

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
(*Staphylococcus aureus*) Y ANTIFÚNGICA (*Trichophyton mentagrophytes*)
DEL EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DEL PERICARPIO DEL FRUTO
Sapindus saponaria (Pacún)

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
JOSÉ WILFRIDO HERNÁNDEZ MONROY
LIDIA CATALINA REYES FLORES
CINDY MARIELOS VILLARREAL RODRÍGUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

JUNIO 2006

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

Dra. María Isabel Rodríguez

SECRETARIO GENERAL

Lic. 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

Lic. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

Lic. Arely Cáceres Magaña

ASESORA DE ÁREA ANÁLISIS DE ALIMENTOS: MICROBIOLÓGICO

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

DOCENTES DIRECTORES

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

Dr. Marvin José Núñez Rivas

Lic. Mercedes Tatiana Quinteros Pérez

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO: Por habernos brindado salud, sabiduría y la capacidad para alcanzar nuestros objetivos que se ven reflejados en la culminación de nuestros estudios.

A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES: Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda, Dr. Marvin José Núñez Rivas y Licda. Mercedes Tatiana Quinteros Pérez, por ser nuestros asesores y brindarnos sus conocimientos los cuales fueron de mucha importancia para la realización de este trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE ÁREA: Licda. María Concepción Odette Rauda, MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos y Licda. Arely Cáceres, por su orientación y tiempo dedicado para el desarrollo y culminación del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES: Licda. Amy Moran, Lic. Raúl Rodríguez y Dn. Juan José, técnicos de laboratorio por su apoyo durante la realización de la etapa experimental de dicho trabajo de investigación.

SINCERAMENTE: José Wilfrido Hernández Monroy, Lidia Catalina Reyes Flores y Cindy Marielos Villarreal Rodríguez.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso

Por ser la fuerza de la vida y la razón por la cual encontremos la paz interior, la tranquilidad del alma y el respeto por la vida y acción de los demás.

A mis Padres

Por darme la vida y enseñarme a emprender mi camino siguiendo principios morales y religiosos. A mi papá, José Guadalupe, le agradezco por ser ejemplo de integridad y ser mi héroe anónimo de todas mis batallas; y a mi mamá, Berta Monroy, por ser el amor incondicional, que sufre, ama y se enorgullece por cada uno de mis pasos.

A mis Hermanos

Por ser parte de mi vida y mi corazón, teniendo un vínculo imborrable de nuestra historia.

Alfonso, Elizabeth, Bertha Gloria y Reyna Guadalupe siempre los tengo en mi mente.

Ángel Antonio, Santos Gilberto y Pedro, por ser los suficientemente buenos conmigo y ayudarme en todo este camino.

A mis Sobrinos

Por ser mi nuevo motor de ser y por los cuales luchare para ser ejemplo.
Anthony, Floribeth, Jennifer, Jason, Ángel Enrique y Fernandito, gracias por iluminar mi vida con su inocencia y ternura.

A mis Compañeras de Tesis

Por emprender juntos las luchas, risas y preocupaciones en todo este largo caminar para llegar a esta meta.

A mis Amigos

Gracias por acompañarme en los diferentes puntos de mi vida.

SINCERAMENTE: José Wilfrido Hernández Monroy.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso

Por permitirme tener unos padres maravillosos que me supieron guiar en las diferentes etapas de mi vida, por haberme dado salud e inteligencia para poder tomar las mejores decisiones, gracias por darme la oportunidad de alcanzar mi meta propuesta.

A mis Padres

Yanira de Reyes y César Antonio Reyes por todo su amor, cariño y por el apoyo incondicional que siempre me dieron en los momentos más difíciles, mil gracias por todo el esfuerzo que realizaron para poder sacarme adelante.

A mis Hermanas

Yanira Beatriz y Linda Cristina por siempre estar a mi lado apoyándome y por toda la alegría que dan a mi vida.

A mis Abuelas

Lidia Morán y María Catalina Reyes por su cariño, amor y por las palabras de motivación que me ayudaron a seguir adelante.

A mis Tías y Tío

Emperatriz, Zeira, Lidia, Alcira, Sandra y Erick por el cariño y apoyo incondicional que siempre me brindaron cuando más lo necesite.

A mi Novio

Freddy Alexander Carranza por su amor, comprensión, colaboración y sobre todo por estar a mi lado en los momentos más significativos de mi vida.

A mis Compañeros y Amigos

Cindy Marielos Villarreal y José Wilfrido Hernández por su valiosa amistad, colaboración, comprensión y cariño durante todos estos años y por todos los momentos gratos que hemos convivido a lo largo de estos años.

SINCERAMENTE: Lidia Catalina Reyes Flores.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso

Por darme vida, salud, fortaleza y fé para seguir adelante, por ser mi consuelo, mi amor eterno, y guiarme cada día en la búsqueda de mi superación.

A mis Padres

José Alfredo Villarreal, por su apoyo y por sus consejos los cuales me formaron como persona.

Rosa María de Villarreal, por su amor incondicional, y su entrega, por estar siempre a mi lado cuando más la necesité apoyándome y siempre creyendo en mí.

A mis Abuelos

Alberto Rodríguez (De grata recordación) y Alicia de Rodríguez, por sus oraciones, por el amor que me entregaron cada día a lo largo de mi vida, porque siempre estuvieron brindándome su apoyo en los momentos más difíciles.

A mis Hermanas

Mariella Beatriz, por ser mi complemento, mi apoyo, mi compañera inseparable de penas y alegrías.

María José, por llenar mi vida con tu alegría y amor haciendo que los momentos difíciles fueran más fáciles de superar.

A mis Tías (os)

Silvia y Rafael, Jorge y Gloria y Marta, por extenderme su mano y brindarme su apoyo en los momentos de dificultad, por confiar y creer en mí.

A mis Demás Familiares y Amigos

Que de un modo u otro estuvieron presentes en mi vida dándome ánimos para seguir adelante.

A mis Compañeros y Amigos

Lidia Catalina Reyes y José Wilfrido Hernández, por su comprensión y su ayuda no solo a lo largo de la elaboración de este trabajo, sino por brindarme su amistad sincera y por compartir conmigo alegrías, preocupaciones, triunfos y fracasos.

SINCERAMENTE: Cindy Marielos Villarreal Rodríguez.

INDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	xxv
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Específicos	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	31
3.1 Monografía de <i>Sapindus saponaria</i> (Pacún)	31
3.2 Generalidades sobre metabolitos secundarios de origen vegetal	33
3.2.1 Algunos metabolitos secundarios aislados del género <i>Sapindus</i>	41
3.3 Métodos generales de extracción	44
3.3.1 Extracción con Soxhlet	44
3.3.2 Fraccionamiento bio-guiado	45
3.4 Generalidades sobre cromatografía	46
3.4.1 Cromatografía en capa fina	47
3.4.2 Determinación del coeficiente de reparto (R_f)	48

3.5 Generalidades de las cepas sometidas a bioensayo	53
3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	53
3.5.1.1 Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	55
3.5.2 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	58
3.5.2.1 Identificación de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	59
3.6 Pruebas de Susceptibilidad Microbiana	60
3.6.1 Prueba de Susceptibilidad por Dilución en Agar	60
3.6.2 Método de Difusión en Placa	61
3.6.3 Macrodilución en caldo	62
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	64
4.1 Tipo de estudio	64
4.2 Investigación bibliográfica	65
4.3 Investigación de campo	65
4.4 Investigación de laboratorio	66
4.4.1 Ensayos fitoquímicos	66
4.4.1.1 Análisis fitoquímico preliminar	66
4.4.1.2 Cromatografía de capa fina (CCF)	67
4.4.2 Ensayos microbiológicos	68
4.4.2.1 Pruebas de identificación microbiológica	68
4.4.2.2 Determinación de la actividad antimicrobiana	69

CAPITULO V	
5.0 RESULTADO Y DISCUSIÓN DE RESULTADO	77
5.1 Resultado del análisis fitoquímico preliminar	77
5.2 Cromatografía de capa fina (CCF)	78
5.3 Resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹ H)	81
5.4 Estudios microbiológicos	81
5.4.1 Pruebas de identificación	82
5.4.2 Estudio de la actividad antimicrobiana	83
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	89
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	92
BIBLIOGRAFÍA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

INDICE DE ANEXOS

Anexo No.

1. Fotografías de ***Sapindus saponaria***.
2. Diez primeras causas frecuentes de morbilidad atendidas en consulta ambulatoria.
3. Principales zonas de distribución de ***Sapindus saponaria*** (Pacún) en El Salvador.
4. Esquema de Trabajo.
5. Aparatos utilizados para la obtención del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún).
6. Procedimiento de obtención del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún).
7. Resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares de obtención del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún).
8. Cromatografía de capa fina.
9. Espectro de resonancia magnética de protón obtenido del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún).
10. Tinción al Gram para ***Staphylococcus aureus***.
11. Identificación y diferenciación para ***Staphylococcus aureus***.
12. Identificación y diferenciación para ***Trichophyton mentagrophytes***.
13. Resultado de morfología macroscópica y microscópica para ***Staphylococcus aureus***.

14. Resultado de Identificación de ***Staphylococcus aureus***.
15. Resultado de morfología macroscópica y microscópica para ***Trichophyton mentagrophytes***.
16. Resultado de la prueba del cebo de pelo.
17. Preparación del estándar de Mc Farland.
18. Esquema de Kirby Bauer Modificado.
19. Esquema de placa vertida.
20. Preparación de la solución madre.
21. Esquema de dilución en caldo.
22. Resultado de la evaluación antibacteriana del extracto diclorometánico de pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún) frente a ***Staphylococcus aureus***.
23. Resultado de la siembras en placas con agar TSA de la serie de dilución en caldo para ***Staphylococcus aureus***.
24. Resultado de la evaluación antifúngica del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** frente a ***Trichophyton mentagrophytes***.
25. Resultado de la siembras en placas con agar Dextrosa Sabouraud de la serie de dilución en caldo para ***Trichophyton mentagrophytes***.
26. Preparación de medios de cultivo.
27. Preparación de reactivos reveladores.
28. Material y equipo.

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.

1. Sesquiterpenlactonas
2. Antraquinonas
3. Glicósidos cardiotónicos
4. Glicósidos Flavonoides
5. Alcaloides
6. Taninos
7. Glicósidos saponínicos
8. Tipos de cromatografía
9. Características macroscópicas de los microorganismos.
10. Pruebas de identificación específicas.
11. Pruebas de identificación específicas para los microorganismos a utilizar.
12. Pruebas de identificación y diferenciación para ***Staphylococcus aureus***.
13. Pruebas de identificación y diferenciación para ***Trichophyton mentagrophytes***
14. Preparación de medios de cultivo.

INDICE DE TABLAS

Tabla No.

1. Resultado de análisis organoléptico del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria***.
2. Pruebas químicas realizadas en tubo y cromatografía de capa fina cuyo resultado es positivo.
3. Resultados obtenidos en la cromatografía de capa fina, realizada en la fase móvil *n*-hexano-cloroformo (4:6).
4. Resultados obtenidos al resembrar los tubos con ***Staphylococcus aureus*** en agar TSA.
5. Resultados obtenidos al resembrar los tubos con ***Trichophyton mentagrophytes*** en agar Dextrosa Sabouraud.
6. Causas frecuentes de morbilidad atendidas en consulta ambulatoria (Enero-Diciembre 2003).

INDICE DE FIGURAS

Figura No.

1. Saponina triterpénica (I).
2. Saponina triterpénica (II).
3. Triterpeno de la serie del oleano.
4. Sesquiterpeno acíclico.
5. Fotografías de ***Sapindus saponaria***.
6. Fotografía captada por satélite de las principales zonas de distribución de ***Sapindus saponaria*** en El Salvador (Fuente: **Jardín Botánico de Missouri**).
7. Esquema de trabajo
8. Aparato Soxhlet.
9. Aparato Rotaevaporador.
10. Prueba de Salkowski.
11. Prueba de la espuma.
12. Cromatografía de capa fina realizada al extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún) fase móvil *n*-hexano-cloroformo (4:6) revelador universal vainillina ácido sulfúrico.
13. Espectro de RMN ¹h (300 MHz, CDCl₃) del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto ***Sapindus saponaria*** (Pacún).
14. ***Staphylococcus aureus*** Gram (+).
15. ***Staphylococcus aureus*** en agar Chapman.

16. ***Staphylococcus aureus*** en agar Baird Parker.
17. Prueba de la catalasa.
18. Prueba de la coagulasa.
19. Prueba de azul algodón lactofenol para ***Trichophyton mentagrophytes***.
20. ***Trichophyton mentagrophytes*** en agar Dextrosa Sabouraud.
21. Prueba del cebo de pelo para ***Trichophyton mentagrophytes***.
22. Prueba del cebo de pelo (+).
23. Prueba de cebo de pelo (-).
24. Esquema de Kirby Bauer Modificado.
25. Evaluación del extracto diclorometánico de pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún) realizada por el método de dilución en caldo para ***Staphylococcus aureus*** en concentraciones de 50 mg/mL, 35 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL.
26. Controles utilizados para la evaluación antimicrobiana del Extracto Diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún)
27. Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en caldo en Agar Tripticasa Soya (TSA) para ***Staphylococcus aureus*** en concentraciones de 50 mg/mL, 35 mg/mL 25 mg/mL, 12.5 mg/mL.
28. Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en caldo en Agar Tripticasa Soya (TSA) para ***Staphylococcus aureus*** en concentraciones de 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL y control positivo.

29. Evaluación del extracto diclorometánico de pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún) realizada por el método de dilución en caldo para ***Trichophyton mentagrophytes*** en concentraciones de 50 mg/mL, 35 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL.
30. Controles utilizados para la evaluación antimicrobiana del Extracto Diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Trichophyton mentagrophytes*** (Pacún)
31. Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en caldo en Agar Dextrosa Sabouraud para ***Trichophyton mentagrophytes*** en concentraciones de 50 mg/mL, 35mg/mL, 25 mg/mL y 12.5 mg/mL.
32. Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en caldo en Agar Dextrosa Sabouraud para ***Trichophyton mentagrophytes*** en concentraciones de 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL y control positivo.

RESUMEN

Sapindus saponaria (Pacún) es una especie vegetal que tiene diferentes usos que van desde artesanales hasta terapéuticos.

Este es un árbol que posee un fruto globoso el cual se recolectó directamente del árbol y del que ha caído al suelo. Del fruto recolectado se tomó el pericarpio, se dividió finamente y se extrajo a reflujo con etanol al 95 % v/v en Soxhlet, luego se concentró el extracto por medio de evaporación del disolvente en un rotaevaporador. Para la partición líquido-líquido se suspendió el residuo en agua-diclorometano y se extrajo la fracción diclorometánica, la cual se concentró en un rotaevaporador.

Una vez concentrado el extracto diclorometánico se procedió a realizar estudios fitoquímicos para determinar la presencia de metabolitos secundarios como glicósidos saponínicos, flavonoides, cardiotónicos, sesquiterpenlactonas y taninos, por medio de pruebas químicas en tubo y cromatografía de capa fina; luego se le realizaron ensayos microbiológicos para determinar la susceptibilidad de ***Staphylococcus aureus*** y ***Trichophyton mentagrophytes*** frente al extracto diclorometánico del pericarpio del fruto ***Sapindus saponaria*** (Pacún) a diferentes concentraciones.

La evaluación de la actividad antibacteriana (***Staphylococcus aureus***) y antifúngica (***Trichophyton mentagrophytes***) se realizó por medio de tres métodos los cuales fueron: Kirby Bauer Modificado, Placa Vertida o Dilución en Agar y Dilución en Caldo, siendo este último el más apropiado para la obtención

de resultados, utilizando como diluyente del extracto diclorometánico Tween 80 (Polisorbato 80) al 10% en Buffer Fosfato pH 7.2.

De acuerdo a los resultados obtenidos del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún), se confirmó la actividad inhibitoria frente *Staphylococcus aureus* a una concentración de 50 mg/mL y actividad fungicida frente a *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración de 50 mg/mL.



CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En El Salvador como en la mayoría de países de Latinoamérica las infecciones provocadas por microorganismos tales como bacterias y hongos, presentan un problema para la salud de la población, estos microorganismos encuentran las condiciones ideales que aporta la región como: humedad, luz, nutrientes, etc. En dichas condiciones el nivel de defensa de las personas, es determinante en la proliferación de diversas enfermedades infecciosas, generando al individuo infectado una serie de trastornos metabólicos que se manifiestan en malestares como: fiebre, inflamación, irritación, dolor y en casos extremos causar la muerte. (Ver anexo No.2)

Durante los últimos 5,000 años se ha encontrado en los productos naturales como hierbas, hongos saprofitos incluso helechos una fuente primaria de medicinas, que han sido empleadas para brindar alivio a las enfermedades. Solo hubo un cambio significativo en un gran período de tiempo, sin embargo, los últimos dos siglos han sido testigos del aislamiento de la primera droga comercial (morfina) y el uso de productos antimicrobianos (penicilina) como medicina. ⁽¹¹⁾

Ahora que comienza un nuevo milenio, la Organización Mundial de la Salud estima que el 80% de los habitantes del mundo consumen o han consumido medicinas naturales para el cuidado de la salud, estas medicinas tradicionales son basadas principalmente en plantas, e incluso el 20% restante de la población considera que los productos naturales son importantes para el cuidado de la salud.

Se estimó que el 25% de todas las prescripciones dispensadas en Estados Unidos contienen extractos de plantas o ingredientes activos derivados de éstas.

También se estimó que el 74% de los 119 fármacos importantes usados en medicina tradicional son ingredientes activos contenidos en las plantas.

En el presente trabajo de investigación se utilizó la especie vegetal ***Sapindus saponaria*** (Pacún).

El estudio se llevó acabo en tres partes definidas:

- Investigación Bibliográfica: consistió en reunir la mayor cantidad de información sobre estudios realizados a la especie vegetal y su familia, generalidades sobre extracción de metabolitos secundarios y sus propiedades físico-químicas y propiedades farmacológicas, cepas sometidas a prueba, y los métodos de evaluación microbiológicos
- Investigación Fitoquímica: consistió en la obtención del extracto diclorometánico obtenido del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria***, y su evaluación de los metabolitos secundarios por cromatografía de capa fina y pruebas en tubo de ensayo.
- Investigación microbiológica: consistió en la evaluación de la propiedad antibacteriana y antifúngica del extracto diclorometánico obtenido del pericarpio del fruto ***Sapindus saponaria*** por diferentes métodos y en microorganismos predefinidos (***S. aureus*** y ***T. mentagrophytes***), por lo cual se concluyó acerca del mejor método de evaluación y la efectividad del extracto.

Al final de todo este proceso, la investigación orientó a la probabilidad de que en un futuro los compuestos activos que estén contenidos en el material vegetal puedan ser aislados para determinar su estructura y evaluar su comportamiento y eficacia específica, así como también el desarrollo de nuevos métodos de obtención que proporcionen una alternativa para el combate de las enfermedades infecciosas.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus*) y antifúngica (*Trichophyton mentagrophytes*) del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún).

