

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:ACETATO DE ETILO 70%, ACETATO DE ETILO PURO Y
METANOL PURO) PROCEDENTES DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO
DE LA GOMA-RESINA DE *Eucalyptus citriodora* (EUCALIPTO)

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
IMELDA MARISOL GUZMÁN DÍAZ
JOAQUIN ANTONIO HENRÍQUEZ ARDÓN

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

JUNIO 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.



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

Coordinadora General

Licda. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Área de Análisis de Alimentos: Microbiológico

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Asesora de Área de Microbiología:

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

Docentes Directores

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

Dr. Marvin J. Núñez Rivas

Licda. Mercedes Tatiana Quinteros Pérez

AGRADECIMIENTOS

De forma especial a nuestros docentes directores: Dr. Marvin J. Núñez Rivas, Licda. Mercedes Tatiana Quinteros Pérez e Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda, por la oportunidad y confianza que depositaron en nosotros para realizar este trabajo de investigación; gracias por su orientación y paciencia en los momentos difíciles. Que la vida generadora de éxitos *os premie*.

A la planta docente de la Facultad de Química y Farmacia por su responsabilidad y compromiso al compartir sus conocimientos, sabiendo orientar de la mejor forma las habilidades de los estudiantes formando íntegros profesionales en Química y Farmacia.

Al Lic. Raúl, Lic. Amy y Sr. Juan José, por sus valiosos consejos y colaboración en el desarrollo de nuestro trabajo experimental desarrollado en CENSALUD.

Al comité de graduación: Licda. Maria Concepción Odette, MSc. Evelyn Sánchez de Ramos y MSc. Coralia González de Díaz por su colaboración a lo largo de este trabajo de investigación.

Y a todas las personas que directa o indirectamente influyeron en nuestra formación ética y profesional, les estamos agradecidos eternamente.

Imelda y Joaquín

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso y a la Virgen Santísima por iluminarme y guiarme por el buen camino y permitirme culminar esta etapa tan importante de mi vida.

A mi madre, querida, Leticia Díaz por su amor incondicional, su apoyo, por ser mi ejemplo a seguir, y mi ánimo para superarme en la vida.

A mi abuelo Mariano Díaz (Q.D.E.P) que desde el cielo me guía y me cuida.

A mis hermanos Karen y Steven por estar siempre a mi lado cuando los necesito.

Al Lic. Francisco Contreras y Licda. Ada Marcela Campos por creer en mí, por su apoyo y ánimo para la realización de esta tesis.

Al Lic. Carlos Felipe Álvarez por darme ánimos para continuar.

A mis amigos y compañeros (Elbita, Katy, Rocio, Lidizse, Benito, Verónica, Marcela, Osito, etc.) por brindarme su amistad, confianza, apoyo y compartir juntos a lo largo de esta carrera.

A mi compañero Joaquín Henríquez, por darme un voto de confianza, por su amistad y su apoyo para la realización de nuestro trabajo de graduación.

IMELDA MARISOL GUZMÁN DÍAZ

DEDICATORIA

A la vida, la naturaleza del ser, que reanima nuestras conciencias llevándolas a un desarrollo constante.

A mi familia por su sacrificio y apoyo a lo largo de estos años.

A mi madre Maria Angelina Ardón por su voluntad y su incansable amar y esperar.

A mis amigos, compañeros y conocidos que aun sin recordar sus nombres, están presentes en las cosas que digo, pienso y escribo; por su apoyo, su solvencia moral al decir las cosas, gracias por siempre.

A mi compañera Imelda Guzmán por su confianza, su amistad y sobre todo su capacidad y profesionalismo al realizar este trabajo.

JOAQUIN ANTONIO HENRÍQUEZ ARDÓN

ÍNDICE

Resumen

Página

CAPÍTULO I

1.0 Introducción xxii

CAPÍTULO II

2.0 Objetivos 25

CAPÍTULO III

3.0 Marco Teórico 28

3.1 Generalidades del Eucalipto 28

3.2 Generalidades sobre metabolitos secundarios
que presentan actividad antimicrobiana. 39

3.2.1 Terpenos 39

3.2.2 Antranósidos 43

3.2.3 Flavonóides 44

3.2.4 Compuestos fenólicos 46

3.3 Exudados de las plantas 49

3.4 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-¹H) 51

3.5 Generalidades sobre cromatografía 56

3.5.1 Cromatografía en columna 58

3.6 Fraccionamiento bioguiado 63

3.7 Generalidades de las cepas sometidas a bioensayo 65

3.7.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	65
3.7.2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	66
3.7.3	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	67
3.8	Método de difusión	70
CAPÍTULO IV		
4.0	Diseño Metodológico	73
4.1	Tipo de estudio	73
4.2	Investigación bibliográfica	73
4.3	Metodología de campo	74
4.4	Metodología de laboratorio	74
4.4.1	Caracterización organoléptica	74
4.4.2	Parte fitoquímica	75
4.4.2.1	Obtención del extracto etanólico	75
4.4.2.2	Obtención del extracto diclorometánico	75
4.4.2.3	Cromatografía de columna	75
4.4.3	Ensayo Microbiológico	79
4.4.3.1	Pruebas de identificación microbiológicas	79
4.4.3.2	Determinación de la actividad antimicrobiana	81
CAPÍTULO V		
5.0	Resultados y discusión de resultados	85
CAPÍTULO VI		
6.0	Conclusiones	129

CAPÍTULO VII

7.0 Recomendaciones

133

Bibliografía

Glosario

Anexos

INDICE DE CUADROS

CUADRO Nº	Páginas
1. Metabolitos secundarios aislados del <i>Eucalyptus citriodora</i> .	34
2. Metabolitos secundarios aislados de las hojas de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	35
3. Continuación de metabolitos secundarios aislados de las hojas <i>Eucalyptus citriodora</i> .	36
4. Metabolitos secundarios aislados de la corteza de <i>Eucalyptus citriodora</i> .	37-38
5. Desplazamientos químicos típicos en RMN- ¹ H	54
6. Desplazamientos químicos aproximados de varios tipos de protones de flavonoides.	55
7. Señales características de RMN- ¹ H de algunos compuestos presentes en las plantas.	55
8. Características macroscópicas.	80
9. Pruebas de identificación microbiológica.	80
10. Parámetros de referencia de los halos de inhibición.	83
11. Características organolépticas del extracto diclorometánico de la goma-resina del <i>Eucalyptus citriodora</i> .	85
12. Datos de RMN- ¹ H de la fracción <i>n</i> -hexano: acetato de etilo 70% (CD ₃ COCD ₃ , 300MHz).	95

13. Datos del espectro de RMN- ¹ H de la fracción acetato de etilo puro (CD ₃ CO ₂ D ₃ , 300MHz).	101
14. Datos del espectro de RMN- ¹ H de la fracción metanol puro (MOD3, 300MHz).	106
15. Resultados de las pruebas de identificación del <i>Staphylococcus aureus.</i>	106
16. Morfología microscópica y macroscópica de la <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	110
17. Pruebas de identificación y diferenciación de <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	110
18. Pruebas de identificación del <i>Streptococcus pneumoniae.</i>	114
19. Resultados de la evaluación microbiológica de las fracciones en estudio por el método de Kirby Bauer Modificado, para <i>Staphylococcus aureus.</i>	116
20. Resultados de la evaluación microbiológica de las fracciones en estudio por el método de Kirby Bauer Modificado, para <i>Pseudomonas aeruginosa.</i>	120
21. Resultados de la evaluación microbiológica de las fracciones en estudio por el método de Kirby Bauer Modificado, para <i>Streptococcus pneumoniae.</i>	124

INDICE DE ANEXOS

ANEXO

- 1 ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto)
- 2 Fotografías de aparato soxhlet y rota evaporador
- 3 Metodología general de trabajo
- 4 Fraccionamiento bioguiado
- 5 Preparación de las diluciones de las fracciones en estudio
- 6 Pruebas microscópicas (Coloración al Gram)
- 7 Características microscópicas
- 8 Cromatografía de columna flash
- 9 Pruebas de identificación y diferenciación para ***Staphylococcus aureus***
- 10 Pruebas bioquímicas
- 11 Pruebas de identificación y diferenciación para ***Streptococcus pneumoniae***
- 12 Preparación del estándar Mc Farland
- 13 Método de Kirby Bauer Modificado
- 14 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en ***Staphylococcus aureus***
- 15 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en ***Pseudomona aeruginosa***

- 16 Resultados del método Kirby Bauer Modificado en ***Streptococcus pneumoniae***
- 17 Preparación de medios de cultivo
- 18 Materiales, equipos, reactivos y solventes

INDICE DE FIGURAS

FIGURA Nº

1. Árbol de *Eucalyptus citriodora*
2. Estructura del Isopreno
3. 1,8 – cineol
4. α -santonina
5. Ácido abiético
6. Lupeol
7. Emodina
8. Rutina
9. Ácido caféico
10. Ácido gálico
11. Recolección de goma-resina de *Eucalyptus citriodora*
12. Empacado de la columna de cromatografía.
13. Preparación de la cabeza de la columna
14. Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%
(CD₃COCD₃, 300 MHz)
15. Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%
(CD₃COCD₃, 300 MHz)
16. Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%
(CD₃COCD₃, 300 MHz)

17. Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%
(CD₃COCD₃, 300 MHz)
18. Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%
(CD₃COCD₃, 300 MHz)
19. Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%
(CD₃COCD₃, 300 MHz)
20. Espectro de RMN-¹H de la fracción AcOEt puro (CD₃COCD₃, 300 MHz)
21. Espectro de RMN-¹H de la fracción AcOEt puro (CD₃COCD₃, 300 MHz)
22. Espectro de RMN-¹H de la fracción AcOEt puro (CD₃COCD₃, 300 MHz)
23. Espectro de RMN-¹H de la fracción MeOH puro (MOD₃, 300 MHz)
24. Espectro de RMN-¹H de la fracción MeOH puro (MOD₃, 300 MHz)
25. Espectro de RMN-¹H de la fracción MeOH puro (MOD₃, 300 MHz)
26. ***Staphylococcus aureus***, en tinción al Gram
27. ***Staphylococcus aureus*** en agar Chapman
28. ***Staphylococcus aureus*** en agar Baird Parker
29. Prueba de catalasa
30. Prueba de coagulasa
31. ***Pseudomona aeruginosa*** en tinción al Gram
32. ***Pseudomona aeruginosa*** en agar Cetrimide
33. Prueba positiva de movilidad
34. Prueba negativa de rojo de metilo
35. Prueba positiva de citrato

36. Prueba negativa de indol
37. Prueba negativa de Voges Proskauer
38. Prueba de TSI
39. Prueba positiva de oxidasa
40. ***Streptococcus pneumoniae*** en tinción al Gram
41. ***Streptococcus pneumoniae*** en agar sangre
42. Prueba positiva de discos de Optoquina
43. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones 0.5%, 1.05%, 2.1% y 3.0% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro (AcOEt) y metanol puro (MeOH) del extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto) en ***Staphylococcus aureus***.
44. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones 0.25%, 0.5%, 0.75% y 1.05% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro (AcOEt) y metanol puro (MeOH) del extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto) en ***Pseudomona aeruginosa***.
45. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones 0.5%, 0.75%, 1.5% y 3.0% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro (AcOEt) y metanol puro (MeOH) del extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto) en ***Streptococcus pneumoniae***.

ABREVIATURA Y SIMBOLOGIA UTILIZADA

AcOEt: Acetato de etilo

ATCC: American Type Culture Collection

BaCl₂: Cloruro de bario

BHI: Brain Heart Infusión Agar

C: Carbono

cm: Centímetros

CDCl₃: Cloroformo deuterado

CD₃COCD₃: Acetona deuterada

CHCl₃: Cloroformo

CO₂: Dióxido de Carbono

d: Doblete

HDO: Agua deuterada

H₂SO₄: Ácido Sulfúrico

H₂O: Agua

H₂O₂: Peroxido de Hidrogeno

MeOH: Metanol

mg: Miligramo

mm: Milímetros

MO: Microorganismo

MOD₃: Metanol deuterado

msnm: Metros sobre el nivel del mar

ppm: Partes por millón

RMN-¹H: Resonancia Magnética Nuclear de protón

TMS: Tetrametilsilano

TSA: Tryptone Soya Agar

UES: Universidad de El Salvador

UNSA: Universidad Nueva San Salvador

RESUMEN

La presente investigación tiene como finalidad determinar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna del extracto diclorometánico de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* contra las cepas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae*, empleando el método Kirby Bauer Modificado.

La goma resina se recolectó en la época seca sometiéndose a extracción en Soxhlet con Etanol 95°, luego realizando una partición líquido-líquido H₂O/CH₂Cl₂ y seguidamente llevando a cabo una cromatografía de columna a media presión, con el extracto diclorometánico, obteniendo las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro; las cuales se analizaron por medio de RMN-¹H, con el fin de determinar los metabolitos secundarios presentes. Finalmente se comprobó la actividad antimicrobiana a través del método Kirby Bauer Modificado, que consiste en colocar cilindros de acero inoxidable que contienen la sustancia a investigar, sobre un medio solidificado (Agar Muller Hinton) cuya superficie debe encontrarse inoculada por el microorganismo de prueba; de manera que si es susceptible se forma un halo alrededor de el cilindro.

La fracción que presentó mayor actividad microbiológica fue *n*-hexano:acetato de etilo 70%, cuya actividad se debe a la presencia de sustancias como flavonoides y ácidos fenólicos comprobando así, que la fracción antes mencionada posee actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

I. INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos ha sido producto de numerosas investigaciones y, aunque muchos de estos agentes pueden sintetizarse por diferentes métodos químicos, constantemente se están buscando nuevas sustancias inhibitorias de origen natural, principalmente vegetal. ⁽³⁴⁾

En El Salvador hay una gran variedad de especies vegetales y de ellas se pueden obtener diferentes extractos que pueden constituirse en un farmacógeno (que genera un fármaco) e identificar estructuras químicas que pueden tener aplicaciones como agentes para curar diversas enfermedades, la importancia de esta investigación radica en justificar la utilización de preparados vegetales y contribuir a la investigación de la flora medicinal en el país. ⁽³⁴⁾

Una de las especies vegetales que mayor beneficio ha aportado al área de la salud, es el Eucalipto (***Eucalyptus citriodora***), el cual exuda una goma-resina del tronco la cual ha sido poco estudiada. Dicha resina contiene varios metabolitos secundarios que presentan actividad antibacteriana. ⁽¹⁸⁾

En este trabajo, se partirá de de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora***, del cual se obtendrá un extracto diclorometánico que se someterá a una

cromatografía de columna obteniéndose, así las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro, las cuales se analizarán por espectroscopía de RMN-¹H para determinar sus posibles metabolitos secundarios y luego se investigará si poseen propiedades antibacterianas, y para ello se realizará una evaluación microbiológica por medio del método de Kirby Bauer Modificado, con las bacterias; ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***, las cuales son microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades como por ejemplo, neumonía, meningitis, infecciones menores hasta potencialmente mortales, epidemias de influenza, bronquitis, etc.

Con esta investigación se espera determinar si las fracciones de la cromatografía de columna antes mencionadas de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** presentan actividad antibacteriana en contra de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***, convirtiéndose así en una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos.



II. OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna, (*n*-hexano:acetato de etilo 70%; acetato de etilo puro y metanol puro), procedentes del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1. Obtener el extracto etanólico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.
- 2.2.2. Realizar la partición líquido-líquido (agua/diclorometano) de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.
- 2.2.3. Obtener las fracciones, *n*-hexano: acetato de etilo 70 %; acetato de etilo puro y metanol puro, a partir de la cromatografía de columna del extracto diclorometánico.

2.2.4. Realizar un análisis espectroscópico por medio de Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN-¹H) de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna.

2.2.5. Comprobar la actividad antibacteriana de las fracciones *n*-hexano: acetato de etilo 70%; acetato de etilo puro y metanol puro, por el método microbiológico Kirby Bauer Modificado, contra las bacterias ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***.

III. MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO



3.1 GENERALIDADES DEL EUCALIPTO

Nombre común: Eucalipto limón, Eucalipto aromático, Gomero de olor a limón.

Nombre científico: *Eucalyptus citriodora*

Familia: Myrtaceae.

Subfamilia: Leptospermoideae.

Figura Nº 1 Árbol de *Eucalyptus citriodora*.

Es una especie de gran adaptabilidad y rápido crecimiento, cuya madera es pesada y fácil de aserrar, desarrolla fustes rectos, proporciona leña de alto valor calorífico, tiene gran potencial en el establecimiento y manejo de sistemas agroforestales.

ORÍGEN Y DISTRIBUCIÓN

Los rodales naturales están restringidos a la costa oriental de Australia, entre los 7 °C y 26 °C de latitud sur. Se le ha plantado en África Central, América del Sur, especialmente en Brasil, América Central, el Mediterráneo, India y Hawaii.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol perennifolio, monoico de gran porte que puede superar los 43 metros de altura, con la corteza lisa, caediza, blanca 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, de 10-16 cm de longitud y 1-2 cm de anchura. Todas las hojas desprenden un fuerte olor a limón. 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, pedícelada, de 8-10mm de diámetro, con valvas sin sobresalir. ⁽²⁶⁾

HÁBITAT

Prefiere suelos de carácter ácido, y exposición al sol.

SIEMBRA

Siembra directa en otoño o primavera.

REQUERIMIENTOS AMBIENTALES ⁽¹⁷⁾

- Temperatura y elevación.

En América Central se le ha plantado en sitios de 100 a 1200 msnm; con una temperatura promedio anual de 20 °C a 26 °C. En El Salvador se ha plantado en sitios de 20 a 600 msnm; con temperaturas de 23.9 °C a 26.5 °C.

- Precipitación.

En la región Centroamericana se ha plantado en sitios con 850 mm. y 280 mm. de precipitación anual con 4 a 8 meses de déficit hídrico.

- Suelos.

La especie crece naturalmente sobre suelos ondulados, pobres, pedregosos, incluyendo suelos lateríticos. No tolera suelos arcillosos, pesados y mal drenados.

SILVICULTURA ⁽¹⁷⁾

- Regeneración natural.

No se tiene experiencia con regeneración natural en América Central.

- Recolección de semillas.

La floración se da de noviembre a diciembre, la recolección se puede realizar en todo el año. Las semillas no requieren tratamiento pregerminativo, su viabilidad, de 75%. El momento de cosechar las semillas es cuando cambian de color verde amarillento a un color negro blanquecino y dentro del fruto aparece un color café y 3 divisiones bien definidas. La recolección se efectúa cortando las ramas con frutos; el secado se realiza exponiendo la semilla al sol de 3 a 4 días; el purificado se realiza a través de un tamizado y luego se almacenan en un cuarto frío a temperaturas de 8 °C a 12 °C.

- Producción en vivero.

Requiere de germinadores conteniendo arena desinfectada. Las semillas germinan de 5 a 12 días. Se trasplanta a la bolsa cuando la planta presenta de

2 a 3 hojas. Las plantas alcanzan 40 cm en 16 semanas, no se puede producir a raíz desnuda, ni como pseudoestaca para su propagación.

- Establecimiento de la plantación.

El establecimiento requiere de una eliminación de malezas; al igual que proteger la plantación del ataque de termitas y zompopos en los primeros años. Posee lignotubérculos, mecanismo fisiológico que le ayuda a la planta a resistir los incendios.

- Manejo.

La especie presenta un buen desarrollo por debajo de los 800 msnm, con menos de 1000 mm de precipitación anual y 8 meses de déficit hídrico, posee capacidad de rebrote. Su rendimiento es de 15 m³/ha/año, cosechadas en rotaciones de rebrote de 8 años. Tiene un incremento en altura de 3 mts/año, durante los primeros años.

USOS TERAPÉUTICOS

En general el eucalipto es antiséptico y antifúngico, tiene acción antiinflamatoria, antiespasmódica y antidiabética, se utiliza en los tratamientos de artritis inflamatoria y reumatoidea. La utilización del eucalipto es también recomendado en casos de fiebre, tos, heridas y picaduras de insectos. ⁽¹⁸⁾

En medicina popular se emplean sus hojas como sudorífico, espasmódico, contra la gripe y los resfriados. En inhalaciones se aprovechan con gran

resultado en caso de ronquera, pérdida de la voz y en la sinusitis, el aroma de las hojas y corteza son un repelente de zancudos y mosquitos. (35)

Su aceite esencial es destilado de las hojas y ramas jóvenes se utiliza: en inhalaciones, vaporizaciones, fricciones y masajes. Se ha utilizado además como antiséptico, balsámico, anticatarral, desodorante, cicatrizante, antiparasitario, antirreumático, antifebril y estimulante en especial del sistema respiratorio. Es fantástico para aliviar congestiones nasales. Es usado principalmente para infecciones de las vías respiratorias, gripe, sinusitis, cistitis, llagas, quemaduras y reumatismo. (30)

OTROS USOS

La madera es de color castaño-oscuro a castaño-grisácea, es muy pesada, dura tenaz y fuerte, es resistente a la pudrición y a las termitas, es una madera de aserrío de buena calidad y se usa en estructuras y armazones, carruajes, tarimas, carpintería naval, apero de labranza, etc. en la construcción en general, mangos de herramientas, durmientes de ferrocarril, se tornea fácilmente y produce postes rectos que pueden impregnarse fácilmente a presión. La leña es utilizada como combustible, arde en forma constante y se utiliza para la producción de carbón industrial y también para obtener celulosa y pulpa de papel. Las hojas en Australia lo utilizan para la extracción de un aceite esencial con olor a limón, el cual es rico en citronelal, y muy apreciado en perfumería. (26)

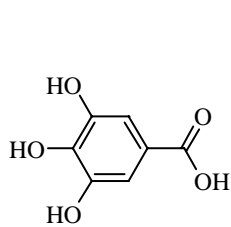
TOXICIDAD

El citronelal encontrado en el *Eucalyptus citriodora*, se reporta que es mutagénico. (46)

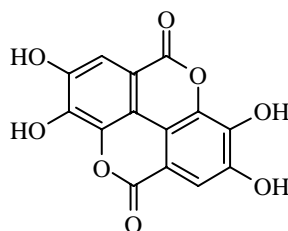
COMPOSICIÓN QUÍMICA
CUADRO Nº1 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DEL *Eucalyptus*
***citriodora.* (31)**

PARTE DE LA PLANTA	EXTRACTO	TIPO DE COMPUESTO	NOMBRE DEL COMPUESTO		
Hojas	Etanólico	Derivados del fenol	1. Acido gálico 2. Acido elágico		
		Tanino	3. Castalagina		
		Flavonoides	4. Quercetina 5. Miricitina 6. Miricitina-3- <i>O</i> -glucosa 7. Quercetina-3- <i>O</i> -glucosa 8. Myricetina-3- <i>O</i> -ramnosa		
		Antocianida	9. Cianidina		
		Antocianidina	10. Delphinidina 11. Citriodorina 12. Eucalyptina		
		Esterol	13. β -Sitosterol		
		Triterpeno	14. Acido botulínico		
		Ácidos carboxílicos	15. Acido shikímico 16. Acido glutárico 17. Acido succínico 18. Acido cítrico 19. Acido málico		
		Fenilpropanopolimérico	20. Lignina		
		Monoterpenos	21. Citral 22. Citronelal		
		Triterpeno	23. Acido ursólico		
		Corteza	Clorofórmico	Sesquiterpenlactonas	1. <i>Trans</i> -calamenino 2. T-murolol 3. α -cadinol 4. 2 β -hidroxi- α -cadinol
				Derivados del fenol	5. 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído 6. Acido 4-hidro-3,5-dimetoxibenzoico
Acido graso	7. Acido linoleico				
Hidrocarburo	8. Escualeno				
Terpenoquinona	9. α -tocoferol				
Triterpenos	10. Eritrodiol 11. Acido morólico 12. Acido botulínico				
Esteroles	13. Cicloescualenol 14. Vernolitato de cicloeucalenol 15. β -sitosterol 16. β -sitosterilo- β - <i>O</i> -glucopiranosido 17. β -sitosterona				
Lignanos	18. Yamgambina 19. Sesamina				

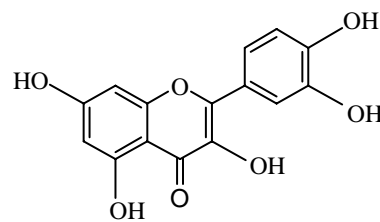
CUADRO NO. 2 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS HOJAS DE
Eucalyptus citriodora.



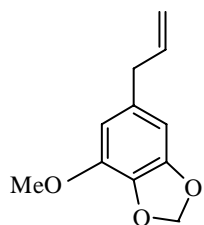
1.Ácido gálico



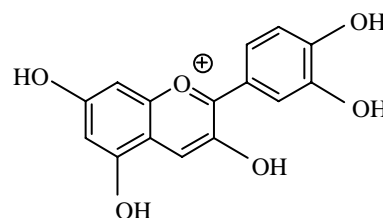
2.Ácido elágico



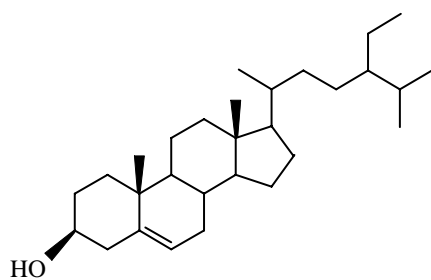
4.Quercetina



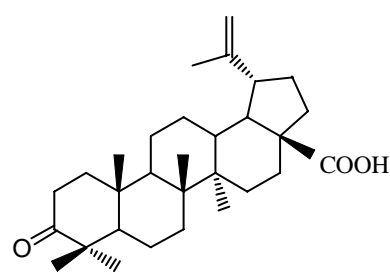
5.Miricetina



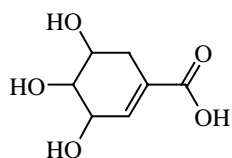
9.Cianidina



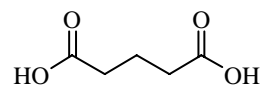
13.β -sitosterol



14.Ácido betulínico

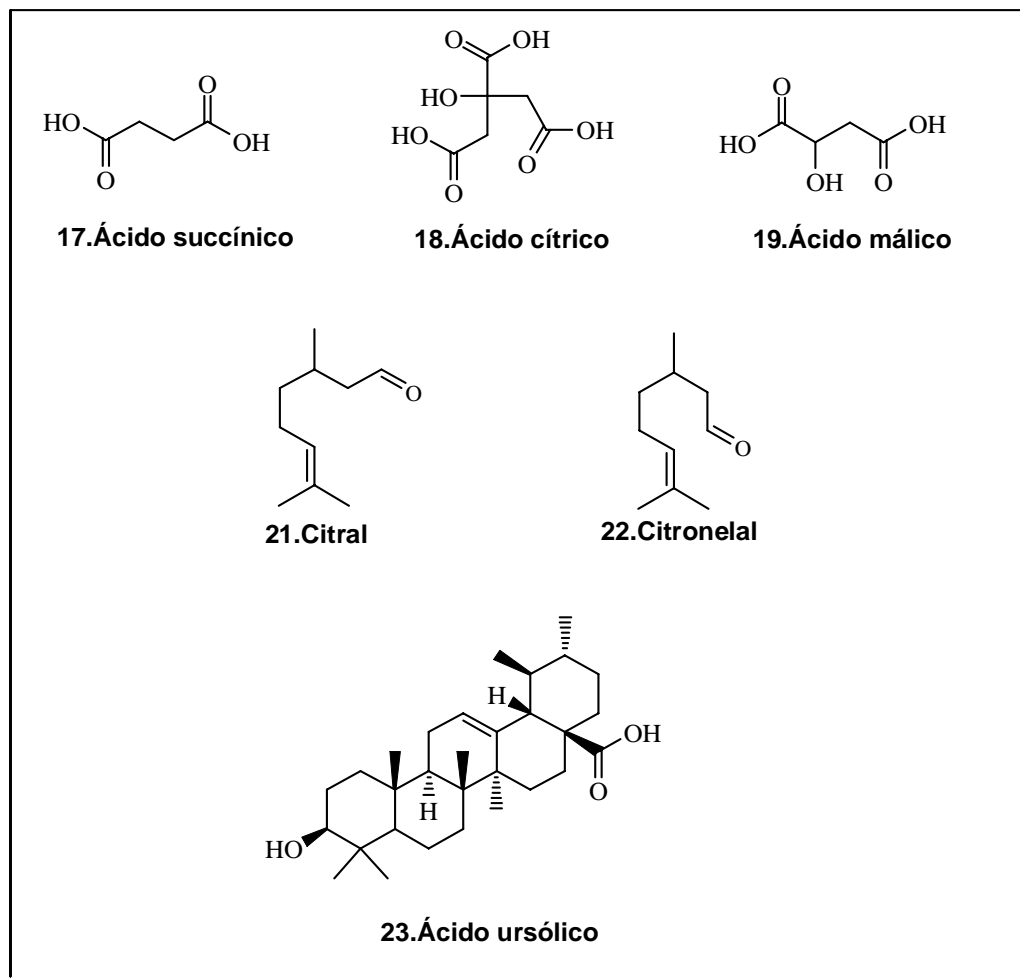


15.Ácido shikimico

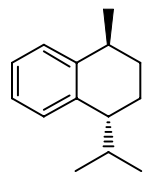


16.Ácido glutárico

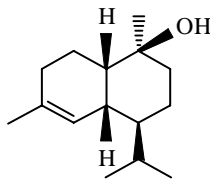
CUADRO NO. 3 CONTINUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LAS HOJAS DE *Eucalyptus citriodora*.



