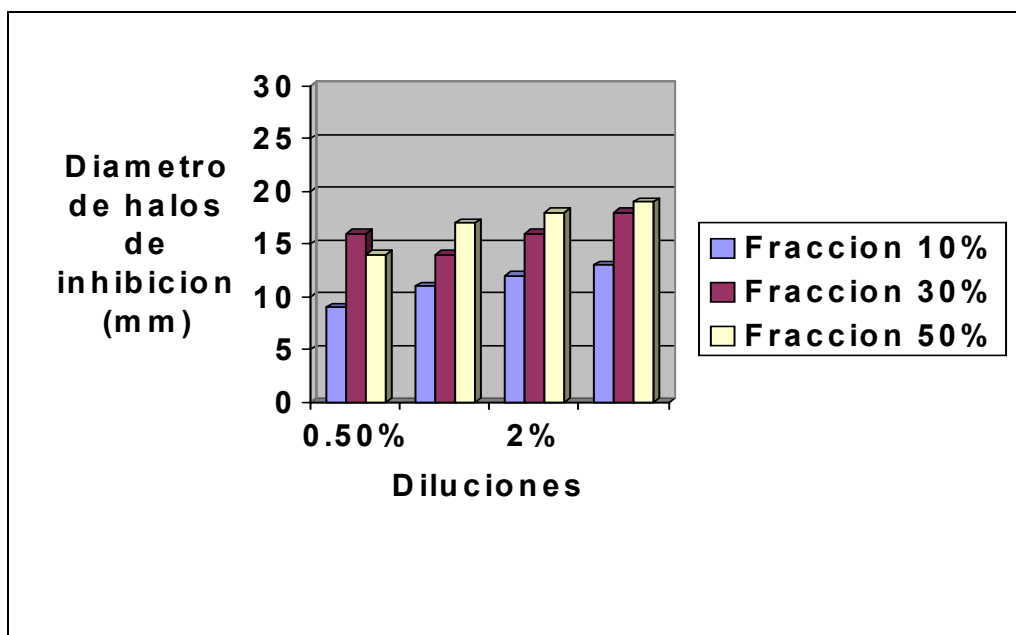


Figura N° 29. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones de las fracciones de la goma-resina de el *Eucalyptus citriodora* en el *Staphylococcus aureus*.

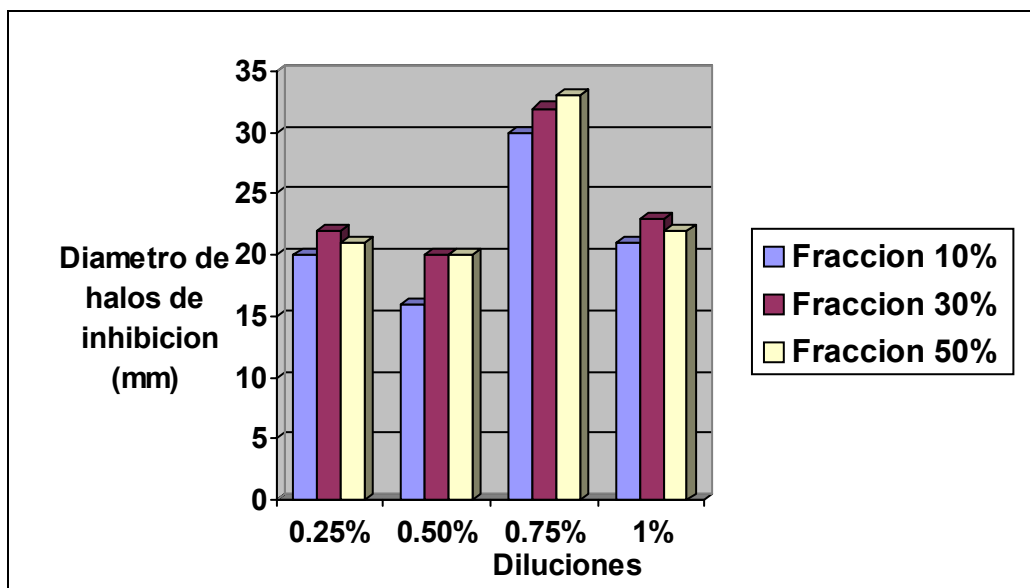


Figura N° 30. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones de las fracciones la goma-resina de el *Eucalyptus citriodora* en la *Pseudomonas aeruginosa*.

En estas gráficas se observan los diferentes niveles de actividad antimicrobiana que presenta el extracto diclorometánico de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos establecer que la *Pseudomonas aeruginosa* resultó mucho más susceptible, en todas las diluciones de las fracciones de 10%, 30% y 50%, presentando mayores halos de inhibición (33 mm de diámetro) en la dilución de 0.75% de la fracción del 50%. El *Staphylococcus aureus* presentó mediana susceptibilidad, debido a que se observa inhibición en todas las diluciones de las fracciones de 30% y 50%, presentando halos mayores (19 mm de diámetro) en la dilución de 3.0% de la fracción de 50% y en el *Streptococcus pneumoniae* se observaron

halos menores comparados con los parámetros, en todas las diluciones de todas las fracciones, lo que indica que esta cepa es resistente.

La actividad inhibitoria que presentaron las diluciones de las fracciones de 10%, 30% y 50% de la goma-resina, resultaron ser mas activas frente ***Pseudomona aeruginosa*** a partir de una dilución de menor concentración de 0.25%, seguido por el ***Staphylococcus aureus*** en donde se observó inhibición en las fracciones de 30% y 50% a partir de una dilución de menor concentración de 0.5% .

En base a los resultados obtenidos se confirma la hipótesis planteada en el diseño metodológico, debido a que las diluciones de cada fracción del extracto diclorometánico de la goma-resina del ***E. citriodora***, posee actividad antimicrobiana contra el ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa***.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En los análisis de los espectros RMN-¹H, realizado a las fracciones del extracto diclorometánico, obtenidas en la columna cromatográfica, se concluye la presencia de flavonoides, flavononas, chalconas, triterpenos y ácidos fenólicos.
2. El análisis detallado de las señales observadas en el espectro de RMN-¹H de la fracción del 10% de la goma-resina del *E. citriodora* nos indica la presencia del cafeato *n*-alquilico.
3. El estudio de RMN-¹H realizado a la fracción de 30% mostró señales características que nos indican la presencia de flavonoides, flavononas, chalconas y triterpenos.
4. Los espectros de RMN-¹H de las fracciones 10%, 30% y 50% presentaron señales específicas del núcleo de flavonoides especialmente chalconas y flavononas.
5. El *Staphylococcus aureus* resultó ser susceptible a las diluciones de 0.5%, 1.0%, 2.0% y 3.0% de las fracciones del 30% y 50%, ya que observaron halos de inhibición en el rango de susceptibilidad, no así en las diluciones de la fracción del 10%, debido a que presentó resistencia frente a ellas.
6. El *Streptococcus pneumoniae* frente a las diluciones de las fracciones de 10%, 30% y 50% resultó resistente, ya que se observaron halos de inhibición menores al rango de susceptibilidad.