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 2.2.1 Efectuar la investigación bibliográfica.
- 2.2.2 Identificar y recolectar el fruto de *Sapindus saponaria* (Pacún).
- 2.2.3 Realizar el extracto etanólico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún).
- 2.2.4 Realizar la extracción líquido-líquido (agua-diclorometano) del extracto etanólico.
- 2.2.5 Efectuar el análisis fitoquímico preliminar al extracto diclorometánico.
- 2.2.6 Evaluar la actividad antibacteriana del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún) a diversas concentraciones frente *Staphylococcus aureus*, por el método de Kirby Bauer modificado, Dilución en Agar y Dilución en Caldo.
- 2.2.7 Evaluar la actividad antifúngica del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún) a diversas concentraciones frente a *Trichophyton mentagrophytes*, por el método de Kirby Bauer Modificado, Dilución en Agar y Dilución en Caldo.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 MONOGRAFÍA

Sapindus saponaria

Familia:

Sapindácea

Sinónimo:

S. inaequalis, *S. Marginatus*

S. drumondii, *S. Amolli*

Nombres populares:

Pacún, jaboncillo, huiril, jaboncillal, jabonera, bolitario, charapo, palo blanco, matamuchacho.

Descripción botánica:

Árbol de 8 a 10 metros de altura, de hojas compuestas alternas paripinnadas, con 6-18 foliolos, lanceoladas asimétricas, de color verde mate, de 3 a 4 pulgadas de largo, lisas en su cara superior. Las flores son blancas, pequeñas, en panojas terminales, de suave aroma; el cáliz es de cuatro sépalos e igual número de pétalos en la corola, 8 a 10 estambres. Ovario de tres carpelos, con óvulos envueltos en una capa carnosa que tiene un principio jabonoso abundante. La semilla es redonda, dura, negra, lustrosa. ^(8, 18)

(Ver Anexo No. 1)



Agricultura:

El *Sapindus saponaria* es común en climas cálidos y semi-cálidos; se propaga por estacas, brotes o semillas. ⁽⁴⁾. (Ver Anexo No. 3)

Usos terapéuticos populares:

El cocimiento de las hojas se usa oralmente como diurético sudorífico y contra edemas de origen renal. ⁽²²⁾

El fruto ha sido usado como febrífugo y en el tratamiento de reumatismo y enfermedades renales.

Otros usos:

Artesanal: Los frutos se usan para fabricar collares y rosarios.

Combustible: La madera se emplea localmente para leña.

Construcción: Se usa para postes, construcciones rurales y ocasionalmente para pequeños trabajos de carpintería.

Uso doméstico: Los frutos contienen aproximadamente 30% de saponina y cuando se maceran en agua producen una sustancia jabonosa con abundante espuma, por lo que se utilizan localmente para lavar la ropa como sustituto del jabón. Las semillas son venenosas y contienen de 35 a 40% de aceite no secante que posee propiedades insecticidas.

3.2 GENERALIDADES SOBRE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL ⁽³¹⁾

Los metabolitos primarios se encuentran en todas las plantas y desempeñan funciones vitales para el desarrollo del vegetal, como la obtención de energía, la morfogénesis o la reproducción. Aquí se incluye: bases nitrogenadas, ácidos grasos, aminoácidos, lípidos, proteínas, entre otros.

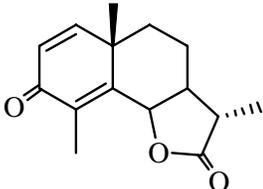
Los metabolitos secundarios se les considera como no esenciales para la vida, aunque pueden ser fundamentales para que pueda operar una determinada función biológica. Son, sin duda alguna, los compuestos de mayor interés farmacológico, los que van a constituir los llamados principios activos de las drogas.

Existe una gran cantidad de estructuras cuya presencia a lo largo de los taxones botánicos varía enormemente. Así, existen familias especialmente ricas en: taninos (***Rosaceae***), sesquiterpenlactonas (***Compositae***) y otras muchas cuya singularidad química es manifiesta.

Los grupos de metabolitos secundarios son: sesquiterpenlactonas, taninos, glicósidos saponínicos, glicósidos flavonoides, glicósidos cardiotónicos, etc.

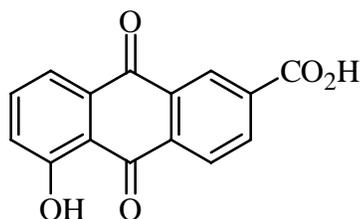
A continuación se presentan cuadros resúmenes de las generalidades físico-químicas y propiedades farmacológicas de los diferentes metabolitos secundarios:

Cuadro No. 1 Sesquiterpenlactonas

Santonina (Sesquiterpenlactona)	
 <p>Posee propiedad analgésica ^(5.31)</p>	
Propiedades Generales	Propiedades Farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Se clasifican de acuerdo a su esqueleto carbocíclico. • Incoloras o ligeramente coloreadas. • Sabor amargo. • Generalmente son sólidos cristalinos • Se encuentran principalmente en extractos de flores o partes aéreas de las compuestas. • Poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono. • Poseen un anillo metil butenólido. • Son derivados del germacrano. 	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad anti-inflamatoria • Actividad anti-artrítica. • Actividad anti-migrañosa. • Acción citoprotectora en ulcera gástrica.

Cuadro No. 2 Antraquinonas

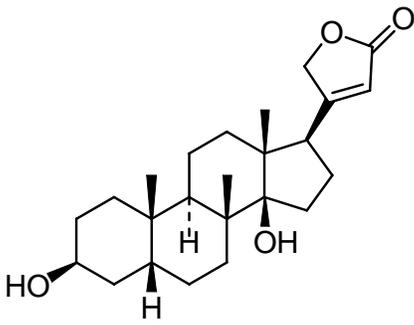
**Rheina
(Antraquinona)**



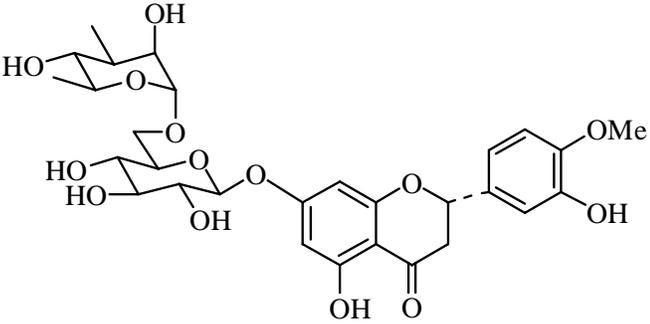
Se ha demostrado su actividad bacteriostática frente al ***Staphylococcus aureus***.^(5,31)

Propiedades Generales	Propiedades Farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Derivados del antraceno. • Se encuentran como heterósidos y geninas. • Los heterósidos son compuestos cristalinos, sublimables y solubles en agua. • Los OH en los carbono 1 y 2 le proporciona propiedad colorante. • Los heterósidos son compuestos cristalinos de coloración rojo-anaranjado. • Sus formas naturales son como glicósidos y como genina en forma oxidada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto laxante. • Actividad anti-microbiana. • Actividad anti-tumoral. • Efecto anti-psoriáticos. • Interfiere en la formación de cálculos en el riñón.

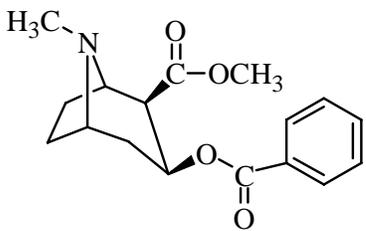
Cuadro No. 3 Glicósidos cardiotónicos

Digitoxigenina (Glicósido cardiotónico)	
	
<p>Acción directa sobre el músculo cardíaco aumentando la contractibilidad intrínseca de la fibra muscular y el volumen minuto. ^(5,31)</p>	
Propiedades Generales	Propiedades Farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Se encuentran como heterósidos. • Poseen anillo esteroidal. • Compuestos polares. • Se extraen con etanol o etanol-agua. • posee de 3-5 moléculas de monosacáridos. • Generalmente posee grupo hidroxilo en los carbonos 3 y 14. • En el carbono 17 generalmente se une una lactona, α-β insaturada. 	<ul style="list-style-type: none"> • Actúan directamente sobre el músculo cardíaco. • Poseen un margen terapéutico estrecho. • Su mecanismo de acción es muscular y nervioso. • Acción indirecta a través del Sistema Nervioso Autónomo, reduciendo la frecuencia sinusal y la velocidad.

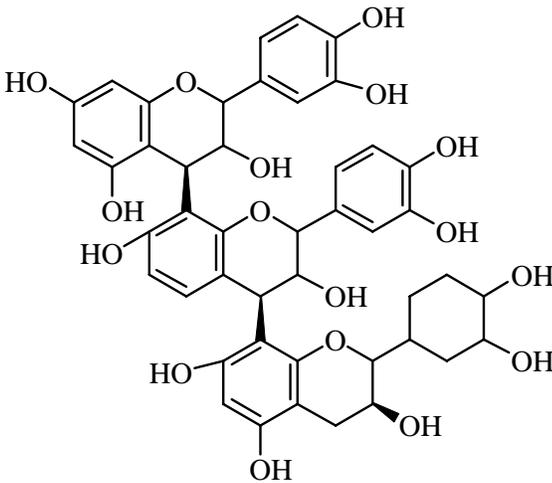
Cuadro No. 4 Glicósidos flavonoides

Hesperedina (Glicósido flavonoide)	
	
Antiinflamatorio. ^(5,31)	
Propiedades Generales	Propiedades Farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Fenoles del tipo diaril-propano unido a un azúcar. • Pigmentos vegetales. • Reacción de quelación con cationes polivalentes metálicos. • Se encuentran en estado libre o como glicósido. • Los glicósidos flavonoides dan color a flores, frutos y hojas. • Las agliconas se encuentran en tejido leñoso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Actividad vascular. • Actividad anti-inflamatoria. • Actividad sobre la ulcera péptica. • Actividad anti-microbiana. • Propiedad diurética. • Propiedad anti-alérgica

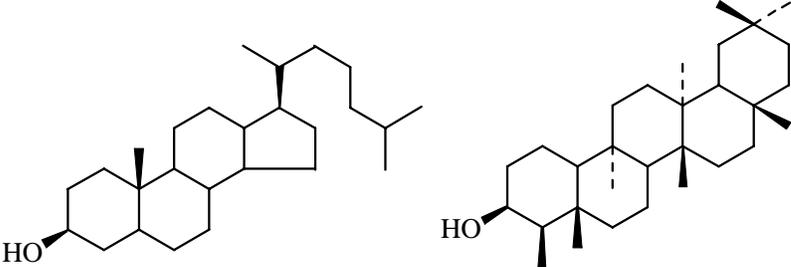
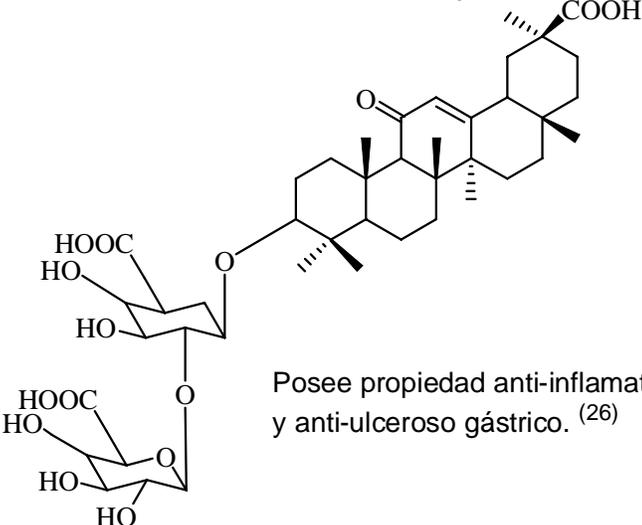
Cuadro No. 5 Alkaloides

Cocaina (Alcaloide del tropano)	
	
<p>Primer anestésico local, su estructura ha dado origen a análogos menos tóxicos. También posee actividad vaso-constrictora por vía tópica.^(5,31)</p>	
Propiedades Generales	Propiedades Farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Compuestos orgánicos. • Se forman a partir de aminoácidos. • Son sustancias nitrogenadas. • Son de estructura compleja. • Son tóxicos • Poseen carácter básico. • Precipitan con ciertos reactivos. • Contiene nitrógeno heterocíclico. 	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulantes /depresores del sistema nervioso central (S.N.C.). • Anti-fibrilantes. • Anti-espasmódico. • Actividad Anti-neoplásica. • Bloqueantes neuromusculares. • Anti-malárico.

Cuadro No. 6 Taninos

<p style="text-align: center;">Trimerico epicatequínico (Tanino)</p>  <p style="text-align: center;">Posee propiedad astringente en alimentos y bebidas. ^(5,31)</p>	
Propiedades Físico-Químicas	Propiedades Farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Polifenoles clasificados en catecólicos y pirogalotánicos. • Compuestos no cristalizables. • Sustancias generalmente amorfas. • Precipitan con metales pesados con formación de complejos. • Forman soluciones coloidales ácidas y de sabor muy acre. • Se oxidan en medio ácido. • Precipitan proteínas en solución. 	<ul style="list-style-type: none"> • Propiedad astringente. • Por reacción con proteínas de la piel evitan su putrefacción. • Anti-diarreicos. • Vasoconstrictores venosos. • Efecto anti-nutriente. • Propiedad anti-oxidante. • Contraveneno de metales pesados

Cuadro No. 7 Glicósidos saponínicos

 <p>Esqueleto Esteroideo Esqueleto Triterpenico (Tipo Friedelano)</p> <p>Glycyrrhizina (Glicósido saponínico triterpenico de la serie del oleano)</p>  <p>Posee propiedad anti-inflamatoria y anti-ulceroso gástrico. ⁽²⁶⁾</p>	
Propiedades Físico-Químicas	Propiedades Farmacológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Poseen genina de naturaleza triterpénica y esteroidea. • Enlace heterósida en el C- 3. • Forman espuma en solución acuosa. • Poseen propiedad tensio-activa. • Poseen elevado peso molecular. • Difícil de cristalizar. • Solubles en mezclas hidro-alcohólicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Acción hemolizante • Propiedad antibacteriana y antifúngica. • Expectorante. • Acción anti-ulcerosa. • Acción anti-inflamatoria. • Actividad anti-hepatotóxica

El cuerpo humano es muy susceptible al ataque de hongos y bacterias debido a que estos son microorganismos oportunistas y que se desarrollan con gran facilidad por acción del calor y la humedad, por eso la ciencia ha realizado estudios de diferentes sustancias (metabolitos secundarios) para encontrar la forma de combatirlos sin causar efectos secundarios significativos al huésped y que también resulte efectivo y económico. Por esta razón se ha recurrido al estudio de diferentes especies vegetales como ***Sapindus saponaria*** (Pacún) árbol al cual se le han realizado variedad de estudios para determinar su composición, y se ha logrado aislar algunos metabolitos secundarios entre los cuales tenemos:

3.2.1 Algunos metabolitos secundarios aislados del genero *Sapindus*

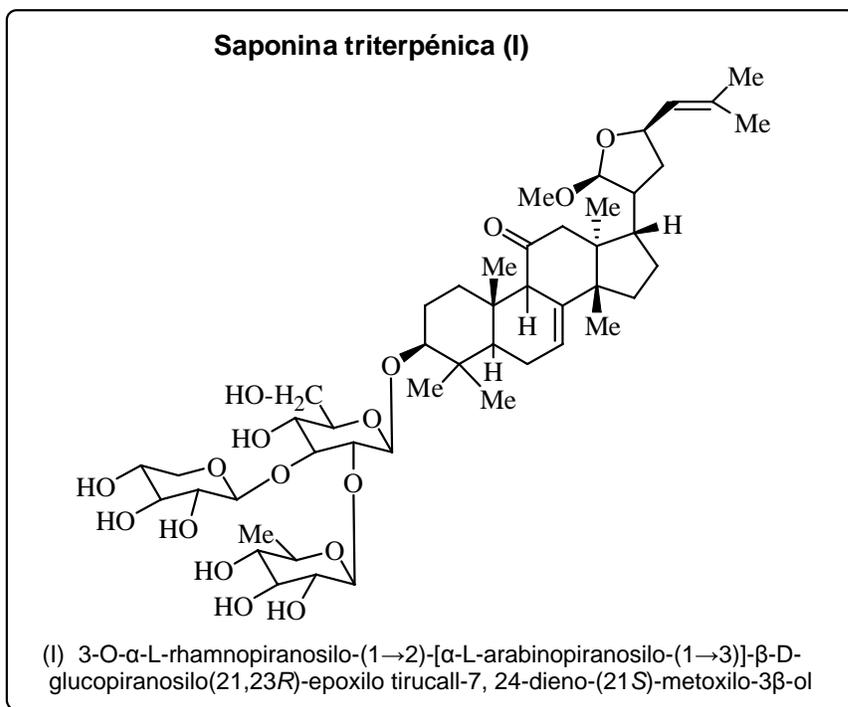


Fig. No. 1 Saponina triterpénica (I)

3.2.1 Continuación de algunos metabolitos secundarios aislados del género *Sapindus*

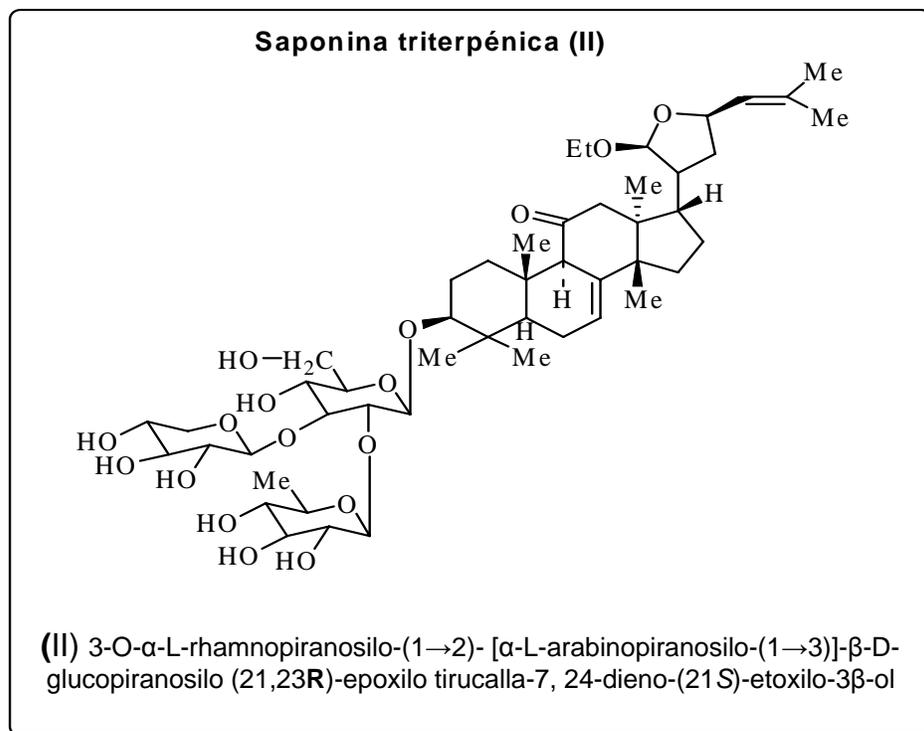


Fig. No. 2 Saponina triterpenica (II)