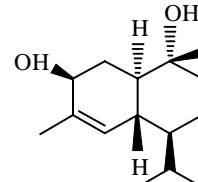
CUADRO NO. 4 METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE
Eucalyptus citriodora



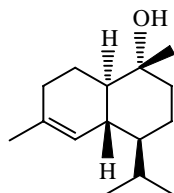
1. *Trans*-calameneno



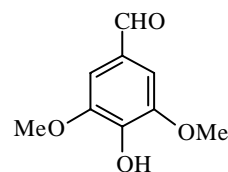
2. T-muurolol



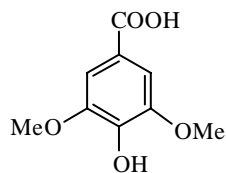
3. α -cadinol



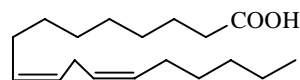
4. 2β -hidroxi- α -cadinol



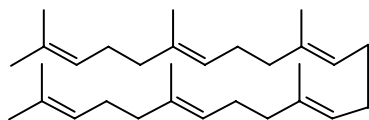
5. 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído



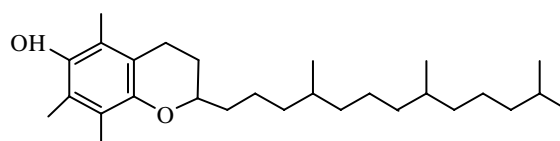
6. Acido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico



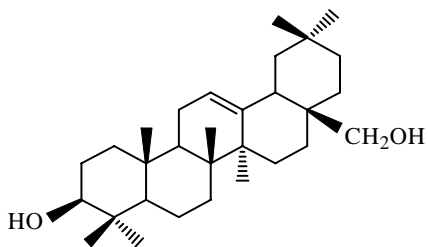
7. Acido linoleico



8. Escualeno

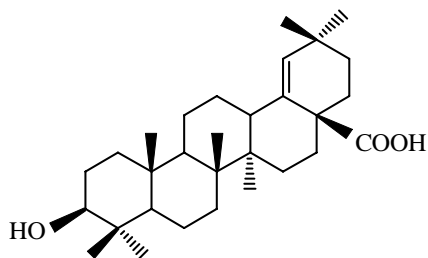


9. α -tocoferol

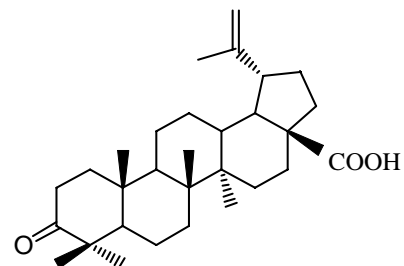


10. Eritrodíol

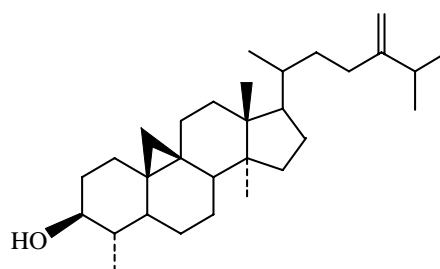
CUADRO NO. 4 CONTINUACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS AISLADOS DE LA CORTEZA DE *Eucalyptus citriodora*.



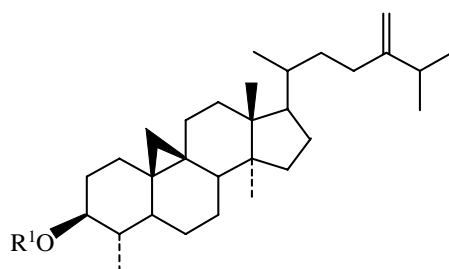
11. Acido morólico



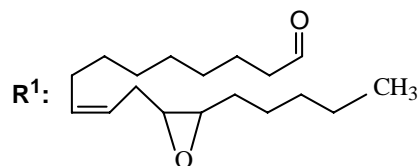
12. Acido betulínico



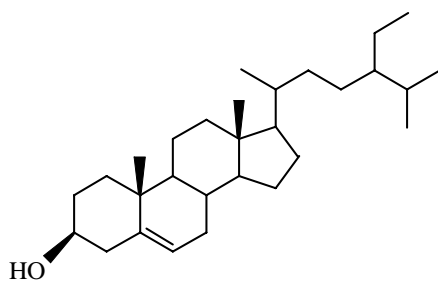
13. Cicloeucalenol



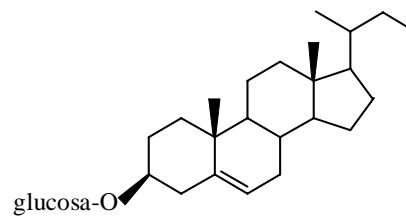
14. Vernolitato de cicloeucanol



Radical del vernolitato de cicloeucanol



15. β - sitosterol



16. β -sitosterilo- β -D-glucopiranosido

3.2 GENERALIDADES SOBRE METABOLITOS SECUNDARIOS QUE PRESENTAN ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

3.2.1. TERPENOS

Son sustancias que tienen un origen biosintético común y que siguen la llamada “regla del isopreno”, pueden clasificarse como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), y tetraterpenos (C_{40}), según el número de unidades de isopreno que lo forman.

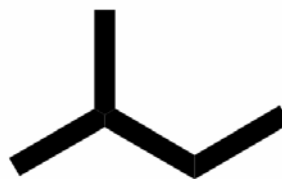


Figura Nº 2: Estructura del Isopreno

- MONOTERPENOS

Formados por dos moléculas de isopreno; los monoterpenos suelen ser los componentes de las esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de las hierbas y especias, en los que los monoterpenos pueden constituir incluso el 5% del peso seco de la planta. Los monoterpenos se pueden aislar tanto por destilación como por extracción, y son utilizados para la producción industrial de sabores y perfumes.

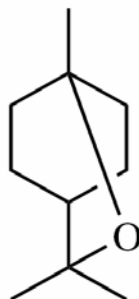


Figura № 3: 1,8-cineol
Descongestionante, expectorante.
Eucalyptus globulus (Mirtaceae)

- SESQUITERPENOS

Son estructuras C_{15} formadas a través de la condensación isoprénica. Se encuentran frecuentemente formando parte de los aceites esenciales pero también hay sesquiterpenos distintos de los que se encuentran en dichos aceites. Entre ellos destacan las lactosas sesquiterpénicas presentes en el árnica o los sesquiterpenos que contiene la valeriana.

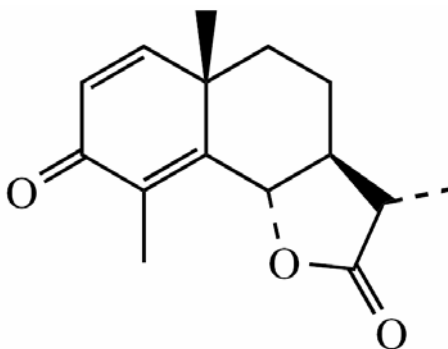


Figura № 4: α -santonina
Analgésica.
Chenopodium ambrosioides L.
 (Chenopodiaceae)

- DITERPENOS

Comprende un grupo de compuestos de 20 átomos de carbono que pueden presentarse en forma de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, lactonas, y ácidos carboxílicos, siendo estos últimos conocidos desde tiempo atrás como ácidos resínicos obtenidos como componentes de las resinas exudadas obtenidas por cortes en los troncos de pinos y abetos.

Se subdividen atendiendo al tipo de esqueleto carbonado, entre otros, como bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos.

También se han clasificado en base a sus propiedades; entre los ácidos resínicos ya nombrados, tenemos los ácidos abiético y agático a los que se le atribuye función protectora a la planta; los diterpenos tóxicos como las grayanotoxinas de las hojas de *Rhododendron* y son las responsables de la naturaleza venenosa de ellas; y las giberelinas, un grupo de hormonas que estimulan el crecimiento vegetal, de las cuales el más común es el ácido giberélico.

Algunos diterpenos muestran actividad antitumoral y citotóxica, otros, actividad irritante, algunas actividades anti-inflamatorias y otros propiedad edulcorante.⁽²⁵⁾

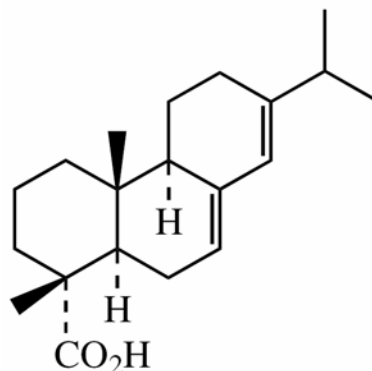


Figura Nº 5: Ácido abiético
Expectorante, anticatarral, vermífuga, antiulcerogénica.
***Pinus silvestris* L. (Pinaceae)**

- TRITERPENOS

Son compuestos con un esqueleto carbonado basado en seis unidades de isopreno que derivan biogenéticamente del escualeno, hidrocarburo acíclico de 30 carbonos. Son de estructura relativamente compleja generalmente tetracíclicos o pentacíclicos, y pueden contener grupos hidroxilo, cetona o aldehído y ácido carboxílico. Muchos se encuentran formando las llamadas saponinas triterpénicas.

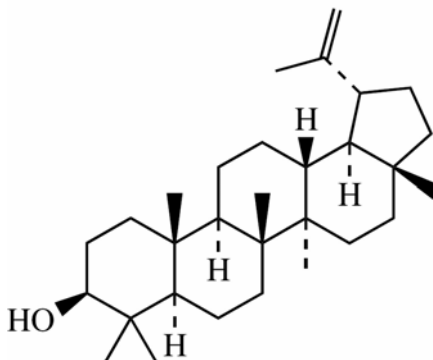


Figura Nº 6: Lupeol
Antiinflamatorio, analgésico y antipirético.
***Aloe vera* L. (Liliáceas)**

3.2.2. ANTRANÓSIDOS

Las quinonas naturales, son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas donde su color está enmascarado por otros pigmentos. Se presentan mayormente al estado libre, pero las hidroxiladas pueden encontrarse glicosidadas. Para confirmar su presencia puede ser útil una reacción de color basada en la propiedad rédox de las quinonas.

Para su mayor estudio, las quinonas se subdividen en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas isoprenoide. Ellas además pueden contener diversos grupos funcionales, anillos de furano o pirano, encontrarse como dímeros, ser parcialmente reducidas como los antranoles y antranas, etc.

Se asume que la mayoría de las antraquinonas han sido elaboradas a través de la ruta acetato y en otros casos, han sido formadas de la ruta del ácido shikímico. Incluye *O*-heterósidos y *C*-heterósidos (estos últimos son enlace carbono-carbono entre el azúcar y el aglicón) su acción más específica es la de estimular la musculatura lisa del intestino grueso. La cual llega a ocasionar una mayor dilución del contenido intestinal. En conjunto producen un claro efecto laxante que se manifiesta después de unas 6 a 7 horas. Las plantas que contienen antraquinonas se comportan como laxantes o purgantes según la dosis. Este tipo de laxantes está contraindicado en caso de embarazo, menstruación y hemorroides.⁽¹⁰⁾

Las quinonas han sido conocidas desde épocas antiguas por sus propiedades tintóreas; algunas presentan otras propiedades como la emodina que es catártica; shikonina, antimicótica; rheina, bajo la forma de diacetato, antirreumático; plumbagina, muy activa para la leishmaniasis; lapachol, citostática, bacteriostática, fungistática, entre otros. (25)

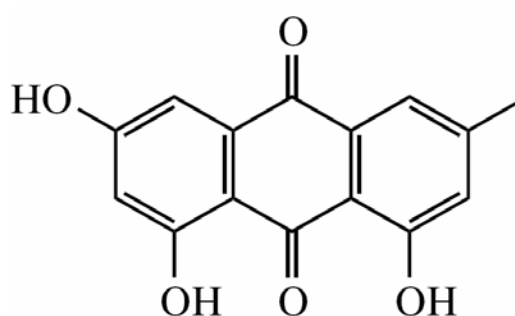


Figura № 7: Emodina
Catártico.
Rheum officinale. (Polygonaceae)

3.2.3. FLAVONOIDES

Los flavonoides son pigmentos vegetales que se encuentran en forma libre y en forma de glicósidos, poseen esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$ como se encuentran en las flavononas, aurona, chalcona, flavona, flavanonol, antocionadina, catequina, isoflavona, antocianidina, etc. Los flavonoides naturales se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, en sus flores, frutos y hojas, en su mayoría están en forma de glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.

Se conocen diez tipos de flavonoides cada uno de los cuales suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar los

cuales se ubican en los carbonos, C₃ y/o C₇. Los diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante reacciones de coloración y por sus propiedades de solubilidad.

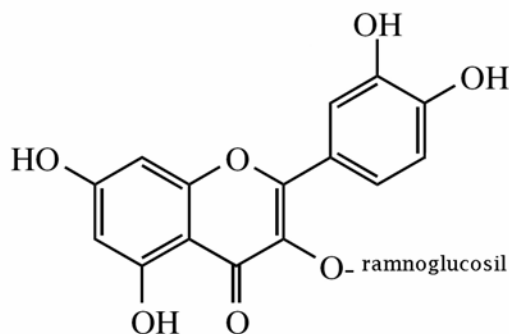


Figura № 8: Rutina
Antiinflamatorio,
antiespasmódico y contra la fragilidad capilar.
***Citrus limon L.* (Rutáceas)**

Proviene de la ruta del acetato y shikimato, el primer flavonoide formado es la chalcona, a partir del cual se derivan los otros tipos de flavonoides por modificaciones que ocurren en varias etapas.

Las agliconas son más comunes en tallo, corteza, raíces y exudaciones resinosas de la madera.

Los disolventes empleados en la extracción de estos compuestos son desde muy polares como el agua, etanol, para glicosidos o agliconas muy hidroxilados, hasta menos polares como el éter y cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. (11)

Algunos pigmentos flavónicos desprovistos de toxicidad para el hombre, tienen propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antihemorrágicas, hemostáticas, antiarrítmicas, cardíacas, antiinflamatorias, antirradicales libres, antihepatotóxicas y antiinfecciosas; además son ampliamente usadas en problemas circulatorios ya que disminuyen la fragilidad capilar, se usan como edulcorantes y hepatoprotectores. (10)

3.2.4. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilados, y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcares. Son relativamente polares que tienden a ser solubles en agua; pueden ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico.(25) Entre los compuestos fenólicos podemos encontrar los siguientes:

- ÁCIDOS CINÁMICOS

Los ácidos cinámicos son obtenidos por reacciones de hidroxilación y de metilación, que sigue la secuencia de los patrones de la substitución, típicos de los metabolitos de la vía del shikimato, es decir un patrón orto de la hidroxilación. Algunos de los ácidos cinámicos naturales más comunes son los

ácidos 4-coumárico, caféico, ferúlico, y sinápico. Éstos se pueden encontrar en plantas en forma libre y en una gama de formas esterificadas.

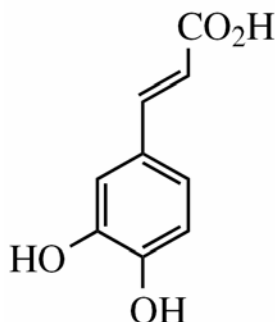


Figura № 9: Ácido caféico
Antifúngico y colagogo.
***Cynara scolymus* L. (Asteraceae)**

- ÁCIDOS BENZOICOS

Los ácidos benzoicos derivados de C_6-C_3 , componen algunos de los ácidos hidroxibenzoicos simples (compuestos C_6-C_1) por ejemplo el ácido 4-hidroxibenzoico y el ácido gálico que se pueden formar directamente de intermediarios en la vía del shikimato, ejemplo, el ácido 3-dihidroshikímico o el ácido chorísmico, aunque existen rutas alternativas en qué derivados ácidos cinámicos (compuestos C_6-C_3) se rompen en el enlace doble y pierden dos carbonos de la cadena lateral. Así, el ácido 4-coumárico puede actuar como precursor del ácido 4-hidroxibenzoico, y el ácido ferúlico puede dar el ácido vanillico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico).

Algunos de estos compuestos poseen actividad antibacterial, bacteriostática y bactericida frente a ***Estafilococos***, ***Streptococos***, ***Salmonella***, ***Bacilo***

subtilis, *Proteus bulgaris*, posiblemente por acción de ácidos fenólicos y ácidos ferúlicos. Otros como el ácido caféico y los cumaratos de bencilo poseen propiedades antifúngicas. (30)

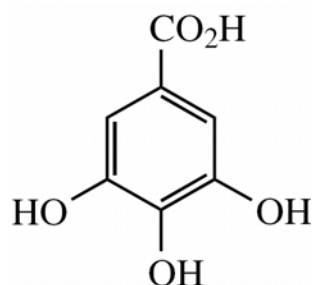


Figura № 10: Ácido gálico
Antibronquítico, astringente.
***Hamamelis virginiana* L. (Hamamelidáceas)**

3.3 EXUDADOS DE LAS PLANTAS

Los exudados de las plantas han sido utilizados a lo largo de la historia, por numerosas culturas ya sea para propósitos religiosos, para impartir lustre al papel y textiles, como adición en materiales de construcción, como pegamentos dentales, como lubricantes en instrumentos quirúrgicos, como estabilizador del vino, o simplemente como objetos de la belleza en joyería.

Estos exudados incluyen: resinas, gomas, goma resinas y látex; los cuales definimos a continuación:

Resinas: son insolubles en agua, están constituidas por grandes cantidades de terpenos, o sustancias extraíbles con solventes apolares.

Gomas: son mezclas solubles en agua o dispersables en agua de polisacáridos de alto peso molecular.

Goma-resinas: Poseen tanto carbohidratos como terpenos o sustancias que son extraíbles en fase acuosa y fase orgánica respectivamente.

Látex: Diminutas gotas blanquecinas o fluidos lechosos de compuestos orgánicos suspendidos o dispersos en medios acuosos, formados por poliisoprenos.

Estos son producidos por células de la superficie de la planta como resultado de un daño o lesión, estos exudados se limitan a los compuestos orgánicos que no requieren la extracción química, es decir estos materiales se pueden escoger o raspar de la superficie de plantas, pueden tener apariencia física y propiedades similares, pero diferente estructura molecular.

Las plantas vasculares son las productoras dominantes de exudados, las familias de las gimnospermas tienen a los productores más grandes de resinas como las Cupresáceas y Pináceas; entre las angiospermas más comunes que exudan tenemos: Anacardiáceas, Burceráceas, Dipterocarpáceas, Euforbiáceas y Fabáceas/Leguminosas.

Las gimnospermas generan resinas, las angiospermas pueden generar resinas, gomas o látex. Las gomas son producidas principalmente por las Fabáceas/Leguminosas y Esterculiáceas; los látex son producidos por las Apocináceas, Asclepidiáceas, Euforbiáceas y Sapotáceas.

Las resinas son producidas por el epitelio derivativo de células adyacentes a las células parenquimatosas. Estas resinas están contenidas en canales alargados (Gimnospermas) o al interior de glóbulos en las Angiospermas; las gomas son producidas por células parenquimatosas derivadas del cambium y los látex son producidos por células conocidas como laticíferos de varios tejidos de la planta tal como el parénquima y el floema secundario.⁽⁴⁸⁾

3.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN-¹H)

El método se basa en la absorción de energía por cambio del espín nuclear de átomos sometidos a un campo magnético externo. El análisis en RMN ofrece evidencias bastante explícitas sobre las características de los núcleos que conforman una dada molécula, y los más frecuentemente analizados son: ¹H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F, ³¹P, etc, siendo los dos primeros utilizados en análisis de rutina. Los desplazamientos químicos de las señales de RMN de ¹H (0–20 ppm) y de ¹³C (0–200 ppm) dan información acerca de la naturaleza de hidrógenos (alifáticos, aromáticos, olefínicos, geminales y heteroátomos, etc.) y de carbonos (en dobles enlaces, aromáticos, carbonílicos, oxigenados, etc.)⁽²⁸⁾

Para identificar los valores de desplazamiento químico, se toma la señal producida por el tetrametilsilano (TMS) ya que debido a la gran protección electrónica experimentada por sus protones es necesario excitarlos a campos mucho más altos que la mayoría de los protones de los compuestos orgánicos. Los valores de desplazamiento químico se expresan en partes por millón (ppm). Con independencia de los efectos producidos por el medio, el desplazamiento químico de un protón se encuentra determinado por tres factores:

- a) Distribución de la densidad electrónica
- b) Efecto de la anisotropía
- c) Efectos estéricos

ACOPLAMIENTO H,H

El acoplamiento magnético de dos núcleos en una molécula se realiza por lo general a través de los enlaces que los unen, sin embargo se conocen también acoplamientos escalares a través del espacio; estos se manifiestan cuando, debido a la compresión estérica, dos núcleos se encuentran tan próximos que se produce una interacción directa de orbitales.

Una medida cuantitativa del acoplamiento la suministra la constante de acoplamiento J la cual mide la distancia entre los diferentes protones. Entre los acoplamientos más importantes tenemos:

- a) acoplamiento geminal J^2
- b) acoplamiento vecinal J^3
- c) acoplamiento a larga distancia J^4 o J^5

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y REGISTRO DE ESPECTROS ⁽¹⁹⁾

Los espectros de resonancia magnética nuclear con finalidad analítica se registran habitualmente en disolución, para ello se prepara una solución concentrada pero no viscosa en un disolvente aprótico el más frecuente es CDCl_3 , además se pueden adquirir una serie de disolventes deuterados.

Los disolventes polares presentan con frecuencia un pequeño contenido de agua cuya presencia se detecta a través de la señal del H₂O o bien HDO.

Como sustancia de referencia para el establecimiento del punto cero u origen de la escala δ se utiliza el tetrametilsilano (TMS), que esta contenido bien en la propia disolución (referencia interna) o bien se aporta al tubo de resonancia en capilar colocado en el tubo (referencia externa). La utilización del TMS es innecesaria cuando por ejemplo se puede tomar directamente la señal residual del CHCl₃ en el CDCl₃ como punto de referencia.

El registro del espectro se lleva a cabo habitualmente a temperatura ambiente, se utilizan espectrómetros de resonancia con frecuencia de trabajo de 250, 270, 300, 400, 500, 600 e incluso 750 MHz. Para el registro de espectros en RMN¹H se conocen dos técnicas: la técnica CW (onda continua) y técnica de pulsos con transformada de fourier (Espectroscopia RMN-PFT)

Técnica CW las diferentes señales de resonancia se van obteniendo una tras otra al ir variando continuamente ν (frecuencia) o B (campo magnético).

La espectroscopia RMN-PFT se emplea para muestras diluidas, con ella se puede obtener espectros de RMN H-1 con 1mg o aun menos de muestra.

Cuadro No. 5 Desplazamientos químicos típicos en RMN-¹H. (21)

TIPO DE PROTÓN	DESPLAZAMIENTO QUÍMICO (ppm)
Alquilo 1º, RCH ₃	0.8-1.0
Alquilo 2º, RCH ₂ R	1.2-1.4
Alquilo 3º, R ₃ CH	1.4-1.7
Alílico, $\begin{array}{c} \text{R}_2\text{C}=\text{C}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{R} \end{array}$	1.6-1.9
Bencílico, ArCH ₃	2.2-2.5
Cloruro de alquilo, RCH ₂ Cl	3.6-3.8
Bromuro de alquilo, RCH ₂ Br	3.4-3.6
Yoduro de alquilo, RCH ₂ I	3.1-3.3
Éter, ROCH ₂ R	3.3-3.9
Alcohol, HOCH ₂ R	3.3-4.0
Cetona, $\begin{array}{c} \text{RCCH}_3 \\ \\ \text{O} \end{array}$	2.1-2.6
Aldehído, $\begin{array}{c} \text{RCH} \\ \\ \text{O} \end{array}$	9.5-9.6
Vinílico, R ₂ C=CH ₂	4.6-5.0
Aromático, ArH	6.0-9.5
Acetilénico, RC≡CH	2.5-3.1
Hidroxilo alcohólico, ROH	0.5-6.0 ^a
Carboxílico, $\begin{array}{c} \text{RCOH} \\ \\ \text{O} \end{array}$	10-13 ^a
Fenólico, ArOH	4.5-7.7 ^a
Amino, R-NH ₂	1.0-5.0 ^a

^aLos desplazamientos químicos de estos grupos varían en los distintos disolventes y con la temperatura y concentración.

Cuadro No. 6 Desplazamientos químicos aproximados de varios tipos de protones de flavonoides. (27)

Desplazamiento, ppm	Tipo de Protón
ca. 1,0	C-CH ₃ de ramnosa (doblete ancho)
ca. 1,7	Metilos de sustituyentes prenilos (-CH ₂ -CH=C(CH ₃) ₂) (los otros protones a 3,5 y 5,2 ppm)
ca. 2,0	Acetato (-OCOCH ₃) y aromático =C-CH ₃
2,0-3,0	H-3 de flavonas) múltiplete, 2 protones)
3,7-4,1	Grupo metoxilo (OCH ₃)
3,5-4,0	C-H de muchos azúcares
4,2-6,0	H-1 de azucares (también H-2 dihidroflavonoles a 5,0 ppm y H-2 de flavanonas a 5,0-5,5 ppm)
6,0	Grupo metilendioxi, O-CH ₂ -O (singulete)
6,0-8,0	Protones de anillo A y B
7,5-8,0	H-2 de isoflavonas (singulete)
9,5-12,5	OH (en derivados no sigilados)

Cuadro No. 7 Señales características de RMN-¹H de algunos compuestos presentes en las plantas. (11,27)

COMPUESTO	SEÑAL
Diterpenos	Protones metilénicos y metínicos entre 0,5 y 1,9 ppm; H geminal al grupo OH δ =3,2-4,5 ppm; H vinílicos δ =6,0-6,8 ppm; protones aldehídicos δ =9,1 ppm; protones α a grupo carbonilo δ =2,1 ppm; H geminal a grupo OR δ =4,4 ppm; protones metínicos δ =1,5-2,0 ppm.
Triterpenos y Esteroides	Región de 3,00-1,00 ppm, protones metílicos entre 1,20 y 0,70 ppm. Singuletes a 0,73 y 1,20 ppm para protones metilicos en C-18 y C-19 y dobles a 0,89 y 0,87 ppm para los C-21 y C-26 en los triterpenos los grupos -CH ₃ en C-4 originan singuletes entre 0,8 y 0,9 ppm. Los protones vinílicos producen señales a 5,20-5,50 ppm.
Antranósidos	Protón del sistema quinonico (δ =6,5-7,0 ppm), Quinonas parcialmente sustituidas, los protones del sistema insaturado dan señales a 6,40 y 6,50 y se acoplan (J = 1,6-3,0) con los protones inmediatos de un grupo alquilo unidos al carbón contiguo (protones alílicos). Los protones de metilo unidos al sistema carbonilo insaturado dan señales a 2,0-2,10, si aparecen como dobles es que hay protón alílico ya citado, los protones enólicos (HO-C=C) dan señales a 7,0-7,10. Las naftoquinonas pueden exhibir señales en la región aromática. Las antraquinonas y fenantraquinonas solo pueden mostrar señales de protones aromáticos y de sus sustituyentes.
Ácidos cinámicos	Protones aromáticos δ =6,5-7,7 ppm; protones vinílicos δ =6,4-7,9 ppm, con J^{β} (cis) =11 Hz y J^{β} (trans) =14 Hz; protones aldehídicos δ =9,1 ppm; protones hidroxilos δ =5,9 ppm

3.5 GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFIA. (27)

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 fase móvil atraviesa el sistema desplazando 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 detección y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original.

El fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la móvil, recibe el nombre de elución. La cromatografía puede emplearse para conocer el número de componentes de una mezcla y su identificación, por comparación con patrones (cromatografía analítica). También se aplica a la separación de mezclas de compuestos, tanto a pequeña como a gran escala, y como método de purificación (cromatografía preparativa).