7. En la evaluación microbiológica de las diluciones de las fracciones de 10%, 30% y 50% del extracto diclorometánico, la ***Pseudomona aeruginosa*** resultó ser susceptible, debido a que presentó halos de inhibición mayores al rango de susceptibilidad con dichas fracciones.
8. El mayor efecto inhibitorio se observó en la concentración de 0.75% de las fracciones de 10%, 30% y 50%, debido a que se formaron mayores halos de inhibición contra la ***Pseudomona aeruginosa*** y para el ***Staphylococcus aureus*** resultó ser la concentración del 3.0% de las fracciones del 30% y 50%.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

RECOMENDACIONES

1. Continuar con el fraccionamiento bioguiado de las fracciones del extracto diclorometánico de la goma-resina del *E. citriodora* mediante cromatografía en columna, con el fin de aislar las moléculas responsables de la actividad antibacteriana.
2. Realizar ensayos *in vitro* con otros microorganismos de interés clínico con el extracto diclorometánico de la goma-resina del *E. citriodora*.
3. Mantener una temperatura para la conservación de las cepas a 8 °C en el medio TSA, estas deben ser repicadas semanalmente y reemplazadas cada mes a partir de las cepas congeladas.
4. Realizar el procedimiento de Kirby Bauer Modificado utilizando colonias frescas de 24 horas y deberán ser repicadas dos veces para iniciar el ensayo.
5. Promover el cultivo de esta especie vegetal debido a que es productora de una gran diversidad de metabolitos secundarios, los cuales pueden emplearse como principios activos nuevos en la elaboración de productos farmacéuticos.
6. Dotar a la Facultad de Química y Farmacia de todos los equipos necesarios, para realizar los estudios espectroscópicos, entre ellos Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear, para desarrollar una mejor investigación de los metabolitos secundarios de la flora salvadoreña.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acortes J. 2003. Prácticas de Laboratorio de Microbiología. España. Consultado 8 Mayo 2006. Disponible en: www.upm.edu/biology/cursos/micro/pruebas
2. Beatty, W. K 1993. Diccionario de Ciencias Médicas. 25ª Ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, P. 37, 69, 163, 165 y 438.
3. Brock , T.D. y otros. 1987. Microbiología 4a Ed. México. Editorial Prentice–Hall. P.906.
4. Bruneton J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 1ª Ed. Zaragoza, España. Editorial Aeribia.P. 52-213
5. Casamada, S.M. 1968. Farmacognosia con farmacodinamia. 1ª Ed. Barcelona, Editorial Científico Médico. P.250-601
6. Dayal, R. y otros. 1980 Chemical components of *Eucalyptus citriodora* leaves. Forest Res Lab., Bangalore, India. Corrent Science . P. 49 (3), 116.
7. Dewick, P. 2002. Medicinal Natural Products. Toronto, Canada. Editorial John wiley., P. 135-141, 219 – 220, 221.
8. Domínguez, A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. 9ª Ed. México, Editorial Limusa. P. 84, 153.
9. Duke J. 1983. *Eucalyptus citriodora* Hook. Myrtaceae-Lemon-scented gum. Francia, Purdue University. Consultado 22 de febrero del 2005. Disponible en: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/dukeenergy/Eucalyptus_citriodora.html.
10. Evans, W.C. y otros. 1991, Farmacognosia, 13ª ed. Editorial Interamericana McGraw – Hill. México. P. 519
11. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Farmacognosia. 2004. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, C.A.
12. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada III 2005. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, C.A

13. Font Quer, P. 1993. Diccionario Botánico 9ª Reimpresión. Barcelona. Editorial Labor S.A. Tomo 1. P. 326, 365, 941.
14. Freman, B.A. 1984. Tratado de B.A. 1984. Tratado de Microbiología de Burrows. 21 Ed. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. P. 446, 447.
15. Gilg, E. 1926 Farmacognosia. Traducido de la 3ª Edición Alemania. Editorial Labor S.A. Barcelona, España, P. 240 – 241.
16. Grieve M. 1998. Eucalypto. Estados Unidos. Missouri Bonical. Consultado 15 de Junio de 2006. Disponible en:
www.bonical.com/bonical/mgmh/eucalypto14.html.
17. Guzmán, D.J. 1975. Especies Útiles de la Flora Salvadoreña. Médico Industrial. Ministerio de Educación, San Salvador, El Salvador, Impreso en los talleres de la dirección de Publicaciones P. 361.
18. Graham Solomons T.W. 1988. Fundamentos de Química Orgánica. 1ª Ed. Editorial Limusa S.A. de C.V. México DF.P. 903 .
19. Herrera F. A y otros. 1995. Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica. 2ª Ed. Vallehermoso, Madrid, ES. Trad. GT ver lag. Editorial síntesis. P. 70 – 142.
20. Ishen Z. y otros. 1987. Insolation and Identification of citriodora. China Ed. Linchan Huaxve, 7(2).P. 35-43
21. Jawets, E. y otros 1992. Microbiología Médica. 14ª Ed. México, D.F., Editorial Manual Moderno, P. 217, 237, 238 y 239
22. Koneman, E.W. y otros 1999. Diagnóstico Microbiológico 6ª Ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamerica S.A. P. 565–604.
23. Kuklinski, C. Farmacognosia. Ediciones Omega, P. 167, 168 y 169.
24. López Lillo, y otros.2004. Árboles en España, Manual de identificación. 2ª Ed. Revisada y ampliada. España. Ediciones mundi – Presa. P. 654.
25. Lock, O. 1994, Investigación Fitoquímica. 2ª Ed. España. Pontificia Universidad Católica del Perú. P.300