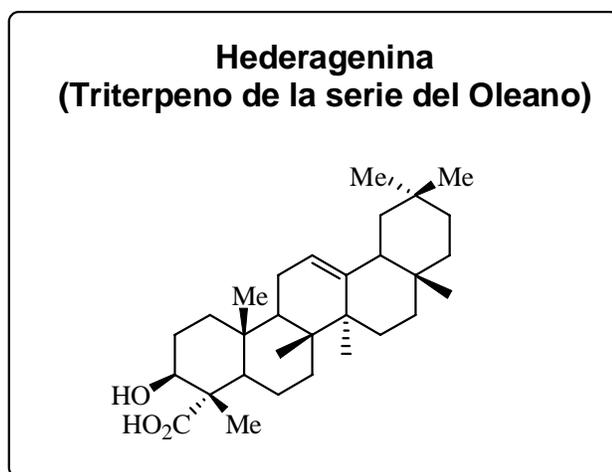


Fig. No. 3 Hederagenina

3.2.1 Continuación de algunos metabolitos secundarios aislados del
género *Sapindus*

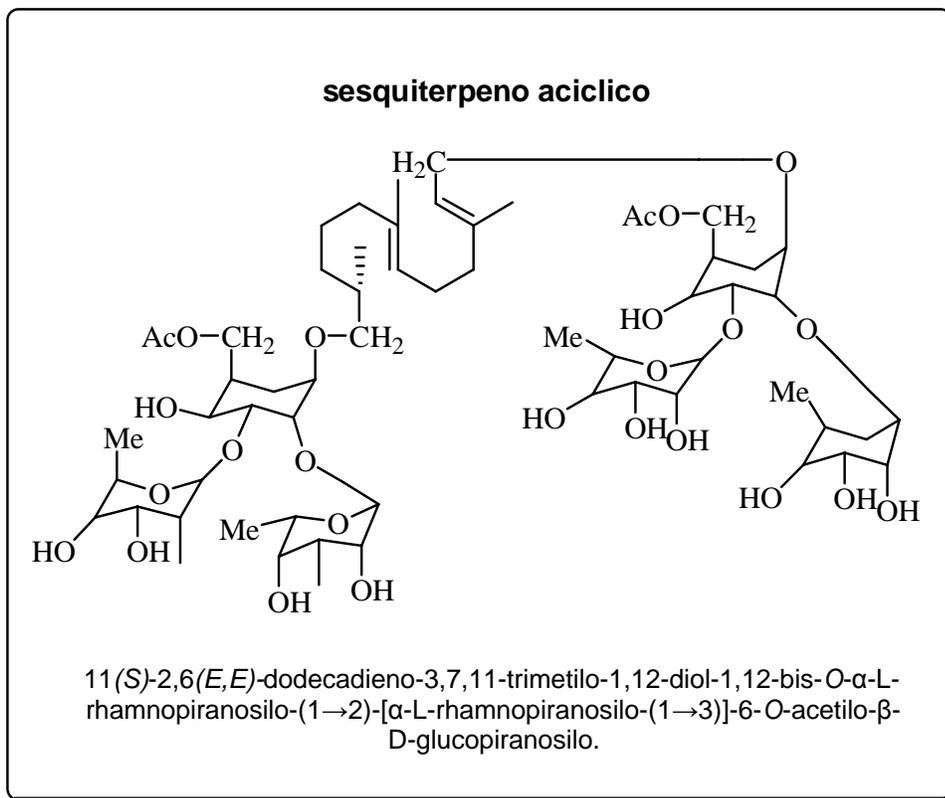


Fig. No. 4 Sesquiterpeno acíclico

3.3 MÉTODOS GENERALES DE EXTRACCIÓN

Los principios activos (droga) en las plantas se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentra incrustados en la célula, con el fin de facilitar la extracción de los mismos, la droga es sometida a un proceso de molturación o troceado que destruye las estructuras que lo contienen, mejorando así el rendimiento de extracción.

Dependiendo el tipo de principios activos a aislar, se elegirá un método u otro.

La extracción puede ser:

- a. Simple o maceración
- b. Continuo o percolación
- c. Continuo mediante el empleo de aparato Soxhlet

3.3.1 Extracción con Soxhlet:

El aparato Soxhlet es un aparato de vidrio que consta de tres partes que son:

- **Matraz:** donde se encuentra el disolvente y mantiene contacto con una manta calefactora.
- **Dedal:** que contiene el cartucho de papel filtro o tela con un peso dado del material vegetal o droga.
- **Refrigerante:** es el encargado de condensar el disolvente que por efecto de la gravedad cae en el dedal, embebiendo el material vegetal.

Cuando el cuerpo intermedio (Dedal) esta lleno del líquido extractivo mediante un sistema de sifón cae de nuevo en el, matraz iniciándose de nuevo el proceso. (Ver anexo No.5)

3.3.2 Fraccionamiento bio-guiado:

Es una técnica cuyo objetivo es ser una 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 ensayados 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 falta de conocimiento de las propiedades químicas de los compuestos. El proceso de aislamiento debe por tanto ser monitoreados por pruebas de todas las fracciones aisladas para la determinación de la actividad. Sólo las fracciones que den un resultado positivo a 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 ensayadas, 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 él o los compuestos causantes del efecto farmacológico demostrado en el sistema de prueba usado. Por tanto es 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 actividades en el sistema de prueba farmacológico escogido.

3.4 GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFÍA. ⁽¹⁶⁾

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

- 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.
- Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas.

La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de 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).

Cuadro No. 8 Tipos de cromatografía

Tipos de cromatografía	Adsorción	Reparto	Intercambio iónico	Filtración molecular
Fase estacionaria	Sólida	Líquida	Sólida	Sólida
Fase móvil	Líquida o Gaseosa	Líquida o Gaseosa	Líquida o Gaseosa	Líquida
La velocidad de la migración varía	Interacción molecular entre el soluto y el solvente	Solubilidad diferencial del soluto entre las fases	Intercambio de iones entre la solución y la fase estacionaria	Grado de inclusión en los poros de la fase estacionaria
Propiedad diferenciadora	Polaridad	Solubilidad	Ionización	Tamaño molecular

3.4.1 Cromatografía en Capa Fina

En este tipo de cromatografía la fase estacionaria (adsorbente) se encuentra depositada, formando una capa fina de espesor uniforme (0.1-0.2 mm), sobre una capa de vidrio, plástico, o una lamina metálica. La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cámara cromatográfica que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, esta

se saca de la cámara cromatográfica, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas.

3.4.2 Determinación del R_f (coeficiente de partición):

La relación entre las distancias recorridas por un compuesto dado y por el disolvente, desde el origen del cromatograma, se conoce como R_f (abreviatura de *rate factor*), y tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbentes, disolventes, tamaño de cámara cromatográfica, temperatura, etc.).

Debido a que es prácticamente imposible reproducir dichas condiciones experimentales, la comparación de una muestra con otra se debe realizar eluyendo ambas en la misma placa.

Para calcular el R_f se aplica la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}}$$

La distancia recorrida por el compuesto se mide desde el centro de la mancha. Si esta es excesivamente grande (diámetro mayor de 4.0mm) se obtendrá un valor erróneo del R_f .

Cuanto más polar es un compuesto, más retenido queda en el adsorbente y menor será su R_f . Por el contrario, los pocos polares se desplazan a mayor distancia del origen. La polaridad del disolvente también influye en el valor del R_f . Así, para un mismo compuesto, un incremento en la polaridad del disolvente aumentará su desplazamiento en la placa y, por tanto, su R_f .

- Elección del eluyente:

Se recomienda elegir un disolvente en el que los componentes de la mezcla presente un R_f medio en torno a 0.3-0.5. La búsqueda del eluyente idóneo requiere probará con varios disolventes de diferente polaridad o con mezclas.

Cuando un componente eluye a un R_f inferior a 0.2 o superior a 0.7 puede ocurrir que lo que parece un compuesto único sea en realidad una mezcla de varios. En estos casos se debe cambiar a otro disolvente más o menos polar.

Para compuestos poco polares, que se desplazan desde el origen con mucha facilidad se debe utilizar un disolvente apolar como el *n*-hexano. En el caso de compuestos de polaridad media, se aconseja utilizar mezclas *n*-hexano-acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, que quedan muy retenidos el adsorbente, requieren un disolvente más polar como el metanol o las mezclas diclorometano-metanol en distintas proporciones.

- Visualización del cromatograma:

La mayor parte de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente que permite la visualización de los compuestos activos a la luz ultravioleta (254 nm). El indicador absorbe luz ultravioleta (UV) y emite luz visible, generalmente verde. La presencia de un compuesto activo en el ultravioleta evita que el indicador absorba luz en la zona en que se encuentra el producto, y el resultado se traduce en la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto.

En el caso de compuestos que no absorban luz ultravioleta la visualización del cromatograma requiere utilizar un agente revelador.

El revelador tiene que reaccionar con los productos adsorbidos proporcionando compuestos coloreados. Por tanto, el revelador a utilizar depende del tipo de compuesto que se pretenda utilizar.

- Procedimiento experimental:

Las placas de cromatografía generalmente se comercializan como laminas (20 x 20 cm) que hay que cortar al tamaño adecuado, preferiblemente con cuchilla o con tijera que no mellen el borde del corte. Normalmente se utilizan placas de 6.0-7.0 cm de altura, y el ancho de 1.5-3.0 cm. Depende del número de compuestos que se vaya a analizar. El tamaño de la placa también esta en función de la placa cromatográfica en la que se va a realizar la elución.

Para llevar a cabo una cromatografía en capa fina, se sigue el procedimiento que se indica a continuación:

En la superficie del adsorbente (fase estacionaria), señalar con un lápiz tantos puntos como muestras que se vayan a aplicar, dejando espacio suficiente entre ellas. Estos deben estar a la misma altura desde la base de la placa (10 cm aproximadamente), por lo que resulta útil trazar una línea recta antes de señalar los puntos. Marcar con suavidad, sin levantar el adsorbente.

- Disolver la muestra a analizar en un disolvente. La disolución no debe estar ni muy diluida ni muy concentrada.

En este último caso, la mancha del compuesto seria muy grande, con poca resolución, y podría interferir con la de otros compuestos contiguos. Se estima que una disolución al 1-5% es la cantidad idónea. Siempre que sea posible se

recomienda disolver la muestra en disolventes volátiles como diclorometano, metanol o acetona.

- Utilizando un capilar de vidrio, depositar una alícuota de la disolución en el punto previamente señalado del adsorbente. Para ello, apoyar ligeramente el capilar con la disolución sobre el adsorbente, dejar evaporar el disolvente, y repetir esta operación de 2-3 veces con la precaución de aplicar la muestra siempre en el mismo sitio. El diámetro de la mancha depositada en el origen debe ser lo más pequeño posible (2-3 mm) y nunca debe solapar con las manchas contiguas. Una vez utilizado el capilar se puede desechar o limpiar introduciéndolo varias veces en un vial con acetona y secándolo con papel absorbente.
- Cortar un trozo de papel filtro e introducirlo en la cámara cromatográfica. Añadir el disolvente. La misión del papel filtro es absorber disolvente y saturar el interior de la cámara con los vapores de este para evitar que la fase móvil se evapore de la superficie de la placa.

El nivel de disolvente debe quedar por debajo de la línea en la que se ha depositado la muestra, de manera que no toque la mancha del compuesto aplicado. Si el origen de la placa quedase cubierto por el disolvente, este disolvería el compuesto en lugar de eluirlo.

- Introducir la placa en posición vertical en la cámara cromatográfica, que durante la elusión debe permanecer tapada, para evitar la evaporación del disolvente, y sin moverse. Apoyar la placa contra la pared de la placa, de

manera que quede vertical o ligeramente inclinada. No utilizar cámara cromatográfica anchas en la que la placa se pueda caer.

- El disolvente ascenderá por capilaridad. Cuando el frente llegue a poca distancia del borde superior de la placa, abrir la cámara, sacar la placa y señalar con un lápiz la distancia recorrida por el disolvente antes de que este se evapore, con el objeto de poder realizar el cálculo del R_f .
- Dejar evaporar el disolvente.
- Si el compuesto es activo a la luz ultravioleta visualizar la placa en una lámpara ultravioleta. Marcar con un lápiz el contorno de las manchas. En caso contrario, utilizar un agente revelador. Para ello, se humedece la placa durante un segundo o se rocía (utilizando un pulverizador) con un revelador, se secan los bordes con un papel absorbente, y se calienta de 100-150 °C en placa eléctrica o con pistola de aire caliente (depende del tipo de revelador). A medida que se va calentando se observa en la placa la aparición de manchas coloreadas correspondiente a los compuestos revelados.

Para la utilización de reveladores se requiere el uso de placas de vidrio o aluminio.

- Determinar el R_f y anotar el disolvente que se ha utilizado.

3.5 GENERALIDADES DE LAS CEPAS SOMETIDAS A BIOENSAYO

3.5.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un patógeno humano importante que coloniza e infecta a pacientes hospitalizados y a personas inmunocompetentes en la comunidad. Produce patologías diversas, desde un absceso de piel, impétigo, forúnculos e infecciones sistémicas graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis. Este tipo de infección se ha denominado: síndrome de la piel escaldada estafilocócico.

El ***Staphylococcus aureus*** puede complicar la recuperación de infecciones virales, como la influenza, y llegar a ser la causa de infecciones serias en huéspedes inmunosuprimidos. La bacteremia de ***Staphylococcus aureus*** es común y puede relacionarse con endocarditis valvular mitral y aórtica aguda, osteomielitis y abscesos pulmonares embólicos, complicando la endocarditis derecha. La bacteremia también puede sembrar a distancia y llegar a la formación de abscesos metastásicos en diversos órganos. Entre ellos piel y tejidos celulares subcutáneos, riñones y cerebro.⁽¹²⁾

Sus células esféricas de 1µm de diámetro, aparecen como masas de células arracimadas, aunque se encuentran como células aisladas, en pareja y tétrada, los ***Staphylococcus*** jóvenes son Gram-positivos, sin embargo al envejecer, muchas células se vuelven Gram-negativas, son no móviles, no forman esporas.

Los ***Staphylococcus*** crecen bajo condiciones aerobias o microaerófilas y con mayor rapidez a 37 °C, pero por su pigmentación es apreciable a temperaturas

entre 20-25 °C. Las colonias en medios sólidos, son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes. La pigmentación de las colonias van desde el gris, 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. ⁽¹⁰⁾

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. Son microorganismos relativamente resistentes a la desecación, a ciertos desinfectantes, al calor y al cloruro de sodio 9 %.

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 estafilocócicas graves son las salas de cunas de recién nacidos, unidades de cuidados intensivos, salas de operaciones y salas de quimioterapia del cáncer.

Los estafilococos producen enzimas como: catalasa, coagulasa, hemolisinas, toxinas como: leucocidina exfoliativa, la del síndrome del choque tóxico y enterotoxinas producidas por el 50 % de las cepas de ***Staphylococcus aureus***, responsable por el envenenamiento con alimentos.

Los estafilococos son patógenos oportunistas, habitualmente las infecciones producidas por estafilococos son cutáneas, el prototipo de investigación estafilocócica es el forúnculo o cualquier absceso localizado.

Entre las enfermedades más comunes producidas por ***Staphylococcus aureus*** están: neumonía estafilocócica, síndrome de la piel escaldada, síndrome de shock tóxico y otras enfermedades respiratorias.

3.5.1.1 Identificación de *Staphylococcus aureus*:

- Tinción al Gram: este método hace uso de colorantes orgánicos catiónicos como cristal violeta o Safranina con fuerte afinidad por materiales celulares con carga negativa como los ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos.
- Prueba de la coagulasa: La coagulasa es una proteína de composición química desconocida con actividad semejante a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina. Produciendo un coagulo visible en un sistema de prueba apropiado. Se cree que la coagulasa actúa *in vivo* formando una barrera de fibrina en el sitio de la infección estafilocócica. La prueba de la coagulasa es la que se emplea con mayor frecuencia para diferenciar ***Staphylococcus aureus*** de los otros estafilococos.

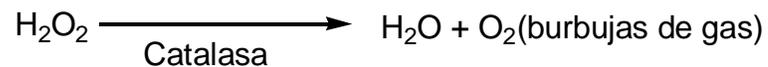
Principio: la coagulasa esta presente en dos formas, libre y ligada, cada una con diferentes propiedades que requieren el uso de pruebas separadas:

- Coagulasa ligada (prueba en porta objeto): La coagulasa ligada también llamada factor de agregación, esta unida a la pared de la célula bacteriana y no se encuentra presente en los filtrados de cultivo la hebra de fibrina se forman entre las células bacterianas suspendidas en plasma, (fibrinógenos), haciendo que se agrupen en agregados visibles cuando se observa en la prueba en el portaobjeto. La actividad de la coagulasa ligada no es inhibida por los anticuerpos formados contra la coagulasa libre.
- Coagulasa libre (prueba en tubo): La coagulasa libre es una sustancia semejante a la trombina presente en los filtrados de cultivo. Cuando una suspensión de las bacterias productoras de coagulasa se mezclan con igual cantidad de plasma en un tubo de prueba, se forma un coágulo visible como resultado de la utilización de los factores plasmáticos de coagulación de manera semejante cuando se agrega trombina.
Interpretación: Prueba en portaobjeto: la reacción positiva por lo general se detecta en 15-20 segundos. Con la aparición de un precipitado granular o la formación de coágulos blancos.
Prueba en tubo: la reacción se considera positiva si cualquier grado de coagulación es visible dentro del tubo. ⁽¹²⁾
- Prueba de catalasa: la catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Desde el punto de vista químico, es una hemoproteína similar en estructura a la hemoglobina, excepto que en los cuatro átomos de hierro en la molécula

están en la forma oxidada en lugar de reducida. Salvo los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. La mayoría de las bacterias anaerobias que descomponen el peróxido de hidrogeno lo hacen mediante enzimas peroxidadas, en forma semejantes a la catalasa, excepto que cada molécula contiene un solo ion férrico.

- Principio: El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos. Si se acumula, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas.

La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, como se muestra en la siguiente reacción:



La prueba de la catalasa, realizada por los métodos del portaobjeto o en tubo por lo común se emplea para diferenciar los estreptococos (negativos) de los estafilococos (positivos), o para diferenciar bacilos de micro bacterias.

Interpretación: La rápida aparición y sostenida producción de burbujas de gas o efervescencia constituye un resultado positivo. ⁽¹²⁾

3.5.2 *Trichophyton mentagrophytes*

Es una de las especies de hongos, más frecuentes, causantes de dermatofitosis que se encuentra entre las infecciones más prevalentes en el mundo.