Tipos de Cromatografía:

Dependiendo de la naturaleza de la fase estacionaria (sólida o líquida) y de la fase móvil (líquida o gaseosa), se pueden distinguir distintos tipos de cromatografía:

- Cromatografía sólido-líquido: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un líquido.
- Cromatografía líquido-líquido: la fase estacionaria es un líquido anclado a un soporte sólido y la fase móvil es un líquido.
- Cromatografía líquido-gas: la fase estacionaria es un líquido no volátil impregnado con un sólido y la fase móvil es un gas.
- Cromatografía sólido-gas: la fase estacionaria es un sólido y la móvil un gas.

Por otra parte, en función al tipo de interacción que se establezca entre los componentes de la mezcla y las fases móvil y estacionaria, se puede hablar de:

- Cromatografía de absorción: la fase estacionaria es un sólido polar capaz de adsorber a los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar.
- Cromatografía de partición: la separación se basa en diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en las fases estacionaria y móvil, que son ambas líquidas. Si la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, se denomina cromatografía en fase inversa.

- Cromatografía de intercambio iónico: la fase estacionaria es un sólido que lleva anclado grupos funcionales fijos ionizables, cuya carga esta contrabalanceada por iones que se pueden intercambiar por aquellos presentes en la fase móvil.

En función del tipo de soporte empleado para la fase estacionaria, se puede establecer otra clasificación:

- Cromatografía en columna: el adsorbente se deposita en el interior de una columna de vidrio.
- Cromatografía en capa fina: una capa de adsorbente de espesor uniforme se deposita sobre una capa de vidrio, aluminio o plástico.

3.5.1. CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.

Es el método más general para la separación y purificación de compuestos orgánicos, sólidos o líquidos, a escala preparativa.

La fase estacionaria (adsorbente) se deposita en el interior de una columna de vidrio que termina en un estrechamiento con una llave, y se impregna con una 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 elución generalmente es necesario incrementar la polaridad del disolvente.

El tiempo necesario para eluir un compuesto de la columna recibe el nombre de tiempo de retención. Es característico para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, diámetro de la columna, presión, etc.).

El adsorbente mas utilizado para cromatografía en columna, es la gel de sílice.

La elución de la cromatografía puede realizarse por gravedad o a media presión (flash chromatography). En este último caso se conecta la cabeza de la columna a un compresor de media presión o a una línea de aire comprimido.

El tamaño de partícula del gel de sílice para cromatografía a media presión es más pequeño que el que se utiliza para cromatografía por gravedad. Si en gravedad se empleara gel de sílice de tamaño de partícula más pequeño, la elución no se produciría ya que se impediría el flujo del disolvente. Sin embargo, si se aplica presión, se fuerza al disolvente a eluir.⁽²⁷⁾

Procedimiento Experimental

Procedimiento experimental para llevar a cabo una cromatografía en columna, por gravedad.

- Preparación de la columna por gravedad:

- a) Elegir una columna del diámetro adecuado a la muestra que se pretende separar (cantidad de muestra).

- b) Sujetar la columna a un soporte utilizando dos pinzas: una deberá sujetar la columna cerca de la llave y otra en la parte de arriba, fuera de la zona en que la columna este rellena. De este modo, si la columna se rompiera accidentalmente en la zona del contacto con las pinzas, seria más fácil la recuperación de su contenido.
- c) Si la columna no lleva una placa porosa en su parte inferior para impedir el paso del adsorbente, colocar en el estrechamiento una pequeña cantidad de lana de vidrio. La cantidad de lana de vidrio debe ser la mínima posible para retener la fase estacionaria sin dificultar el paso del disolvente.
- d) Preparación de la columna: Un procedimiento consiste en llenar la columna de disolvente y añadir después el adsorbente dejando que este se deposite por gravedad, al mismo tiempo que se golpea suavemente la columna con la mano. Una vez que el adsorbente empieza a depositarse en el fondo, se abre la llave para que salga el disolvente. Otro método implica la preparación de una suspensión con el adsorbente y el disolvente. Se añade un poco de disolvente a la columna y se vierte la suspensión en el interior de esta. La columna se golpea ligeramente con la mano para compactar el adsorbente sin formación de burbujas, a la vez que se abre la llave para permitir la salida del disolvente. En ambos casos, después de compactar se añaden 1-2 cm de lana de vidrio para proteger el frente del adsorbente.

En la cromatografía de columna por gravedad, la superficie superior del adsorbente (frente) y la franja de lana de vidrio deben quedar completamente horizontales. Una vez que el adsorbente se ha compactado, el disolvente debe quedar a la altura del nivel de la lana de vidrio. El adsorbente no debe secarse nunca, ya que daría lugar a la aparición de grietas y burbujas de aire.

- Sembrado de la mezcla a separar:

- a) Disolver la mezcla a separar (sólida o líquida) en la mínima cantidad del mismo disolvente en el que se va empezar la elución o en uno de polaridad menor. Si la muestra resultara insoluble en dichas condiciones, el sembrado se realiza adsorbiendo la muestra en el adsorbente (silica gel) antes de introducirlo en la columna. Para ello, se disuelve la muestra en un disolvente más polar y se añade una cantidad de adsorbente proporcional a la cantidad de muestra. El disolvente de la mezcla se elimina con cuidado en el rota evaporador, ya que al contener un sólido, las posibilidades de proyección de la mezcla al tubo de rota evaporador son grandes. Una vez que el disolvente se a eliminado, tiene que obtenerse una mezcla homogénea, pulverulenta y exenta de disolvente, que se incorpora a la columna utilizando un embudo de sólidos (preparación de la cabeza).
- b) Depositar con una pipeta la disolución sobre la lana de vidrio. Si esta operación se realiza con una pipeta Pasteur, mas corta, la disolución debe

dejarse resbalar por las paredes de la columna. En ambos casos, se debe conseguir una franja horizontal uniforme.

- c) Abrir la llave para que la disolución quede inmersa en la lana de vidrio.
- d) Cerrar la llave y añadir con pipeta una pequeña cantidad de disolvente para lavar el recipiente en el que se encontraba la disolución y la pared interior de la columna. Si es necesario repetir esta operación un par de veces. La adición debe realizarse con cuidado para no modificar el frente horizontal.
- e) Abrir la llave para introducir en la lana de vidrio el producto recogido hasta que el disolvente quede al nivel de la lana de vidrio.

- Elución de Fracciones:

- a) Añadir el disolvente con cuidado por la pared de la columna, para no modificar la horizontalidad del frente hasta llenarla.
- b) Los componentes de la mezcla a separar deben fluirse manteniendo un flujo continuo de disolvente.
- c) El volumen inicial de disolvente que se recoge, que corresponde al volumen muerto de la columna, no contendrá ningún producto y puede despreciarse. Después se utilizan erlenmeyers, tubos de ensayo, viales o balones para recoger fracciones en pequeños volúmenes.
- d) El adsorbente nunca debe secarse.
- e) Los componentes de la mezcla elúyen en orden de polaridad creciente.

3.6 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 varios organismos (especies vegetales, organismos marinos, etc.). Estos extractos son probados frente a diferentes actividades biológicas (antimicrobiana, citotóxica, inhibidora de enzimas, 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 tanto ser monitoreado por pruebas de todas las fracciones aisladas para la determinación de la actividad. Solo las fracciones que den un resultado positivo en la prueba estarán sujetas a más pasos de separación y eventualmente la actividad pura de los compuestos será obtenida. Este proceso es llamado **FRACCIONAMIENTO BIO-GUIADO**. Como se tiene un gran número de fracciones para ser probadas, el método de prueba usado debe ser fácil de llevar a cabo y la cantidad de sustancia requerida para la prueba debe ser pequeña.

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 prueba farmacológico escogido. ⁽⁴¹⁾

3.7 GENERALIDADES DE LAS CEPAS SOMETIDAS A BIOENSAYO

3.7.1. *Staphylococcus aureus*

Morfología y fisiología. Células esféricas de 1µm de diámetro, aparecen como masas de células arracimadas, aunque se encuentran como células aisladas, en parejas y tétradas, los estafilococos jóvenes son gram positivos, sin embargo al envejecer, muchas células se vuelven gram negativas, son no móviles, no forman esporas. Los estafilococos crecen bajo condiciones aeróbicas o microaerófilas y con mayor rapidez a 37 °C, pero su pigmentaciones apreciable a temperaturas entre 20-25 °C. Las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. La pigmentación de las colonias en agar Chapman va desde el amarillo al amarillo dorado intenso. Cuando se cultivan en agar sangre la mayoría de las colonias de ***Staphylococcus aureus***, aparecen redondas con una zona de β-hemólisis. (15)

Son microorganismos relativamente resistentes a la desecación, a ciertos desinfectantes, al calor y al cloruro de sodio 9%. Son sensibles a las actividades bacteriostáticas del trifenilmetano y otros colorantes, además a los antibióticos. Los estafilococos producen catalasa, lo que los distingue de los estreptococos. Tienen la particularidad de fermentar con lentitud muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas y su actividad proteolítica varía de una cepa a otra. (37)

El ***Staphylococcus aureus*** es la única especie que tiene la capacidad y poder enzimático de coagular el plasma oxalatado, en presencia de un factor

contenido en muchos sueros; esto se asocia con la formación de la toxina hemolítica que tiene alto grado de virulencia, se encuentra como microorganismo de vida libre en el ambiente y vías respiratorias. En los hospitales las zonas de mayor riesgo de infecciones estafilococcicas graves son las salas de cuna de recién nacidos, unidad de cuidados intensivos, salas de operaciones y las salas de quimioterapia del cáncer. ⁽¹⁵⁾

Los estafilococos producen enzimas como: catalasa, coagulasa, hemolisinas, toxinas como: leucocidinas, exfoliativa, la del síndrome del choque tóxico y enterotoxinas (de la A a la F) producidas por casi el 50% de las cepas de ***Staphylococcus aureus***, responsables del envenenamiento con alimentos.

Los estafilococos son patógenos oportunistas, habitualmente las infecciones producidas por estafilococos son cutáneas. El prototipo de infección estafilocócica es el furúnculo o cualquier absceso localizado. Entre las enfermedades más comunes producidas por ***Staphylococcus aureus*** son: Neumonía estafilocócica, síndrome de la piel escaldada, síndrome de shock toxico y otras enfermedades respiratorias. ⁽¹²⁾

3.7.2. *Streptococcus pneumoniae*

Morfología y fisiología: son diplococos típicos gram positivos, lanceolados o se presentan en cadena de tres o mas células individuales, esféricas, de 0.5 a 1.0 μm de diámetro. ⁽²³⁾

La hemólisis en agar sangre es de importancia considerable en la subdivisión del género de estreptococos. Los estreptococos que producen estreptolisina “o” o “s” (toxinas) producen una gran zona de hemólisis completa de células sanguíneas rojas por lo que se conocen como estreptococos β -hemolíticos; por otra parte los estreptococos que no producen hemólisis, originan una zona verde café alrededor de sus colonias, la cual se debe no a hemólisis verdadera sino a decoloración y pérdida de potasio de las células rojas; estos pertenecen a los estreptococos α -hemolíticos. (3) El ***Streptococcus pneumoniae*** forma una pequeña colonia redonda, traslúcida, mucoide, al principio en forma de domo y después desarrollan una placa central con un reborde elevado; son hemolíticos α sobre agar sangre y su crecimiento aumenta con 5 a 10% de CO₂.(23)

Muchos estreptococos son miembros de la flora normal del cuerpo humano. Solo producen enfermedad cuando se establecen en regiones del cuerpo donde no se encuentra normalmente; por ejemplo los neumococos son habitantes normales de las vías respiratorias superiores del humano y pueden causar neumonía, sinusitis, otitis, bronquitis, bacteriemia, meningitis y otros procesos infecciosos. Los alcohólicos y las personas mayores con enfermedad debilitante son especialmente susceptibles. Sin embargo la sensibilidad de los neumococos a los derivados de la penicilina hace posible una rápida curación para la mayoría de los casos de infecciones neumocócicas. (23)

3.7.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Morfología y fisiología. Las células de *Pseudomonas aeruginosa* varían considerablemente de tamaño y proporciones, pero generalmente aparecen como bastoncitos delgados, pequeños, de 1.5 a 3 μm de largo y 0.5 μm de ancho frecuentemente unidos a pares y en cadena corta. Son flagelos polares únicos por que la bacteria tiene movimientos muy activos, no forma cápsulas ni esporas. Las esporas son grandes y diseminadas, de bordes irregulares y consistencia grasosa.

Pseudomonas aeruginosa se desarrolla fácilmente en todos los medios de cultivo ordinarios, mas rápidamente a temperatura de 30 a 37 °C, requiere condiciones aerobias.

Su capacidad fermentativa es limitada; produce ácido a partir de glucosa, pero no ataca otros carbohidratos. En leche tornasolada produce reacción alcalina; forma un coagulo blando, seguido de peptonización rápida y reducción del indicador.

Una de las características mas especiales de *Pseudomonas aeruginosa* es la producción de pigmento soluble, verde azulado que no tiñe las colonias u otras masas en desarrollo, sino que se difunde en el medio. Algunas cepas tienen actividad hemolítica. Entre los pigmentos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* están la piocianina, una sustancia azulosa soluble en agua y en

cloroformo, que posee cierta actividad antimicrobiana, y la fluoresceína una sustancia verdosa, fluorescente, hidrosoluble, insoluble en cloroformo.

En el ser humano la bacteria se encuentra implicada en una amplia variedad de afecciones supurativas y de otra naturaleza. Se encuentra en cultivo puro de abscesos de diferentes partes del cuerpo, especialmente el oído medio.

También ocurre en caso de endocarditis, neumonía y meningitis, aun que raros, y en los cuales la ***Pseudomona aeruginosa*** parece ser el único microorganismo casual.

Pueden producirse infecciones después de cirugía y tiene importancia especial en infección de quemaduras, donde tales infecciones son la causa mas frecuente de muerte. Las infecciones por *Pseudomona* son difíciles de tratar, por la resistencia de los microorganismos a los antibióticos. (15)

3.8 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA

Probablemente la técnica de ensayo más ampliamente utilizada, aunque no necesariamente la mejor, es el método de **difusión en agar**, también conocido como método de **Kirby-Bauer**, aquí se usan discos de papel filtro en envase poroso, que contiene cantidades medidas del fármaco, no así en el método de **Kirby-Bauer Modificado** donde se da la utilización de cilindros de acero inoxidable sin fondo donde es colocada la solución de prueba; luego se coloca ya sea el disco o el cilindro sobre un medio sólido sembrado con abundantes microorganismos de prueba. Después de incubación, el diámetro de la zona clara de inhibición que rodea el fármaco depositado se toma como medida de la potencia inhibidora del fármaco contra el microorganismo en particular de prueba.

Este método está sujeto a la influencia de muchos factores físicos y químicos además de la simple interacción entre el fármaco y el microorganismo (por ejemplo, la naturaleza del medio y la del fármaco). No obstante, la estandarización de las condiciones permite efectuar una prueba cuantitativa de la potencia del fármaco o de la susceptibilidad del microorganismo.

El empleo de un solo disco para cada antibiótico y la estandarización cuidadosa de las condiciones de la prueba permiten conocer la susceptibilidad o la resistencia de un microorganismo al comparar la magnitud de la zona de inhibición contra un estándar del mismo fármaco (método de Kirby-Bauer).

La inhibición alrededor de un disco que contiene una cierta cantidad de antimicrobiano no implica la susceptibilidad a esa misma concentración del fármaco por mililitro de medio, sangre u orina.

La prueba en disco mide la capacidad del fármaco para inhibir el crecimiento de la bacteria. Los resultados se correlacionan de manera razonablemente bien con la respuesta terapéutica en aquellos procesos patológicos donde las defensas del cuerpo pueden con frecuencia, eliminar microorganismos infecciosos. (22)

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio

La presente investigación es un tipo de estudio retrospectivo, prospectivo y experimental, debido a que 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 *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro del extracto diclorometánico de la goma resina de ***Eucalyptus citriodora*** posee actividad antimicrobiana contra ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***.

La investigación se dividió en tres etapas:

- Investigación Bibliográfica
- Metodología de Campo
- Metodología de laboratorio

4.2 Investigación Bibliográfica:

- Consultas de libros, trabajos de graduación, manuales, etc. en la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador (UES) y Universidad Nueva San Salvador (UNSA).
- Revistas científicas
- Scifinder scholar (base de datos mundial)

4.3 Metodología de Campo

La recolección de la goma-resina del árbol de *Eucalyptus citriodora* se realizó en el Campus Universitario, en la zona del parqueo de la Facultad de Química y Farmacia y la Facultad de Ciencias Agronómicas durante la época seca. La muestra se recolectó en frascos de vidrio color ámbar con tapadera de metal y se almacenó en un lugar fresco y seco, (fig. № 11).

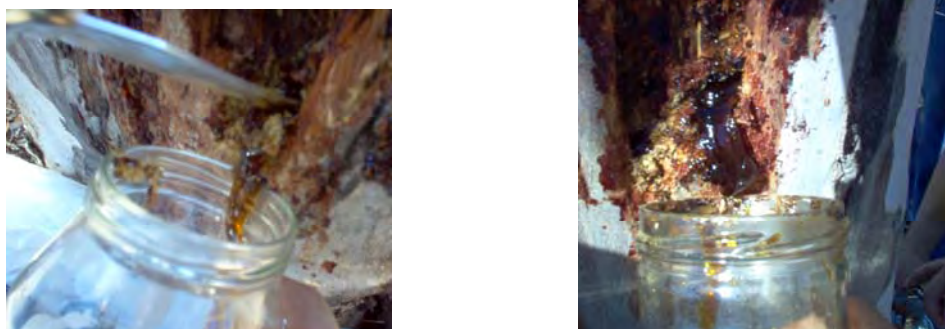


Figura №. 11 Recolección de goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

4.4 Metodología de laboratorio

4.4.1 CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA

Se determinaron las características organolépticas de la goma-resina: color, olor, sabor y consistencia.

4.4.2 PARTE FITOQUÍMICA

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

La muestra de la goma-resina seca o cristalizada se pulverizó en un mortero, luego se pesaron 2000g. de la muestra, y se realizó la extracción con etanol al 95% en un Soxhlet (anexo № 2). Se concentró el extracto etanólico por medio del rota evaporador (anexo № 2).

4.4.2.2 Obtención del extracto diclorometánico.

A partir del extracto etanólico, se realizó posteriormente la partición líquido-líquido agua/diclorometano, obteniendo así el extracto diclorometánico.

4.4.2.3 Cromatografía de columna

Procedimiento

Se utilizó una columna cromatográfica de vidrio de un diámetro adecuado a la cantidad de muestra, si la columna no lleva una placa porosa en su parte inferior para impedir el paso del adsorbente, se debe colocar en el estrechamiento una pequeña cantidad de lana de vidrio. La cantidad de lana de vidrio debe ser la mínima posible para retener la fase estacionaria sin dificultar el paso del disolvente.

Preparación de la columna

Cromatografía a media presión (Cromatografía Flash): consiste en añadir un poco de *n*-hexano a la columna y se vierte una suspensión de adsorbente y

disolvente en el interior de esta. La columna se golpea ligeramente con la mano para compactar el adsorbente sin formación de burbujas, a la vez que se abre la llave para permitir la salida del disolvente. Después de compactar se añaden 1-2 cm de lana de vidrio para proteger el frente del adsorbente. Se conecta la cabeza de la columna a un compresor de aire, asegurándola con una pinza clip, y hacer pasar el disolvente a través de la gel de sílice para que se compacte.

La superficie superior del adsorbente (frente) y la franja de lana de vidrio deben quedar completamente horizontales. Una vez que el adsorbente se ha compactado, el disolvente debe quedar a la altura del nivel de la lana de vidrio. El adsorbente no debe secarse nunca, ya que daría lugar a la aparición de grietas y burbujas de aire.



Figura Nº 12 Empacado de la columna de cromatografía.

- Sembrado de la muestra (extracto diclorometánico) a separar.

El sembrado se realizó adsorbiendo la muestra en el adsorbente (silica gel) antes de introducirlo en la columna. Para ello, se disolvió la muestra en un disolvente más polar (Ej. acetona, diclorometano, etc.), y se añadió una cantidad de adsorbente proporcional a la cantidad de muestra. El disolvente de la mezcla se elimina con cuidado en el rota evaporador, ya que al contener un sólido, las posibilidades de proyección de la mezcla al tubo de rota evaporador son grandes. Una vez que el disolvente se ha eliminado, tiene que obtenerse una mezcla homogénea, pulverulenta y exenta de disolvente, que se incorpora a la columna utilizando un embudo de sólidos (preparación de la cabeza), (fig. Nº 13).



Figura Nº 13 Preparación de la cabeza de la columna.

- Elución de las fracciones:

Añadir 500 ml de *n*-hexano con cuidado por la pared de la columna, para no modificar la horizontalidad del frente hasta llenarla.

El volumen inicial de disolvente que se recoge, que corresponde al volumen muerto de la columna, no contendrá ningún producto y puede despreciarse.

Luego adicionar la mezcla de solventes de la siguiente forma:

1. *n*-hexano : acetato de etilo 10%
2. *n*-hexano: acetato de etilo 30%
3. *n*-hexano:acetato de etilo 50%
4. *n*-hexano:acetato de etilo 70%
5. Acetato de etilo puro

Adicionar metanol puro para lavar la columna.

Las fracciones que se examinaron por medio de ensayos microbiológicos fueron: *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro.

- Preparación de las diluciones de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

Se partió de la obtención de una solución madre, esta se realizó basándonos en la tesis de Méndez R. y otros. 2006. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Preparación de la solución madre: Se pesaron en una balanza analítica exactamente 750 mg de cada una de las fracciones y se diluyeron en etanol al 70% hasta llevar a volumen cada una de las fracciones en un balón volumétrico de 25 mL, luego se homogeniza la solución y para el resto de las diluciones que se elaboraron, se realizaron utilizando pipetas volumétricas, tomando una determinada alícuota y llevando a volumen en balones volumétricos. Luego se homogeniza la solución y así sucesivamente para cada una de las diluciones. (anexo № 5)

4.4.3 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS.

4.4.3.1 Pruebas de identificación microbiológica.

A los microorganismos se les realizaron tres clases de pruebas:

- Características Macroscópicas
- Características Microscópicas
- Pruebas de Identificación

Características macroscópicas.

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

Cuadro № 8 Características macroscópicas

MICROORGANISMOS	MEDIO DE CULTIVO	COLONIAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Chapman	Colonias de color amarillo dorado.
	Agar Baird Parker	Colonias de color negro lustroso, redondas de borde convexo.
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Agar Cetrimide	Colonias grandes, diseminadas con pigmento verde azulado.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Agar Sangre	Colonias transparentes, pequeñas, redondas, con el tiempo desarrollan una depresión central, una α -hemólisis rodea casi siempre a las colonias.

Características Microscópicas. (anexos № 6,7)

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

Pruebas de Identificación. (anexo № 9, 10, 11)

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

Cuadro № 9 Pruebas de Identificación Microbiológica.

MICROORGANISMO	PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN
<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, Oxidasa.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Discos de Optoquin

Para conservar las cepas, se hicieron resiembras semanales en placas conteniendo Tripticasa soya agar (TSA), a excepción del ***Streptococcus pneumoniae***, que se resembró en Agar Sangre y se conservó en leche descremada a -5 °C. Y las otras cepas se mantuvieron en refrigeración a menos de 30 °C, además de conservarse en caldo BHI.

4.4.3.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

Método Cilindro Placa

(Método de Kirby Bauer Modificado)

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

Preparación de la suspensión de microorganismos.

Del cultivo de ***Pseudomona*** mantenido en la placa de agar TSA: se transfiere cierto número de colonias a un tubo de ensayo utilizando un asa bacteriológica.

El tubo contiene 10 mL de solución salina isotónica estéril 0.85%. Este procedimiento se repetirá hasta que se obtenga una turbidez equivalente al estándar Mc Farland de 0.5%, el cual se preparara así 0.05ml de BaCl₂ + 9.95 mL de H₂SO₄. Obteniéndose una densidad celular aproximada de 1.5 x10⁸

microorganismos/mL (MO/mL). De igual manera se realizó para ***Staphylococcus aureus*** y ***Streptococcus pneumoniae***. (anexo № 12)

Inoculación de las placas

Por el método del extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalentes a 1.5×10^8 MO/mL se inocula uniformemente la superficie del medio Agar Muller Hinton para ***Pseudomona aeruginosa***, y ***Staphylococcus aureus***. Para el ***Streptococcus pneumoniae*** el medio Agar Muller 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 microorganismos durante 10 minutos a temperatura ambiente, en condiciones estériles.

Inoculación con la solución de prueba.

Se colocan sobre la superficie del medio inoculado cuatro cilindros de acero inoxidable, a intervalos de 90° entre cada uno; luego se llena con una micropipeta con la solución de prueba y se incuba a 37°C por 24 y 48 horas. Los diámetros de inhibición: se miden con un pie de rey. Las pruebas se hicieron por duplicado para cada una de las diluciones de cada fracción, se colocaran discos de gentamicina para ***Pseudomona aeruginosa***, de ampicilina, para ***Streptococcus pneumoniae*** y penicilina para ***Staphylococcus aureus***, los cuales sirven como parámetro de comparación de la eficacia de cada

fracción. Además de los parámetros antes mencionados; se llevaron dos placas como blanco una que contenía en los cilindros únicamente etanol y otra con yodo al 2% en presencia del microorganismo inoculado.

Ver procedimiento y esquema del Método de Kirby Bauer Modificado (anexo №13)

Cuadro № 10 Parámetros de referencia de los halos de inhibición. (5)

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

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

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

Una vez obtenido el extracto diclorometánico de la goma-resina por medio de la partición líquido-líquido agua/diclorometano, se determinaron las características organolépticas prácticas como son color olor y consistencia.

Cuadro Nº 11 Características organolépticas de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*.

PARAMETROS	CARACTERÍSTICAS
Color	Amarillo
Olor	Agradable
Consistencia	Sólido

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

Se realizaron cuatro extracciones con etanol al 95% a partir de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*.

Cantidad de muestra = 2,102.8 gramos

Cantidad de extracto etanólico obtenido = 2,097.4 gramos

Porcentaje de rendimiento =

$$\begin{array}{r} 2,102.8 \text{ g} \text{ -----} 2,097.4 \text{ g} \\ 100 \text{ g} \text{ -----} \quad \times \\ X = 99.74 \% \end{array}$$

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

Cantidad de extracto etanólico = 2,097.4 g

Cantidad de extracto diclorometánico obtenido = 158.1 g

Porcentaje de rendimiento =

$$\begin{array}{r} 2,097.4 \text{ g} \text{ -----} 158.1 \text{ g} \\ 100 \text{ g} \text{ -----} \quad \times \\ X = 7.53 \% \end{array}$$

Cantidad de extracto diclorometánico utilizado= 94.6 g

Cantidad obtenida de fracción al 70 %= 5.91g

Cantidad obtenida de fracción de acetato de etilo puro= 28.23 g

Cantidad obtenida de fracción de metanol puro= 2.45 g

Resultados del Análisis Espectroscópico realizado por medio de RMN-¹H a las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro procedentes de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto)

Análisis y discusión del espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70% (CD₃COCD₃, 300 MHz).

Del extracto diclorometánico de la goma-resina, se obtuvieron los siguientes resultados: señales a $\delta_{\text{H}} = 12.75, 12.74, 12.67, 12.53, 12.52, 12.51, 12.49, 12.17, 12.14, 12.03, 11.99, 11.84$ y 11.67 ppm; todas como singulete ancho (s.a), que corresponden a protones quelatados, los cuales se producen entre el OH de la posición 5 y el grupo carbonilo de la posición 4 de los flavonoides;⁽²⁵⁾ lo que nos indica la posibilidad de al menos 13 diferentes flavonoides.(fig. Nº 15).

Además se observó en la región 6.7 a 7.5 ppm, cuatro señales típicas de un sistema *p*-hidroxi, presentes en las estructuras de los flavonoides, se aprecian también en esta zona señales de protones aromáticos.

Se observa otra señal a $\delta_{\text{H}} = 5.1$ ppm (d, $J = 11.61$ Hz) que corresponde al protón bencílico de los flavonoides, también se aprecia una señal a $\delta_{\text{H}} = 4.6$ ppm (d, $J = 10.90$ Hz) correspondiente a H-3 geminal al OH de los flavonoles; que es característico en esta zona del espectro de protón. ⁽²⁵⁾ (fig. Nº 16).

A $\delta_{\text{H}} = 7.86$ ppm, aparece un singlete correspondiente a H-2 de isoflavonas, ⁽²⁵⁾ (fig. Nº 17); una señal a $\delta_{\text{H}} = 6.1$ ppm (d, $J = 13.6$ Hz) correspondiente al H-3 vinílico de una chalcona, ⁽²⁵⁾ (fig. Nº 18). La señal de H-2 se encuentra solapada entorno a 7.5 ppm.