26. Martínez G, R.E. 2003. Comprobación de la Actividad Antimicótico in–*Vitro* de la tintura elaborada con oleorresina de Eucalipto (***Eucalyptus citriodora***). Trabajo de graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C.A.
27. Martínez, M. 2001 Técnicas experimentales en síntesis Orgánicas. España. Grav. Editorial síntesis. P. 171-176.
28. Matthew J. L, y otros Métodos de Laboratorio 2ª Ed. México, D.F., Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. Trad. Roberto Folch Fabre, P. 956–957.
29. Merck. 1994. Manual de Medios de cultivos. Darmstadt. Alemania, P. 74, 127, 144, 807
30. Ministerio de Salud. Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos. (2, 2000, San Salvador, El Salvador) 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test Approved Standard. San Salvador, El Salvador. V2. 7a Edición.
31. Najarro, C.M. y otros. 2004. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la oleorresina del ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto). Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador, C.A.
32. Navarro, L. 2002. El Eucalipto. Argentina. Naturamedic Consultado 7 de Marzo de 2006. Disponible en: www.naturamedic.com/eucalipto.htm.
33. Núñez M. 2004. Métodos Secundarios Bioactivos Aislados de ***Maytenus chiapensis*** y ***Crossopetalum uragoga*** (Celastráceas). Trabajo de graduación doctoral. Universidad de Laguna Tenerife. España.
34. Organización de los Estados Americanos (OEA), Universidad de El Salvador, (UES), Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS), Planter 1994. Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. 2ª Ed. San Salvador. Editorial Universitaria, P.354–355.
35. Pradeau. D. y otros 2001. Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos. 1ª Reimpresión Balderas 95, México, D.F. Trad. Grupo Noriega editores. Editorial Limusa, P.1130 .
36. Pelzar, M.J. y 1992. Microbiología, 4ª ed. México, D.F. Editorial McGraw – Hill. P. 206–271.

37. Real Academia Española. 1970. Diccionario de la Lengua Española. 19ª Ed. Madrid. Editorial Espasa – Calpe, S.A. P. 940.
38. Samuelson, G. 1998. Drugs of natural origin a Textbook of Fharmacognosy. 4a Ed. U.S.A. Editorial Wm. C. Brown. Publishers. P. 57–59.
39. Salvat Mexicana. 1974. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. Undécima edición. México. Salvat Mexicana de ediciones, S.A. de C.V.
40. Skoug, D.A. y otros. 2001. Química Analítica. 7ª ed. México D.F. Editorial McGraw – Hill.P. 203–204.
41. Stuart W, 2000. Microbiología. México, D.F. McGraw – Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. P. 153–154
42. Tortora, G. y otros. 1993. España. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia, S.A. 1993. P. 494.
43. United Status Pharmacopeial convention USP 25 NF 20. 2002. The Official Compendia of Standards 25º Revisión (USO) y 20º ed. (NF), Inc. Canada, P. 883, 2221 y 2222 y 2234.
44. University Northwestern. 2005. Taxonomic and Chemical Relation Ships Revealed by Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Plant Exudade. Journal of Natural Products. Illinois. U.S.A. Ene.
45. Villar del Fresno, A.M. 1999. Farmacognosia General. Vallehermoso, Madrid. ES. Editorial Síntesis. 335 p.
46. Westrop, R.A. 1957. The Isolation of shikimic acid from ***Eucalyptus citriodora***. Univ. Sydney, Australian Journal of Chemistry. 1(3):10,93–4.

GLOSARIO₍₇₎₍₂₁₎₍₃₂₎

ANAEROBIO: Microorganismo que crece mejor o exclusivamente en ausencia de oxígeno.

AEROBIO: Microorganismo que vive y crece en presencia de oxígeno.

ANTISÉPTICO: Sustancia que sirve para lograr la desinfección.

FURÚNCULO: Infección cutánea estafilocócica de carácter localizado y supurativo que se origina en una glándula o folículo piloso y se caracteriza por dolor, enrojecimiento e hinchazón.

ASTRINGENTE: Sustancia que provoca una contracción fibrilar de los tejidos orgánicos o que produce contracción y sequedad de los tejidos cuando se aplica localmente.

ANTIBIÓTICOS: Compuestos químicos producidos biosintéticamente que destruyen o inhiben a los microorganismos.

EXUDADOS VEGETALES: Mezclas naturales sólidas o semisólidas químicamente complejas de origen vegetal, como bálsamos, gomas, oleorresinas y resinas.

PRODUCTOS BIOLÓGICOS: Productos compuestos de materia antigénica o preparaciones de anticuerpos capaces de producir un estado de inmunidad en el paciente.

ENZIMAS: Catalizador orgánico producido por los microorganismos vivos.

PATÓGENO: Productor o causante de enfermedad.

ANEXOS

ANEXO N°. 1
ÁRBOLES Y EXUDADOS DE LA GOMA-RESINA
DE *Eucalyptus citriodora*



Figura N°. 31 Árboles de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto)



Figura N°. 32 Exudado goma-resina de *E. citriodora*

ANEXO N° 2
EQUIPOS DE EXTRACCIÓN



Figura N° 33 Aparato Soxhlet (Extracción etanólica)



Figura N° 34. Rotaevaporador (Extracción etanólica)