Por su carácter superficial, las infecciones dermatofíticas (tiña) se han reconocido desde la antigüedad. En la piel se diagnostican por presencia de hifas ramificadas, septadas, hialinas.⁽¹⁰⁾

Los dermatofitos se suelen clasificar según el hábitat natural donde residen normalmente:

Geofílicos: Residen en el suelo. Normalmente se adquieren por microtraumatismos o por roce con el suelo o superficies contaminadas.⁽³⁶⁾

Zoofílicos: Residen en los animales. Se suelen adquirir por contacto con animales infectados (gatos, perros, etc.), y una vez el ser humano se ha infectado, puede actuar de fuente de contagio para otros casos.⁽³⁶⁾

Los animales de compañía pueden ser una fuente de contagio muy frecuente.

Antropofílicos: Residen en los humanos. Se adquieren directamente por contacto con el sujeto infectado, indirectamente por el uso de objetos de uso común, como toallas, o servicios tales como piscinas, baños, etc. Son infecciones muy frecuentes.⁽³⁶⁾

Hay una serie de factores predisponentes para sufrir una infección fúngica como son la humedad, el calor, la oclusión y los pacientes diabéticos, atópicos o inmunodeprimidos.

Ciertas ocupaciones favorecen las infecciones fúngicas (granjeros, veterinarios, etc.), un mismo agente puede producir patología en diferentes localizaciones y por ello, las infecciones que producen tiña (*tinea*, en latín) reciben el nombre dependiendo de la zona infectada:

- *Tinea capitis* en el cuero cabelludo.
- *Tinea corporis* en el cuerpo.
- *Tinea cruris* en la región inguinal.
- *Tinea pedis* en los pies.
- *Tinea manum* en la mano.
- Onicomycosis o tiña ungueal en las uñas.

3.5.2.1 Identificación de *Trichophyton mentagrophytes*:

- **Tinción con azul de algodón-lactofenol:** debido a los grupos sulfónicos, el colorante es fuertemente ácido y se ha usado como contra tinción en bacterias y protozoarios, en combinación con otros colorantes. Actualmente se usa mas para la tinción directa del micelio micótico y estructuras que dan frutos que toman un delicado color azul claro. ⁽¹⁷⁾

- **Morfología colonial:** este hongo produce diferentes variantes coloniales, sin embargo, se reconocen solo dos patrones básicos, veloso y granular. El primero tiene mayor tendencia a asociarse con dermatosis inflamatorias en humanos.

En general el color es blanco a rosado, algunas cepas producen pigmento rojo-marrón.

Observar la apariencia de las colonias y su morfología después de dos semanas de crecimiento a 25°C sobre agar Dextrosa Saboraud. Las colonias pueden ser algodonosas o granulares; muestran abundantes microconidios esféricos similares a racimos de uvas sobre ramas terminales. Se observan hifas espirales o enrolladas. ⁽¹⁷⁾

3.6 PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA. ⁽¹²⁾

Se han ideado varios tipos de pruebas de susceptibilidad o sensibilidad antimicrobiana. Las dos pruebas de referencia son las técnicas microscópicas de dilución en caldo y en agar. Ambas fueron programadas para cuantificar la mínima concentración del antibiótico que inhibe el crecimiento visible, in Vitro, del microbio: **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)**. Las pautas para el tratamiento antibiótico están destinadas por lo común, a la técnica de difusión en disco (Método de Kirby Bauer) o cilindro (Método de Kirby Bauer Modificado), en la que las interpretaciones clínicas derivan de las correlaciones con las pruebas de referencia. En años recientes, un número creciente de laboratorios ha utilizado, de forma rutinaria una prueba en caldo miniaturizada (prueba de micro dilución en caldo) o un sistema comercial automatizado. ⁽¹²⁾

3.6.1 Prueba de Susceptibilidad por Dilución en Agar.

El procedimiento de dilución en agar, ha sido exitosamente adaptado para uso de rutina en los grandes laboratorios mediante la prueba de concentraciones seleccionadas de antibióticos. Se inocula una suspensión normalizada de

bacterias en una serie de placas de agar, cada uno con diferentes concentraciones de antibióticos, acompañando al rango terapéutico de la droga. Para determinar la susceptibilidad del microorganismo se observara su comportamiento frente a las diferentes concentraciones de antibióticos donde **CIM** será el valor de la concentración a la cual inhibe todo crecimiento del microorganismo a prueba. ⁽¹²⁾

3.6.2 Método de Difusión en Placa.

Probablemente la técnica más ampliamente utilizada, aunque no necesariamente la mejor, es el método de **difusión en agar**, también conocido como método de **Kirby-Bauer Modificado**, se inocula (siembra) uniformemente toda la superficie de una placa de Petri, que contiene un medio con agar, con una cantidad normalizada de microorganismos a ensayar. A continuación se colocan sobre la superficie del agar solidificado cilindros de acero inoxidable con concentraciones conocidas de agentes quimioterapéuticos. Durante la incubación los agentes quimioterapéuticos difunden por el agar a partir de los cilindros. Cuanto más lejos del cilindro difunde más baja es su concentración. Si el quimioterapéutico es eficaz se forma un halo de inhibición que rodea al cilindro y puede medirse el diámetro de ese halo. Como el tamaño del halo de inhibición se ve afectado por la velocidad de difusión del quimioterapéutico, un halo más grande no siempre indica una mayor actividad antimicrobiana. El diámetro se compara con los de una tabla de referencia para cada fármaco y dosis, el resultado informa acerca de si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente. Esta información es a menudo inadecuada para

muchos fines clínicos; sin embargo, es un ensayo sencillo y económico y tiene un valor considerable en la práctica médica. ⁽²⁸⁾

3.6.3 Macrodilución en caldo

La prueba de susceptibilidad por macrodilución en caldo fue de las primeras en ser desarrolladas y aun sirve como método de referencia.

Se preparan diluciones seriadas del agente antimicrobiano en caldo o agar, después de lo cual se agrega una suspensión bacteriana normalizada, se prepara además un tubo que no contiene agente antimicrobiano el cual sirve como control de crecimiento. Se inocula cada tubo con una suspensión calibrada del microorganismo en estudio y se incuba, al final del periodo de incubación los tubos se examinan visualmente controlando la turbidez. La turbidez indica que el crecimiento bacteriano no fue inhibido por la concentración del antimicrobiano contenido en el medio.

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación es de carácter hipotético-deductivo, retrospectivo-prospectivo y experimental.

Es hipotético-deductivo ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permite formular las siguientes hipótesis. ⁽²⁹⁾

- Hipótesis positiva: el extracto diclorometánico obtenido del fruto de la especie vegetal ***Sapindus saponaria*** (Pacún) posee actividad antibacteriana y antifúngica.

- Hipótesis negativa: el extracto diclorometánico obtenido del fruto de la especie vegetal ***Sapindus saponaria*** (Pacún) no posee actividad antibacteriana y antifúngica.

Es un estudio retrospectivo porque se realizó una medición actual y se comparó con datos ya obtenidos; es prospectivo porque se basa en datos obtenidos actualmente de los cuales se obtuvieron conclusiones para proyectarlas a futuro.

También experimental ya que proporcionó datos interpretables, que condujeron a conclusiones mas claras.

La investigación realizada se llevó a cabo en tres etapas: investigación bibliográfica, investigación de campo e investigación de laboratorio.

4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La cual comprendió la consulta de libros, trabajos de graduación, revistas científicas, manuales, etc. en la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador, así como también investigaciones en Internet y en la bases de datos científica Scfinder Scholar.

4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO

En la Universidad de El Salvador hay diferentes tipos de plantas, entre las cuales podemos encontrar el árbol de ***Sapindus saponaria*** (Pacún), especie vegetal de trabajo para el estudio de la propiedad antimicrobiana.

El primer paso de la investigación fue el reconocimiento de dicha especie, luego de haber reconocido el material vegetal se procedió a su recolección, la toma de muestra se llevó a cabo en los árboles específicos de ***Sapindus saponaria*** (Pacún), que se encuentran ubicados en la zona verde alrededor de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Ciudad Universitaria. ***Sapindus saponaria*** (Pacún) posee un fruto globoso amarillo brillante, la recolección de dicho fruto se realizó directamente del árbol y del que ha caído al suelo, se utilizaron sobres de papel para almacenarlo, con el objetivo de protegerlo de insectos y del ambiente hasta el momento de su utilización.

Dicha recolección se realizó en el mes de abril aprovechando que aun prevalece la época seca (verano), ya que este tiempo es el más recomendable para su recolección, por encontrarse libre de humedad.

4.4 INVESTIGACIÓN DE LABORATORIO

La investigación de laboratorio se realizó en dos partes: ensayos fitoquímicos y ensayos microbiológicos:

4.4.1 Ensayos fitoquímicos:

Del fruto recolectado se tomó una porción aproximada de 1,500 g. de pericarpio, finamente dividido, se extrajo a reflujo con etanol 95° en Soxhlet, durante dos semanas y se concentró el extracto por medio de evaporación del disolvente, una vez eliminado éste por medio de rotaevaporador, en una ampolla de separación se suspendió en agua y se realizó la separación líquido-líquido (agua-diclorometano), y la porción diclorometánica se concentró.

(Ver anexo No. 6)

4.4.1.1 Análisis fitoquímico preliminar:

Las pruebas fitoquímicas se realizaron en tubos y placas cromatográficas, el fundamento de dichas pruebas es la formación de complejos y reacciones de precipitación realizadas al extracto diclorometánico con el objetivo de identificar los metabolitos secundarios.

Las pruebas a realizar son:

Glicósidos Saponínicos: Lieberman-Burchard (prueba en capa fina), Salkowski (prueba en tubo), prueba de la espuma (prueba en tubo). (Ver anexo No.7)

Glicósidos Cardiotónicos: Legal (prueba en tubo), Kedde (prueba en capa fina), Lieberman-Burchard (prueba en capa fina).

Glicósidos Flavonoides: Shinoda (prueba en tubo).

Glicósidos Antraquinónicos: Prueba de Borntrager (prueba en capa fina).

Taninos: Cloruro férrico y subacetato de plomo (pruebas en capa fina).

Alcaloides: Dragendorff (prueba en capa fina).

Sesquiterpenlactonas: Legal (prueba en tubo) y Baljet (prueba en capa fina).

(Ver Anexo No. 8)

La evaluación fitoquímica, orientó a la confirmación de la presencia de diversos compuestos que incluyen a los responsables de la propiedad antibacteriana y antifúngica. (Ver Anexo No.4)

4.4.1.2 Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Procedimiento:

La cromatografía de capa fina se hizo con el objetivo de identificar la presencia de metabolitos secundarios, que se encuentran en el extracto diclorometánico del fruto de *Sapindus saponaria*, mediante la utilización de reveladores adecuados para cada grupo de metabolitos en placas cromatográficas con sílica gel de 6.0 cm de largo por 1.0 cm de ancho. Se inyectó con la ayuda de un capilar el extracto diclorometánico en cada una de las placas cromatográficas, las cuales se revelaron con diferentes reactivos.

Las placas se colocaron en cámaras cromatográficas previamente saturadas con las diferentes fases móviles: tolueno:cloroformo (10:0.25), *n*-hexano:cloroformo (4:6) y *n*-hexano:metanol (6:4), se deja elucionar la placa hasta $\frac{3}{4}$ partes, se retiran y se dejan secar. Posteriormente se observaron a la

luz ultravioleta y luego se rociaron con el reactivo revelador para determinar la presencia de compuestos específicos, finalmente se obtuvo el R_f de las diferentes manchas. (Ver anexo 8)

4.4.2 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

4.4.2.1 Pruebas de identificación microbiológicas

A los microorganismos de ensayo *Staphylococcus aureus* (cepa ATCC 65923) y *Trichophyton mentagrophytes* (cepa salvaje), se les realizaron tres clases de pruebas para su 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:

Cuadro No. 9 Características macroscópicas de los microorganismos. ⁽¹⁰⁾

MICROORGANISMOS	MEDIO DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Chapman	Colonias cremosas con crecimiento abundante de color amarillo.
	Agar Baird Parker	Colonias color negro, lustroso, redondo, borde convexo.
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Dextrosa Sabouraud	Colonias polvosas a granuladas, formando racimo de uvas abundantes

-Características microscópicas

Utilizando métodos de tinción se observó la morfología microscópica de los microorganismos a prueba: tinción al Gram para *Staphylococcus aureus* y Azul de Algodón-Lactofenol para *Trichophyton mentagrophytes*.⁽¹²⁾

(Ver Anexo No.10, 11 y 12)

- Pruebas de identificación específicas:

Para la identificación y diferenciación de los microorganismos utilizados en estudio se realizaron las siguientes pruebas:

Cuadro No. 10 Pruebas de Identificación Específicas (Ver Anexo 14 y 16)

MICROORGANISMOS	PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa y Coagulasa
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Prueba de cebo de pelo

Para *S. aureus* se hicieron resiembras semanales en Agar Trypticasa Soya (TSA) y para el *Trichophyton mentagrophytes* cada dos semanas en el medio Dextrosa Sabouraud con el objetivo de evitar la muerte de los microorganismos.

4.4.2.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

La evaluación microbiológica del extracto diclorometánico se realizó en concentraciones de 50.0 mg/mL, 35.0 mg/mL, 25.0 mg/mL, 12.5 mg/ mL, 6.25 mg/mL y 3.125 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y *Trichophyton mentagrophytes*, utilizando los medios de cultivo Mueller Hinton y Dextrosa Sabouraud respectivamente.

La bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 65923) fue proporcionada por el Laboratorio del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) y el hongo *Trichophyton mentagrophytes* (cepa salvaje) fue proporcionado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador.

- Método de Kirby Bauer Modificado

Para determinar la susceptibilidad de un microorganismos a una sustancia antibacteriana en particular, existen varios métodos; los más comúnmente utilizados, son el Método de Dilución Seriada y el de Difusión en Agar desde cilindros de acero inoxidable. Alternativamente, el agente antibacteriano puede colocarse en cilindros de vidrio, porcelana sobre la superficie del medio, en lugar de discos de papel (Método de Cilindro Placa). (Ver Anexo 18)

a) Preparación de las placas de cultivo

El agar se preparó a partir de la base deshidratada y de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Después de realizar la esterilización en autoclave, inmediatamente se dejó enfriar en un baño de agua hasta una temperatura de 45-50 °C.

Se vertió el agar fundido en las cajas de petri, de manera que la superficie horizontal debe tener una profundidad uniforme de 4 mm. Aproximadamente, esto corresponde a 60-70 mL de medio (agar) para placas con diámetros de 150 mm y 25-30 mL para placas con diámetros de 100 mm.

El medio de cultivo (agar) se dejó solidificar a temperatura ambiente, y se almacena en un refrigerador (2-8 °C) en caso de utilización posterior.

Después de preparadas, las placas pueden ser usadas siete días posteriores al día de preparación.

Una muestra representativa de cada grupo de placas debe ser examinada para esterilidad por incubación entre 30-35 °C por 24 horas o más. ⁽²¹⁾

b) Preparación de la suspensión de los microorganismos

Del cultivo de 18 a 24 horas de *Staphylococcus aureus* mantenido en la placa de agar TSA, se transfirió cierto número de colonias a un tubo de ensayo utilizando una asa bacteriológica estéril; el tubo contiene 10 mL de solución salina isotónica estéril al 0.85%.

Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvo una turbidez equivalente al estándar Mc Farland 0.5, el cual se prepara con 0.05 mL de BaCl₂·2H₂O al 1.175% (p/v) y 9.95ml de H₂SO₄ al 1% (v/v), obteniéndose una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 Mo/mL. ⁽³⁰⁾ De igual manera se realizó para *Trichophyton mentagrophytes* en medio Dextrosa Sabouraud.

(Ver Anexo No.17)

c) Inoculación de las placas

Por el método extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalente a 1.5×10^8 Mo/mL Se inoculó uniformemente la superficie del medio Agar Mueller Hinton para

Staphylococcus aureus y Dextrosa Sabouraud para ***Trichophyton mentagrophytes***.

El medio se dejó secar con la suspensión de microorganismos durante 10 minutos a temperatura ambiente bajo flujo laminar.

d) Inoculación con la Solución Prueba, Incubación y Lectura

Se colocaron sobre la superficie del medio inoculado cuatro cilindros de acero inoxidable, a intervalos de 90° entre cada uno; luego se llenó con una micropipeta con la solución de prueba y se incubó a 37 °C por 24 a 48 horas para ***Staphylococcus aureus*** y de 25 °C por 5-7 días el ***Trichophyton mentagrophytes***.

Después del tiempo de incubación, se retiraron los cilindros y se midieron los diámetros de los halos de inhibición con una regla milimetrada transparente especial usada en la lectura de resultados de antibiogramas para determinar si es sensible o resistente.

Las pruebas se hicieron tres veces, tanto para el extracto madre, como para las diluciones; se colocaron discos de Penicilina para ***Staphylococcus aureus*** y Ketoconazole 1% para ***Trichophyton mentagrophytes***, los cuales sirvieron como parámetro para comparar la eficacia del extracto diclorometánico.

- Método de Dilución en Agar.

Se inoculó una suspensión normalizada de bacterias en una serie de placas de agar, cada una con diferentes concentraciones (50.0 mg/mL, 35.0 mg/mL, 25.0 mg/mL, 12.5 mg/ mL, 6.25 mg/mL y 3.125 mg/mL) del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto de *Sapindus saponaria*, para determinar la susceptibilidad del microorganismo se observó su comportamiento frente a las diferentes concentraciones del extracto diclorometánico donde CIM será el valor de la concentración a la cual inhibe todo crecimiento del microorganismo a prueba.⁽¹²⁾ (Ver Anexo No. 19)

- Método de dilución en caldo

a) Preparación de la solución madre:

Se preparó utilizando el método para solubilizar cremas y ceras de la USP 28.

(Ver Anexo No. 20)

b) Preparación del inóculo:

Para llevar a cabo el estudio de dilución en caldo se necesita una concentración 1:100 en caldo del microorganismo a prueba obtenido en relación nefelométrica al Mc Farland 0.5 (0.05 mL de BaCl₂ 1% y 9.95 mL de H₂SO₄ 1%), obteniendo una concentración aproximada de 1.5×10^8 Mo/mL.

Procedimiento:

Partiendo del extracto diclorometánico se realizaron una serie de diluciones seriadas utilizando Tween al 10% en Buffer Fosfato pH 7.2.

Se colocaron una serie de tubos estériles, en el primer tubo se colocó 2 mL de solución madre (10% = 100 mg/mL), de este tubo se tomó 1 mL y se transfirió al segundo tubo y se le agregó 1 mL de diluyente (solución de Tween al 10% en Buffer fosfato pH 7.2) de tal manera que la solución resultante posee una concentración igual a la mitad de la solución madre (5% = 50 mg/mL), de este tubo se tomó 1 mL de solución resultante y se transfiere a un tercer tubo, se continúa el procedimiento como el segundo tubo para llevar la solución a una concentración resultante igual a la mitad, de esta manera se continuó hasta obtener la solución equivalente a 0.625% ó 6.25 mg/mL a la última concentración del ensayo se le descartó 1 mL para igualar condiciones de volumen con las otras concentraciones del ensayo.