A $\delta_{\text{H}} = 6.3$ a 6.5 ppm aparecen dos dobletes ($J = 15.9$ Hz) los cuales indican un sistema *trans* de protones vinílicos, las que corresponden al H-8 de dos posibles ácidos fenólicos. Las señales del H-7 se encuentran ocultas en la región de los protones aromáticos. ^(19, 25) (fig. Nº 19).

Aparecen señales singletes entre 3.77 y 3.8 ppm que son características de protones de grupos metoxilos los cuales son frecuentes en flavonoides y ácidos fenólicos. ⁽¹⁹⁾

Observamos señales correspondientes a metabolitos secundarios no caracterizados en la región de 1 a 2 ppm (d, $\delta_{\text{H}} = 1.6$ ppm, $J = 7.2$ Hz; t $\delta_{\text{H}} = 1.5$ ppm; s a, $\delta_{\text{H}} = 2.1$ ppm y m, $\delta_{\text{H}} = 1.2$ ppm); (fig Nº 19).

Los datos de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70% se resumen en el cuadro Nº 12.

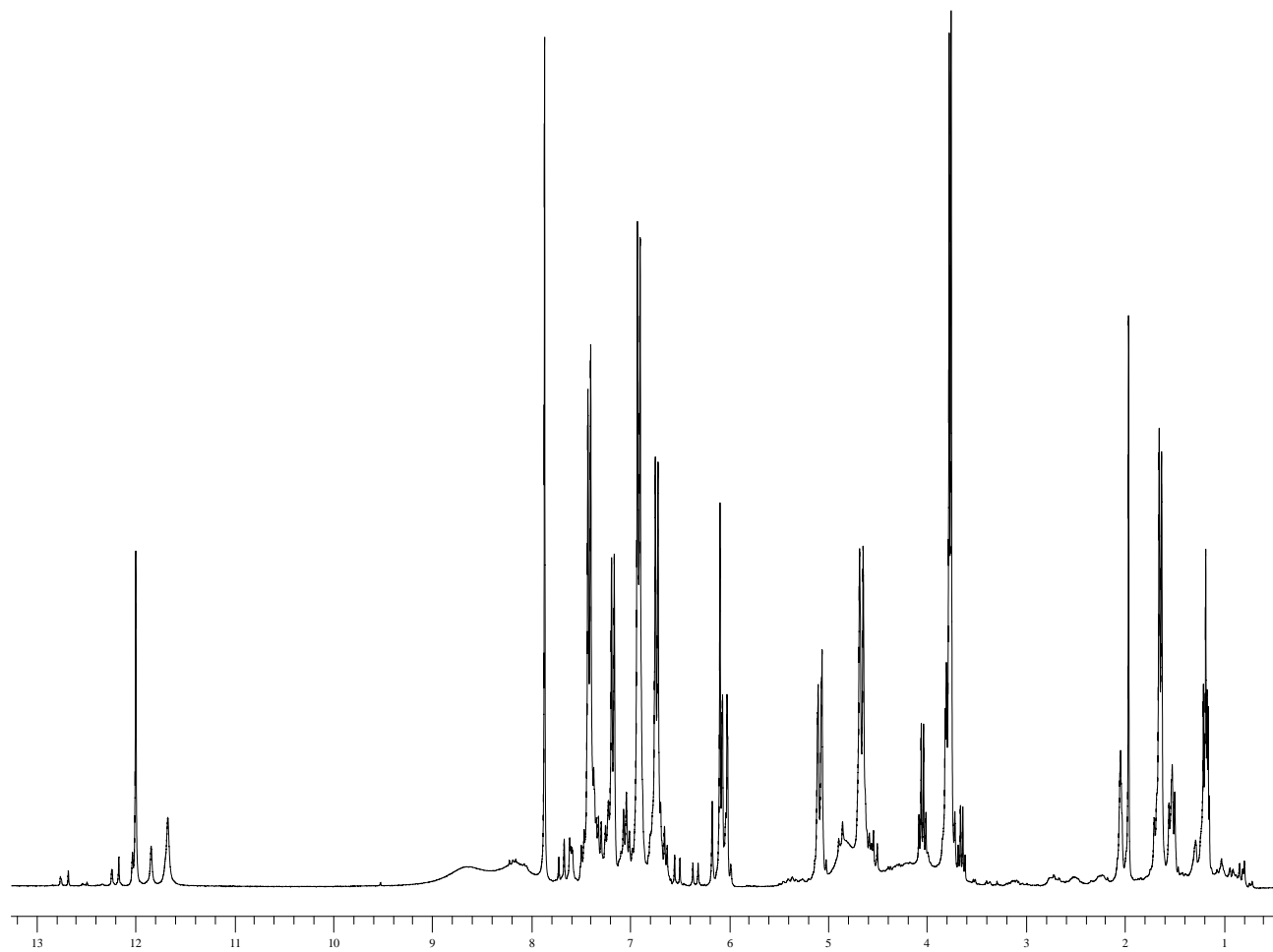


Figura № 14: Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%
(CD₃COCD₃, 300 MHz)

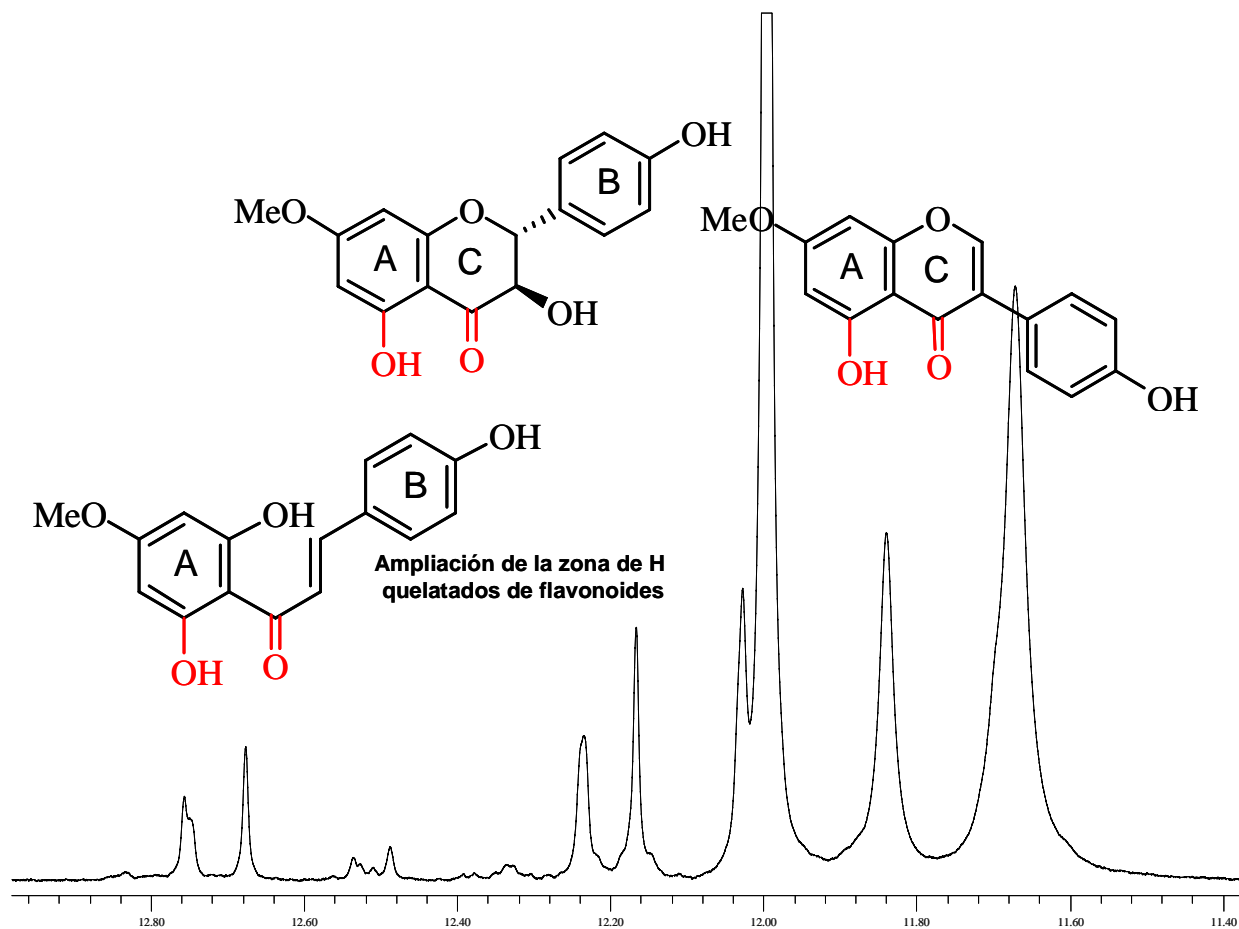


Figura № 15: Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70 % (CD₃COCD₃, 300 MHz). En esta ampliación de espectro apreciamos señales de protones quelatados, que se producen entre el OH y el grupo carbonilo de los flavonoides (rojo).

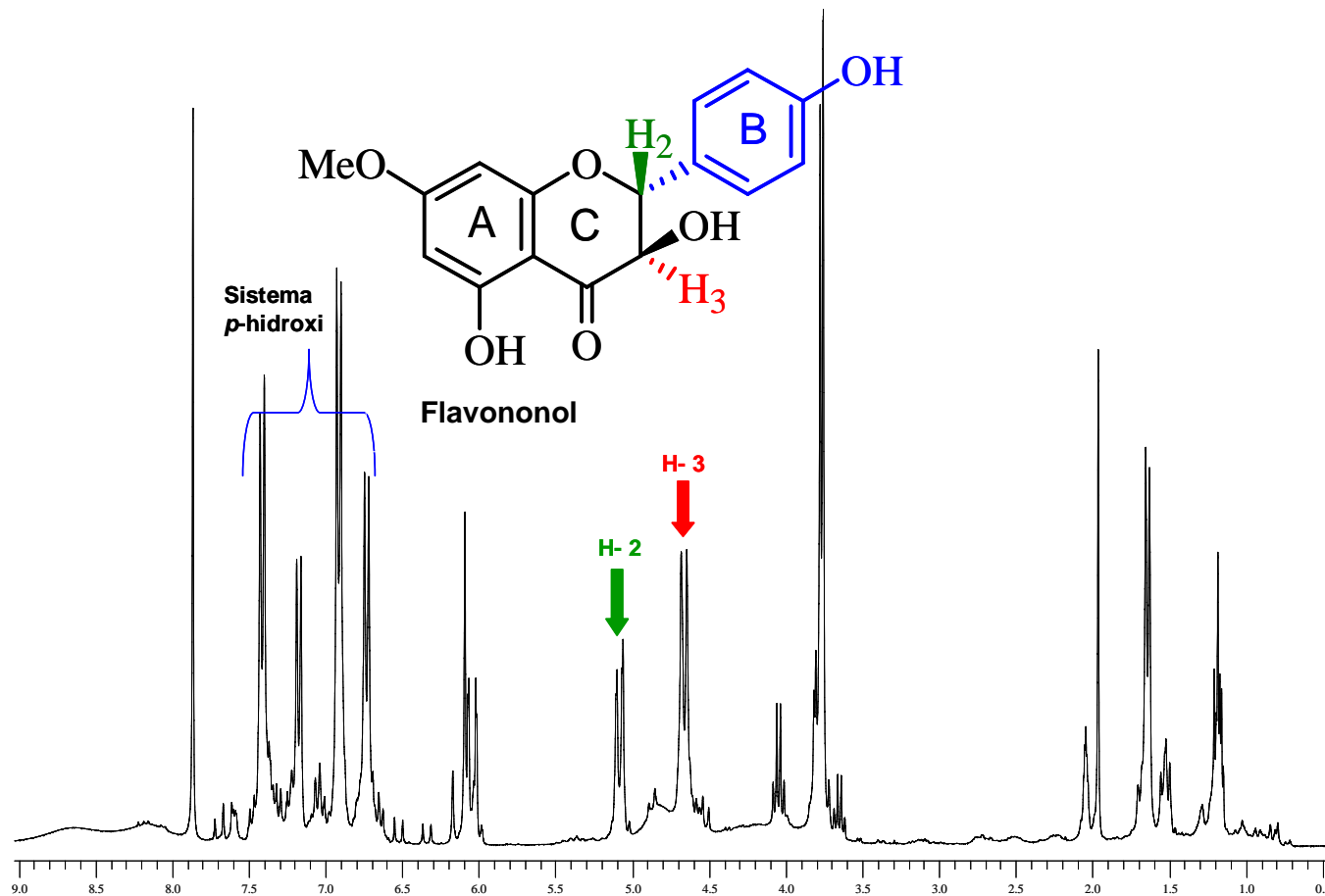


Figura № 16: Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70 % (CD₃COCD₃, 300 MHz). En la región 6.7 a 7.5 ppm se observan cuatro señales típicas de un sistema *p*-hidroxi, presentes en las estructuras de los flavonoides (azul). El protón bencílico (verde) aparece a δ_H= 5.1 ppm y el H-3 de los flavonoles (rojo) a δ_H= 4.6 ppm.

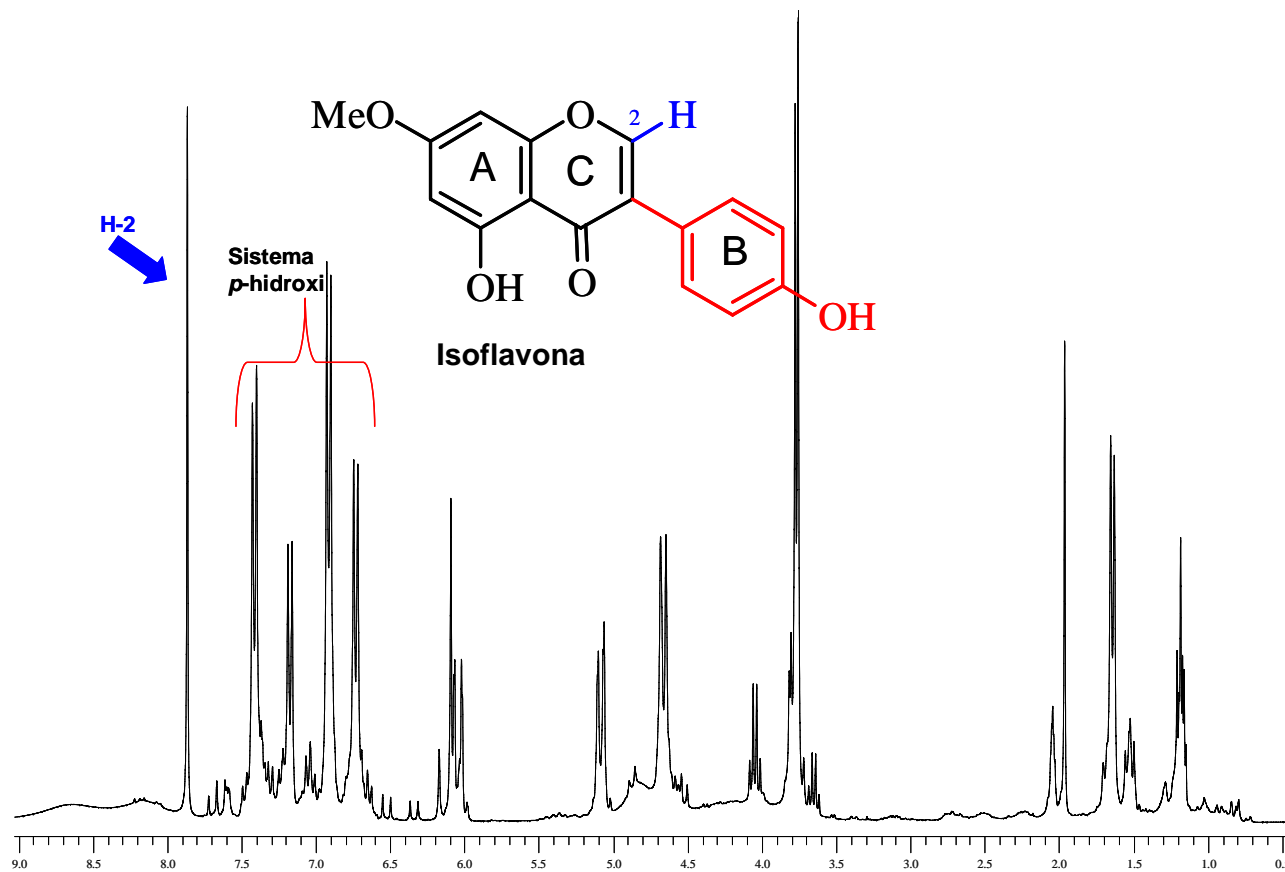


Figura № 17: Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70 % (CD₃COCD₃, 300 MHz).
 A δ_H= 7.86 ppm, aparece un singlete correspondiente a H-2 de isoflavonas (azul).

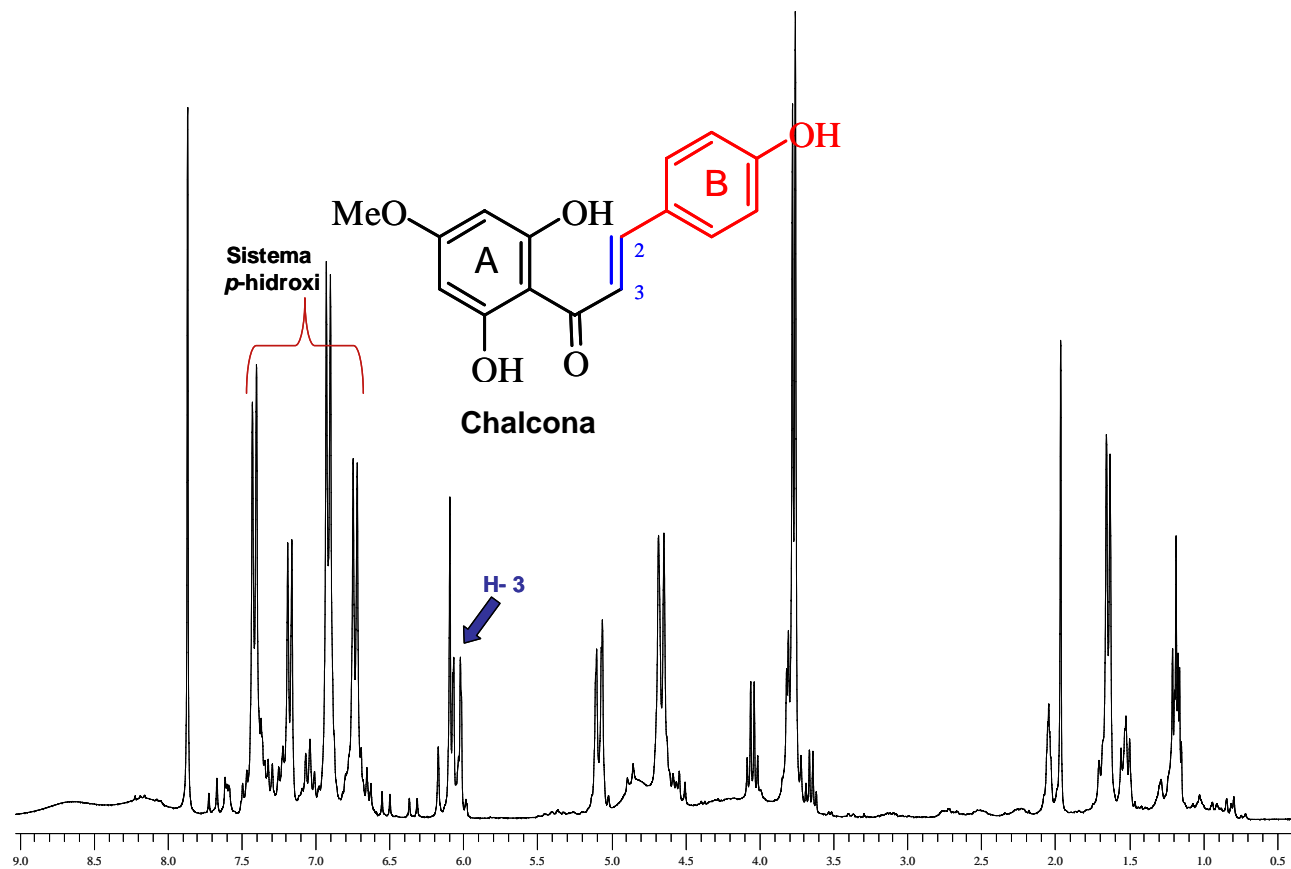


Figura № 18: Espectro de RMN- ^1H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70 % (CD_3COCD_3 , 300 MHz). Señal a $\delta_{\text{H}} = 6.1$ ppm (d, $J = 13.6$ Hz) correspondiente al H-3 vinílico de una chalcona (azul). La señal de H-2 se encuentra solapada entorno a 7.5 ppm.

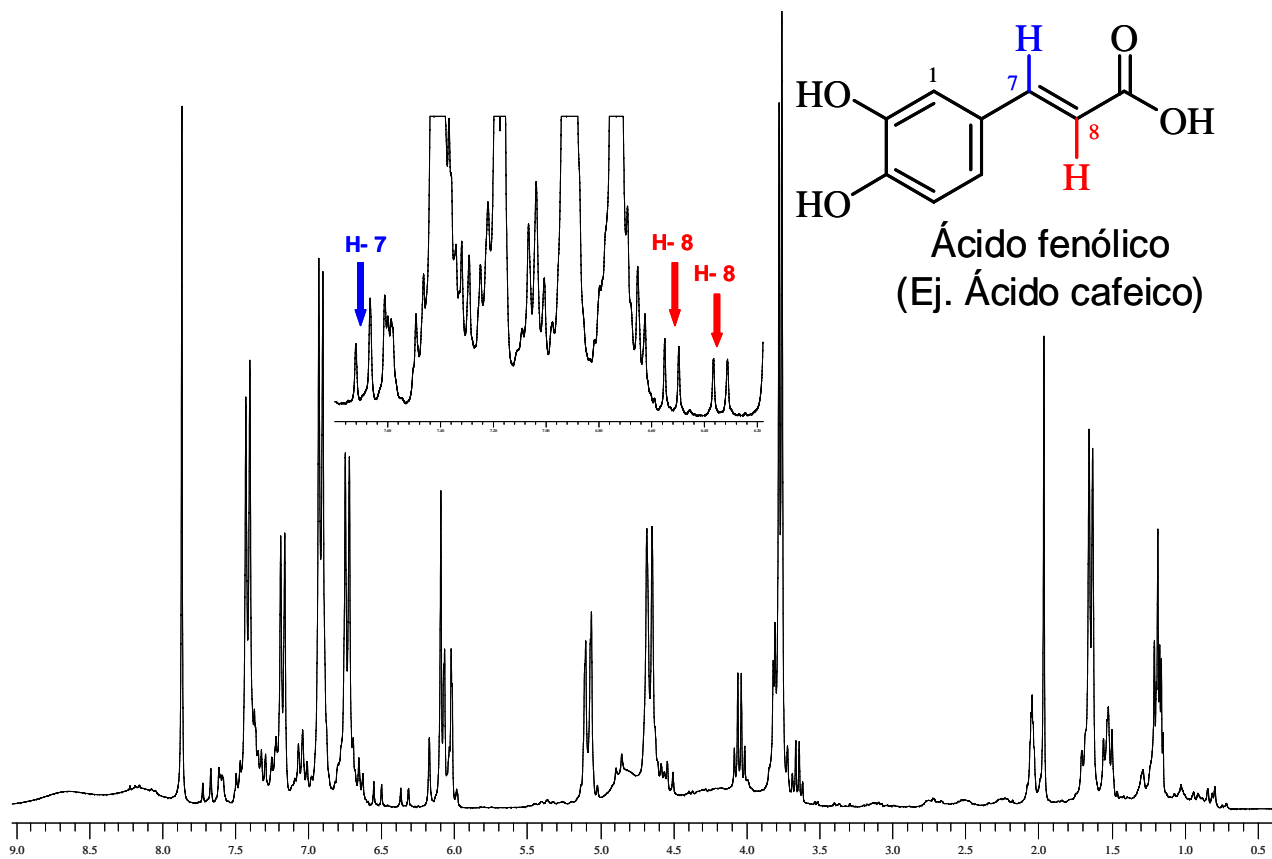


Figura № 19: Espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70 % (CD₃COCD₃, 300 MHz). A δ_H= 6.3 a 6.5 ppm aparecen dos dobletes (*J* = 15.9 Hz) los cuales indican un sistema *trans* de protones vinílicos, las que corresponden al H-8 de dos posibles ácidos fenólicos. Las señales del H-7 se encuentran ocultas en la región de los protones aromáticos.

Cuadro Nº 12 Datos de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70% (CD₃COCD₃, 300 MHz).

δ_H ppm	<i>J</i> (Hz)	Tipo de protón. Metabolito secundario
12.75, 12.74, 12.67, 12.53, 12.52, 12.51, 12.49, 12.17, 12.14, 12.03, 11.99, 11.84, 11.67	–	H quelatados de flavonoides
6.7-7.5	–	H de sistema <i>p</i> -hidroxi
7.86 s	–	H-2 de isoflavonoides
6.50 d	15.9	H-8 vinílico <i>trans</i> de ácidos fenolicos
6.30 d	15.9	H-8 de ácido fenólico
6.10 d	13.6	H-2 de una chalcona
5.10 d	11.61	H-2 protón bencilico de flavonoides
4.60 d	10.89	H-3 geminal al OH de los flavononoles
3.80 s	–	H de metoxilos
2.10 sa	–	Señal de sustancia desconocida
1.60 d	7.2	Señal de sustancia desconocida
1.50 t	7.7	Señal de sustancia desconocida
1.20 m	–	Señal de sustancia desconocida

Análisis y discusión del espectro de RMN-¹H de la fracción acetato de etilo puro (CD₃COCD₃, 300 MHz).

En el espectro de RMN-¹H de la fracción acetato de etilo puro, se observó entre 7.4 a 7.7 ppm un sistema *p*-hidroxi típico de los flavonoides (fig. № 20), además aparecen pequeñas señales de protones aromáticos.

De acuerdo a las publicaciones consultadas, el o los glicósidos se encuentran presentes en la posición 5 de la estructura de los flavonoides, de esta manera se justifica la no aparición de señales de protones quelatados en el espectro de RMN-¹H.⁽⁷⁾

Se observó un doblete a $\delta_H = 6.88$ ppm ($J = 8.7$ Hz) perteneciente a un protón en posición *orto* de flavonoides o de ácidos fenólicos; otra señal singulete a $\delta_H = 7.99$ ppm, que pertenece a H-2 de la isoflavona, ⁽²⁵⁾ (fig. № 20).

La estereoquímica *trans* de los ácidos fenólicos, ⁽¹⁹⁾(fig.№ 21) se determinó mediante una señal doblete a $\delta_H = 6.5$ ppm ($J = 16.1$ Hz) que corresponde al H-8 (no se observan señales correspondientes al H-7 debido a que se encuentran solapados en la región de 7.4 a 7.9 ppm). Aparece otro sistema *trans* de los protones vinílicos a $\delta_H = 6.3$ ppm ($J = 16.4$ Hz), que confirma la presencia de otro ácido fenólico que podría estar unido a un glicósido como en el caso del ácido clorogénico, debido a la polaridad de la fracción ⁽⁷⁾ (fig.№ 21).

En la región de 3.5 a 4.7 ppm, se observan varias señales que corresponden a protones geminales a grupos OH de los azúcares, además se aprecia una señal ancha a 3.0 ppm correspondientes al hidroxilo, (fig. № 21).

Aparecen en la región de 0.7 a 1.3 ppm señales singuletes, correspondiendo a protones de triterpenos (fig. № 22), los cuales podrían estar unidos a azúcares, para que sea posible su aparición en esta fracción.

Los datos de RMN-¹H de la fracción de acetato de etilo puro se resumen en el cuadro № 13.