ANEXO N°. 3
METODOLOGÍA GENERAL DEL TRABAJO

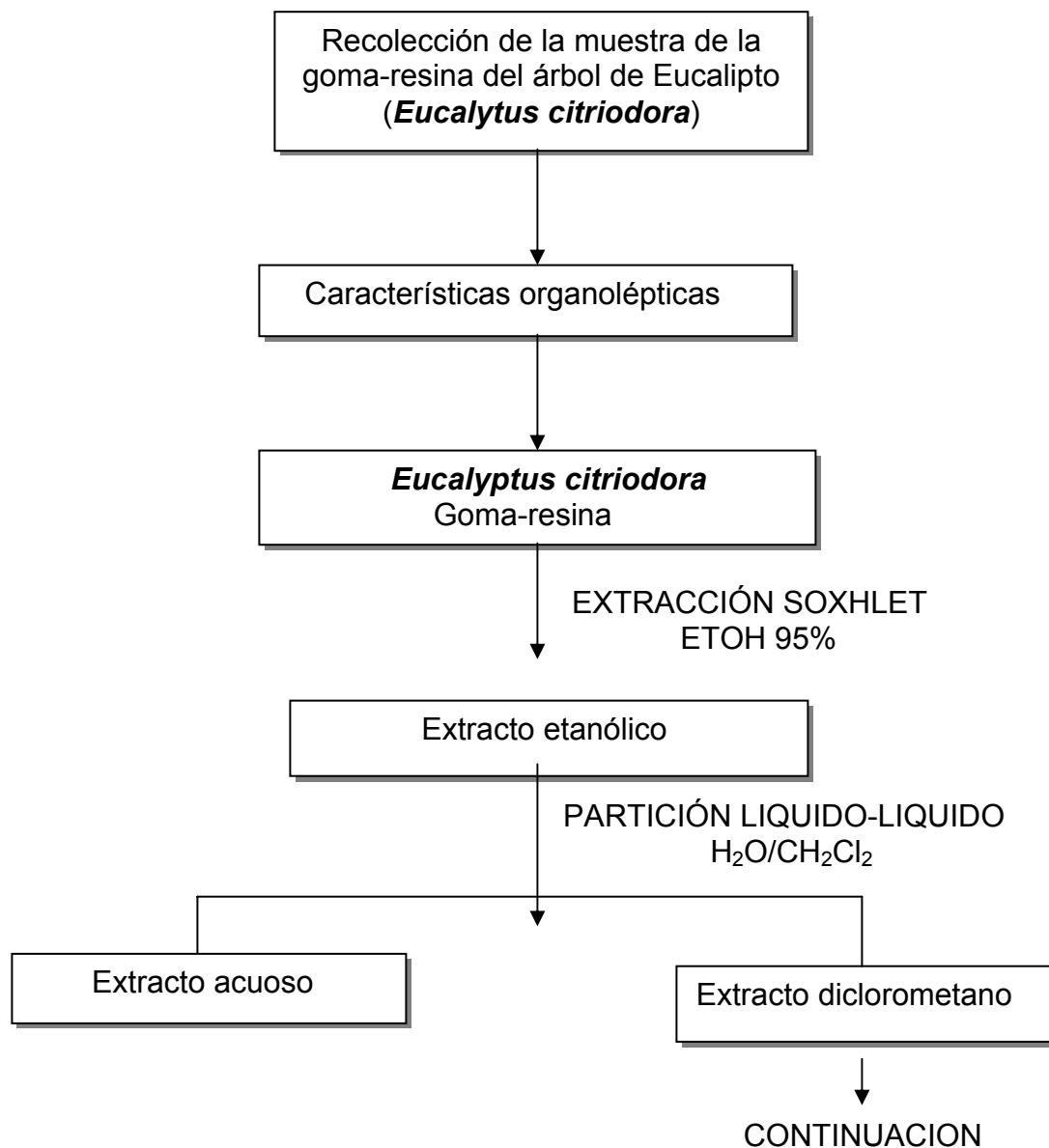


Figura N°. 35 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA GENERAL DE TRABAJO.

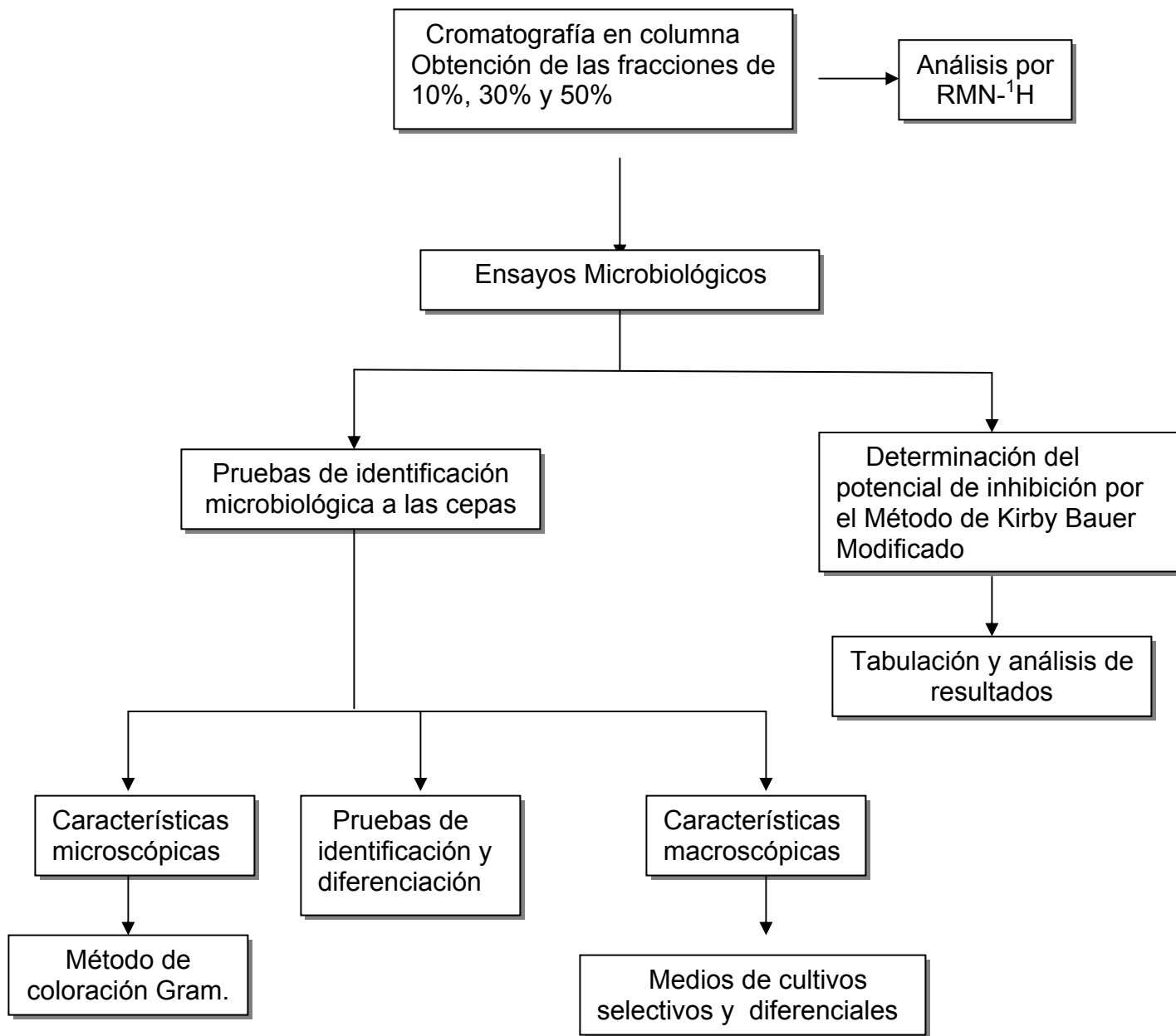


Figura N°. 35 DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA GENERAL DE TRABAJO