Para la concentración de 7% (70 mg/mL) se tomó 0.7 mL de solución madre y 0.3 mL de diluyente.

Después de obtener todas las diluciones del estudio a cada tubo se le adicionó 1 mL de caldo inoculado, esto redujo la concentración del extracto a la mitad (50.0 mg/mL, 35.0 mg/mL, 25.0 mg/mL, 12.5 mg/ mL, 6.25 mg/mL y 3.125 mg/mL). (Ver Anexo No. 21).

Se realizaron los siguientes blancos y controles para el estudio:

- Control positivo 1: Caldo inoculado + diluyente.
- Control negativo: Caldo nutritivo
- Control positivo 2: Caldo inoculado + solución salina estéril 0.9%.
- Blanco: Caldo + extracto. (Ver Anexo No. 21)

Incubación:

S. aureus: 24 horas a 37 °C de temperatura.

T. mentagrophytes: 5 días a temperatura ambiente.

- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM):

A cada uno de los tubos sometidos a ensayo se realizaron hisopados y se resembraron en placas de petri, después del tiempo y condiciones de incubación, la placa donde se presente el menor crecimiento determina la concentración mínima inhibitoria.

- Determinación de la Concentración Mínima Bactericida o Fungicida (CMB o CMF):

A cada uno de los tubos sometidos a ensayo se realizaron hisopados y se resembraron en placas de petri, después del tiempo y condiciones de incubación, la placa a menor concentración donde no presente crecimiento es la concentración mínima bactericida o fungicida.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 RESULTADO DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Tabla No. 1 Resultado de análisis organoléptico del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún).

COLOR	OLOR	APARIENCIA
Café oscuro	Dulce agradable	Untuosa

Al extracto diclorometánico obtenido, se le realizaron diversas pruebas físico-químicas (pruebas en tubo y cromatografía de capa fina CCF), para determinar la presencia de metabolitos secundarios presentes en el extracto.

Tabla No. 2 Pruebas químicas realizadas en tubo y cromatografía de capa fina cuyo resultado es positivo.

PRUEBAS	RESULTADO	COMPUESTO DETECTADO
Lieberman Burchard	+	Glicósidos Saponínicos
Salkowski	+	
Prueba de la Espuma	+	

(+) Resultado positivo.

Las pruebas de Shinoda, Acetato de plomo, Börntrager, Kedde, Baljet, tricloruro de hierro y Draguendorff presentaron resultados negativos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las pruebas en tubo que resultaron positivas fueron:

- **Prueba de la espuma:** se incorporó la muestra en agua y después de agitar constantemente durante 30 segundos se observó la aparición de espuma, que se mantiene por más de 15 minutos, esto indica prueba positiva para Glicósidos saponínicos.
- **Salkowski:** dicha prueba presentó un anillo color violáceo, cuya aparición indica prueba positiva para saponina triterpénica por reacción con la genina.
- **Lieberman Burchard:** en esta prueba se observó un anillo de color violáceo cuya aparición indica presencia de tritrepénos.

Las pruebas para flavonoides, antraquinonas, glicósidos cardiotónicos, sesquiterpenlactonas y taninos presentaron resultados negativos, por lo tanto no se encuentran presentes en el extracto diclorometánico.

5.2 CROMATOGRAFIA DE CAPA FINA

El estudio cromatográfico se realizó en las siguientes fases móviles:

- *n*-hexano-cloroformo (4:6)
- tolueno-metanol (6:4)
- tolueno-cloroformo (40:1)

La fase móvil que presentó mayor separación de manchas fue:

n-hexano-cloroformo (4:6).

Tabla No. 3: Resultados obtenidos en la Cromatografía de capa fina realizada en la fase móvil *n*-hexano-cloroformo (4:6)

Reactivo revelador Condición	Vainillina Acido Sulfúrico	Lieberman Burchard	Anisaldehido Acido Sulfúrico
Sustancias detectadas	Reactivo Universal	Triterpenos	Terpenos
Resultado	+	+	+
Número de manchas	6	6	5
R_f	—	$M_1 = 0.070$	$M_1 = 0.070$
	$M_2 = 0.135$	$M_2 = 0.164$	—
	$M_3 = 0.197$	$M_3 = 0.211$	$M_3 = 0.200$
	$M_4 = 0.284$	$M_4 = 0.317$	$M_4 = 0.305$
	$M_5 = 0.358$	—	—
	$M_6 = 0.420$	—	—
	—	$M_7 = 0.623$	$M_7 = 0.588$
	$M_8 = 0.938$	$M_8 = 0.941$	$M_8 = 0.952$
Observación	Manchas color azul	Manchas fluorescentes a la luz U.V. 365 nm.	Manchas color azul y verde-azuladas, evaluadas al U.V. 365 nm

(—) No se observó manchas

(M_x) Mancha

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

En la cromatografía de capa fina utilizando como reactivo revelador vainilla-ácido sulfúrico (Reactivo Universal) se detectaron 6 manchas y se obtuvo además su R_f .

La utilización de reveladores como Lieberman Burchard y anisaldehído-ácido sulfúrico fueron para reconocer metabolitos específicos y reunir la información para tener un argumento más preciso de los compuestos presentes en el extracto, así:

- Mancha 1: presenta prueba positiva para terpenos y triterpenos.
- Mancha 2: prueba positiva con el reactivo universal y específica para triterpenos.
- Mancha 3: reconocida por los tres reveladores, por lo cual se concluye la presencia de triterpenos y terpenos.
- Manchas 4 y 5: solo fueron reconocidas por el reactivo universal por lo que no se puede concluir presencia de un grupo químico específico.
- Mancha 7: prueba positiva para terpenos y triterpenos.
- Mancha 8: prueba positiva con los tres reveladores, concluyendo la presencia de terpenos y triterpenos.

5.3 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTÓN

Se le realizó un espectro de protón de 300 MHz al extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún) y dicho espectro reveló señales para ácidos grasos, metilenos, metinos y metilos entre 0.5-2.1 ppm y señales para azúcares entre 4.0-5.3 ppm. (Ver anexo No. 9)

5.4 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Para el estudio microbiológico se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 65923 (proporcionado por el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud “CENSALUD”, Universidad de El Salvador) y *Trichophyton mentagrophytes* cepa salvaje (proporcionado por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad de El Salvador); cada uno resembrado en tubos de agar inclinado: TSA para *S. aureus*, y Dextrosa Sabouraud para *T. mentagrophytes*. De dichos tubos se realizaron las pruebas de identificación.

5.4.1 Pruebas de identificación:

Cuadro No. 11: Pruebas de Identificación para los microorganismos a utilizar

Microorganismo Prueba	<i>S. aureus</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
Morfología macroscópica	<p>Agar Bair Parker: colonias color negro, lustroso, redondo, borde convexo</p> <p>Agar Chapman: colonias cremosas, de color amarillo dorado, lisas, redondas y convexas</p> <p>(Ver Anexo No.13).</p>	<p>Agar Dextrosa Sabouraud: colonias vellosas, color blanco, el fondo color amarillo a café oscuro con el tiempo</p> <p>(Ver Anexo No. 15).</p>
Morfología microscópica	<p>Por reacción al Gram, bacteria Gram positiva, en forma de cocos, formando racimos</p> <p>(Ver Anexo No. 13).</p>	<p>Tinción de azul de algodón lactofenol: microconidias en abundancia, globosas y en forma de racimos de uvas.</p> <p>(Ver Anexo No. 15).</p>
Pruebas específicas	<p>Prueba de la Catalasa: produce un burbujeo intenso con peróxido de hidrógeno al 2%.</p> <p>Prueba de la Coagulasa: formación de un coágulo después de 24 horas de incubación.</p> <p>(Ver Anexo No.14)</p>	<p>Prueba de cebo de pelo. Invasión de la cutícula del pelo después de 12 días de incubación.</p> <p>(Ver anexo No. 16)</p>

Las pruebas de identificación realizadas en medio de cultivo selectivo (morfología macroscópica), tinción, y otras pruebas mostraron resultados positivos y de acuerdo a las especificaciones, se comprueba que las cepas de trabajo proporcionadas son puras (sin otros microorganismos ni otras formas de contaminación).

5.4.2 Estudio de la actividad antimicrobiana:

Para el estudio de la actividad antimicrobiana se realizaron varios ensayos utilizando diferentes disolventes, a continuación se describen las diferentes pruebas.

- Prueba de Kirby Bauer Modificado:

En la realización del estudio de Kirby Bauer Modificado, se presentaron diferentes problemas, a continuación se describen los resultados de las pruebas realizadas con *Staphylococcus aureus*:

- Etanol al 70% v/v: el extracto presentó problemas de insolubilidad al llevar a cabo el estudio, generando un sedimento de consistencia viscosa en los cilindros, que afectó la difusión del extracto en el medio.
- Etanol 95°: en este solvente el extracto se solubilizó con mayor facilidad, pero poseía los mismos problemas de insolubilidad del alcohol al 70%, dificultando la realización del estudio.
- Dimetilsulfoxido (DMSO) al 10%: al incorporar el extracto en esta dilución presento problema de precipitación.
- Dimetilsulfoxido puro: la disolución del extracto en este disolvente es completa, no presenta problemas de de precipitación, pero la realización del estudio revelo la inhibición del microorganismo con DMSO puro.

- Pruebas de Dilución en Agar:

Debido a los problemas encontrados en la realización del estudio según el método de Kirby Bauer Modificado la metodología de evaluación cambió a pruebas de dilución en agar, en esta prueba se realizaron los siguientes ensayos con *Staphylococcus aureus* y *Trichophyton mentagrophytes*:

- Disolución del extracto con DMSO puro: al incorporar dicha solución al agar fundido se presentó el mismo problema de insolubilidad al contacto con el agua del medio, generando así la precipitación de los metabolitos del extracto, dificultando su acción e interfiriendo con la observación de colonias formadas dentro del agar.
- Disolución con Tween 80 (Polisorbato 80): Esta solución no presenta problemas de insolubilidad, pero era de consistencia demasiado viscosa, dificultando la incorporación de la solución, y al solidificarse no era homogénea.

- Pruebas de Dilución en Caldo:

Para evitar el uso de medio de cultivo sólidos con Tween 80, el estudio se modificó al uso de medios de cultivo líquidos (caldos), cuyos ensayos fueron los siguientes:

- Dilución en Tween 80 puro: Los estudios de dilución en caldo se realizan en proporción de 1:1 (1 mL. de caldo inoculado y otro de solución a prueba), la dificultad en esta prueba se presentó al incorporar el caldo a la solución de Tween 80, que generaba la formación de gel en el fondo del tubo, impidiendo la agitación y homogeneidad.

- Solución de Tween al 10% en Buffer fosfato pH 7.2: dicha solución disolvía bien el extracto, y el blanco no inhibía el crecimiento de los microorganismos a prueba, por lo tanto es la que se utilizó para realizar el estudio.

Resultados de la prueba:

Los tubos sometidos a prueba que contenían el extracto presentaban problemas de turbidez debido a cierta precipitación causada por el extracto, debido a esta condición se realizaron hisopados a cada uno de los tubos sometidos a prueba.

Tabla No. 4: Resultados obtenidos al resembrar los tubos con *S. aureus* en agar TSA.

Condicción Concentración	Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)		Resultado
	Serie A	Serie B	
Prueba(mg/mL)			
50	5	3	Inhibición (CIM)
35	59	55	Inhibición moderada
25	2,291	2,844	Leve inhibición
12.5	3,348	4,989.	No hay inhibición
6.25	M.N.C.	M.N.C.	No hay inhibición
3.125	M.N.C.	M.N.C.	No hay inhibición

*M.N.C.: muy numerosas para contar.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Del hisopado realizado a cada uno de los tubos a prueba y resembrados en Agar TSA se encontró que a las concentraciones de 3.125 mg/mL, 6.25 mg/mL, 12.5 mg/mL y 25 mg/mL no hay considerable inhibición del microorganismo.

La concentración de 35 mg/mL presentó una marcada inhibición con respecto a las placas anteriores ya que las colonias podían contarse fácilmente.

La actividad inhibitoria significativa se observó en la concentración de 50 mg/mL que presentó un recuento de 3-5 colonias por placas estimándose así como la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM). (Ver Anexo No. 23)

Tabla No.5: Resultados obtenidos al resembrar los tubos con *T. mentagrophytes* en agar Dextrosa Sabouraud.

Concentración / Condición	Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)		Resultado
	Serie A	Serie B	
Prueba(mg/mL)			
50	0	0	No se observa crecimiento (CMF)
35	395	280	Leve inhibición
25	180	185	Leve inhibición
12.5	683	666	No hay inhibición
6.25	748	748	No hay inhibición
3.125	715	813	No hay inhibición

INTERPRETACIÓN:

Del hisopado realizado a cada uno de los tubos a prueba y resembrados en Agar TSA se encontró que a las concentraciones de 3.125 mg/mL, 6.25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 25 mg/mL y 35 mg/mL no hay considerable inhibición del microorganismo.

La actividad fungicida se observó en la concentración de 50 mg/mL por que no presento ningún crecimiento de microorganismos por lo que determina la Concentración Mínima Fungicida (CMF). (Ver Anexo No. 25)

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo al estudio fitoquímico preliminar, el extracto diclorometánico obtenido del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún) están presentes glicósidos saponínicos y terpenos.
2. En el extracto diclorometánico se descarta la presencia de taninos, alcaloides, flavonoides, sesquiterpenlactonas, glicósidos cardiotónicos, y antraquinonas.
3. El dimetilsulfóxido, posee propiedades efectivas para la disolución de extractos vegetales pero concentrado inhibe el crecimiento microbiano del ***Staphylococcus aureus*** y ***Trichophyton mentagrophytes***.
4. Las solución de Tween al 10% es efectiva para la disolución de extractos vegetales de difícil incorporación y dicha solución no inhibe el crecimiento microbiano.
5. La evaluación de la propiedad antibacteriana del extracto diclorometánico del pacún frente a ***Staphylococcus aureus*** indica actividad inhibitoria a la concentración de 50 mg/mL. (CIM).

6. La evaluación de la propiedad antifúngica del extracto diclorometánico del pacún frente al *Trichophyton mentagrophytes* indica actividad fungicida a la concentración de 50 mg/mL, (CMF).
7. El efecto antibacteriano y antifúngico es debido a la presencia de saponinas triterpénicas.
8. La evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto, permite hacer una contribución en el área de la salud, debido a que pueden formularse preparados a base de pericarpio de *Sapindus saponaria* (Pacún) para las diferentes infecciones provocadas por hongos y bacterias

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar el fraccionamiento bioguiado del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto ***Sapindus saponaria*** (Pacún), con el objetivo de descubrir en cual o cuales fracciones se encuentran los metabolitos secundarios responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica.
2. Llevar a cabo la investigación antimicrobiana a otras cepas de microorganismos patógenos, para ampliar su estudio y utilidad en diferentes enfermedades que afectan a la población, especialmente con otros hongos.
3. No utilizar dimetilsulfoxido puro, para realizar pruebas de propiedad antimicrobiana, debido a que presenta actividad inhibitoria frente a ***Staphylococcus aureus*** y ***Trichophyton mentagrophytes***.
4. Utilizar solución de Tween 80 al 10% en Buffer fosfato pH = 7.2, puede ser una alternativa para la incorporación de extractos con problemas de insolubilidad.

5. Realizar estudios de actividad antimicrobiana por métodos de dilución en caldo o microdilución, por que con ellos se pueden encontrar datos más precisos sobre Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) o Concentración Fungicida Mínima (CFM) así como también son una alternativa para los estudios que presentan dificultad por el método de Kirby Bauer Modificado

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel Wahab, y otros. 1985. Lipids and flavonoids of *Sapindus saponaria*. *Fitoterapia*. 56(3), 167–8.
2. Amaya E.,y otros. 2004. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana y Antifúngica del Extracto Etanólico del Fruto ***Sapindus saponaria*** (Pacún). Licenciatura en Química y Farmacia. San Salvador, El Salvador. Universidad de El Salvador.
3. Beatty, W. K. 1993. “Diccionario de Ciencias Médicas “25^a ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. Pág. 69, 163, 165, 437.
4. Calderón S. Flora Salvadoreña. 1941. Lista Preliminar de Plantas de El Salvador. 2 Edición. Imprenta Nacional. Pag 178, 450..
5. Dewick, P. M. 1997. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. England. Editorial John Wiley & Sons. Págs. 57, 137, 226-227, 272.
6. Domínguez, X. A. 1963 “Métodos de Investigación Fitoquímica.” primera Edición. Editorial Limusa. México D. F. Pág. 84–100.
7. Font Quer, P. 1993. Diccionario de Botánica, Barcelona. Editorial Labor S.A., Tomo I y II. Pags. 318, 794-795, 805, 822.
8. Guzmán, D. J. 1975. Especies Útiles de la Flora Salvadoreña Médico Industrial. Ministerio de Educación. Impreso en los Talleres de la Dirección de publicaciones. San Salvador. Págs. 167-168.
9. Hasan, S. Q.; y otros. 1994. Reinvestigation of seed oil of *Sapindus saponaria*. *Journal of the oil*. 26(3), 77-9.

10. Jawets. E.; y otros. 1992. Microbiología Médica. 14 Edición. Editorial el Manual Moderno. México D. F. Págs. 243, 368, 217, 218,237-239.
11. Kingston, D. y otros. 2001. Isolation, Characterization, and Síntesis of Bioactive Natural Products From Rainforest Flora. Doctor of Philosophy in Chemistry. Blacksburg, Virginia. Virginia Polytechnic Institute and State University. Págs. 13-15.
12. Koneman, E. W. 1997. Diagnóstico Microbiológico. 3 Edición. Editorial Médica Panamericana. México D. F. Págs. 582 – 587, 612 - 613, 909.
13. Lemos, y otros. 1992. New saponin from ***Sapindus saponaria***. Fitoterapia. 63(6), 515-17.
14. Lemos, y otros. 1994. Saponin from ***Sapindus saponaria***. Fitoterapia. 65(6), 557.
15. Lock de Ugaz, Olga. Investigación Fitoquímica. Segunda Edición. Pontificia Universidad Católica de Perú. Fondo Editorial. Págs. 6-7, 255-267.
16. Martínez Grau, M. A. Técnicas experimentales en Síntesis Orgánicas. Editorial Síntesis. S. A. España. Págs. 168-174.
17. Martínez Guerrero, y otros. 2003. Comprobación de la Actividad Antimicótica in Vitro de una Tintura Elaborada con Oleorresina de Eucalipto. Trabajo de Graduación. Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. Pág. 45.
18. Martínez, M. Catalogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Editorial Fondo de Cultura Económico. México. Págs. 483.