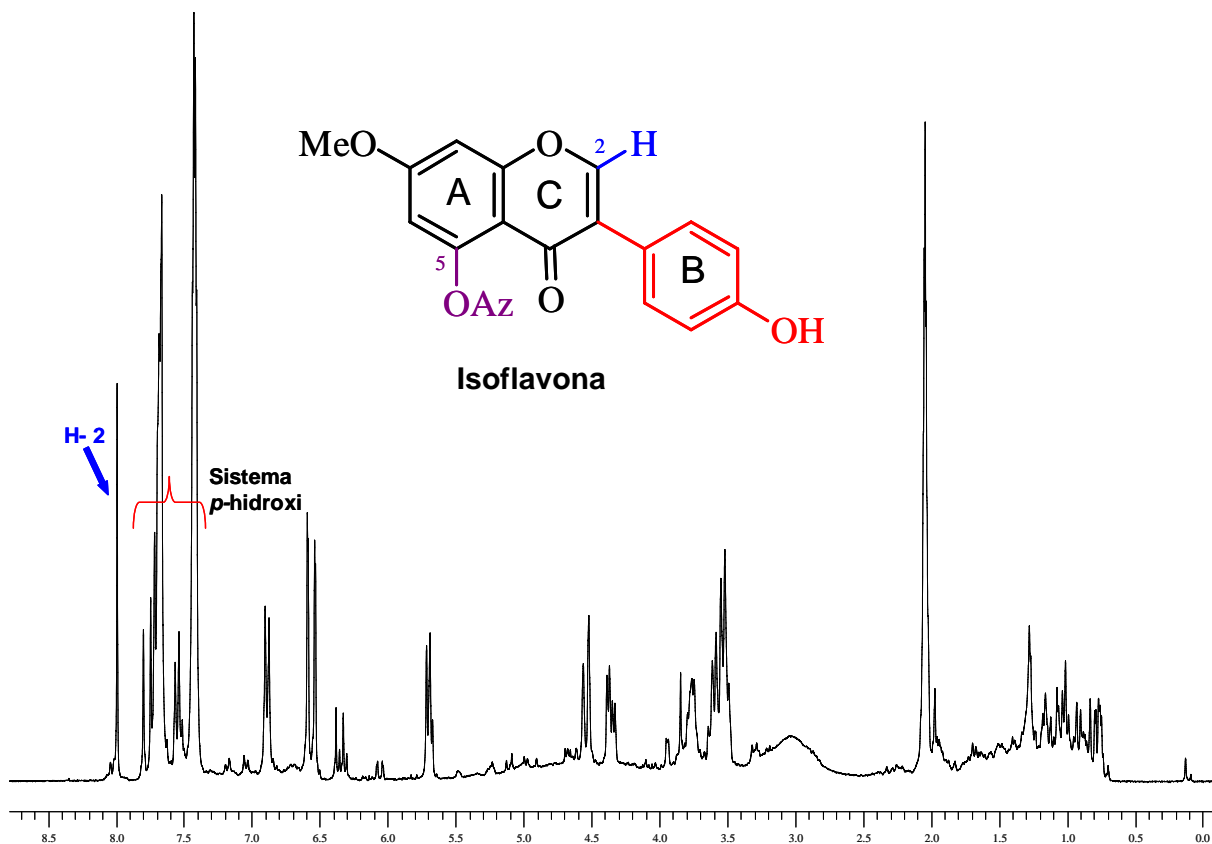


Figura Nº 20: Espectro de RMN- ^1H de la fracción AcOEt puro (CD_3COCD_3 , 300 MHz).
 Observamos el sistema *p*-hidroxi típico de flavonoides, además se observa una señal singlete $\delta_{\text{H}} = 7.99$ ppm, que pertenece a H-2 de la isoflavona.

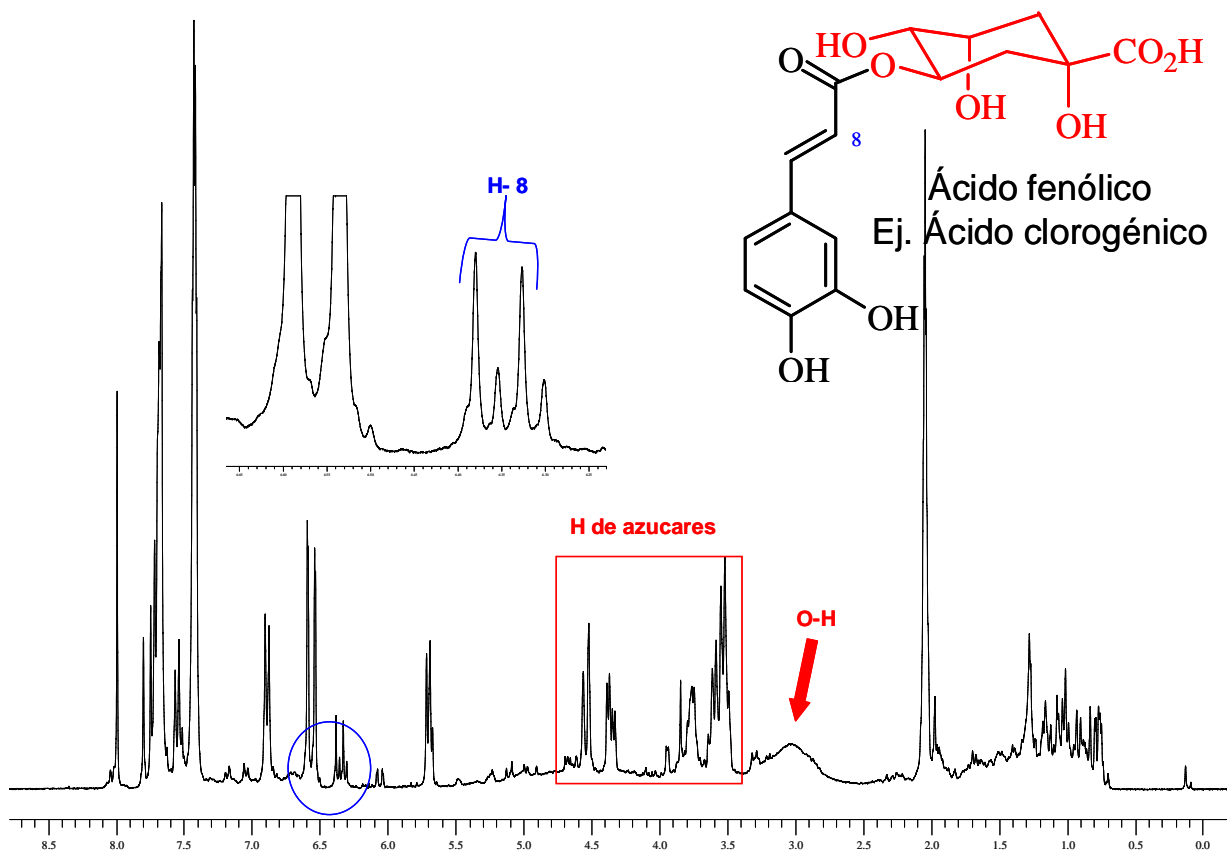


Figura Nº 21: Espectro de RMN-¹H de la fracción AcOEt puro (CD₃COCD₃, 300 MHz). La estereoquímica *trans* de los ácidos fenólicos, se determinó mediante una señal doblete a δ_H = 6.5 ppm que corresponde al H-8 (azul). Aparece otro sistema *trans* de los protones vinílicos a δ_H = 6.3 ppm. Las partes marcadas en rojo corresponden a señales de azúcares.

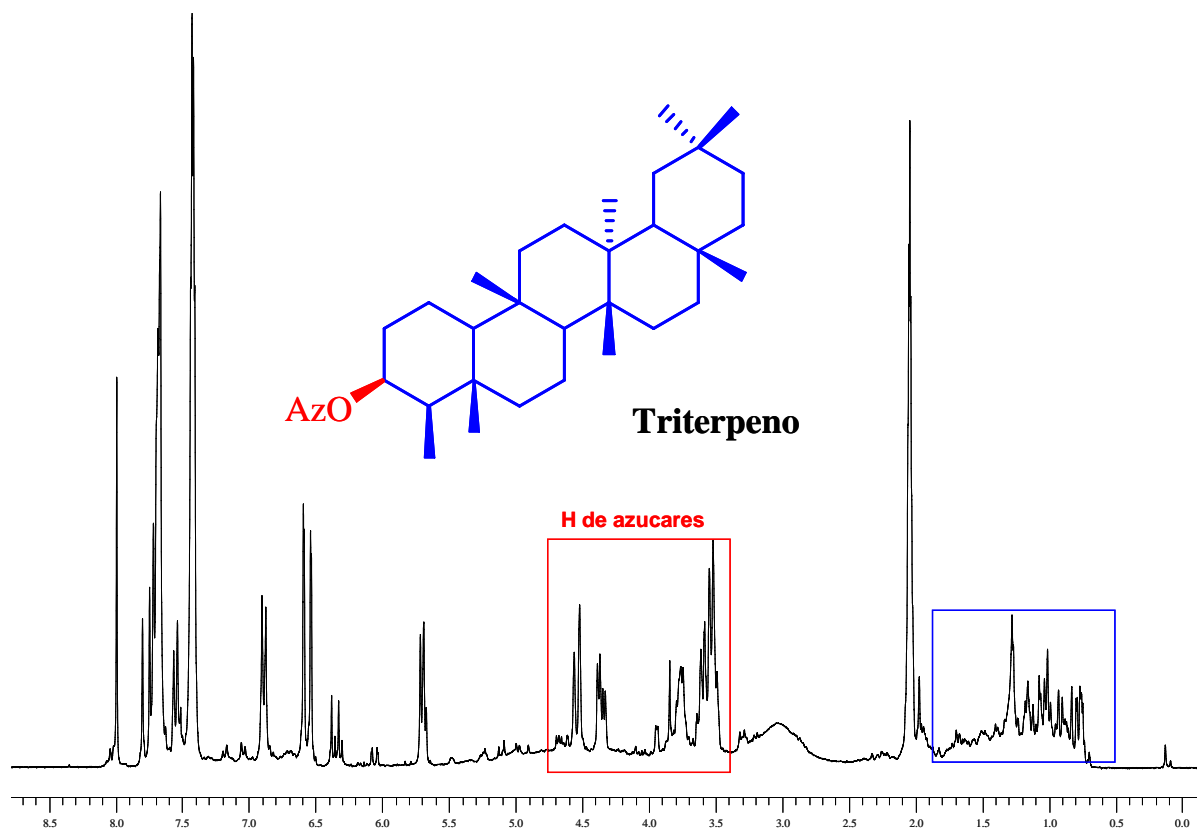


Figura № 22: Espectro de RMN-¹H de la fracción AcOEt puro (CD₃COCD₃, 300 MHz). Aparecen en la región de 0.7 a 1.3 ppm señales singuletes, correspondientes a protones de triterpenos (azul).

Cuadro № 13 Datos del espectro de RMN-¹H de la fracción acetato de etilo puro (CD₃COCD₃, 300 MHz)

δ_H (ppm)	<i>J</i> (Hz)	Tipo de protón. Metabolito secundario
7.99 s	–	H-2 de isoflavonoides
7.40-7.70m	–	Sistema <i>p</i> -hidroxi de flavonoides
6.88 d	8.7	H de flavonoide o ácido fenólico en posición orto
6.50 d	16.1	H-8 <i>trans</i> de ácidos fenólicos
6.30 d	16.4	H-8 <i>trans</i> de ácidos fenólicos
3.50-4.70 m	–	H geminal al OH de azúcares
3.00 sa	–	OH de azúcares
0.70-1.30 s	–	H de triterpenos

**Análisis y discusión del espectro de RMN-¹H de la fracción metanol puro
(MOD₃, 300 MHz).**

Como en el caso de la fracción anterior se observa una señal singulete a $\delta_{\text{H}}=7.88$ ppm del H-2 de los isoflavonoides. ⁽²⁵⁾ (fig. Nº 23).

Presenta señales entre 7.3 a 7.7 ppm pertenecientes a protones aromáticos de ácidos fenólicos y de isoflavonoides.

Se observa dos dobletes a $\delta_{\text{H}}=6.3$ ppm y 7.7 ppm; $J=15.8$ Hz correspondientes a los protones del H-8 y H-7 de los ácidos fenólicos presentes en la fracción, ⁽¹⁹⁾ (fig. Nº 24).

En la región de 3.4 a 4.0 ppm, se aprecian señales típicas de protones geminales a grupos OH de azúcares (fig. Nº14).

Al igual que en el espectro de la fracción anterior, aparecen señales entre 0.7 y 1.5 ppm que corresponderían a protones de triterpenos que deben estar unidos a grupos azúcares, para que sea posible su presencia en esta fracción (fig. Nº 25).

Además se observa una señal singulete a $\delta_{\text{H}}=1.9$ ppm de metilos sobre dobles enlaces correspondientes a triterpenos ⁽²⁵⁾(fig.Nº 25).

Los datos de RMN-¹H de esta fracción se resumen en el cuadro Nº 14.

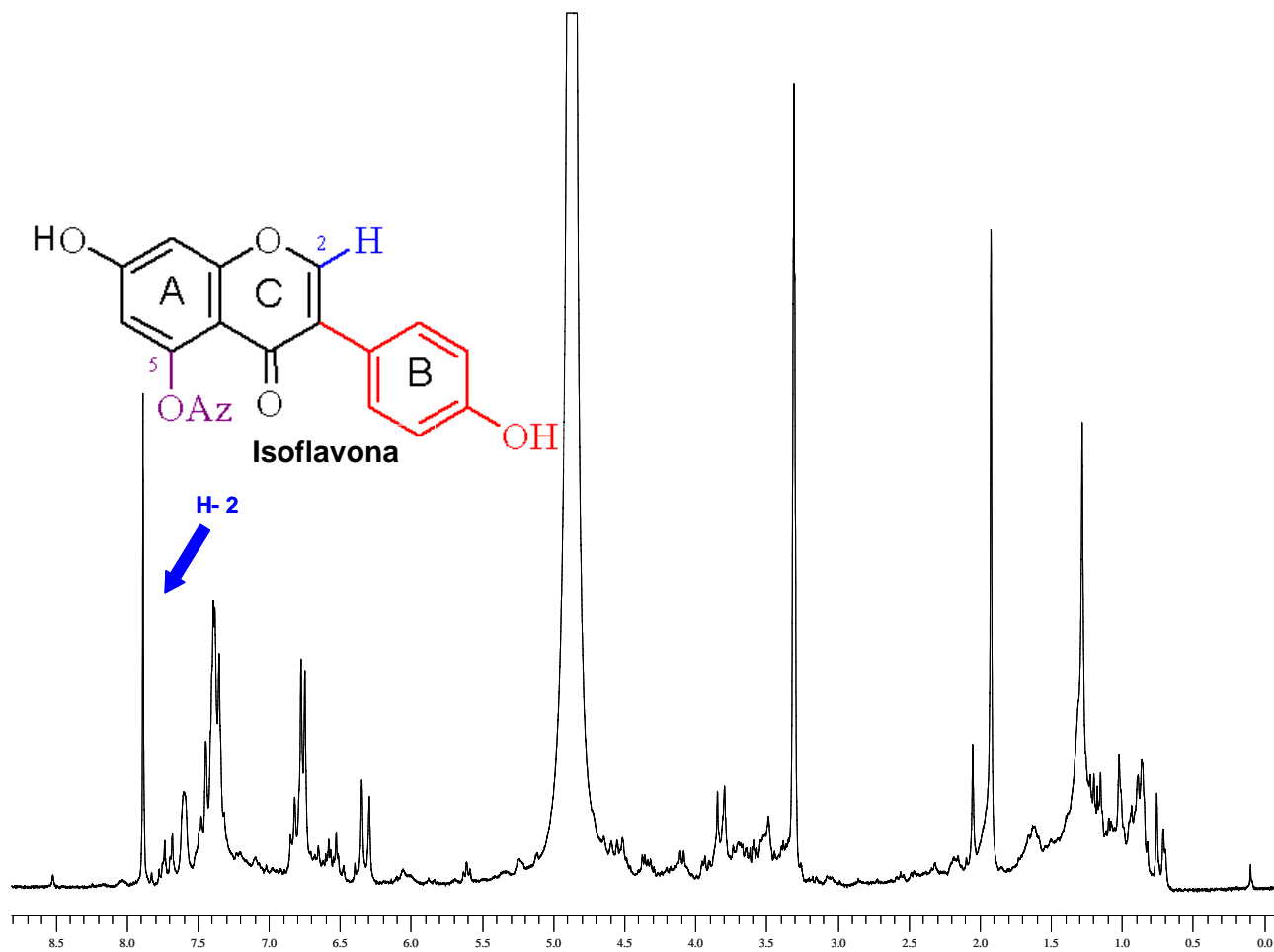


Figura № 23: Espectro de RMN-¹H de la fracción MeOH puro (MOD₃, 300 MHz). Señal singlete a δ_H= 7.88 ppm del H-2 de los isoflavonoides (Azul).

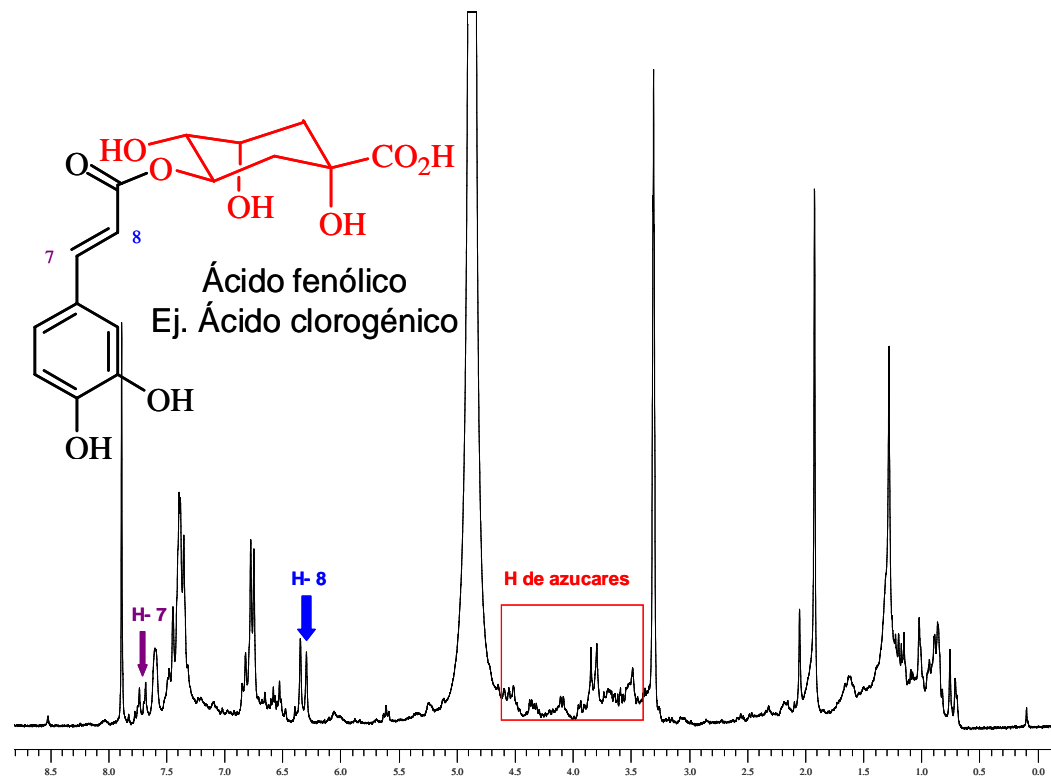


Figura Nº 24: Espectro de RMN-¹H de la fracción MeOH puro (MOD₃, 300 MHz).
 Dos dobletes a $\delta_H = 6.3$ ppm y 7.7 ppm; $J = 15.8$ Hz correspondientes
 a los protones del H-8 y H-7 de los ácidos fenólicos. De 3.4 a 4.0 ppm,
 se aprecian señales típicas de protones geminales a grupos OH de azúcares.

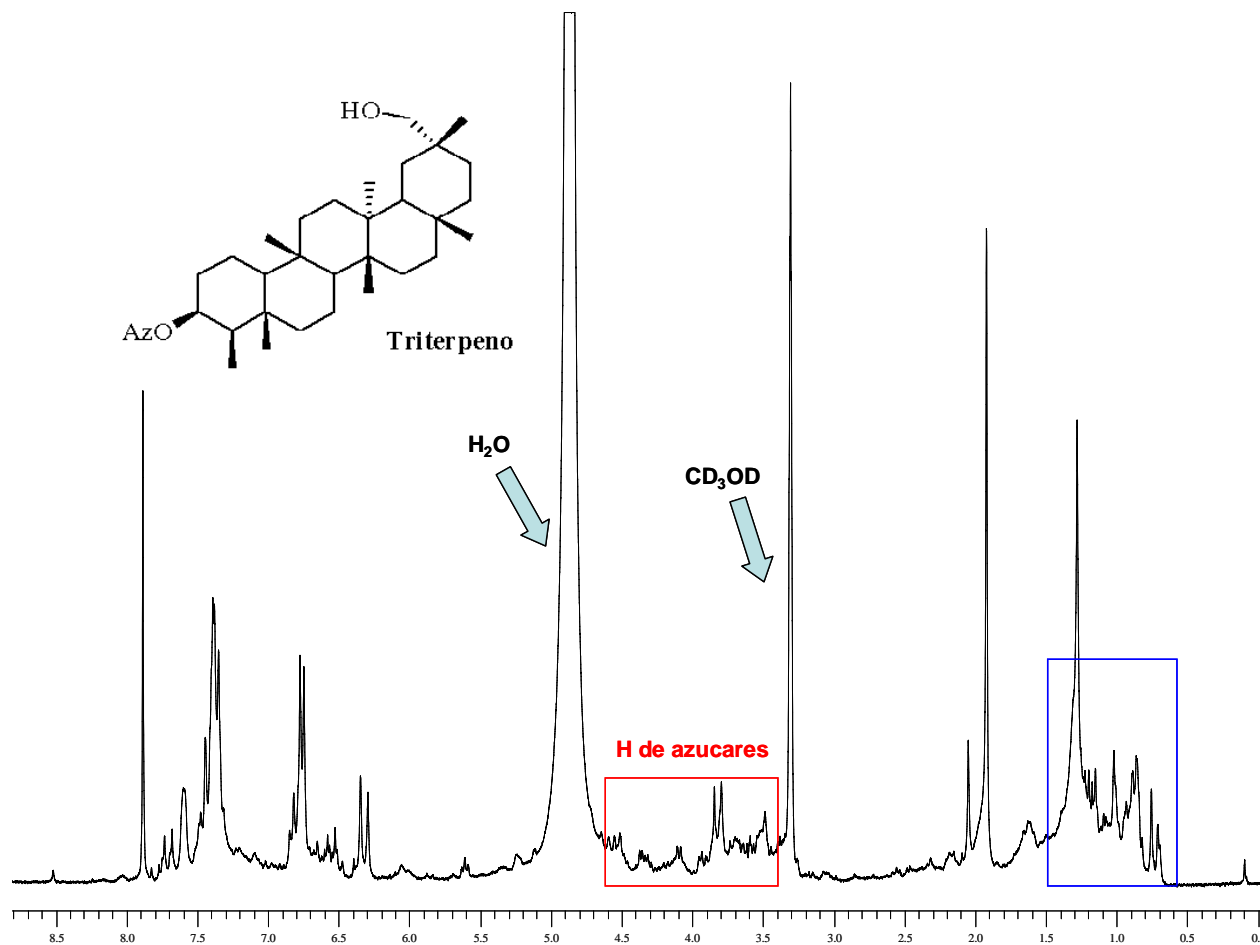


Figura № 25: Espectro de RMN^{-1}H de la fracción MeOH puro (MOD_3 , 300 MHz). Señales entre 0.7 y 1.5 ppm que corresponderían a protones de triterpenos que deben estar unidos a grupos azúcares (cuadro azul).

**Cuadro № 14 Datos del espectro de RMN-¹H de la fracción metanol puro
(MOD₃, 300 MHz)**

δ_H (ppm)	<i>J</i> (Hz)	Tipo de protón. Metabolito secundario.
7.88 s	–	H-2 de isoflavonoides
7.70 d	15.8	H-7 <i>trans</i> de ácidos cinámicos
6.30 d	15.8	H-8 <i>trans</i> de ácidos cinámicos
3.30-3.80 m	–	H geminal a grupos OH de azúcares
1.90 s	–	H de metilos sobre dobles enlaces de triterpenos
0.70-1.50 s	–	H de triterpenos

Resultados de la evaluación microbiológica.

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

Cuadro № 15 Resultados de las pruebas de identificación del *Staphylococcus aureus*.

PRUEBA	RESULTADO
Características microscópicas	Coloración al Gram: microorganismos Gram positivos. Se observan bacterias en forma de cocos, unidos en pares y en racimos, color azul. Prueba positiva (+)
Características macroscópicas	En medio selectivo agar Chapman se observan colonias de color amarillo dorado. En el medio agar Bair-Parker se observan colonias de color negro lustroso con halo alrededor, redondas de borde convexo. Prueba positiva (+)
Identificación y diferenciación	Catalasa: al colocar H ₂ O ₂ se produce una efervescencia rápida. Prueba positiva (+). Coagulasa: se observa una coagulación total del plasma. Prueba positiva (+)

Estas pruebas son características del *Staphylococcus aureus*, donde se confirma que la bacteria analizada se encuentra en óptimas condiciones y sin contaminación de otro microorganismo.

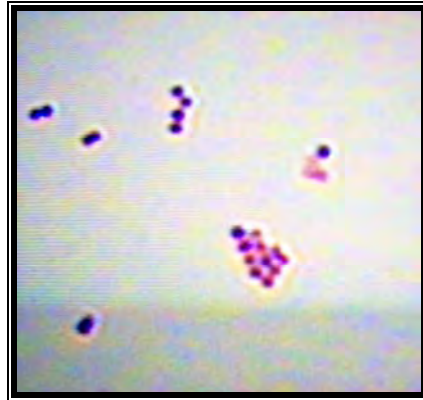


Figura № 26 *Staphylococcus aureus*, en tinción al Gram.

Microorganismo Gram positivo.



Figura № 27 *Staphylococcus aureus* en agar Chapman.



Figura № 28 *Staphylococcus aureus* en agar Baird Parker.

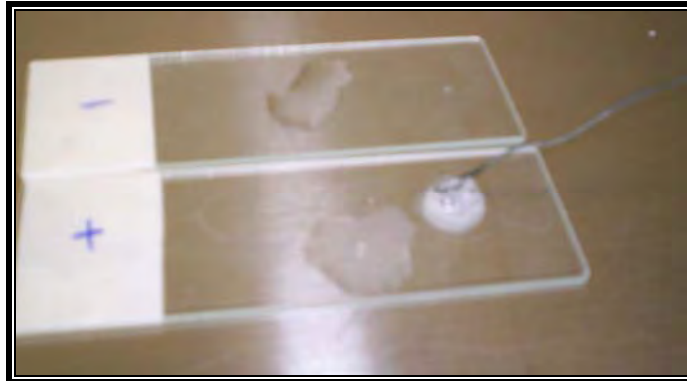


Figura № 29 Prueba de Catalasa
Positivo(+) Burbujeo vigoroso de peróxido de hidrogeno.



Figura № 30 Prueba de Coagulasa
Positivo(+) Coagulación parcial del plasma

Cuadro № 16 Morfología microscópica y macroscópica de la *Pseudomona aeruginosa*.

PRUEBA	RESULTADO
Características microscópicas	Coloración al Gram: microorganismo Gram negativo, se observan bacterias en forma de bacilos pequeños, unidos en pares y cadenas cortas, color rosado. Prueba positiva (+)
Características macroscópicas	En medio selectivo agar Cetrimide, se observan colonias grandes, diseminadas con pigmento verde azulado. Prueba positiva (+)

Cuadro № 17 Pruebas de identificación y diferenciación de *Pseudomona aeruginosa*.

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

K/K = Pico de flauta alcalina/ Profundidad alcalina

(+) = Positivo (-) = Negativo

Estas pruebas son características de la *Pseudomona aeruginosa*, donde se confirma que la bacteria analizada se encuentra en óptimas condiciones y sin contaminación de otro microorganismo.



Figura № 31 *Pseudomona aeruginosa* en tinción al Gram.

Microorganismo Gram negativo.



Figura № 32 *Pseudomona aeruginosa* en agar Cetrimide.



Figura № 33 Prueba (+) de Movilidad, crecimiento de la bacteria más allá de la línea de incisión.



Figura № 34 Prueba (-) de Rojo de metilo, no hay aparición de color rojo intenso.

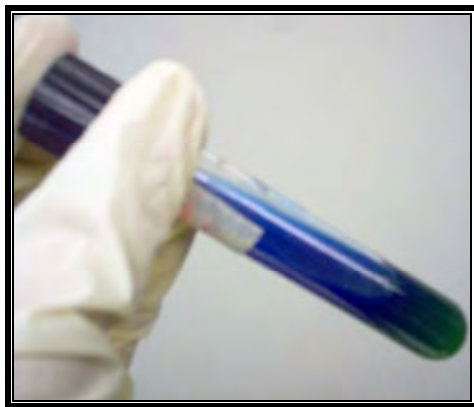


Figura № 35 Prueba (+) de Citrato, crecimiento de la bacteria en el medio y cambio de color verde-azul.