ANEXO N° 4

FRACCIONAMIENTO BIOGUIADO

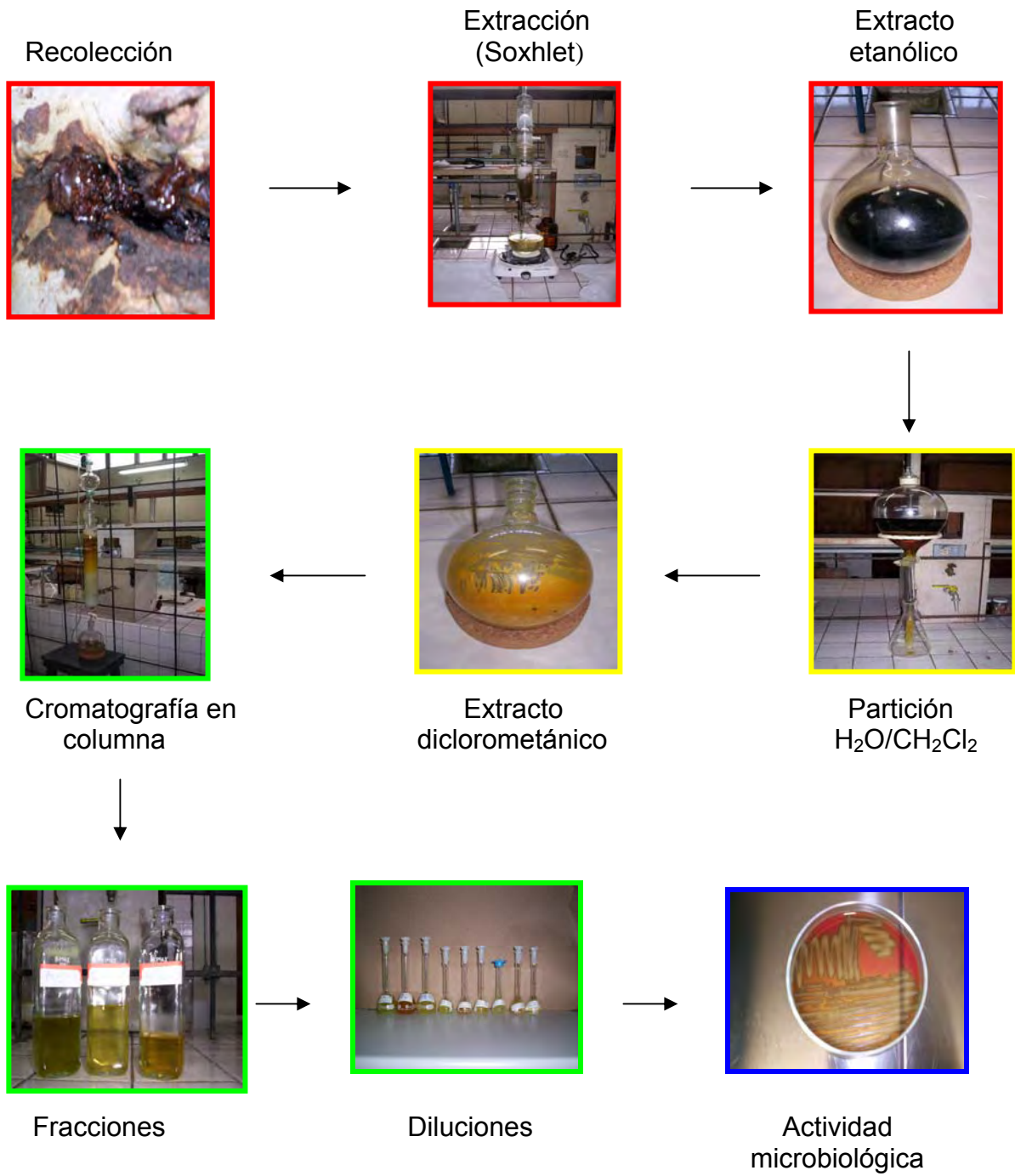


Figura N° 36. Esquema del Fraccionamiento Bioguiado

ANEXO N°. 5
PRUEBAS MICROSCÓPICAS

COLORACIÓN AL GRAM (36) (22)

Este método permite el proceso de tinción de los colorantes anílicos que se fijan bajo la acción posterior del yodo en la pared celular de las bacterias, formando un complejo de yodo y clasificando así a las bacterias en grampositivo y bacterias gramnegativo. En las bacterias grampositivo el complejo de colorante–yodo no se puede eliminar de las células al utilizar alcohol como decolorante, permaneciendo las células teñidas de color azul–violeta. En las bacterias gramnegativas el complejo colorante–yodo puede eliminarse y las células se tiñen de color rosa a rojo con una contratinción de zafranina.

MÉTODO:

1) Extensión

- a) En un portaobjetos limpio con etanol 93% colocar una gota de solución salina.
- b) Con una asa previamente esterilizada a la llama colocar en el porta objeto una pequeña cantidad de suspensión de bacterias o una colonia.
- c) Con el asa extender la gota y las bacterias sobre el portaobjeto.
- d) Fijar la extensión calentándola suavemente a la llama del mechero hasta que se seque.
- e) Dejar enfriar el frotis.

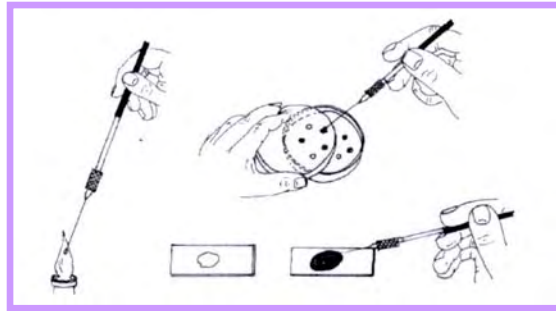


Figura N°. 39. Método de extensión

2) Coloración

- a) Cubrir el frotis con cristal violeta por 1 minuto (colorante inicial)
- b) Lavar con agua destilada y eliminar el exceso de agua.
- c) Cubrir el frotis con lugol por 1 minuto (mordiente).
- d) Lavar con agua destilada y eliminar el exceso.
- e) Dejar caer por gotas el alcohol 95° sobre el frotis hasta que se decolore totalmente.
- f) Lavar con agua destilada y eliminar el exceso.
- g) Cubrir con safranina el frotis por 30 segundos (colorante de contraste).
- h) Lavar con agua corriente.
- i) Dejar secar al aire o secar suavemente sin frotar con papel filtro.

Cuando la preparación está totalmente seca, colocar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio a 100x. Las bacterias grampositivas se observan de color azul o púrpura y las bacterias gramnegativas se observan de color rojas a rosadas.