19. Merck. 1994. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt. Alemania. Págs. 144, 74, 127, 807.
20. Ni, W.; y otros. 2004. New ticuracallane-type triterpenoid saponins from *Sapindus mukorosii* Gaetn. Journal of Asian Natural Products Research. 6(3), 205-206.
21. NCCLS. Subcomité on Antimicrobial Suceptibility Testing. Vol. 23. Pág. 7.
22. Organización de los Estados Americanos (OEA), Universidad de El Salvador (UES), Ministerio de Salud Pública Y Asistencia Social (MSPAS). Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. Planter. Volumen 1. 1989. Editorial Universitaria. Universidad de El Salvador. Págs. Total de 564.
23. Ribeiro, A. y otros. 1995. Molluscicidal saponins from the pericarp of *Sapindus saponaria*. International Journal of Pharmacognosy. 33(3), 177 - 80.
24. Stedman, T. Diccionario de las Ciencias Médicas ilustrado, 25 Edición, Editorial Médica Panamericana, Pag. 517, 575, 1083, 1139, 1158-1159, 1263, 1374.
25. Sun, J. R.; y otros. 2002. A new acyclic sesquiterpene oligoglycoside from pericarps of ***Sapindus mukorosii***. 13(6), 555-556.
26. Tamura, y otros. 1990. Isolation of monodesmoside saponins from rind of ***Sapindus trifoliatus*** or – ***mukorosii*** fruits as skin fungicides. Patent (Copyright 2004 ACS on SciFinder ®).

27. Takagi, K.; y otros. 1980. Antiinflammatory activities of hederagenin and crude saponin isolated from *Sapindus mukorosii*. 28(4), 1183-8.
28. Tortora, Gerard. y otros. Introducción a la microbiología. Editorial Acriba, S.A. 1993. Pág. 494.
29. Tamayo, M. El Proceso de la Investigación Científica. 3^o Edición, Editorial Limusa, S. A. de C. V. México D. F. Pág. 105-108.
30. United States Pharmacopeial Convention, 2003, The United States Pharmacopeial, 27 Edición, Toronto, Edit Webcom Limited, Pag. 2006-2007, 2149.
31. Villar del Fresno, A. M. Farmacognosia General. Editorial Síntesis S. A. Madrid España.1999. Págs. 178, 182-185, 211, 214, 220, 229, 231, 237, 241 – 242, 251, 254, 261.
32. Werner, D.; y otros. 1987. Aprendiendo a Promover la Salud. Editorial Centro de Estudios Educativos, A. C. México.
33. www.mobot.mobot.org (02/062005).
34. www.upm.edu/biology/cursos/micro/pruebas (02/06/2005).
35. www.uc.cl/edu/enferm/ciclo/htm/grales/glosario.htm. (16/06/2005).
36. www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=s1609-91172004000100002&=sciarttext&tlng=es. (02/03/05)
37. www.ucm.es/info/otri/computecno/ficha/tec_rf fuente1.htm.(12/03/05)
38. www.mspas.gob.sv/pdf/causas_de_morbilidad_2003.pdf

GLOSARIO (3, 7, 5, 12, 15)

- Absceso: Cavity que contiene pus y está rodeada de tejido inflamado formado como consecuencia de la supuración en una infección localizada.
- Aerobio: Microorganismo que vive y crece en presencia de oxígeno.
- Anaerobio: Microorganismo que solo puede vivir y crecer en ausencia de oxígeno.
- Edema: Acumulación de cantidades excesivas de líquido acuoso en células, tejidos o cavidades cerosas.
- Elución: Fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria impulsados por la fase móvil.
- Epicarpio (Epicarpo): (Del griego *karphe* = fruto y *epi* = sobre) en el pericarpio, dicese de la capa externa del mismo, que suele corresponder a la epidermis externa o inferior de la hoja carpelar.
- Esquistosomiasis (Schistosomiasis): Enfermedad causada por parásitos de género *Schistosoma*, conocida también como Bilharzia, el cual tiene como huésped intermediario al caracol. Estos gusanos pueden vivir en una persona y colocar millares de huevos sobre el curso de varios años. Los síntomas incluyen el sarpullido o piel picante, fiebre, frío, dolores de músculo, y el daño posible al hígado, a los intestinos, a los pulmones, y a la vesícula.
- Febrífugo: Agente que tiende a reducir la fiebre.
- Fibrilante: Que efectúa el proceso de fibrilación

- Fibrina: Proteína filamentososa elástica derivada del fibrinógeno por acción de la trombina, que libera fibrinopéptidos A y B del fibrinógeno, en la coagulación de la sangre.
- Fibrinógeno: Factor I (de la coagulación de la sangre); globulina del plasma, la cual es convertida en fibrina por acción de la trombina en presencia de calcio ionizado para producir la coagulación de sangre.
- Forúnculo: infección cutánea estafilocócica de carácter localizado supurativo que se origina en una glándula o folículo piloso y se caracteriza por dolor enrojecimiento e hinchazón.
- Impétigo: infección cutánea de origen bacteriano caracterizada por ampollas microscópicas llenas de pus.
- Inoculación: Implantación de microorganismos dentro o sobre de un medio de cultivo.
- Microaerófilo: Organismo que crece mejor en un ambiente con menos oxígeno que el que se encuentra en el aire.
- Morbilidad: Proporción de enfermos y sanos en una comunidad. Frecuencia de la aparición de complicaciones luego de un procedimiento quirúrgico u otro tratamiento.
- Panoja: Término usual con que se designa principalmente el espádice del maíz; panícula; Inflorescencia compuesta de tipo racemosa, en la que los ramitos van decreciendo de la base al ápice, por lo que toma aspecto piramidal. Es un racimo de racimos, como la inflorescencia de la vid.

- Paripinnada: Se aplica a la hoja pinnada cuyos caquis carece de foliolo terminal, por donde resulta que el número de elementos que la componen es par. En lugar de foliolo apical puede haber un zarcillo, una breve arista, etc.
- Patógeno: Cualquier agente, usualmente un virus, bacteria, hongo. Protozoo o helminto que causa enfermedades.
- Pericarpio. Parte del fruto que rodea la semilla y la protege contra las inclemencias del tiempo y animales. En los frutos propiamente dichos se divide en tres capas, epicarpio, endocarpio y entre ellos el mesocarpio.
- Pitiriasis versicolor: Erupción de parches color tostado o pardo sobre la piel del tronco; a menudo son de color blanco en contraste con la piel hiperpigmentada luego de la exposición al sol del verano; es causada por *Malassezia furfur*.
- Protrombina: Factor II de la coagulación de la sangre; glucoproteína de peso molecular aproximado 69000, formada y almacenada en las células parenquimáticas del hígado. Esta sustancia se ha aislado del plasma y esta presente en la sangre en concentración aproximada de 20 mg. por 100 mL. En presencia de tromboplastina e ión calcio la protrombina se convierte en trombina, que a su vez, convierte fibrinógeno en fibrina, proceso que lleva a cabo la coagulación de la sangre.
- Psoriasis: Estado caracterizado por la erupción de maculopápulas escamosas plateado-rojiza, circunscriptas, discretas y confluyentes, sobre todo en los codos, las rodillas, el cuero cabelludo y el tronco; microscópicamente, las

lesiones muestran paraqueratosis característica y elongación de los rebordes de la red.

- Septicemia: Enfermedad sistemática causada por la multiplicación de microorganismos en la sangre circulante.
- Shock tóxico: (síndrome de) Infección endotóxica estafilocócica que se produce sobre todo en la vagina de mujeres menstruales que usan tampones súper absorbentes; se caracteriza por hipertermia, vómitos, diarrea, una erupción escarlatinoforme seguida de descamación, descenso de la presión arterial y shock, que puede ser mortal; también hay hiperemia de la mucosa conjuntiva, orofaríngea y vaginal.
- Tíña: Tinea; micosis del pelo, piel y uñas, los géneros de hongos que la causan son ***Microsporum, Trichophyton y Epidermiphyton.***
- Virulencia: Propiedad de un agente patógeno infectante de provocar enfermedad.

ANEXOS

ANEXO No. 1

FOTOGRAFIAS DE *Sapindus saponaria*



Fruto verde



Fruto maduro



Árbol



Hoja

Figura No. 5 Fotografías de *Sapindus saponaria* (Pacún)

ANEXO No. 2

**DIEZ PRIMERAS CAUSAS FRECUENTES DE MORBILIDAD ATENDIDAS EN
CONSULTA AMBULATORIA. ⁽³⁸⁾**

Tabla No. 6 Causas frecuentes de morbilidad atendidas en consulta ambulatoria (Enero-Diciembre 2003)

No.	DIAGNOSTICO	TOTAL CONSULTA DE PRIMERA VEZ (CASOS NUEVOS)	% DEL TOTAL DE PRIMERAS CONSULTAS	TOTAL DE CONSULTAS (PRIMERA VEZ MÁS SUBSECUENTES)	TASA DE INCIDENCIA
1	INFECCIONES AGUDAS DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS SUPERIORES 1/	1,895,823	25.90	2,130,622	35,699
2	INFECCION DE VÍAS URINARIAS	305,059	4.17	369,056	5,744
3	PARASITISMO INTESTINAL 2/	303,084	4.14	351,597	5,707
4	DIARREA Y GASTROENTERITIS DE PRESUNTO ORIGEN INFECCIOSO	282,616	3.86	327,058	5,322
5	CONJUNTIVITIS AGUDA Y LA NO ESPECIFICADA	171,958	2.35	188,091	3,238
6	BRONQUITIS Y BRONQUIOLITIS AGUDA	168,449	2.30	200,931	3,172
7	MICOSIS 3/	133,426	1.82	155,976	2,512
8	ENFERMEDADES DEL ESTOMAGO Y DEL DUODENO 4/	130,248	1.78	177,849	2,453
9	ENFERMEDADES NO INFLAMATORIAS DE ORGANOS GENITALES FEMENINOS 5/	127,448	1.74	188,714	
10	INFECCIONES DE LA PIEL Y TEJIDO SUBCUTANEO 6/	177,464	1.60	135,567	2,212
SUB-TOTAL DE CONSULTAS		3,635,575	49.67	4,225,461	
LAS DEMAS CAUSAS		3,684,230	50.33	5,882,191	
TOTAL CONSULTAS			100.00	10,107,652	

FUENTE: Registro Diario de Consulta Médica

1/ Incluye: Rinofaringitis aguda, (resfriado común), sinusitis aguda, faringitis aguda, amigdalitis aguda,, laringitis, traqueitis aguda, laringitis obstructiva aguda (Crup), epiglotitis, faringoamidalitis y otras infecciones agudas de las vías respiratorias superiores, de sitios múltiples o sitios no especificados.

2/ Incluye: Amebiasis, giardiasis, ascariasis, tricuriasis, enterobiasis, parasitosis intestinal sin otra especificación y helmintiasis no especificada.

3/ Incluye: Dermatofitosis (Tiña todo sitio anatómico), micosis superficiales, candidiasis, (todo sitio anatómico), coccidioidomicosis, histoplasmosis, blastomicosis, esporotricosis, aspergilosis, micetoma, cromomicosis, criptococosis, mucomicosis sin otra especificación, otras micosis especificadas y micosis no especificadas.

4/ Incluye: Úlcera gástrica, duodenal, péptica de sitio no especificado, gastroyeyunal, gastritis y duodenitis, dispepsia, otras enfermedades del estómago y del duodeno.

5/ Incluye: Endometriosis del útero y sitio no especificado, prolapso genital femenino, fístulas que afectan el tracto genital femenino, trastornos no inflamatorios del ovario, trompa de falopio y ligamento ancho, pólipo del tracto genital femenino, hiperplasia de la glándula del endometrio, hipertrofia del útero, trastornos del útero no especificados, erosión y ectropion del cuello del útero, displasia del cuello uterino, menstruación ausente, escasa o rara, menstruación excesiva, frecuente e irregular, hemorragia vaginal y uterina anormal no especificada, otros dolores o afecciones relacionadas con los órganos genitales

femeninos, trastornos menopáusicos y perimenopáusicos, otros trastornos no inflamatorios del cuello del útero y de la vagina.

6/ Incluye: Impétigo, absceso cutáneo, furúnculo, carbunco, celulitis (todo sitio anatómico), linfadenitis aguda, quiste pilodinal, piodema y otras infecciones locales de la piel y del tejido subcutáneo no especificadas.

ANEXO No. 3

PRINCIPALES ZONAS DE DISTRIBUCIÓN DE *Sapindus saponaria* (Pacún)
EN EL SALVADOR.



FIGURA No. 6 Fotografía captada por satélite de las principales zonas de distribución de *Sapindus saponaria* en El Salvador.
(Fuente: **Jardín Botánico de Missouri**)

ANEXO No. 4

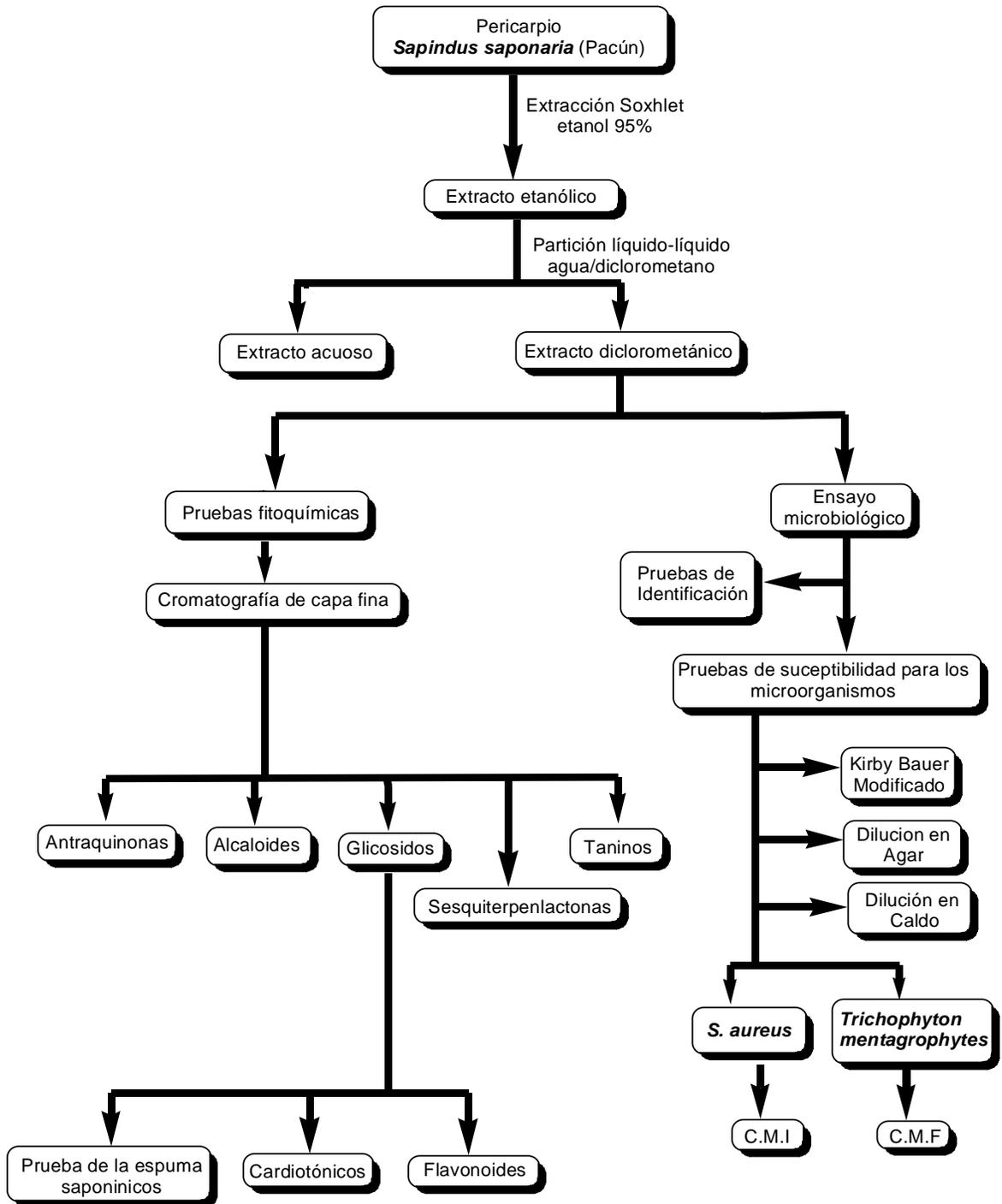


Figura No. 7 Esquema de Trabajo

ANEXO No. 5

APARATOS UTILIZADOS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

DICLOROMETANICO DEL PERICARPIO DEL FRUTO DE

***Sapindus saponaria* (Pacún)**



Figura No. 8 Aparato Soxhlet



Figura No. 9 Aparato Rotaevaporador

ANEXO No. 6

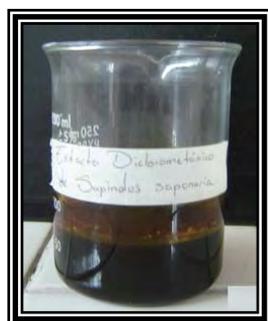
PROCESO DE OBTENCION DEL EXTRACTO DICLOROMETANICO DEL PERICARPIO DEL FRUTO *Sapindus saponaria* (Pacún).



Pericarpio de Pacún



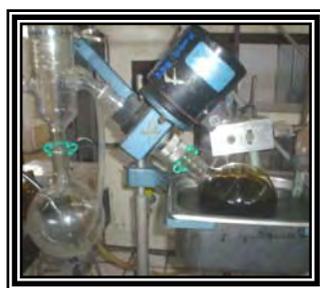
Extracción con etanol 95% (Soxhlet)



Extracto diclorometánico



Concentración (rotaevaporador)



Concentración del extracto diclorometánico



Separación agua/diclorometano en ampolla de separación



ANEXO No. 7

**RESULTADO DE PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES DEL
EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DEL PERICARPIO DEL FRUTO DE
Sapindus saponaria (Pacún)**

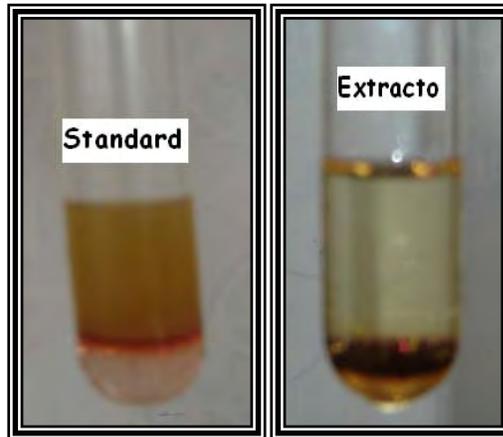


Figura No. 10 Prueba de salkowski (+) anillo púrpura
Identificación del anillo triterpénico



Figura No. 11 Prueba de la espuma (+) Identificación
de glicósidos Saponínicos.