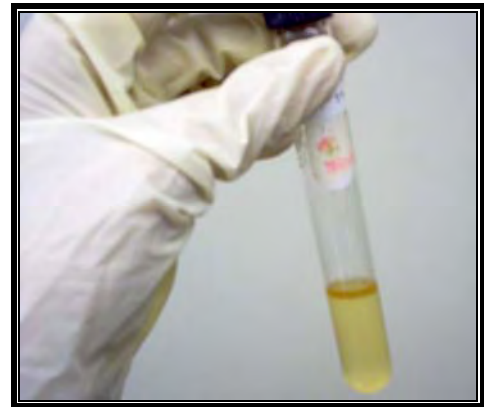


Figura № 36 Prueba (-) de Indol, no hubo formación de anillo violáceo en la interfase.

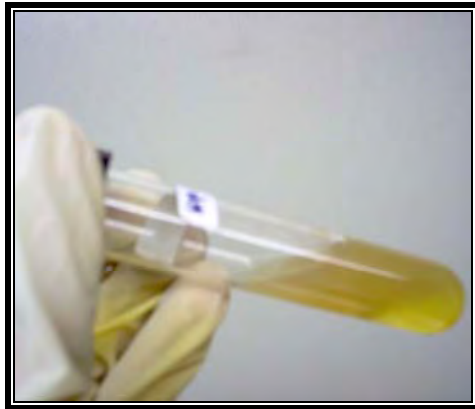


Figura № 37 Prueba (-) de Voges Proskauer no hay cambio de color.



Figura № 38 Prueba de TSI, no hay fermentación de azúcares, por lo que el pico es alcalino y el fondo es alcalino (K/K).



Figura № 39 Prueba positiva de Oxidasa, viraje de color a púrpura-negrusco intenso presencia de enzimas oxidadas.

Cuadro Nº 18 Pruebas de identificación del *Streptococcus pneumoniae*.

PRUEBA	RESULTADO
Características microscópicas	<p>Coloración al Gram: Microorganismo Gram positivo, se observan bacterias en forma de cocos, unidos en cadenas cortas, color azul.</p> <p>Prueba positiva (+)</p>
Características macroscópicas	<p>En medio Agar Sangre, se observan colonias transparentes, pequeñas, redondas, inicialmente convexas y con el tiempo desarrollan una depresión central, una α-hemólisis rodea casi siempre a las colonias.</p> <p>Prueba positiva (+)</p>
Identificación y diferenciación	<p>En una placa de Agar Sangre, se coloca un disco de Optoquin, el cual presenta una zona de inhibición alrededor de éste.</p> <p>Prueba positiva (+)</p>

Estas pruebas son características de *Streptococcus pneumoniae*, donde se confirma que la bacteria analizada se encuentra en óptimas condiciones y sin contaminación de otro microorganismo.

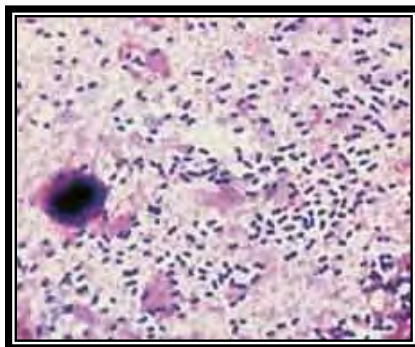


Figura № 40 *Streptococcus pneumoniae* en tinción al Gram.

Microorganismo Gram positivo.



Figura № 41 *Streptococcus pneumoniae* en agar Sangre.



Figura № 42 Prueba positiva de discos de Optoquina, inhibición del desarrollo bacteriano alrededor del disco de Optoquina.

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA.

Cuadro Nº 19 Resultados de la evaluación microbiológica de las fracciones en estudio por el método de Kirby Bauer Modificado, para *Staphylococcus aureus*. (anexo Nº 14)

FRACCIÓN	DILUCIONES	RESULTADOS LECTURA DE HALOS
Fracción <i>n</i> -hexano:acetato de etilo 70%,	0.5 %	Formación de halos de 18.2 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	1.05 %	Formación de halos de 16.6 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	2.1 %	Formación de halos de 17.4 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	3%	Formación de halos de 19 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible.
Fracción acetato de etilo puro	0.5 %	Formación de halos de 15.5 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible.
	1.05 %	Formación de halos de 15.2 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible.
	2.1 %	Formación de halos de 17.5 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible.
	3 %	Formación de halos de 17.5 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible.
Fracción metanol puro	0.5 %	Formación de halos de 14 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible

	1.05 %	Formación de halos de 13 mm de diámetro aproximadamente MO Intermedio
	2.1 %	Formación de halos de 13.6 mm de diámetro aproximadamente MO Intermedio
	3 %	Formación de halos de 14.6 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible

PATRONES Y CONTROLES	RESULTADOS LECTURA DE LAS PLACAS
Blanco: Etanol al 70%	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO resistente
Patrón: Yodo al 2%	Formación de halos inmedibles. No hay crecimiento en toda la placa MO Susceptible.
Patrón: 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

La susceptibilidad o resistencia se ha determinado en base al cuadro N° 3 de Parámetros de referencia de los halos de inhibición.

NOTA: Se empleo como disolvente etanol 70% debido a que en ensayos previos el etanol 96° presento inhibición sobre la cepa.

En el cuadro se considera la bacteria susceptible a las diluciones 0.5%, 1.05%, 2.1%, 3% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro, ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición, excepto las diluciones del 1.05% y 2.1% de la fracción metanol puro considerándose al microorganismo como intermedio. Para confirmar el efecto antimicrobiano de las fracciones y sus diluciones se determinó que este se debió a la goma-resina y no al alcohol etílico al 70%, ya que se llevó un blanco de este último, presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que el ***Staphylococcus aureus***, es resistente al alcohol etílico. Como comparación entre las fracciones de la goma-resina y sustancias de conocida actividad antimicrobiana, se llevaron como patrones: solución de yodo al 2% y un disco de antibiótico (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.

Además se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, en la primera se observó un crecimiento uniforme y abundante en toda la placa y en el segundo no, lo que indica que no hay contaminación por parte de bacterias extrañas.

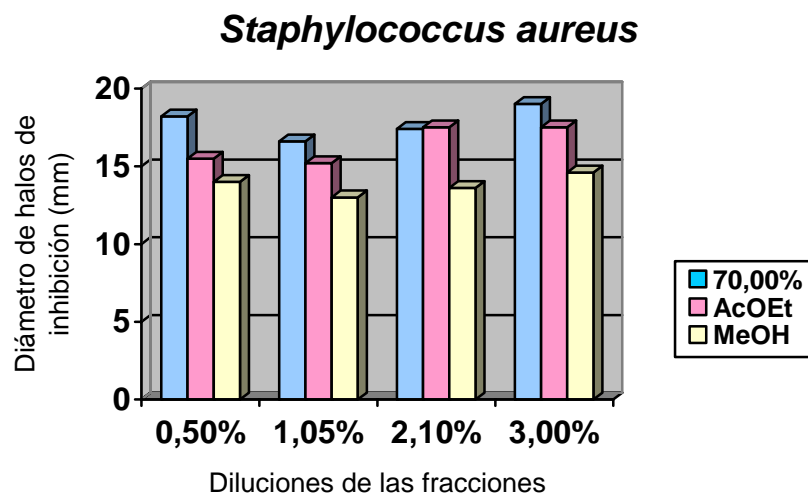


Figura № 43. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones 0.5%, 1.05%, 2.1% y 3.0% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro (AcOEt) y metanol puro (MeOH) del extracto diclorometánico de la goma resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto) en *Staphylococcus aureus*.

Cuadro № 20 Resultados de la evaluación microbiológica de las fracciones en estudio por el método de Kirby Bauer Modificado, para *Pseudomona aeruginosa*. (anexo № 15)

FRACCIÓN	DILUCIONES	RESULTADOS LECTURA DE HALOS
Fracción <i>n</i> -hexano:acetato de etilo 70%,	0.25%	Formación de halos de 13.4 mm de diámetro aproximadamente MO Intermedio.
	0.5%	Formación de halos de 21.5 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible.
	0.75%	Formación de halos de 31.6 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	1.05%	Formación de halos de 24.8 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
Fracción acetato de etilo puro	0.25%	Formación de halos de 19.7 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	0.5%	Formación de halos de 22.7 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	0.75%	Formación de halos de 31.1mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	1.05%	Formación de halos de 22.5 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
Fracción metanol puro	0.25%	Formación de halos de 19 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible

	0.5%	Formación de halos de 23.2 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible.
	0.75%	Formación de halos de 27.4 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible
	1.05%	Formación de halos de 19 mm de diámetro aproximadamente MO Susceptible

PATRONES Y CONTROLES	RESULTADOS LECTURA DE LAS PLACAS
Blanco: Etanol al 70%	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO Resistente
Patrón: Yodo al 2%	Formación de halo entre 25 a 27 mm de diámetro MO Susceptible
Patrón: Disco de Antibiótico de Gentamicina 10 Unidades	Formación de halo entre 19 a 20 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

La susceptibilidad o resistencia se ha determinado en base al cuadro Nº 3 de Parámetros de referencia de los halos de inhibición.

NOTA: Se empleo como disolvente etanol 70% debido a que en ensayos previos el etanol 96° presento inhibición sobre la cepa.

En el cuadro se considera la bacteria susceptible a las diluciones 0.25%, 0.5%, 0.75%, 1.05% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro, ya que se observa la formación de halos definidos con el tamaño requerido para afirmar que la bacteria es sensible a estas concentraciones excepto la dilución al 0.25% de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70% donde por el tamaño de los halos es considerado como intermedio .

Para confirmar el efecto antimicrobiano de las fracciones y sus diluciones se determina que este se debió a la goma-resina y no al alcohol etílico al 70%, ya que se llevo un blanco de éste último, presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que la ***Pseudomona aeruginosa***, es resistente al alcohol etílico.

Como comparación entre las fracciones de la goma-resina y sustancias de conocida actividad antimicrobiana, se llevaron como patrones: solución de yodo al 2% y un disco de antibiótico (gentamicina), en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antimicrobiana del yodo y de la gentamicina, en comparación con las diluciones de las fracciones.

También se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo. En el control positivo crece por completo la bacteria por toda la placa, no así en el control negativo este sirve para asegurar que no exista ningún tipo de contaminación por parte de otra bacteria.

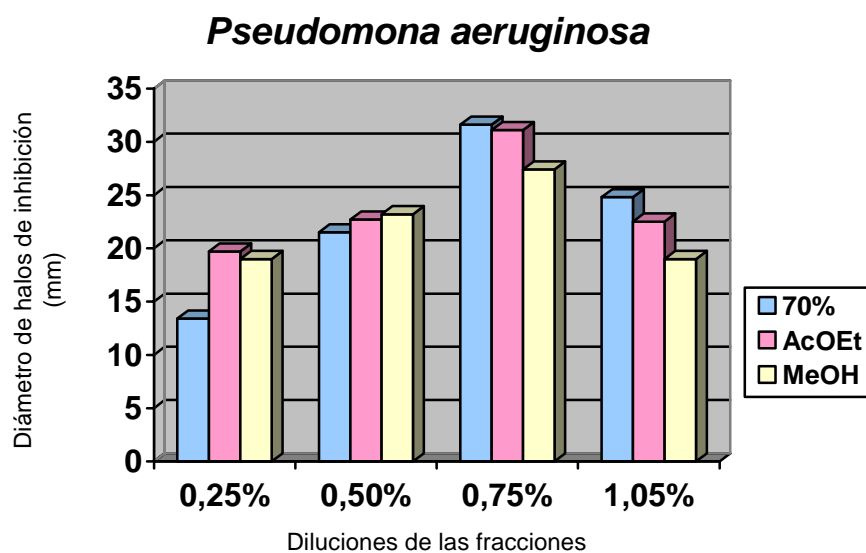


Figura № 44. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones 0.25%, 0.5%, 0.75% y 1.05% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro (AcOEt) y metanol puro (MeOH) del extracto diclorometánico de la goma resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto) en *Pseudomona aeruginosa*.

Cuadro № 21 Resultados de la evaluación microbiológica de las fracciones en estudio por el método de Kirby Bauer Modificado para el *Streptococcus pneumoniae*. (anexo № 16)

FRACCIÓN	DILUCIONES	RESULTADOS LECTURA DE HALOS
Fracción <i>n</i> -hexano:acetato de etilo 70%,	0.5%	Formación de halos de 12 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente
	0.75%	Formación de halos de 16.25 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente
	1.5%	Formación de halos de 18 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente
	3%	Formación de halos de 15.5 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente
Fracción acetato de etilo puro	0.5%	Formación de halos de 13 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente.
	0.75%	Formación de halos de 16 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente
	1.5%	Formación de halos de 22.5 mm de diámetro aproximadamente MO Intermedio
	3%	Formación de halos de 20.5 mm de diámetro aproximadamente MO Intermedio
Fracción metanol puro	0.5%	Formación de halos de 12.5 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente.

	0.75%	Formación de halos de 15.2 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente
	1.5%	Formación de halos de 16 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente
	3%	Formación de halos de 15.4 mm de diámetro aproximadamente MO Resistente

PATRONES Y CONTROLES	RESULTADOS LECTURA DE LAS PLACAS
Blanco: Etanol al 70%	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO Resistente
Patrón: Yodo al 2%	Formación de halos de 40 mm de diámetro MO Susceptible.
Patrón: Disco de Antibiótico de Ampicilina 10 Unidades	Formación de halos entre 35 a 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

La susceptibilidad o resistencia se ha determinado en base al cuadro Nº 3 de Parámetros de referencia de los halos de inhibición.

NOTA: Se empleo como disolvente etanol 70% debido a que en ensayos previos el etanol 96° presento inhibición sobre la cepa.

En el cuadro se considera la bacteria resistente a las diluciones 0.5%, 0.75%, 1.5% y 3.0% de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%; y resistente a las diluciones 0.5% y 0.75% de la fracción acetato de etilo puro, exceptuando la dilución al 1.5% y 3.0% que se considero como intermedio; en cuanto a las diluciones de 0.5%, 0.75%, 1.5% y 3% de la fracción de metanol puro se considera la bacteria como resistente, ya que hay formación de halos con medidas no considerables de inhibición, las cuales se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

Se lleva al mismo tiempo un blanco con alcohol etílico al 70%, presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que el ***Streptococcus pneumoniae***, es resistente al alcohol etílico.

Como comparación entre las fracciones de la goma-resina y sustancias de conocida actividad antimicrobiana, se llevaron como patrones: solución de yodo al 2% y un disco de antibiótico (ampicilina), en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antimicrobiana del yodo y de la ampicilina, en comparación con las diluciones de las fracciones.

Se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, en la primera se observó un crecimiento uniforme y abundante en toda la placa y en el segundo no, lo que nos indica que no hay ningún tipo de contaminación por parte de otras bacterias.

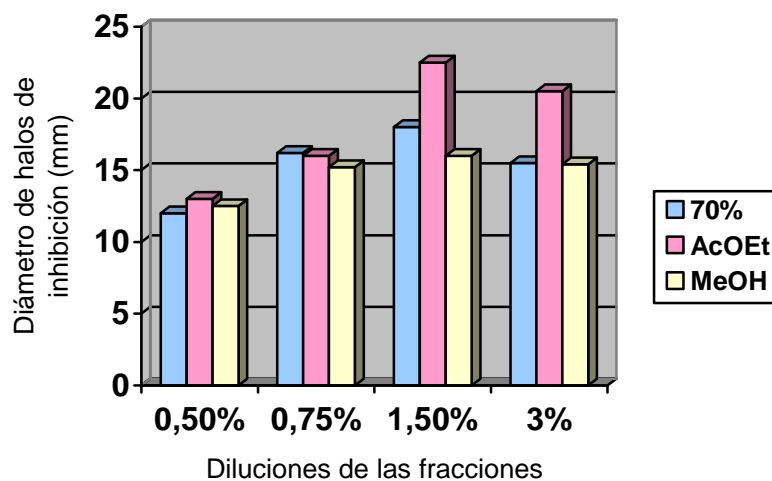
Streptococcus pneumoniae

Figura № 45. Comparación del efecto inhibitorio de las diluciones 0.5%, 0.75%, 1.5% y 3% de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro (AcOEt) y metanol puro (MeOH) del extracto diclorometánico de la goma resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto) en *Streptococcus pneumoniae*.

VI. CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo con los resultados obtenidos del espectro de RMN-¹H de la fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%, en esta última se encuentran presentes al menos 15 metabolitos secundarios, entre los cuales es posible la presencia de chalconas, isoflavonoides, flavononoles y ácidos fenólicos (Ej. ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido caféico, ácido clorogénico, entre otros).
2. De acuerdo a los datos espectroscópicos obtenidos de la fracción acetato de etilo puro, en esta fracción se encuentran isoflavonoides, que aparentemente presentan azúcares en la posición 5 de su estructura; esto explica la no aparición de protones quelatados en la región de 11-12 ppm.
3. En la fracción acetato de etilo puro se observan al menos 4 ácidos cinámicos diferentes, los cuales no poseen grupos metoxilos por lo que tendríamos ácidos como el caféico, cinámico y cumárico; y que además por encontrarse en esta fracción podrían estar unidos a azúcares como en el caso del ácido clorogénico.

4. Debido a la aparición de señales de protón en la región de 0.7-1.3 ppm en la fracción acetato de etilo puro, también se encuentran presentes sustancias triterpénicas las cuales deben estar glicosadas, para que sea posible su presencia en esta fracción.
5. En relación con las señales que aparecen en el espectro de RMN-¹H de la fracción metanol puro, en esta se encuentran presentes isoflavonoides unidos a azúcares, 3 posibles ácidos fenólicos también glicosados, además de triterpenos glicosados.
6. En la valoración microbiológica de las diluciones de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro del extracto diclorometánico de la goma resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto), los microorganismos ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** resultaron susceptibles, debido a que los halos de inhibición presentados se encuentran dentro del rango de susceptibilidad; no así para ***Streptococcus pneumoniae*** que resulto resistente ya que sus halos de inhibición se encuentran dentro del rango de resistencia.

7. Se llevó un blanco de etanol al 70 %, en el que se obtuvo un crecimiento abundante y no hubo formación de halos, lo que demostró que el efecto antimicrobiano se debe a las sustancias extraídas y no al etanol al 70%.
8. Las diluciones de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro del extracto diclorometánico de la goma resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto), poseen actividad antimicrobiana contra ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa***.
9. La fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70% presento mayor efecto inhibitorio contra el ***Staphylococcus aureus***, esto se debe a que en dicha fracción se encuentran metabolitos secundarios tales como flavonoides y ácidos fenólicos, los cuales presentan actividad antimicrobiana comprobada.
10. La dilución del 0.75 % de las fracciones *n*-hexano:acetato de etilo 70%, acetato de etilo puro y metanol puro para la cepa ***Pseudomona aeruginosa***, presentó mayor actividad antimicrobiana a causa de encontrarse sustancias como flavonoides, ácidos fenólicos y triterpenos glicosados de conocida actividad antimicrobiana. (25, 17)

VII. RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Continuar con el fraccionamiento bioguiado de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, a través de la realización de sucesivas cromatografías de columna, en las fracciones obtenidas, con el objetivo de aislar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana.
2. Investigar la actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna, contra diferentes cepas de interés clínico, comprobando así su amplio espectro y poder utilizarlo en un mayor número de afecciones.
3. Realizar un ensayo con los disolventes a utilizar, previo a la evaluación de susceptibilidad, para verificar que estos no afecten ni inhiban la cepa y evitar la obtención de un resultado falso positivo, así también durante la evaluación de susceptibilidad se debe llevar un blanco corroborando así que los resultados se deban a la sustancia en estudio y no al disolvente.
4. Para una mejor conservación de los microorganismos utilizados se recomienda mantenerlos en caldos nutritivos ya sea BHI para

Staphylococcus aureus, ***Pseudomona aeruginosa*** y leche descremada para ***Streptococcus pneumoniae***, conservándolos en congelación a -5°C.

5. Preparar las diluciones de la muestra utilizando etanol al 70 % para ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***, ya que a 96° presenta un efecto inhibitorio sobre estas cepas.
6. Extraer en soxhlet por cinco días continuos sin cambiar la muestra; para obtener el mayor rendimiento posible de la goma-resina.
7. Recolectar la goma-resina preferiblemente en época seca, ya que en estas condiciones se facilita su recolección y conservación.
8. Conservar adecuadamente durante el proceso de secado cada una de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna, ya que pueden ser afectadas por el calor y humedad.
9. Para muestras de origen vegetal, es preferible emplear la cromatografía flash (cromatografía a media presión) ya que permite obtener un fraccionamiento en menor tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acortes J. 2003. Prácticas de Laboratorio de Microbiología. España. Consultado 3 de Agosto 2006. Disponible en:
www.upm.edu/biology/cursos/micro/pruebas
2. Beatty, W.K. 1993 Diccionario de ciencias médicas 25ªed. Buenos Aires,Editorial Médica Panamericana. Pág. 37, 69, 163, 165 y 438.
3. Brock, T. D y otros. 1987. Microbiología. 4ª ed. México. Prentice-Hall. Pág.906
4. Cucufate Rivas,C.M. y otros. 2001. Formulación y elaboración de una tintura con acción antiséptica cicatrizante a base del extracto del tallo del apio (*Apium graveolens*). Trabajo de graduación. Licenciatura en Química y Farmacia. Facultad de Ciencias Puras y Aplicadas. Universidad Nueva San Salvador. San Salvador, El Salvador, C.A.
5. Ministerio de Salud. Curso Latinoamericano de Actualización en Antimicrobianos. 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test Approved Standard. Séptima Edición.
6. Dayal, R. y otros. 1980. Chemical components of *Eucalyptus citriodora* leaves. Forest Res Lab., Bangalore, India. Current Science, 49(3), 116.
7. Dewick, P. 2002.Medicinal Natural Products. Editorial John Wiley. Toronto, Canadá. Págs. 219,220 y 221.

8. Domínguez, A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. 9ªed. México. Editorial Limusa. Págs.84, 153.
9. Duke J. 1983. ***Eucalyptus citriodora*** Hook. Myrtaceae-Lemonscented gum. Francia, Purdue University. Consultado 22 de Agosto de 2006. Disponible en:
<http://www.nortpurdue.edu/newcrop/duke-energy/Eucalyptuscitriodora.html>
10. Evans, W.C. y otros. 1991, Farmacognosia, 13ªed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. Págs.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.2001. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C.A.
13. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Microbiología y Parasitología. 1994. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C.A.
14. Font Quer, P. 1993. Diccionario Botánico. 9ª. Reimpresión. Barcelona. Editorial Labor S.A. Tomo 1. Págs.326, 365,941.

15. Freman, B. A. 1984. Tratado de Microbiología de Burrows. 21^a. Ed. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. Págs. 446,447.
16. Gilg, E. 1926. Farmacognosia. Traducido de la 3^a. Ed. Alemania. Editorial Labor S.A. Barcelona, España. Págs. 240-241.
17. Grieve M. 1998. Eucalipto. Estados Unidos. Missouri Botanical. Consultado 22 de Julio de 2006. Disponible en:
www.Botanical.com/botanical/mgmh/eucaly14html
18. Guzmán, D.J. 1975. Especies Útiles de la Flora Salvadoreña Medico Industrial. Ministerio de Educación, San Salvador, El Salvador. Impreso en los talleres de la Dirección de Publicaciones. Pág.361.
19. Herrera F., A. y otros. 1995. Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica. 2^a edición. Madrid, España. Editorial Sintesis. Págs. 100-142.
20. Shen, Z y otros. 1987. Isolation and Identification of Citriodorin. Chinese Acad, Forestry, Nanjing, Peop, Rep, China, Linchan Huaxue Yu Gongye; 7(2), 35-43.
21. Shen, Z y otros. 1987. Isolation and Identification of Flavonoid Compounds. Chinese Acad. Forestry, Nanjing, Peop, Rep. China. Linchan Huaxue Yu Gongye, 7(2) 28-34.
22. Jawets, E, y Otros. 1992. Microbiología Médica. 14^aed. México, D.F. Editorial Manual Moderno. Págs. 217, 218, 237,238 y 239.

23. Koneman, E.W. y otros. 1992. Diagnostico Microbiológico. 3ªed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana S.A. Pág.415-604.
24. Kuklinski, C. 1983. Farmacognosia. Ediciones Omega. Págs. 167,168 y 169.
25. Lock de Ugaz, O. 1994. Investigación Fitoquímica. 2ª edición. Perú. Fondo Editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú. Págs. 64, 66, 72, 73, 111,112, 114, 183,184, 185,186.
26. López L. y otros. 2004. Árboles en España, Manual de identificación. Ediciones mundi-Prensa. 2ª.Edición. Págs.654.
27. Martínez G., y otros. 2001. Técnicas Experimentales en Síntesis Orgánica. 1ª Reimpresión. España. Editorial Síntesis S.A.Págs.168-187.
28. Marcano, D. y otros. 1991. Fitoquímica Orgánica. 1ªed. Caracas, Venezuela. Editorial Talleres de Litopar. Págs. 125-131.
29. Martínez R., y otros. 2003. Comprobación de la actividad antimicótica *in-vitro* de la tintura elaborada con oleoresina de Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C.A.
30. Martínez R, M. 2006. Los beneficios del Eucalipto. Consultado el 12 de jul. de 2006. Disponible en:
http://www.infarmate.org/pdfs/mayo_junio06/eucalipto.pdf

31. Méndez R., y otros. 2006. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto). Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C.A.
32. Merck. 1994. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt. Alemania. Págs. 74, 127, 144,807.
33. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Dirección General de Ordenamiento forestal cuencas y riesgos. Área Forestal ***Eucalyptus citriodora***. Consultado 9 jul. 2006. Disponible en: <http://www.mag.gob.sv/admin/publicaciones/upload-file/1121114265-82.pdf>
34. Najarro M.,y otros. 2005. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la oleoresina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto). Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C.A.
35. Naturamedic. 2002. El Eucalipto. Argentina. Consultado 5 de Junio de 2006. Disponible en: www.naturamedic.com/eucalipto.htm
36. 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. 2ªed. San Salvador. Editorial Universitaria. Pág. 354-355.

37. Pelczar, M.J. y otros, 1992. Microbiología. 4^aed. México, D.F. Editorial McGraw-Hill. Págs. 206-271.
38. Real Academia Española. 1970. Diccionario de la Lengua Española. 19^aed. Madrid. Editorial Espasa-Calpe, S.A. Pág.940
39. Reina, M. 2003. Cromatografía (en línea). Consultado 10 jul. 2006. Disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/images/inmunocitoquimia-53/cromatografia4.jpg>.
40. Sáenz P., R. 1999. Revista de Ciencias Forestales-Quebracho Nº7. Facultad de Agroindustria. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. Consultado 10 jul. 2006. Disponible en: <http://fcf.unse.edu.ar/pdf/quebracho/q7-11.pdf>.
41. Samuelsson, G. 1992. Drugs of Natural Origin a Textbook of Pharmacognosy. 4^aed. Págs 57, 58 y 59.
42. Skoog, D.A. y otros. 2001. Química Analítica. 7^aed. México D.F. Editorial McGraw-Hill. Págs.203, 204.
43. Técnicas Experimentales en Síntesis Orgánicas. Mā, Angeles Matínez Grau, Editorial Síntesis, 2001. Págs. 171-176.
44. The Isolation of Shikimic Acid from *Eucalyptus citriodora*. Anet, E. F.L.J. Birch, A.J. Massy-Westropp, R.A. Univ. Sydney, *Australian Journal of Chemistry* (1957), 1093-4.

45. Tortora, G. y otros. 1993. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia, S.A. Pág.494.
46. University Purdue. Department of Horticultura and Landscape Architecture. Consultado: 10 de mayo 2006. Disponible en: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/dukeenergy/eucalyptuscitriodora.html>
47. United States Pharmacopeial convention USP 25. NF 20. 2002. The Official Compendia of Standards 25^o Revision (USP) y 20^o ed. (NF), Inc. Canada. Págs. 883, 2221 y 2234.
48. Wu, Y.; y otros. (2005). Taxonomic And Chemical Relationships Revealed By Nuclear Magnetic Resonance Spectra Of Plant Exudates.. *Journal of Natural Products*. Volume 68, Number 5. 1(14): 635-648.

GLOSARIO (2, 36, 14)

Absceso: Cavidad que contiene pus y esta rodeada de tejido inflamado formado como consecuencia de la supuración de una infección localizada.

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

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

Antiespasmódico: Agente que cura o alivia los espasmos.

Antiséptico: Sustancia que sirve para lograr la desinfección.

Asepsia: Una condición libre de microorganismos patógenos viables.

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

Corimbo: Inflorescencia racimosa; los pedúnculos arrancan a distintas alturas del eje de la inflorescencia y las flores quedan más o menos al mismo nivel.

Dermatitis: Diversas afecciones de la piel.

Edema: Acumulación de cantidades excesivas de líquido acuoso en células, tejidos o cavidades serosas.

Endocarditis: Inflamación aguda o crónica del endocardio, se manifiesta generalmente en el curso del reumatismo articular agudo y en otras enfermedades febriles agudas.