CUADRO N° 22. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE LOS MICROORGANISMOS.

MICROORGANISMO	INTERPRETACIÓN	COLORACIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Grampositivo	Azul
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Gramnegativo	Rojo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Grampositivo	Azul

ANEXO N° 6

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y RESULTADOS

Staphylococcus aureus

CUADRO N° 23. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN ⁽²¹⁾

CEPA	PRUEBA	FUNDAMENTO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<p align="center"><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p align="center">Catalasa</p>	<p>La prueba catalasa descompone al H₂O₂ en oxígeno y agua. El peróxido de Hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos. Su acumulación es letal para las células bacterianas.</p>	<p>Con una asa de inoculación transferir una colonia a la superficie del portaobjeto agregan una gota de peróxido de hidrógeno al 3%.</p>	<p>La aparición rápida o sostenida de burbujas o efervescencia de peróxido de hidrógeno indica la presencia de <i>Staphylococcus</i>.</p>
	<p align="center">Coagulasa</p>	<p>La coagulasa presenta actividad similar a la protrombina; capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina dando como resultado la formación de un coágulo visible.</p>	<p>Emulsionan a una pequeña cantidad de las colonias de microorganismos en un tubo que contenga 0.5 ml de plasma. Incubar a 35°C por 1 ó 4 horas.</p>	<p>La formación de coágulos total o parcial indica la presencia de la enzima coagulasa la cual es producida por <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>

ANEXO N° 7
PRUEBAS DE IDENTIFICACION, DIFERENCIACIÓN Y RESULTADOS DE
Pseudomona aeruginosa

CUADRO N° 24. PRUEBAS BIOQUÍMICAS ⁽²¹⁾ ⁽²²⁾

CEPA	PRUEBA	FUNDAMENTO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Agar triple azúcar y Hierro (TSI)	Mide la fermentación de azúcares a través de la incorporación de pH que cambia de color al acidificarse el medio; determina la producción de H ₂ CO ₂ y H ₂ S.	Inocular el medio con cultivo puro, tanto en la superficie inclinada como en el fondo del agar. Incubar de 24 a 48 horas a 37°C.	Los microorganismos que fermentan la glucosa forman ácido dentro del agar los que fermentan la sacarosa y lactosa forman ácido en la parte alta del medio. La fractura indica la formación de gas, el medio ennegrecido indica la formación de gas.
	Citrato	La utilización de citrato como fuente de carbono eleva el pH en el colorante utilizado como indicador.	Inocular en forma de estria única en el fondo del tubo de agar citrato. Incubar a 35°C por 24 a 48 horas.	La producción de color azul oscuro prueba positiva que indica que el microorganismo ha utilizado el citrato contenido en el medio.
	Indol	Las bacterias poseen enzima triptofanasa que hidroliza el triptofano con la producción del Indol formando un complejo rojo cuando reacciona con el P-dimetilamino benzaldehido el cual es el producto activo del reactivo Kovac y Ehrlich.	Inocular el caldo con el microorganismo e incubar a 35 °C por 18 a 24 horas. Finalizada la incubación agregar 15 gotas del reactivo Kovac o Ehrlich.	El desarrollo de color rojo fucsia brillante en la interfase del reactivo y el medio líquido y segundos después de agregar el reactivo. Indica la presencia del Indol constituyendo una prueba positiva.

CUADRO N° 24 Continuación

CEPA	PRUEBA	FUNDAMENTO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Rojo de Metilo	Es una prueba cuantitativa de la producción de ácido que necesita microorganismo que produzcan ácidos fuertes a partir de la glucosa a través de la vía de fermentación ácida mixta, es un indicador de pH entre el rango de 6 a 4.4.	Inocular el caldo con un cultivo puro de microorganismo. Incubar a 35 °C por 48 a 72 horas, finalizada la incubación agregar 5 gotas de reactivo rojo de fenol.	El desarrollo de color rojo estable en la superficie del medio indica la suficiente producción de ácido lo constituyendo prueba positiva.
	Movilidad	Determina la capacidad de las bacterias de desplazarse en medios sólidos por medio de flagelos.	Inocular el medio hasta el fondo con el microorganismo con un asa en punta e incubar durante 24 a 48 horas a 37 °C.	Si las bacterias no son móviles, el crecimiento n se difunde más allá de la línea de puntura, pero si es móvil el crecimiento se difunde visualmente formando turbidez.
	Voges Proskauer	El ácido pirúvico es un compuesto formado en la degradación fermentativa de la glucosa, se metaboliza formando acetoina que en presencia de oxígeno atmosférico e hidróxido de potasio al 40% se convierte en diacetilo.	Inocular el caldo con cultivo puro de microorganismo. Incubar a 35 °C por 24 horas. Finalizada la incubación agregar 0.6 ml de alfa-naftol 5%, seguido de 0.2 ml KOH al 40%, agitar suavemente para exponer el medio de oxígeno y dejar reposar 10 a 15 minutos.	Es prueba positiva el desarrollo de color rojo 15 minutos después de agregado el reactivo lo que indica la presencia de diacetilo producto de oxidación de la acetoina.

CUADRO N° 24 Continuación

CEPA	PRUEBA	FUNDAMENTO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<p align="center"><i>Pseudomona aeruginosa</i></p>	<p align="center">Oxidasa</p>	<p>La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.</p>	<p>Seleccionar varias colonias y frotarlas sobre un pedazo de papel filtro y agregar una gota de reactivo Oxidasa (hidrocloruro de tetrametilfenildiamina dimetil sulfóxido)</p>	<p>La presencia de color azul oscuro indica prueba positiva.</p>

RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE
Pseudomonas aeruginosa



Fig. N° 40. Prueba rojo de metilo
Negativo (-)



Fig. N° 41. Prueba Indol.
Negativo (-)



Fig. N° 42. Prueba de TSI
Negativo(-)



Fig. N° 43. Prueba movilidad
Positivo(+)

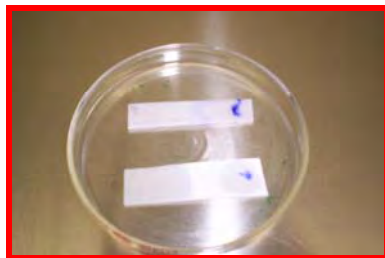


Fig. N° 44. Prueba de Oxidasa
Positivo (+)



Fig. N° 45. Prueba de Voges-
Proskauer
Negativo (-)