ANEXO No. 8

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

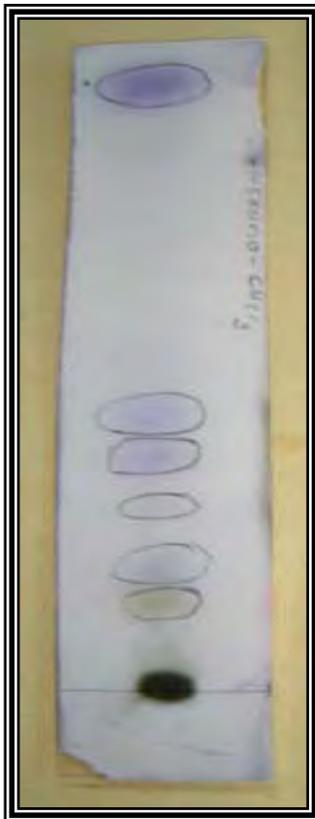


Figura No. 12 Cromatografía de capa fina realizada al extracto Diclorometánico del pericarpio del fruto de ***Sapindus saponaria*** (Pacún).
Fase móvil: *n*-hexano:cloroformo (4:6), revelador universal(vainillina-ácido sulfúrico).

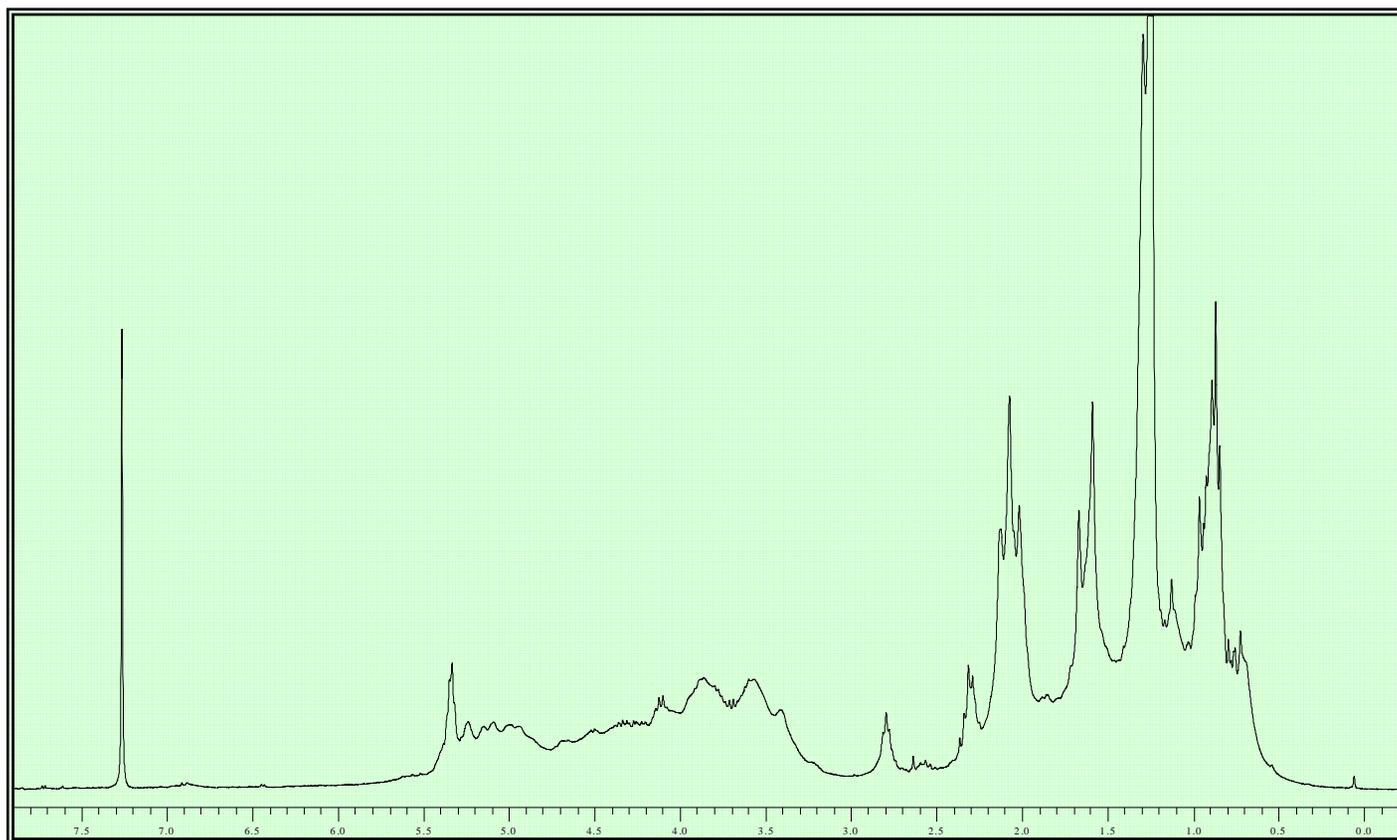


Figura No. 13 Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún).

ANEXO No. 10

MORFOLOGIA MICROSCÓPICA.

TINCIÓN AL GRAM PARA *Staphylococcus aureus*

MÉTODO:

1. Extensión: En un portaobjetos limpio con etanol al 93%, 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 seque.

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

- a) Un minuto en cristal violeta (colorante inicial)
- b) Se lava con agua destilada
- c) Un minuto en lugol (mordiente)
- d) Se decolora con alcohol-acetona (1:1)
- e) Lavar con agua destilada
- f) Un minuto en safranina (colorante de contraste)
- g) Lavar con agua
- h) Secar suavemente (sin frotar) con papel filtro
- i) Ya seco colocar una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio. ⁽³⁴⁾

ANEXO No. 11

IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE *Staphylococcus aureus*.

Cuadro No.12 Pruebas de Identificación y Diferenciación de
Staphylococcus aureus.⁽²⁾

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coagulasa	Evidencia de reacción de coagulación del plasma sanguíneo que produce la enzima. Característica que permite diferenciar los <i>Staphylococcus</i> de los <i>Streptococcus</i>	Colocar 0.5 mL de plasma citrado. Inocular una colonia de microorganismos e incubar a 37° C por 24 horas.	Observar una coagulación total o parcial del plasma, se interpreta como presencia de coagulasa, enzima característicamente producida por <i>Staphylococcus aureus</i> .
	Catalasa	Identifica la enzima catalasa que descompone el H ₂ O ₂ , en oxígeno y agua.	Colocar una gota de agua al 30% sobre una lamina porta objetos y colocar una porción de colonia del microorganismo	Se produce un burbujeo vigoroso del peroxido, que indica la presencia de <i>Staphylococcus</i>

ANEXO No. 12

IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE *Trichophyton mentagrophytes*.

Cuadro No. 13 Pruebas de Identificación y Diferenciación de *Trichophyton mentagrophytes*.⁽¹²⁾

MICRO-ORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACION
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Tinción con azul de algodón-lactofenol	Debido a los grupos sulfónicos, el colorante es fuertemente ácido y se ha usado como contra tinción en bacterias y protozoarios, en combinación con otros colorantes. Actualmente se usa mas para la tinción directa del micelio micótico.	Se hace un frotis delgado al material a utilizar. Secar a temperatura ambiente y fijar a través de la llama. Colocar solución de azul de algodón lactofenol. Y observar al microscopio.	Se observa las microaleuriosporas dispuestas en cúmulos con formas de pinos o de racimos de color azul tenue.
	Prueba del cebo de pelo	El <i>Trichophyton mentagrophytes</i> invade la cutícula del pelo formando agujeros.	Se colocan pelos y agua en una caja de petri y se inocula la colonia a prueba.	Invasión de la cutícula del pelo de siete a diez días produciendo agujeros en forma cónica.

ANEXO No. 13

RESULTADO DE MORFOLOGIA MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA

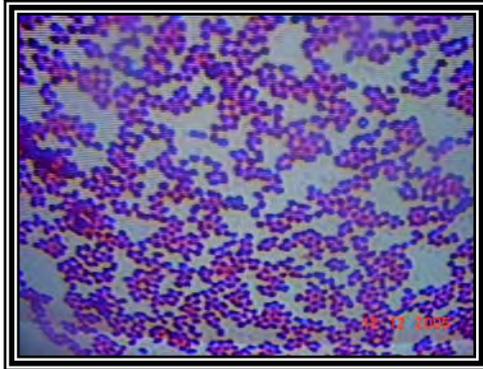


Figura No. 14 ***S. aureus*** Gram (+).
Cocos en forma de
racimo color violeta.

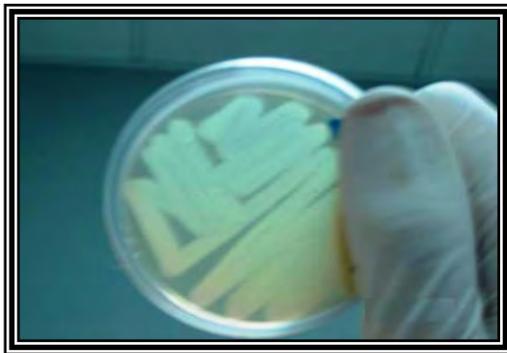


Figura No. 15 ***S. aureus*** en Agar
Chapman.
Colonias cremosas color
amarillo dorado, lisas,
redondas y borde
convexo.



Figura No. 16 ***S. aureus*** en Agar Baird
Parker.
Colonias color negro,
lustros, redondas de
borde convexo.

ANEXO No. 14

RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

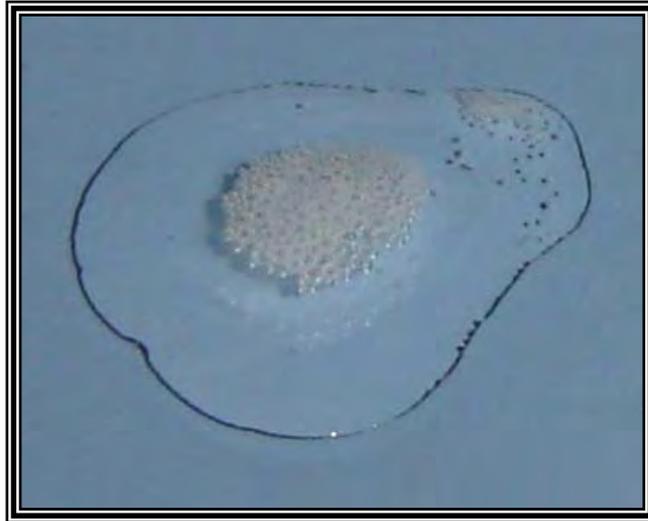


Figura No. 17 Prueba de la catalasa
Resultado (+) burbujeo.

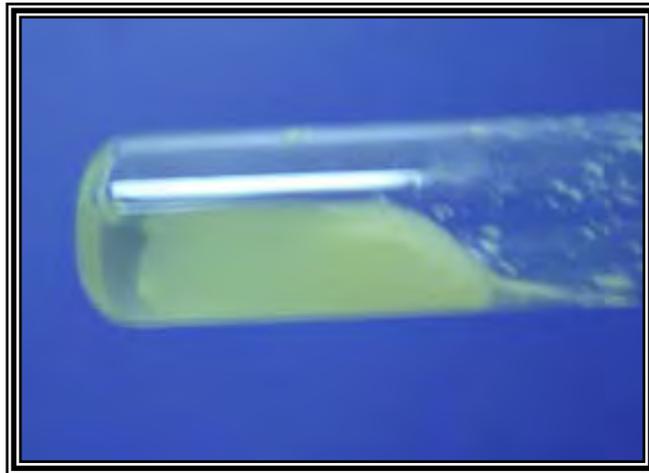


Figura No. 18 Prueba de la coagulasa
Resultado (+).
Formación de coagulo.

ANEXO No. 15

RESULTADO DE MORFOLOGIA MICROSCÓPICA Y MACROSCÓPICA

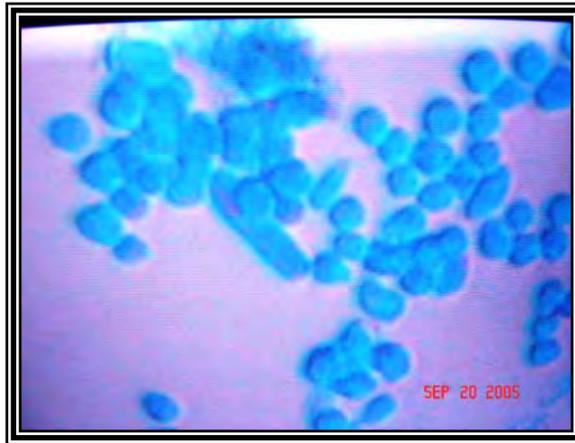


Figura No. 19 Prueba con azul algodón lactofenol para ***T. mentagrophytes***.
Microconidias globosas en forma de racimo de uvas color azul tenue.



Figura No.20 ***T. mentagrophytes*** en Agar Dextrosa Sabouraud
Colonias vellosas, color blanco.

ANEXO No. 16

RESULTADO DE LA PRUEBA DEL CEBO DE PELO



Figura No. 21 Prueba del cebo de pelo para *T. mentagrophytes*

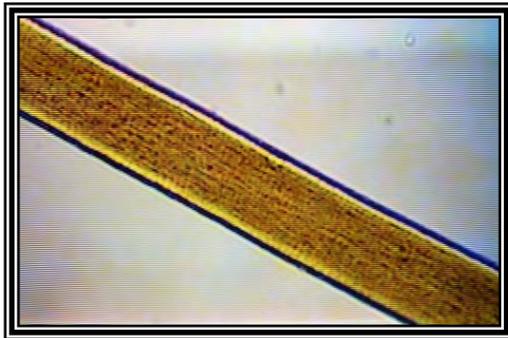


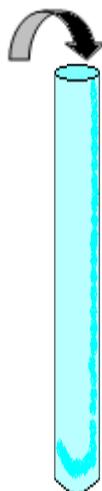
Figura No. 22 Prueba de cebo de pelo (-).
No se observa invasión de la cutícula.



Figura No. 23 Prueba de cebo de Pelo (+).
se observa invasión de la cutícula.

ANEXO No. 17

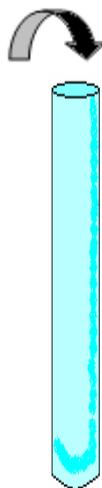
PREPARACIÓN DEL ESTANDAR MC FARLAND ⁽²¹⁾



9.5 mL de H_2SO_4 + 0.5 mL de $BaCl_2$

- Preparación de la suspensión para ***Staphylococcus aureus***:

10 mL de caldo nutritivo + cantidad necesaria de bacteria.



9.9 mL de H_2SO_4 + 0.1 mL de $BaCl_2$

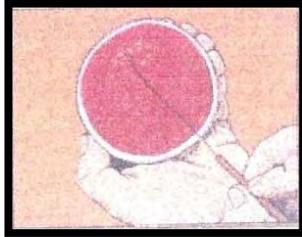
- Densidad aproximada: 3×10^8 microorganismos/mL

- Preparación de la suspensión para ***Trichophyton mentagrophytes***:

10 mL de caldo nutritivo + cantidad necesaria del hongo.

ANEXO No. 18

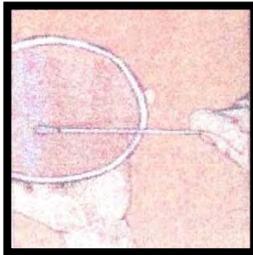
1. Remover las colonias con asa bacteriológica.



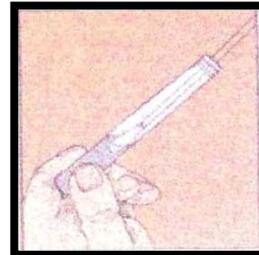
2. Preparar una suspensión del microorganismo y comparar con estándar de Mc Farland



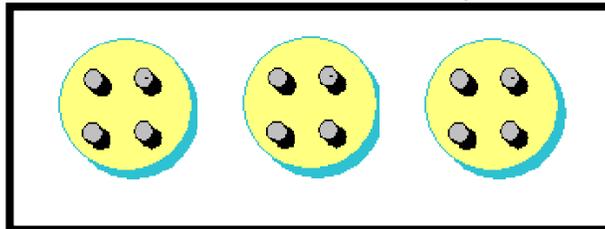
3. Sembrar por hisopado en la superficie de la placa.