Eritema: Enrojecimiento o inflamación de la piel o membranas mucosas como resultado de la dilatación y congestión de los capilares superficiales.

Espasmo: Contracción involuntaria persistente de un músculo o grupo muscular.

Exudados vegetales: Estos son producidos por células de la superficie de la planta como resultado de un daño o lesión, estos exudados se limitan a los compuestos orgánicos que no requieren la extracción química.

Febrífugo: Agente que tiende a reducir la fiebre.

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.

Kino: El nombre kino se ha aplicado a numerosos jugos desecados, ricos en flavotaninos y empleados antiguamente por sus propiedades astringentes.

Necrosis: Muerte de una porción de tejido a consecuencia de una enfermedad o lesión.

Neumonía estafilocócica: Inflamación del tejido pulmonar causada por los estafilococos.

Oleoresina: Jugo líquido, o casi líquido, procedente de varias plantas, formado por resina disuelta en aceite volátil.

Patogenicidad: Capacidad de un microorganismo de infectar (invadir y multiplicarse, en un ser vivo), produciendo unos síntomas (enfermedad).

Patógeno: Productor o causante de enfermedad.

Septicemia: Infección sistémica caracterizada por la aparición de patógenos en la sangre circulante, procedentes de una infección localizada en cualquier parte del organismo.

Silvicultura: Comprende todas las operaciones necesarias para regenerar, explotar y proteger los bosques, así como para recolectar sus productos.

Urceolado (a): Se aplica a la corola o a la flor cuya corola tiene forma de olla.

ANEXOS

ANEXO Nº 1

Eucalyptus citriodora (Eucalipto)



Figura Nº 46 Árboles de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto)

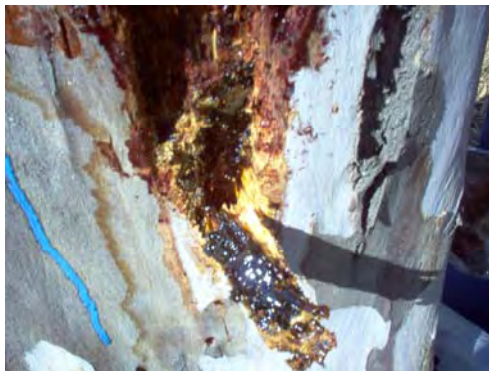


Figura Nº 47 Árboles de ***Eucalyptus citriodora*** exudando goma-resina.

ANEXO Nº 2

FOTOGRAFÍAS DE APARATO SOXHLET Y ROTA EVAPORADOR.



Figura Nº 48 Extracción continua con Soxhlet



Figura Nº 49 Rota Evaporador.

ANEXO № 3

METODOLOGÍA GENERAL DE TRABAJO

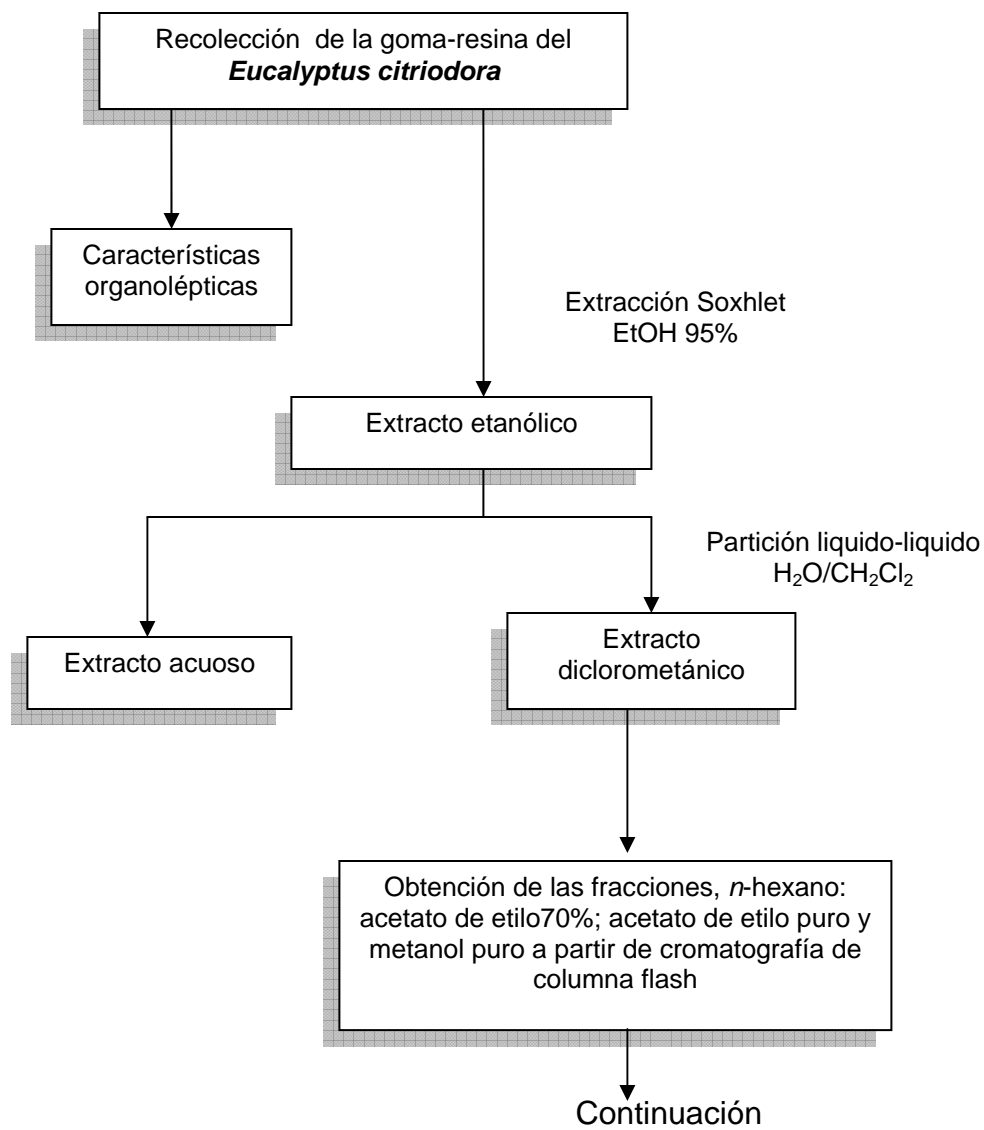


Figura № 50 Diagrama de la metodología general de trabajo.

Continuación

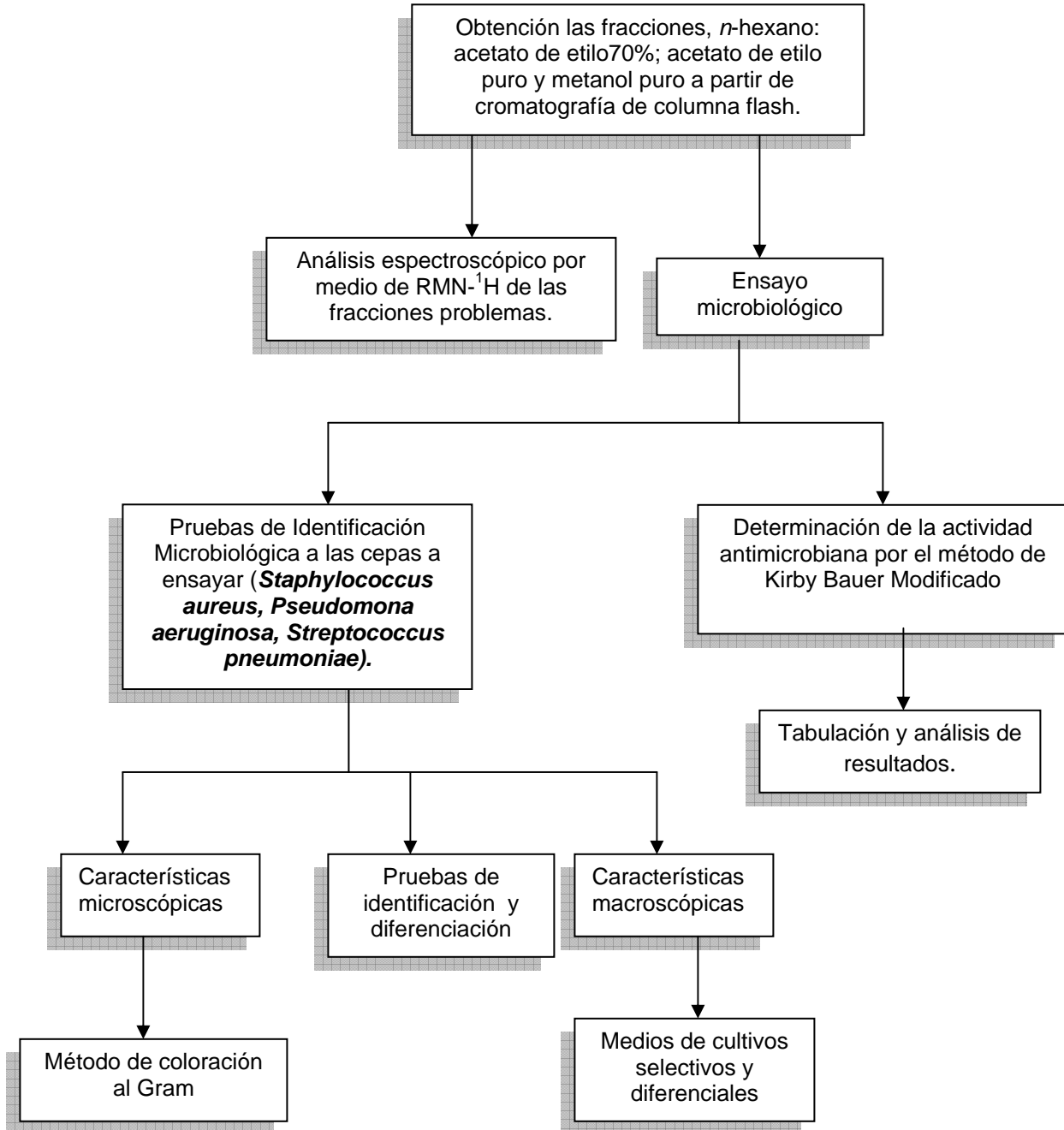


Figura № 51 Diagrama de la Metodología General de Trabajo.

ANEXO No 4

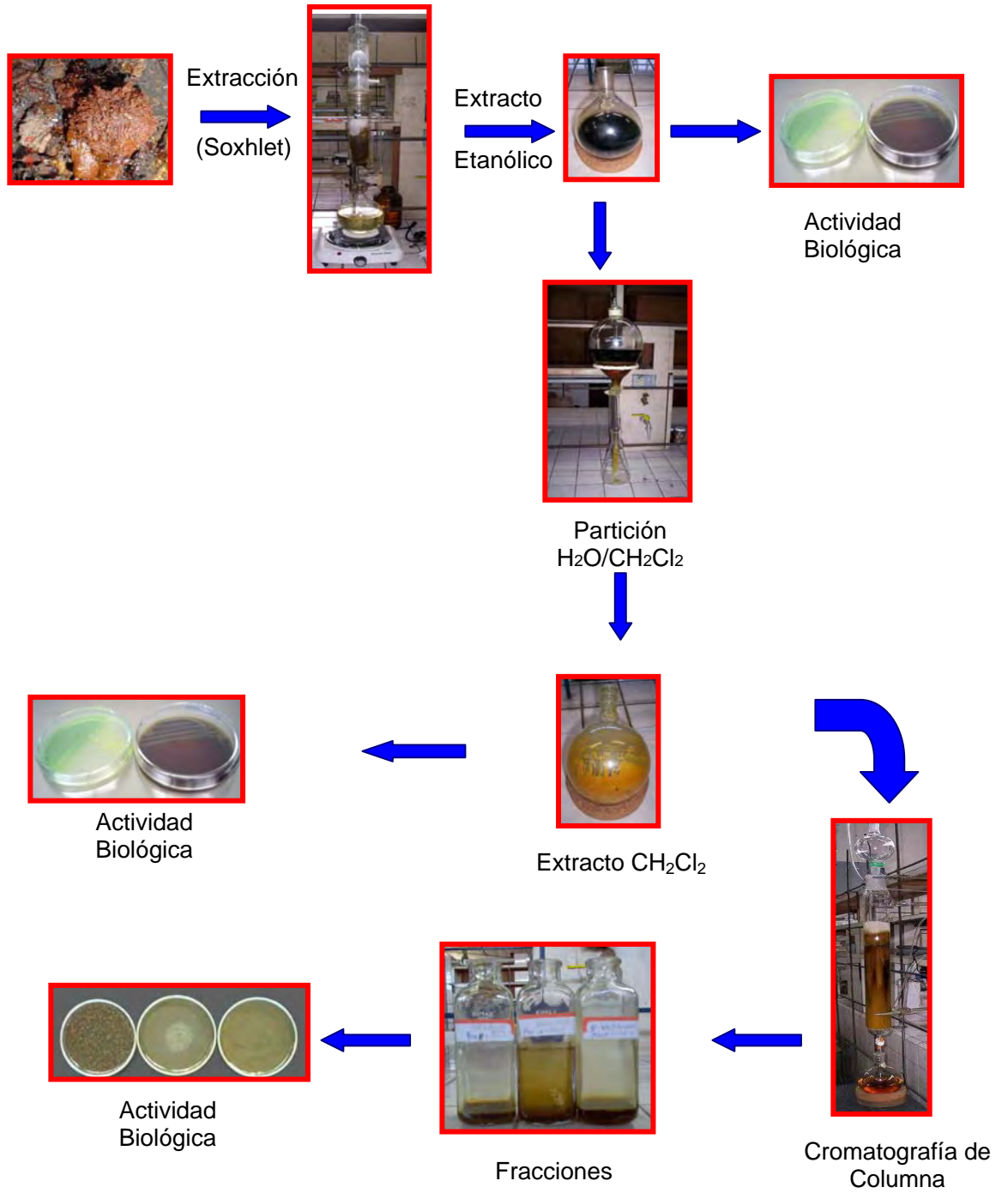
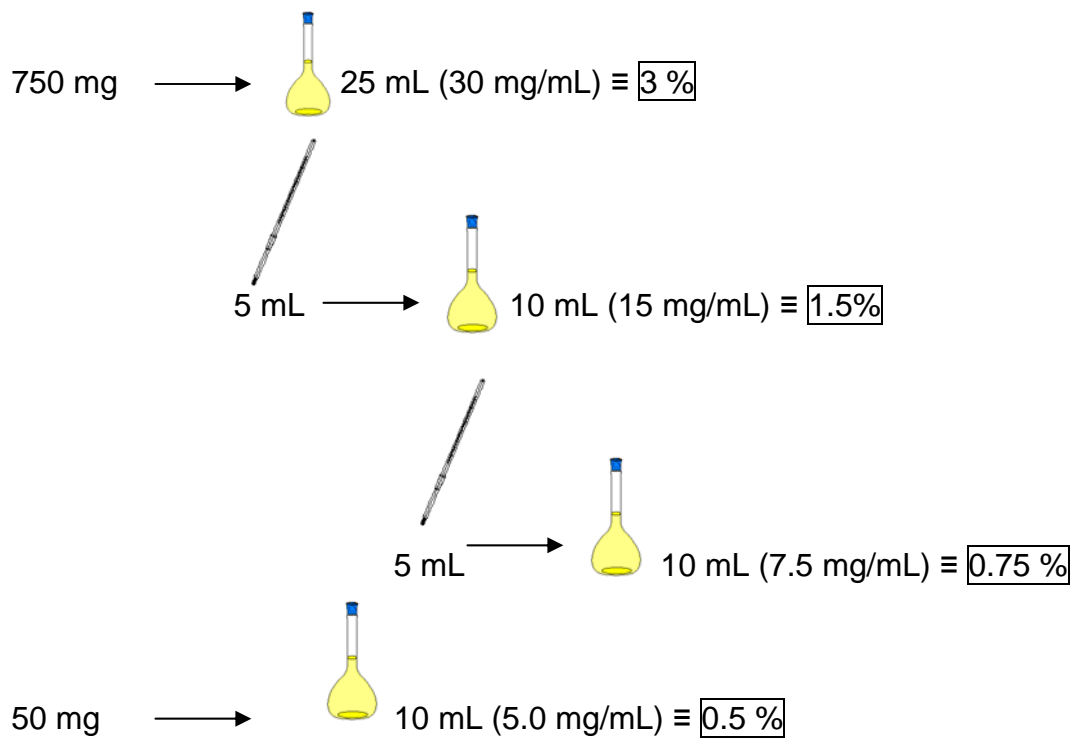


Figura No 52 Esquema del Fraccionamiento bioguiado.

ANEXO Nº 5

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LAS FRACCIONES EN ESTUDIO.

Para ***Streptococcus pneumoniae*** se realizaron las diluciones de 0.5%,
0.75%, 1.5% y 3%.



Nota: De cada una de las fracciones se peso inicialmente 750 mg para preparar la solución madre.

Figura Nº 53 Diluciones de las fracciones para ***Streptococcus pneumoniae***.

Para *Staphylococcus aureus* se realizaron las diluciones de 0.5 %, 1.05 %, 2.1 % y 3 %.

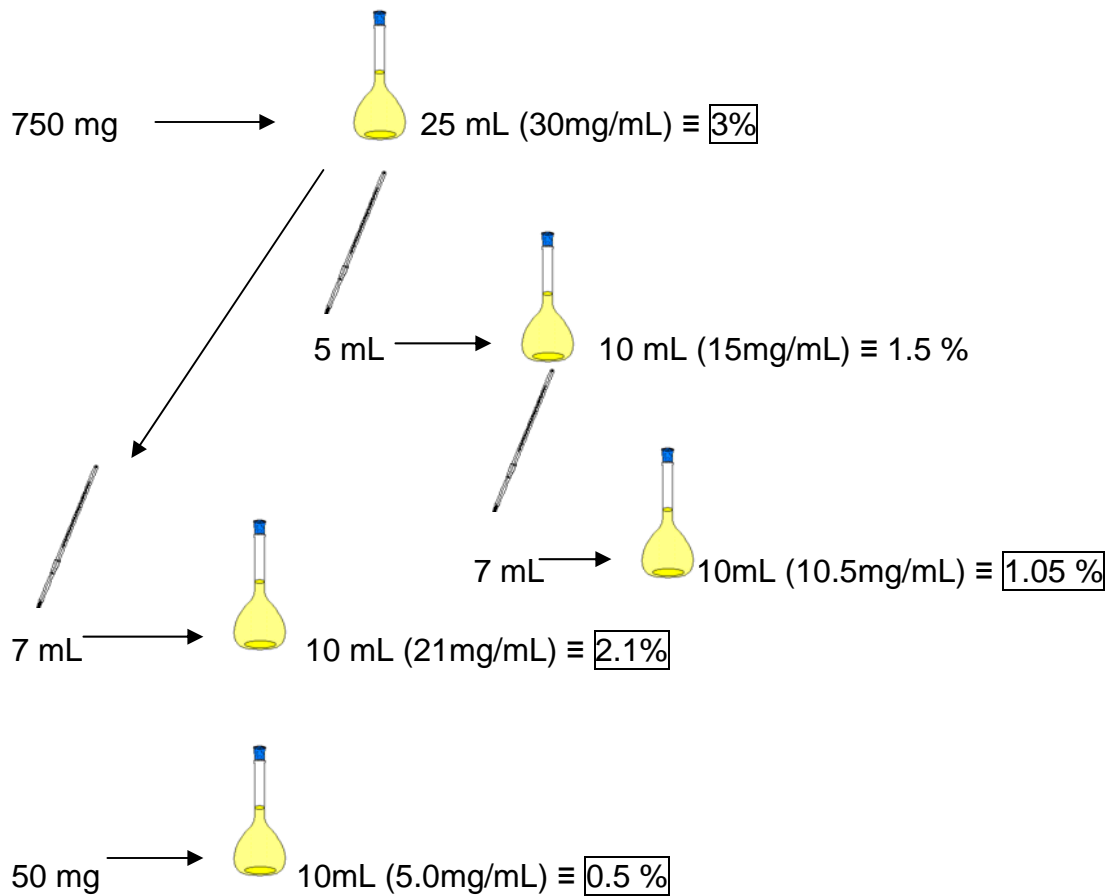


Figura № 54 Diluciones de las fracciones para *Staphylococcus aureus*.

Para *Pseudomona aeruginosa* se realizaron las diluciones 0.25 %, 0.5 %, 0.75

% y 1.05 %.

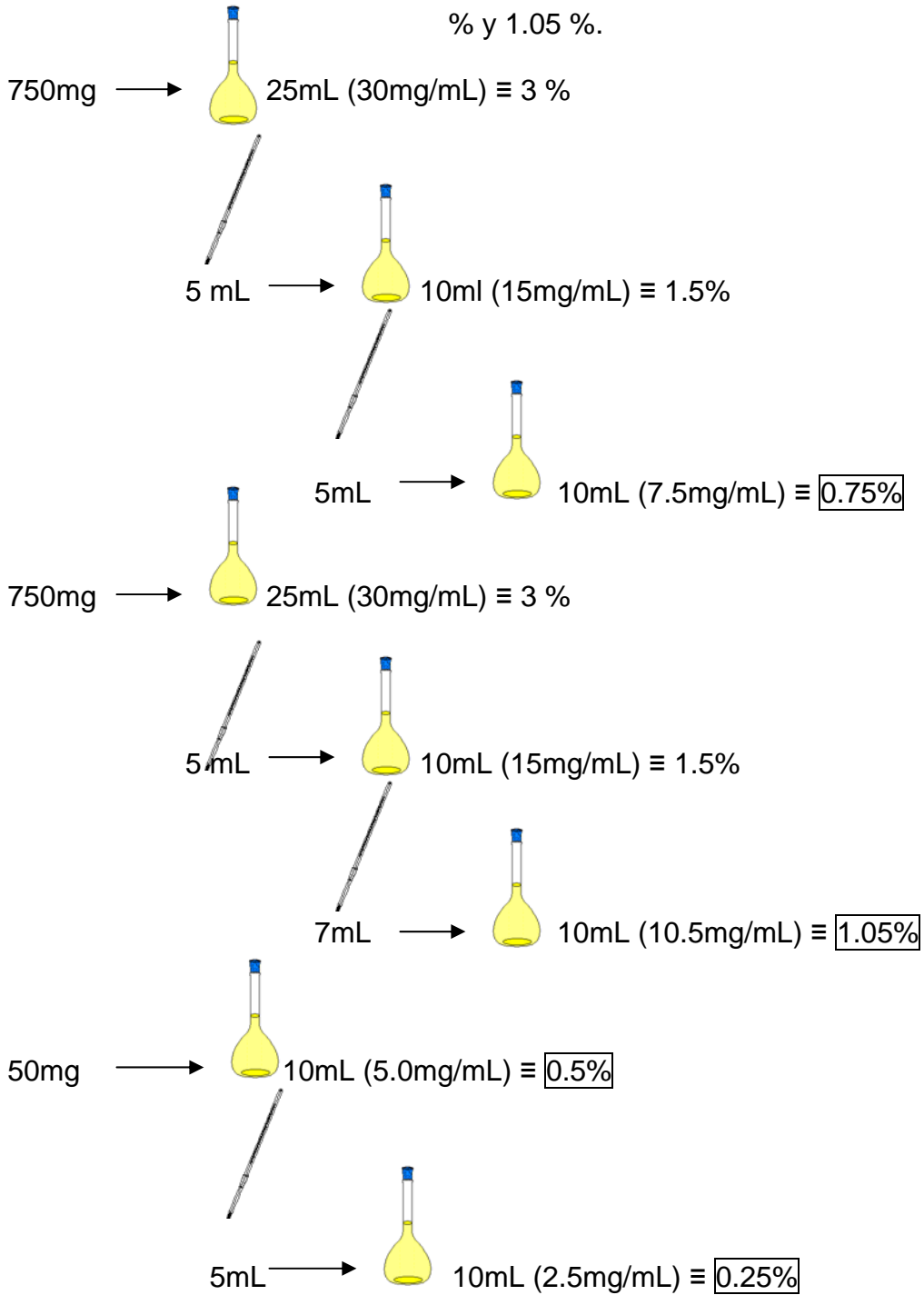


Figura Nº 55 Diluciones de las fracciones para *Pseudomona aeruginosa*.

ANEXO № 6

PRUEBAS MICROSCÓPICAS (COLORACIÓN AL GRAM)

PRUEBAS MICROSCÓPICAS (COLORACIÓN AL GRAM) ⁽¹⁾

Este método hace uso de colorantes orgánicos catiónicos como cristal violeta safranina con fuerte afinidad por materiales celulares con carga negativa como los ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos.

METODO:

1. Extensión: Se limpia con etanol 93% un portaobjeto, en este se coloca una gota de solución salina a la que con el asa de siembra, previamente esterilizada a la llama; se lleva una pequeña cantidad de suspensión de bacterias o, en su caso, de una colonia. Con el asa se extiende la gota y las bacterias sobre el portaobjetos y se fija la extensión por el calor, calentando suavemente a la llama del mechero hasta que se seque.

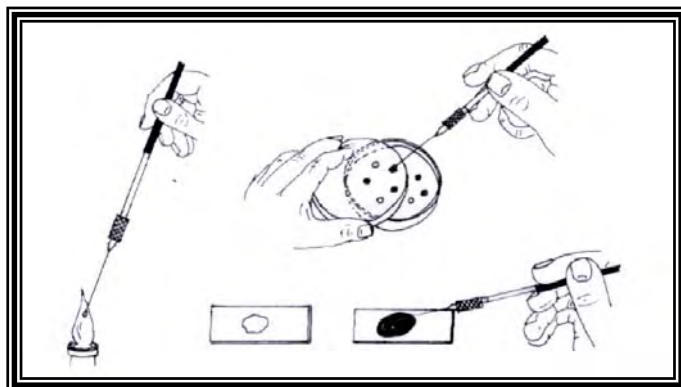


Figura Nº 56 – MÉTODO DE EXTENSIÓN

2. Coloración: Se llevan a cabo los siguientes pasos:

- a) 1 minuto en cristal violeta (colorante inicial),
- b) Se lava con agua destilada,
- c) 1 minuto en lugol (mordiente),
- d) Se decolora con alcohol de 95° (decolorante),
- e) Se lava con agua destilada,
- f) 1 minuto en safranina (colorante de contraste),
- g) Se lava con agua corriente y
- h) Se seca suavemente y sin frotar con papel de filtro.

Cuando la preparación esta totalmente seca, poner una gota muy pequeña de aceite de cedro de inmersión y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

ANEXO № 7

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.

Cuadro № 22 Resultados de Tinción al Gram.

MICROORGANISMO	INTERPRETACIÓN	COLORACIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram positivo	Azul
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	Gram negativo	Rosado
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Gram positivo	Azul

ANEXO № 8
CROMATOGRAFIA DE COLUMNA FLASH



Figura № 57 Cromatografía de columna flash.



Figura № 58 Elución de fracción *n*-hexano:acetato de etilo 70%.



Figura № 59 Elución de fracción acetato de etilo puro.



Figura № 60 Elución de fracción metanol puro



Figura № 61 Fracciones obtenidas

CUADRO No. 23 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN ⁽³⁴⁾

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>Catalasa</p>	<p>Identifica la enzima Catalasa que descompone el H₂O₂, característica que permite diferenciar los <i>Staphylococcus</i> de los <i>Streptococcus</i></p>	<p>Colocar una gota de H₂O₂ al 30% sobre una lamina portaobjetos y colocar una porción de colonia del microorganismo.</p>	<p>Se produce un burbujeo vigoroso del peróxido que indica la presencia de <i>Staphylococcus</i>.</p>
	<p>Coagulasa</p>	<p>Evidencia de reacción de coagulación del plasma sanguíneo que produce la enzima coagulasa.</p>	<p>Colocar 0.5 ml de plasma citratado. Inocular una colonia de microorganismo e incubar a 37°C por 24 horas</p>	<p>La observación de coagulación total o parcial del plasma, indica prueba positiva, y se interpreta como presencia de coagulasa, enzima característicamente producida por <i>Staphylococcus aureus</i></p>

ANEXO Nº 10
PRUEBAS BIOQUÍMICAS

CUADRO No. 24 PRUEBAS BIOQUÍMICAS (13)

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<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 (amarillo) 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. Se incuban de 24 a 48 horas a 37°C	Los organismos capaces de fermentar solamente la glucosa causan la formación del ácido dentro del agar, los que fermentan la sacarosa y la lactosa causan la formación de ácido en la parte alta del medio. La fractura indica la formación de gas, el medio ennegrecido indica la formación de H ₂ S. La prueba para <i>Pseudomona</i> debe indicar que no hay fermentación de azúcares, por lo que el pico es alcalino y el fondo es alcalino (cambiando de color el medio a rojo) con producción de gas.
	Citrato	Identifica la utilización del Citrato como única fuente de carbono que se visualiza por la elevación del pH en el colorante utilizado como indicador.	Inocular, la superficie del medio e incubar 24 horas a 37°C	Prueba positiva permite el crecimiento en el medio y el cambio de color es de verde a azul. En el resultado para <i>Pseudomona</i> debe observarse crecimiento y cambio de color en el medio
	Indol	Caldo de peptona con alto contenido de triptófano el cual es convertido en Indol.	Inocular el caldo con el microorganismo e incubar de 24 a 48 horas a 37°C. Añadir reactivo de Erlich (P-dimetil Amino Benzaldehído) por las paredes del tubo y ver la formación de anillo.	Prueba positiva da la formación de anillo violáceo en la interfase que identifica la presencia del Indol. Para <i>Pseudomona</i> no debe darse la formación de anillo violáceo.