ANEXO N° 8

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN, DIFERENCIACIÓN Y RESULTADOS DE

Streptococcus pneumoniae

CUADRO N° 25. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN ⁽²¹⁾

CEPA	PRUEBA	FUNDAMENTO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<p><i>Streptococcus pneumoniae</i></p>	<p>Optoquin</p>	<p>Se basa en la difusión de discos de papel filtro impregnados con Optoquin (clorhidrato de etildihidrocupreína) para determinar la sensibilidad o inhibición selectiva del crecimiento de <i>Streptococcus pneumoniae</i>.</p>	<p>Seleccionar varias colonias del microorganismo a prueba y estriarlas en placa de agar sangre, colocar un disco de Optoquin presionarlo con pinzas estériles. Incubar a 35 °C por 18 a 24 horas.</p>	<p>La presencia de un halo de inhibición de 14 mm o más alrededor de un disco de 6 mm o una zona de 16 mm o más alrededor de un disco de 10 mm indica la presencia de <i>E. pneumoniae</i></p>

ANEXO N° 9
PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE MAC FARLAND⁽¹²⁾

9.95 mL de H₂SO₄ + 0.05 mL de BaCl₂ → Estándar de MacFarland 0.5%

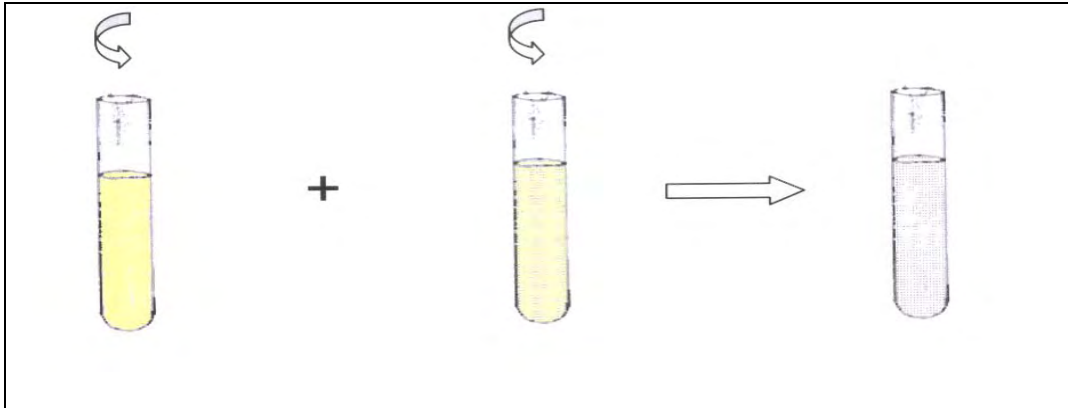


Figura N° 47. PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE MAC FARLAND ⁽¹¹⁾

La densidad celular aproximada es de 1.5×10^8 microorganismo /mL.

La preparación de la suspensión de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae*** se realizó con 10 mL de solución salina + cantidad necesaria de microorganismo.

ANEXO N° 10
METODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO

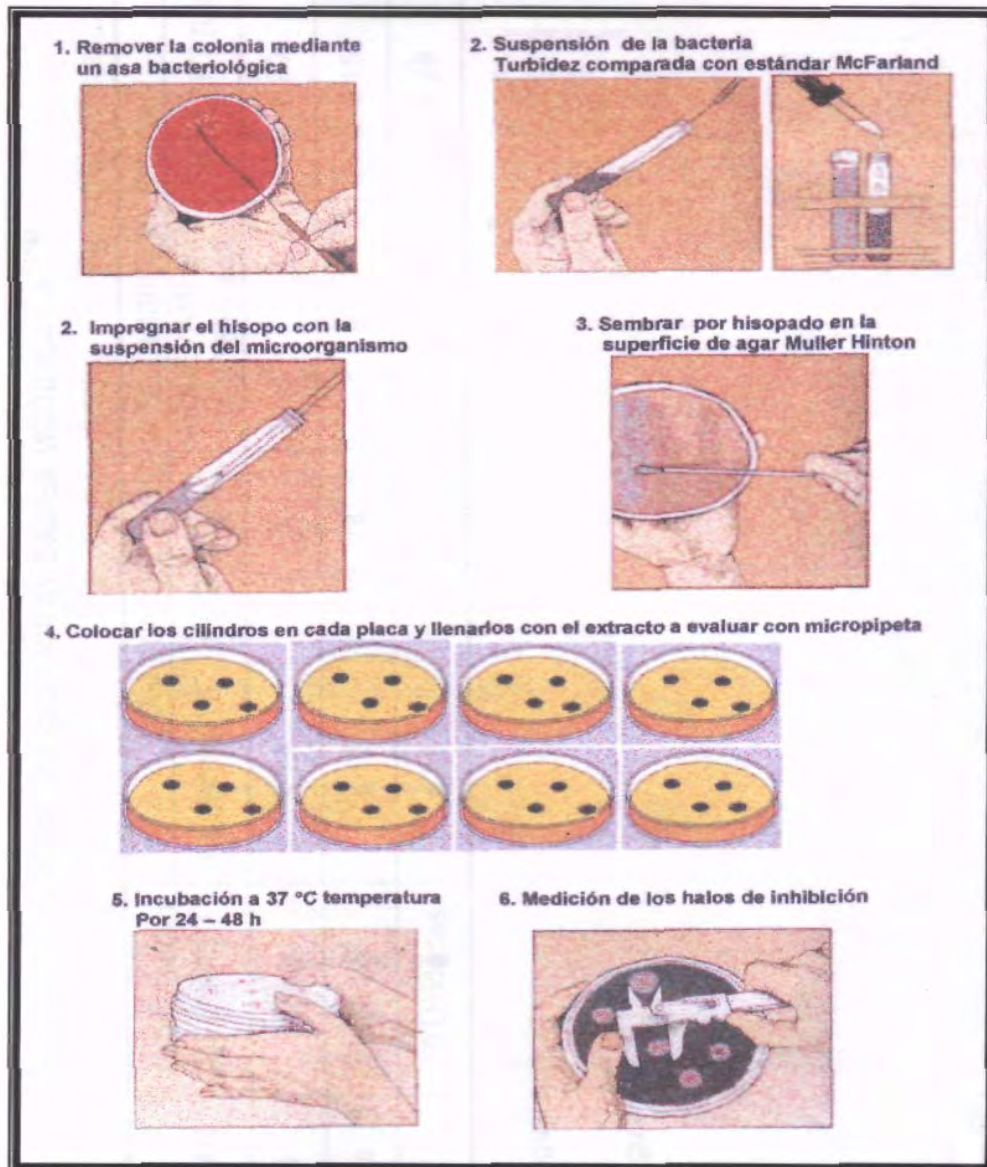


Figura N° 48. ESQUEMA DEL MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO

ANEXO N° 11
NORMATIZACIONES INTERPRETATIVAS DE LOS DIÁMETROS DE LAS
ZONAS, BASADOS EN EL METODO KIRBY BAUER MODIFICADO ⁽²²⁾

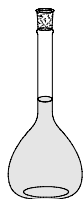
CUADRO N° 26. PARÁMETROS DE REFERENCIA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN.

CEPA	ANTIBIÓTICO	RESISTENTE	INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Gentamicina	≤ 12 mm	13 - 14 mm	≥ 15 mm
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ampicilina	≤ 18 mm	19 - 25 mm	≥ 26 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina	≤ 11 mm	12 - 13 mm	≥ 14 mm

ANEXO N° 12
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ⁽²⁹⁾

MEDIO DE CULTIVO	PREPARACIÓN
Agar Chapman	Disolver 146.5 g /litro, esterilizar en autoclave (15 min a 121 °C) y verter en placas. pH 7± 0.2. Las placas con medios de cultivo son clara c amarillentas.
Agar Bair Parker	Disolver 58g en 0.95 litros, esterilizar en autoclave (15 mina 121 °C) enfriar a 45 – 50 °C, añadir mezclado 50 ml de emulsión de yema de huevo telurito y eventualmente, 50 mg/litros de sulfametacina, verter en placas. pH 6.8 ± 0.2
Agar Cetrimide	Disolver 44.5g/litros, esterilizar en autoclave (15 min 121 °C) y verter en placa pH 7± 0.2.
Agar sangre (base)	Disolver 40 g/litros, esterilizar en autoclave (15 min 121 °C) dejar enfriar a 45–50 °C incorporar 5 a 8% de sangre desfibrinada y verter en placa pH 6.8 ± 0.2.
Agar Muller – Hinton	Disolver 34g/L, esterilizar con cuidado en autoclave (10min115 °C) enfriar eventualmente a 45–50 °C para incorporar del 5–10% de sangre desfibrinada. Verter en placa pH 7.4 ± 0.2. Las placas con medio de cultivo sin sangre son claras o parduscas.
Caldo Nutritivo	Suspender 13g/Lt de agua destilada o desionizada, mezclar bien y esterilizar a 121 °C por 15 min.
Leche descremada	Disolver 20g en 100 mL de agua destilada, esterilizar a 115 °C por 10 min. Posteriormente incubar a 37 °C por 72 h.
BHI	Disolver 37 g/litros, esterilizar en autoclave (15 min 121 °C) dejar enfriar a 45–50 °C incorporar 5 a 8% de sangre desfibrinada.

ANEXO N° 13
PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LAS FRACCIONES

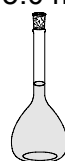
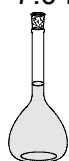


750 mg muestra en 25 mL de etanol 70%
(30 mg/mL = 3.0%)



7.0 mL

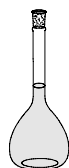
5.0 mL



10 mL (20 mg/mL = 2.0%)

10 mL (15 mg/mL = 1.5 %)

7.0 mL



50 mg muestra en
10 mL (50 mg/mL = 0.5 %)



10 mL (10.0 mL mg/mL = 1.0 %)

Se peso 750 mg y 50 mg para cada fracción y se realizó la misma técnica para la preparación de las diluciones a diferentes concentraciones.

ANEXO N° 14
MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLVENTES

1.1 Material Vegetal

- Goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***

1.2 Cepas de Referencia

- ***Pseudomona aeruginosa***
- ***Staphylococcus aureus***
- ***Streptococcus pneumoniae***.

1.3 Material de Laboratorio

- Agitadores de vidrio
- Beaker (30, 50, 100 y 250 mL)
- Embudo de vidrio
- Ampolla de separación (5000 mL)
- Erlenmeyers (250, 500 mL)
- Probetas (25, 100 mL)
- Tubos de ensayos
- Tubos de ensayo con rosca
- Pipetas Mohr (1,5 mL)
- Pipetas volumétricas (1,5 mL)
- Balón fondo Redondo (500 mL)
- Caja Petri (13 x 100 mm)
- Láminas portaobjeto
- Frasco de vidrio color ámbar con tapón rosca (500 mL)
- Asas bacteriológicas
- Guantes de asbesto
- Pipeteadores
- Mecheros bunsen
- Aros metálicos
- Trípode
- Mortero y pistilo
- Microespátula
- Malla de asbesto
- Baño de María
- Gradillas

- Pinzas (extensión y soporte)
- Papel filtro
- Papel toalla
- Papel kraff
- Tirros
- Etiquetas
- Fósforos
- Papel aluminio

1.4 Equipo

- Autoclave: de vapor húmedo, Webeco 1978, serie 72244. De aire seco, presión, modelo 25EG, serie 99033-005.
- Estufa Thelco: modelo 3542, serie 21-AF-10.
- Balanza analítica metteler: modelo PM400, serie SNR 124297.
- Balanza granataria: marca Cenco Central Scientific Company. Triple Beam
- Hot plane fisher: modelo 75h, serie 557101947.
- Microscopio: marca Tisher Micromaster, modelo Input:11GUEOH125
- Refrigeradora marca CETRON
- Soxhelt (1L, 1.5L)
- Rotavapor: Labconco
- Hot plane: Corning mode RF 425
- Medidor vernier

1.5 Reactivos y solventes

- Cloroformo
- Diclorometano
- Alcohol etílico 99%
- Acetona industrial
- Azul de metileno
- Peróxido de Hidrógeno 3.0%
- Cristal violeta
- Lugol
- Zafranina
- *n*-hexano

- Éter destilado
- Agua destilada
- α -naftol
- Indicador rojo de metilo
- Hidróxido de sodio IN
- Deoxicolato de sodio 2%

1.6 Medios de cultivos

- Agar Muller-Hilton
- Agar tripticasa soya
- Agar citrato
- Agar ***Staphylococcus*** 110
- Agar tripticasa azúcares y hierro
- Agar Baird-Parker
- Agar Chapman
- Agar Cetrimide
- Agar sangre
- Caldo rojo de metilo
- Caldo voges-proskaver
- Medio de movilidad
- Sangre de carnero
- Solución salina
- Agua estéril.