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Rojo de Metilo	Indica fermentadores acido-mixto que producen suficiente acido para disminuir el pH por debajo de 4.3	Inocular el caldo con el microorganismo en estudio con un asa en punta e incubar a 37°C de 24 a 48 horas. Añadir gotas de indicador rojo de metilo.	La aparición de un rojo intenso que se mantiene es indicio de la caída de pH. En <i>Pseudomona</i> no se da la aparición de un color rojo intenso.
	Movilidad	Determina la capacidad de las bacterias de desplazarse en medios sólidos por medio de flagelos peritricos característicos de las Enterobacterias.	Inocular el medio hasta el fondo con el microorganismo con una asa en punta e incubar durante 24 a 48 horas a 37°C	Si las bacterias no son móviles, el crecimiento no se difunde más allá de la línea de puntura. Pero si es móvil el crecimiento se difunde visualmente formando turbidez. Para <i>Pseudomona</i> el crecimiento debe difundirse formando turbidez por lo que es móvil.
	Voges-Proskauer	Determina la presencia de acetyl Carbinol que es una acetona producida por la fermentación de la dextrosa.	Inocular el caldo con el cultivo del microorganismo e incubar de 24 a 48 horas a 37°C. Añadir gotas de α -naftol, alcohol absoluto y KOH 40%	El desarrollo de una coloración roja que perdura de 15 a 30 minutos, indica la presencia de acetyl carbinol. Para <i>Pseudomona</i> no debe haber cambio de color.

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<p><i>Pseudomona aeruginosa</i></p>	<p>Oxidasa</p>	<p>Determina la presencia de enzimas oxidasas. 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>Se toma una colonia proveniente de una placa de agar sangre de carnero de 15 a 24 horas de incubación. Se frota sobre un pedazo de papel filtro impregnado con una gota del reactivo de oxidasa modificado (6% hidrocloreuro de tetrametilfenildiamina dimetil sulfóxido). Se observa la reacción en el término de dos minutos.</p>	<p>El desarrollo de una coloración azul oscuro indica la presencia de enzimas oxidasas, si la zona de frotación permanece incolora indica una prueba negativa. <i>Pseudomona aeruginosa</i> da prueba positiva de oxidasa por lo que se da el viraje de color a azul oscuro.</p>

CUADRO No. 25 PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN (15)

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Optoquina (Clorhidrato de etilhidroxicu-preína)	Inhibe selectivamente el crecimiento de <i>S. pneumoniae</i> en concentraciones muy bajas (5 µg/ml o menos). Pero puede inhibir otros streptococos α-hemolíticos, solo en concentraciones mayores. La zona de inhibición del crecimiento se da cuando las células alrededor del disco son lisadas debido a cambios en la tensión superficial.	Inocular por diseminación la superficie de Agar sangre con el microorganismo a prueba, colocar los discos de Optoquina sobre la superficie del área sembrada y presionar suavemente para que este se adhiera a la superficie. Invertir la placa e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas en un frasco con vela o en incubadora de CO ₂ .	Se considera prueba positiva cuando hay inhibición del desarrollo bacteriano, alrededor del disco de Optoquina.

ANEXO Nº 12

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR McFARLAND ⁽¹⁾

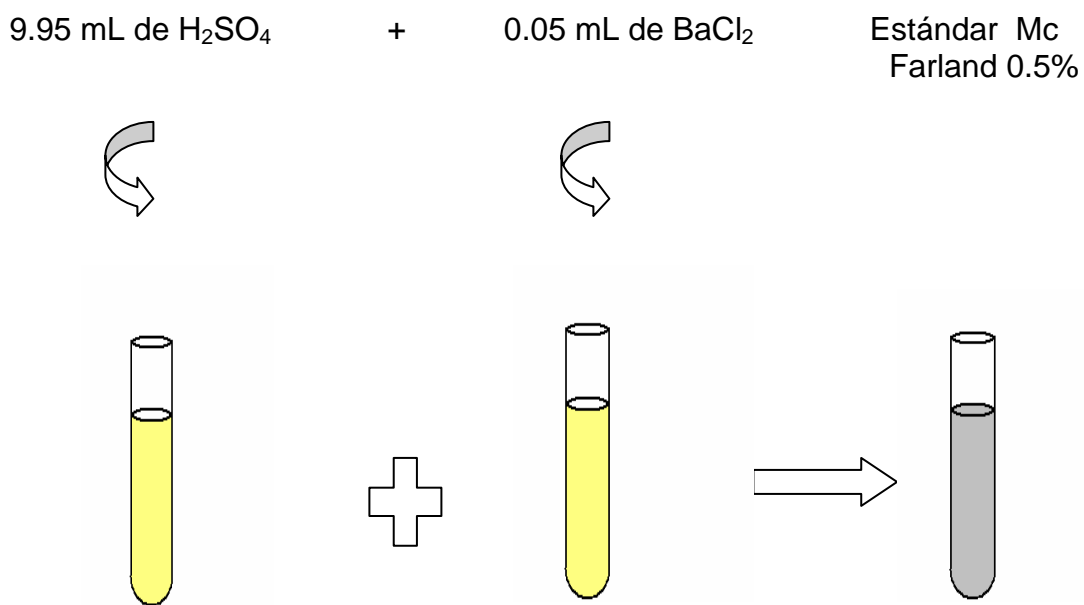


Figura Nº 62 Preparación del Estándar McFarland.

Densidad celular aproximada de 1.5×10^8 microorganismos/mL.

Preparación de la suspensión de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pneumoniae***: 10 mL de caldo nutritivo + cantidad necesaria de microorganismos.

ANEXO Nº 13
MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO ⁽³¹⁾

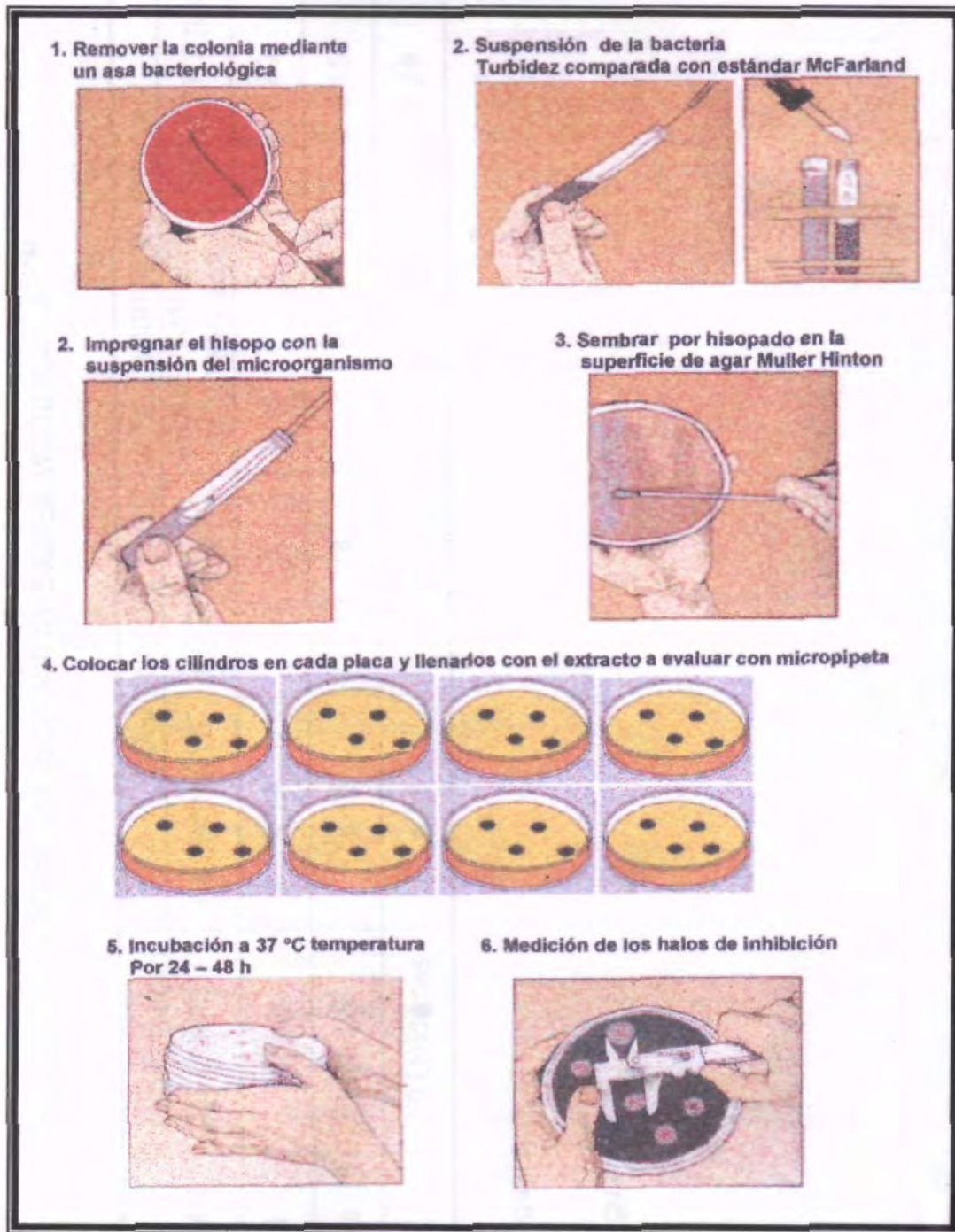
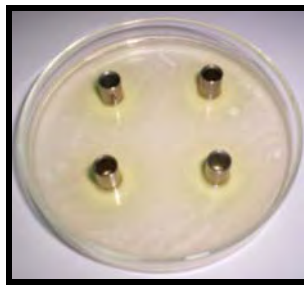


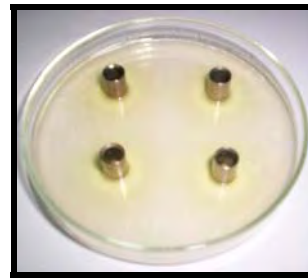
Figura Nº 63 Esquema del Método de Kirby Bauer Modificado.

ANEXO Nº 14
RESULTADOS DEL MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO EN
Staphylococcus aureus.

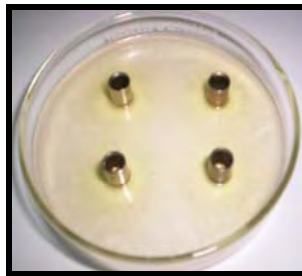
FRACCIÓN *n*-HEXANO:ACETATO DE ETILO 70%.



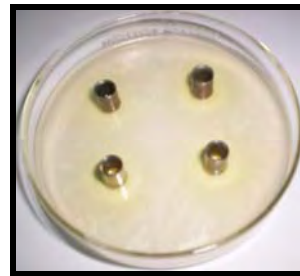
0.5 %



1.05 %



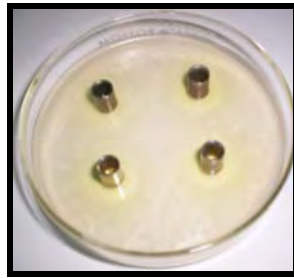
2.1 %



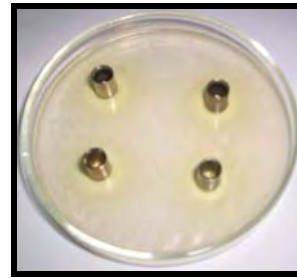
3 %

Figura Nº 64 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*.

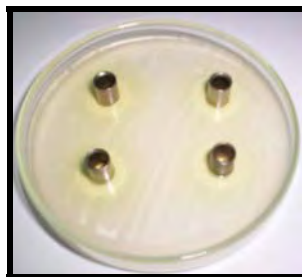
FRACCIÓN ACETATO DE ETILO PURO.



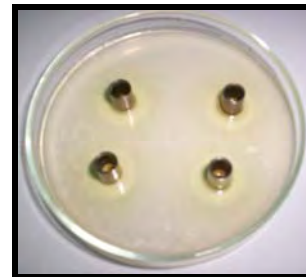
0.5 %



1.05 %



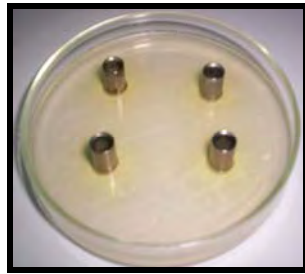
2.1 %



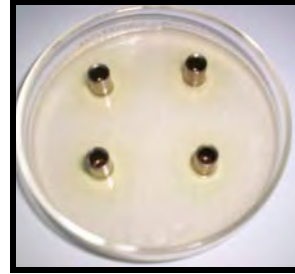
3 %

Figura № 65 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*.

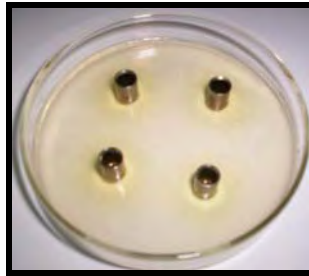
FRACCIÓN METANOL PURO.



0.5 %



1.05 %



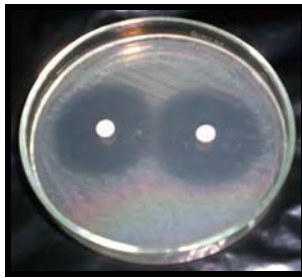
2.1 %



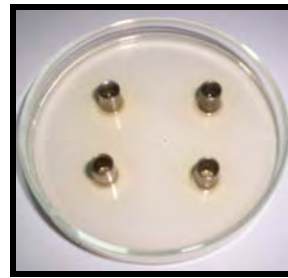
3 %

Figura № 66 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*.

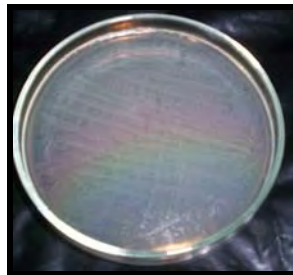
PATRONES Y CONTROLES



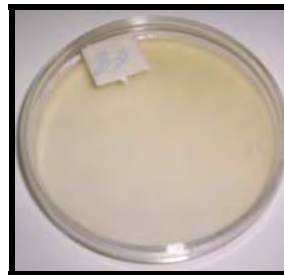
Patrón: Penicilina



Patrón: Yodo 2%



Control Positivo



Control Negativo

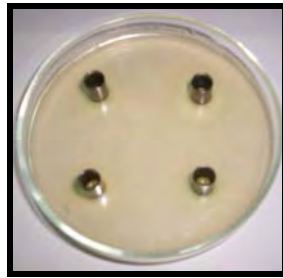


Blanco: Etanol 70 %

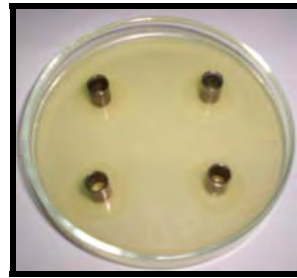
Figura № 67 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*.

ANEXO Nº 15
RESULTADOS DEL MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO EN
Pseudomonas aeruginosa.

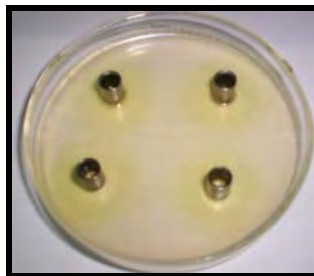
FRACCIÓN *n*-HEXANO:ACETATO DE ETILO 70%.



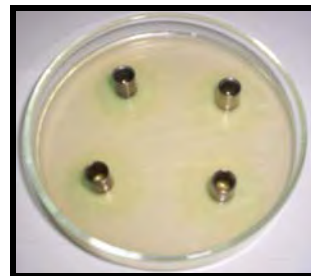
0.25 %



0.5 %



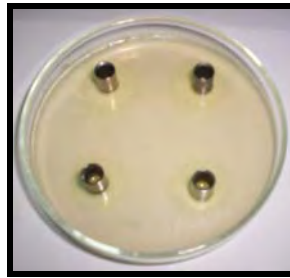
0.75 %



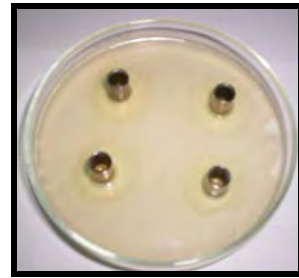
1.05 %

Figura № 68 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Pseudomonas aeruginosa*.

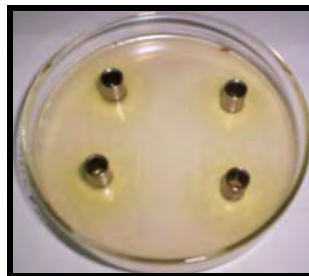
FRACCIÓN ACETATO DE ETILO PURO.



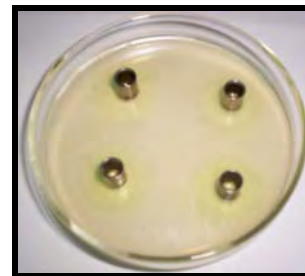
0.25 %



0.5 %



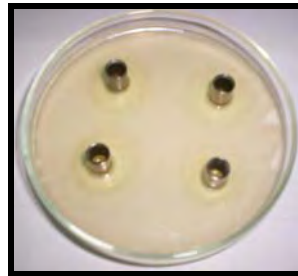
0.75 %



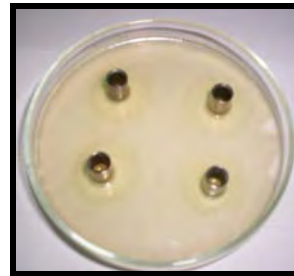
1.05 %

Figura № 69 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Pseudomonas aeruginosa*.

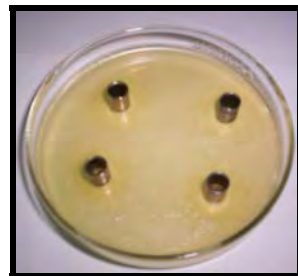
FRACCIÓN METANOL PURO.



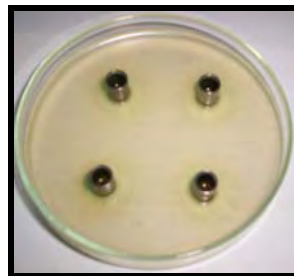
0.25 %



0.5 %



0.75 %



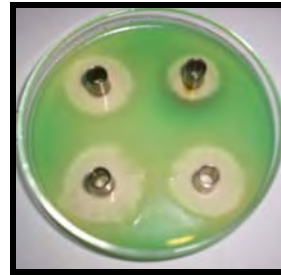
1.05 %

Figura № 70 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Pseudomonas aeruginosa*.

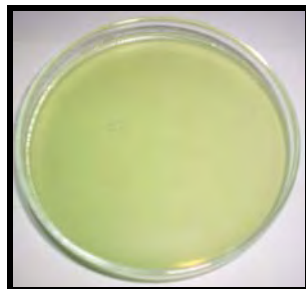
PATRONES Y CONTROLES



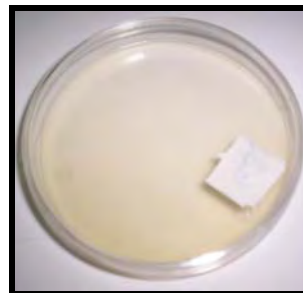
Patrón: Gentamicina



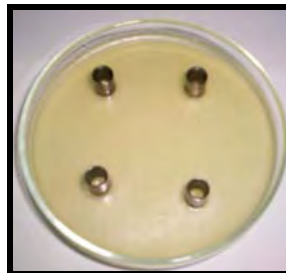
Patrón: Yodo 2%



Control Positivo



Control Negativo

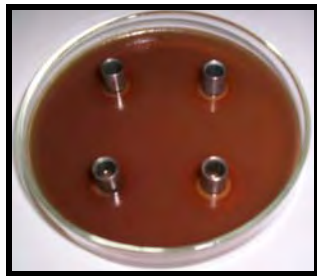


Blanco: Etanol 70 %

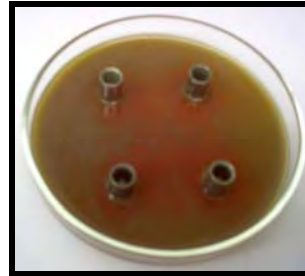
Figura Nº 71 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Pseudomona aeruginosa*.

ANEXO № 16
RESULTADOS DEL MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO EN
Streptococcus pneumoniae.

FRACCIÓN *n*-HEXANO:ACETATO DE ETILO 70%.



0.5 %



0.75 %



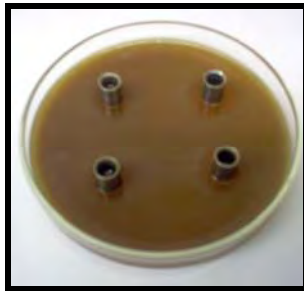
1.5 %



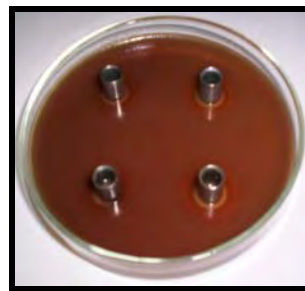
3 %

Figura № 72 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pneumoniae*.

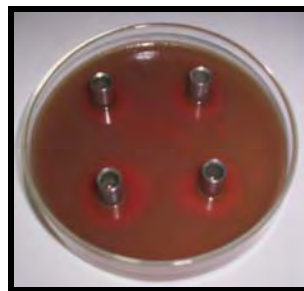
FRACCIÓN ACETATO DE ETILO PURO.



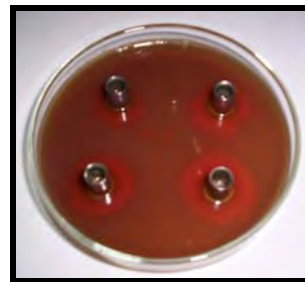
0.5 %



0.75 %



1.5 %



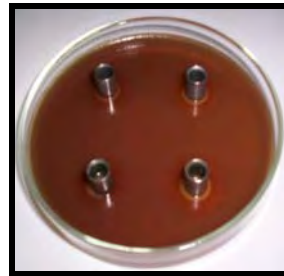
3 %

Figura № 73 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pneumoniae*.

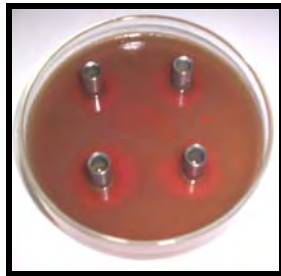
FRACCIÓN METANOL PURO.



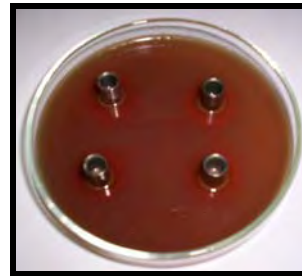
0.5 %



0.75 %



1.5 %



3 %

Figura № 74 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pneumoniae*.

PATRONES Y CONTROLES



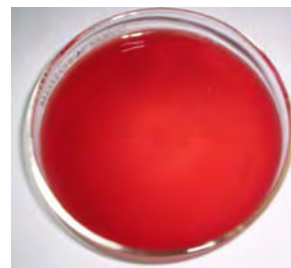
Patrón: Ampicilina



Patrón: Yodo 2 %



Control Positivo



Control Negativo



Blanco: Etanol 70 %

Figura Nº 75 Resultados de la evaluación microbiológica por el método Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pneumoniae*.

ANEXO Nº 17

Cuadro Nº 26 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ⁽³²⁾

MEDIO DE CULTIVO	PREPARACIÓN
Agar Chapman	Disolver 146.5 g/Lt, esterilizar en autoclave (15 min. a 121°C) y verter en placas. pH \pm 0.2. Las placas con medios de cultivo son claras e incoloras.
Agar Baird Parker	Disolver 58 g en 0.95 Lt, esterilizar en autoclave (15 min. a 121°C), enfriar a 45-50°C, añadir mezclando 50 mL de emulsión de yema de huevo telurito y eventualmente, 50 mg/Lt de Sulfametacina, pH 6.8 ± 0.2 .
Agar Cetrimide	Disolver 44.5 g/Lt, esterilizar en autoclave (15 min. a 121°C) y verter en placa. pH 7.2 ± 0.2
Base Agar Sangre	Disolver 37 g en un Lt, de agua destilada, llevar a ebullición agitando frecuentemente hasta conseguir una completa disolución. Esterilizar en autoclave (15 min. a 121°C). Enfriar a 50°C y añadir 5-7% (60mL) de sangre de carnero desfibrinada estéril, precalentada a 37°C. Mezclar suavemente y verter en placas de petri estériles.
Agar Muller-Hinton	Disolver 34 g/Lt, esterilizar con cuidado en autoclave, enfriar eventualmente a 45-50°C para incorporar del 5-10% de sangre desfibrinada. Verter en placas. pH 7.4 ± 0.2 . Las placas con medio de cultivo sin sangre son claras y de color amarillo.
Caldo Nutritivo	Suspender 13 g en 1Lt de agua destilada o desionizada, mezclar bien, distribuir y esterilizar a 121°C por 15 min.
Trypticase Soya Agar	Disolver 40 g en 1 Lt de agua desmineralizada por calentamiento en un baño de agua hirviendo o en baño de vapor; tratar en autoclave (15 min. a 121°C), verter placas.

ANEXO Nº 18
MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLVENTES.

MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLVENTES.

Material Vegetal

- Goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

Cepas de Referencia

- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619

Material de Laboratorio

- Agitadores de vidrio
- Beakers (250, 100, 50, 30 mL)
- Embudos de vidrio
- Ampollas de separación (125, 60 mL)
- Erlenmeyers (500, 250mL)
- Probetas (100, 25, 10 mL)
- Vidrio reloj
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con rosca
- Pipetas Mohr (5 y 1 mL)
- Pipetas volumétricas (5.0, 1.0 mL)
- Balón fondo redondo de 500 ml
- Cajas de petri
- Laminas portaobjetos
- Frasco de vidrio color ámbar con tapón de rosca (500 mL)
- Asas bacteriológicas
- Guantes de asbesto
- Pipeteadores
- Mecheros Bunsen
- Aros metálicos
- Trípode
- Capsula de porcelana
- Mortero y pistilo
- Espátula metálica
- Microespátula
- Gradilla para tubos
- Malla de asbesto
- Baño María
- Pinzas (para crisol, de extensión y de soporte)
- Papel filtro
- Papel toalla
- Papel aluminio

- Tirro
- Etiquetas
- Plumones
- Fósforos
- Mangueras para entrada y salida de agua
- Gabacha, mascarilla, gorro y guantes estériles

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 Mettler: modelo PM400, serie SNR1243297.
- Balanza granataria: marca Cenco Central Schentific Company. Triple Beam Balance USA. PAT.No. 2,729.439 capacity 2610g
- Hot plate fisher: modelo -75h, serie 557101947
- Microscópio: marca Tisher Micromaster, modelo Input:11GUEOH₂125
- Refrigeradora marca CETRON
- Rotaevaporador Büchi R-205
- Aparato soxhlet de 2 Lt

Reactivos y Solventes

- Diclorometano
- Alcohol etílico 95%
- Acetato de etilo
- Indicador rojo de metilo
- α -Naftol
- Hidróxido de potasio 5 o 10%
- Nitrato básico de bismuto
- Éter etílico
- *n*-hexano
- Alcohol isopropílico
- Acetona calidad reactivo
- Acetona industrial
- Metanol
- Peroxido de hidrogeno 30%
- Cristal violeta sólido
- Alcohol-cetona
- Lugol
- Safranina
- Amoniaco

- Agua destilada
- Silica gel (0.015- 0.040 mm)

Medios de Cultivo

- Agar Muller-Hilton
- Agar tripticasa soya
- Agar citrato
- Agar ***Staphylococcus*** 110
- Agar tres azúcares y hierro
- Caldo rojo de metilo
- Caldo voges-proskauer
- Caldo urea
- Medio de Movilidad
- Agar Sangre
- Agar cetrimide
- Plasma sanguíneo
- Solución salina estéril