4. Impregnar un hisopo con la suspensión del microorganismo



5. Colocar los cilindros en cada placa y con ayuda de una micropipeta llenarlos con la solución de prueba



6. Incubar según las condiciones específicas del microorganismo.

7. Medir los halos de inhibición

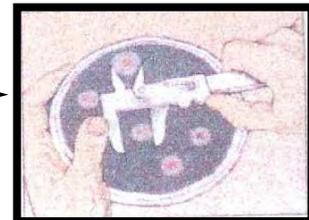
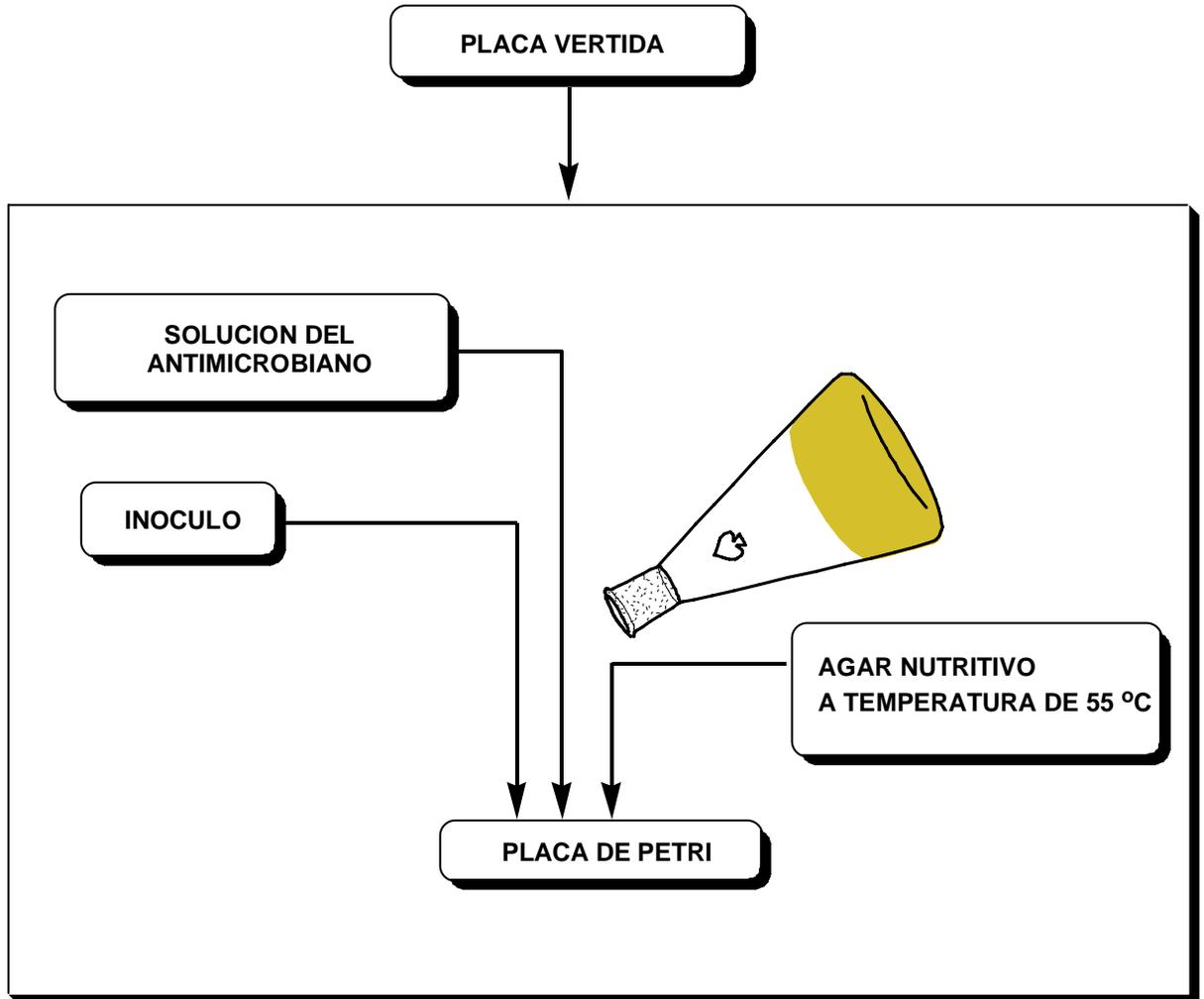


Figura No. 24 Esquema de Kirby Bauer Modificado

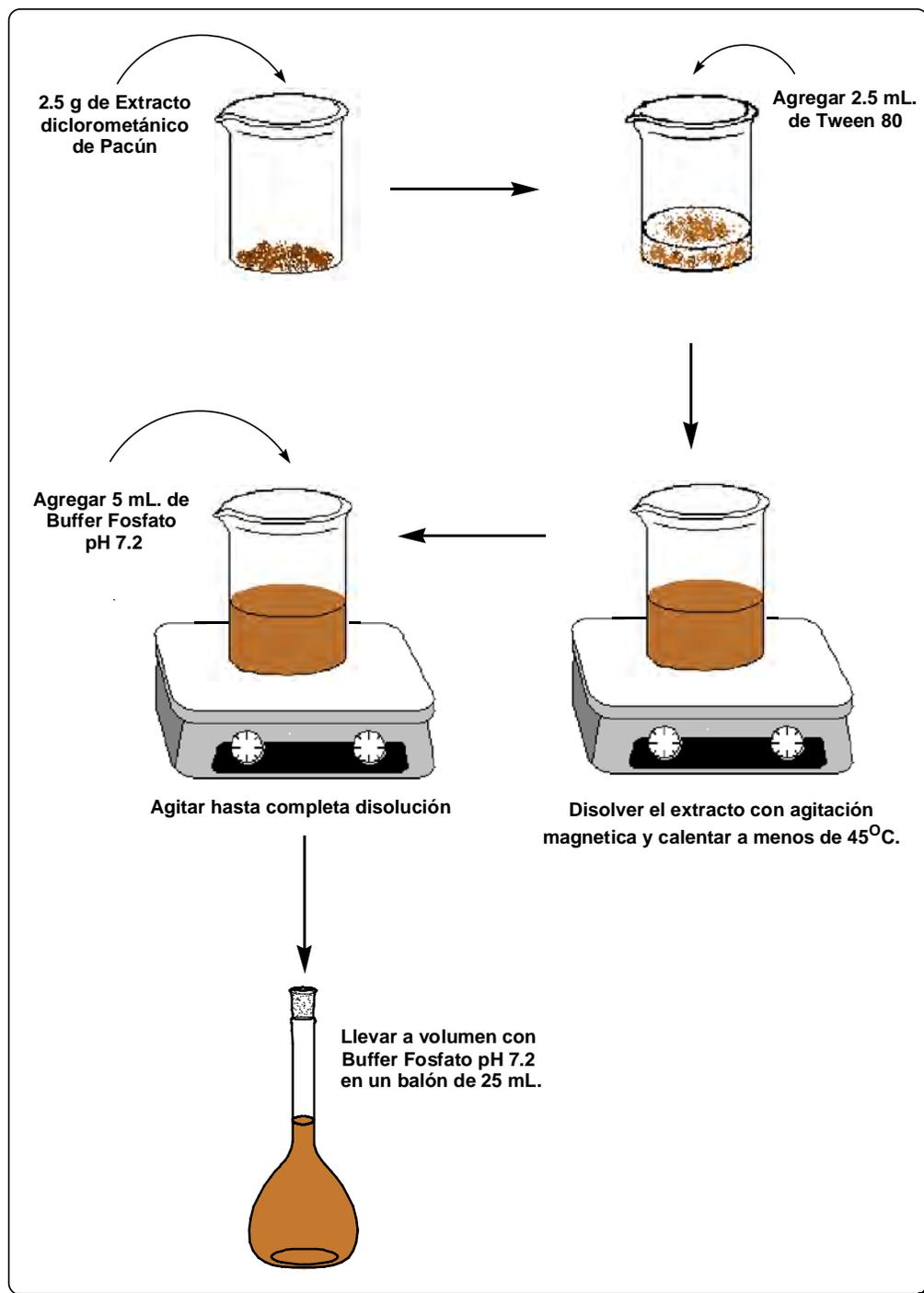
ANEXO No. 19

ESQUEMA DE PLACA VERTIDA



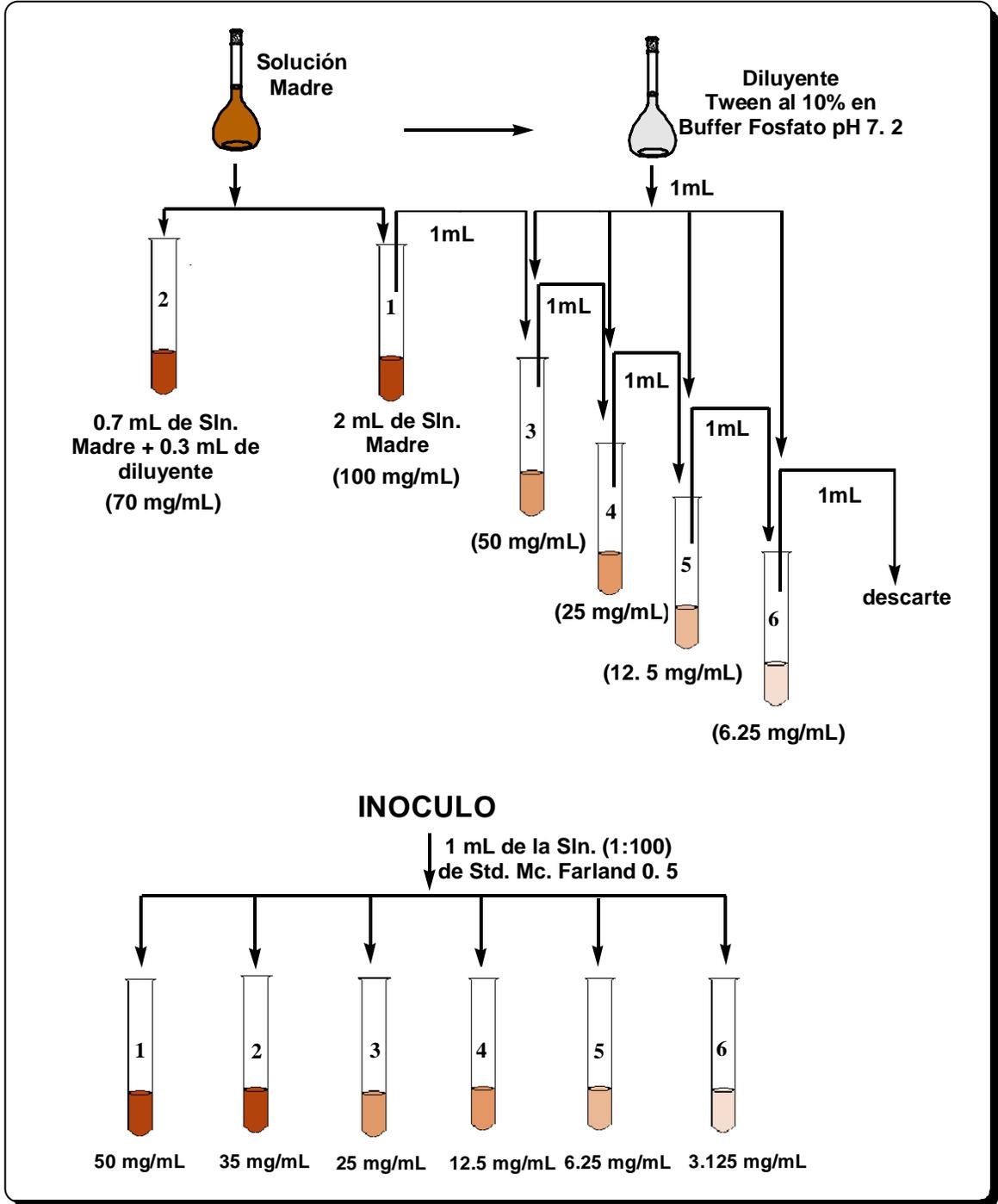
ANEXO No. 20

PREPARACION DE LA SOLUCION MADRE

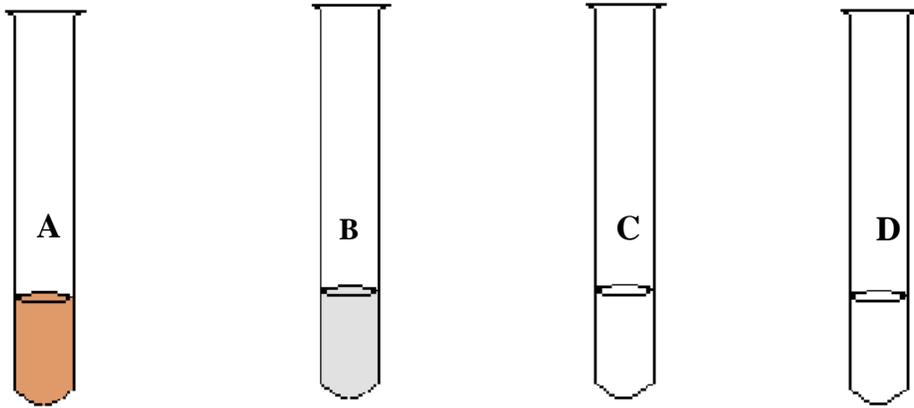


ANEXO No. 21

ESQUEMA DE DILUCIÓN EN CALDO



BLANCO Y CONTROLES



Tubo A (blanco): Caldo + Extracto

Tubo C (control positivo 1): Caldo inoculado + Diluyente*

Tubo B (control positivo 2): Caldo inoculado + Solución salina esteril 0.9%

Tubo D (control negativo): Caldo nutritivo

***(Tween al 10% en Buffer Fosfato pH 7. 2)**

ANEXO No. 22

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO
DICLOROMETÁNICO DEL PERICARPIO DEL FRUTO *Sapindus saponaria*
FRENTE A *Staphylococcus aureus*

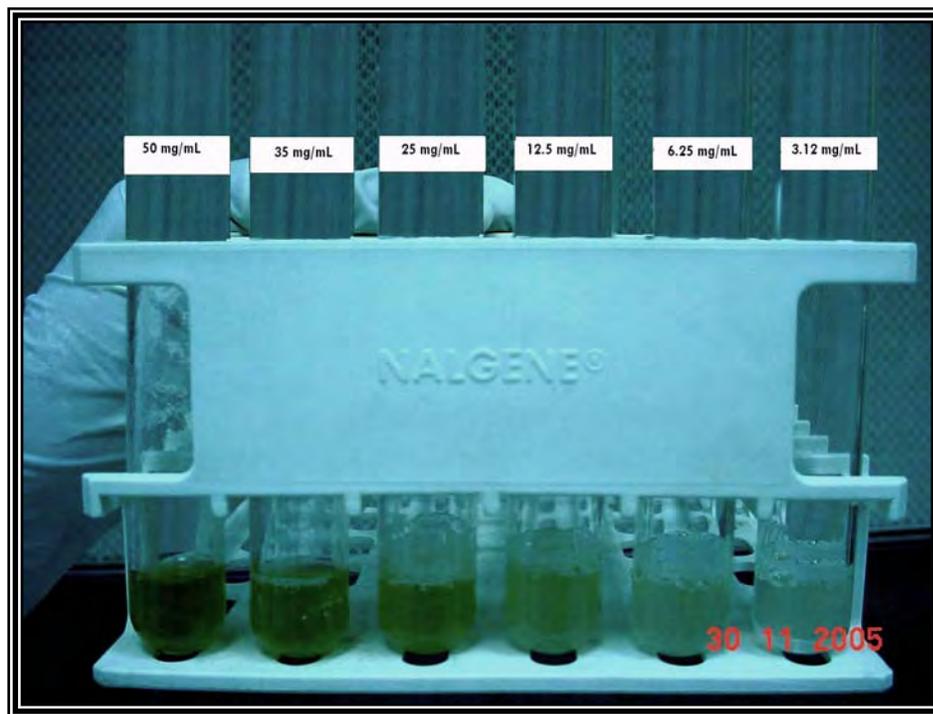


Figura No. 25 Evaluación del extracto diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún) realizada por el método de dilución en caldo para *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 50 mg/mL, 35 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL y 3.125 mg/mL.

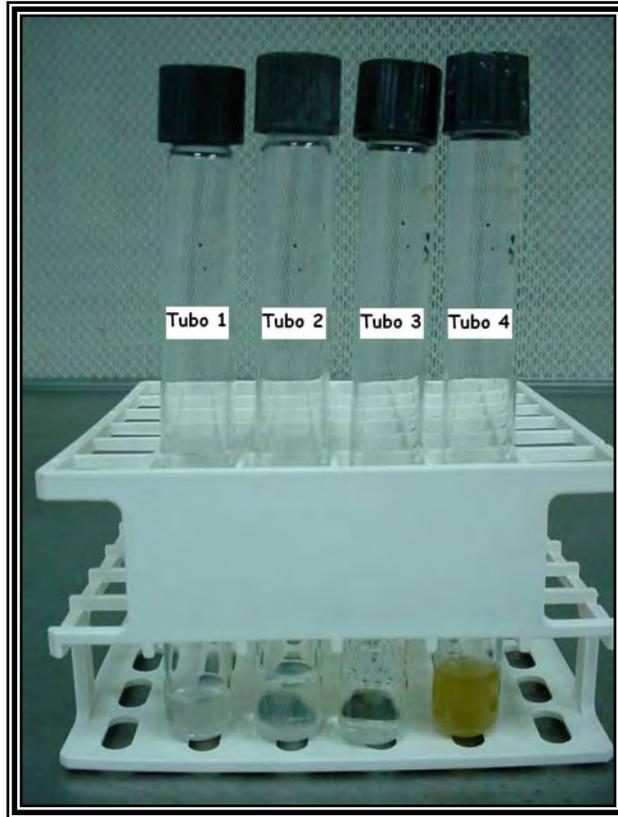


Figura No. 26 Blancos utilizados para la evaluación antimicrobiana del extracto Diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún).

BLANCO Y CONTROLES:

- Tubo No.1 (control positivo 1): Caldo inoculado (*S. aureus*) + solución salina estéril 0.9%.
- Tubo No. 2 (control positivo 2): Caldo inoculado (*S. aureus*) + diluyente*
- Tubo No. 3 (control negativo): Caldo
- Tubo No. 4 (blanco): Caldo + extracto.

*(Tween al 10% en Buffer fosfato pH 7.2)

ANEXO No. 23

RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS EN PLACAS CON AGAR TRIPTICASA
SOYA (TSA) DE LA SERIE DE DILUCIÓN EN CALDO PARA
Staphylococcus aureus

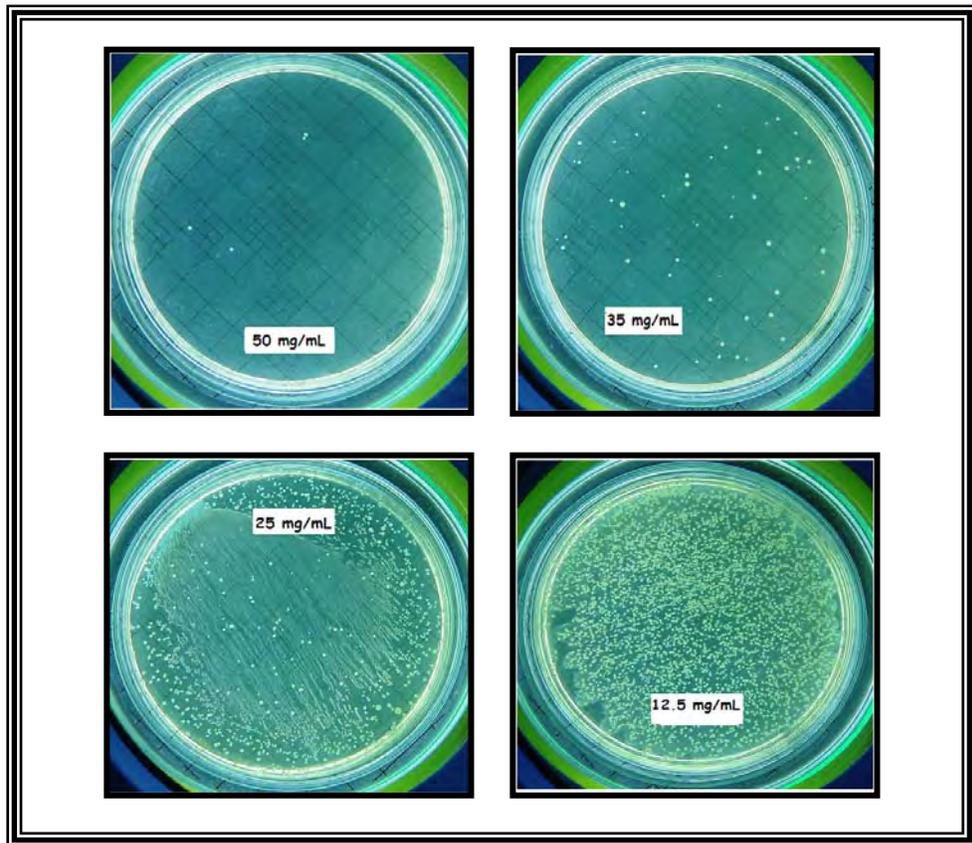


Figura No. 27 Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en caldo en Agar Tripticasa Soya (TSA) para *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 50 mg/mL, 35 mg/mL, 25 mg/mL y 12.5 mg/mL.

RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS EN PLACAS CON AGAR TRIPTICASA
SOYA DE LA SERIE DE DILUCION EN CALDO PARA
Staphylococcus aureus

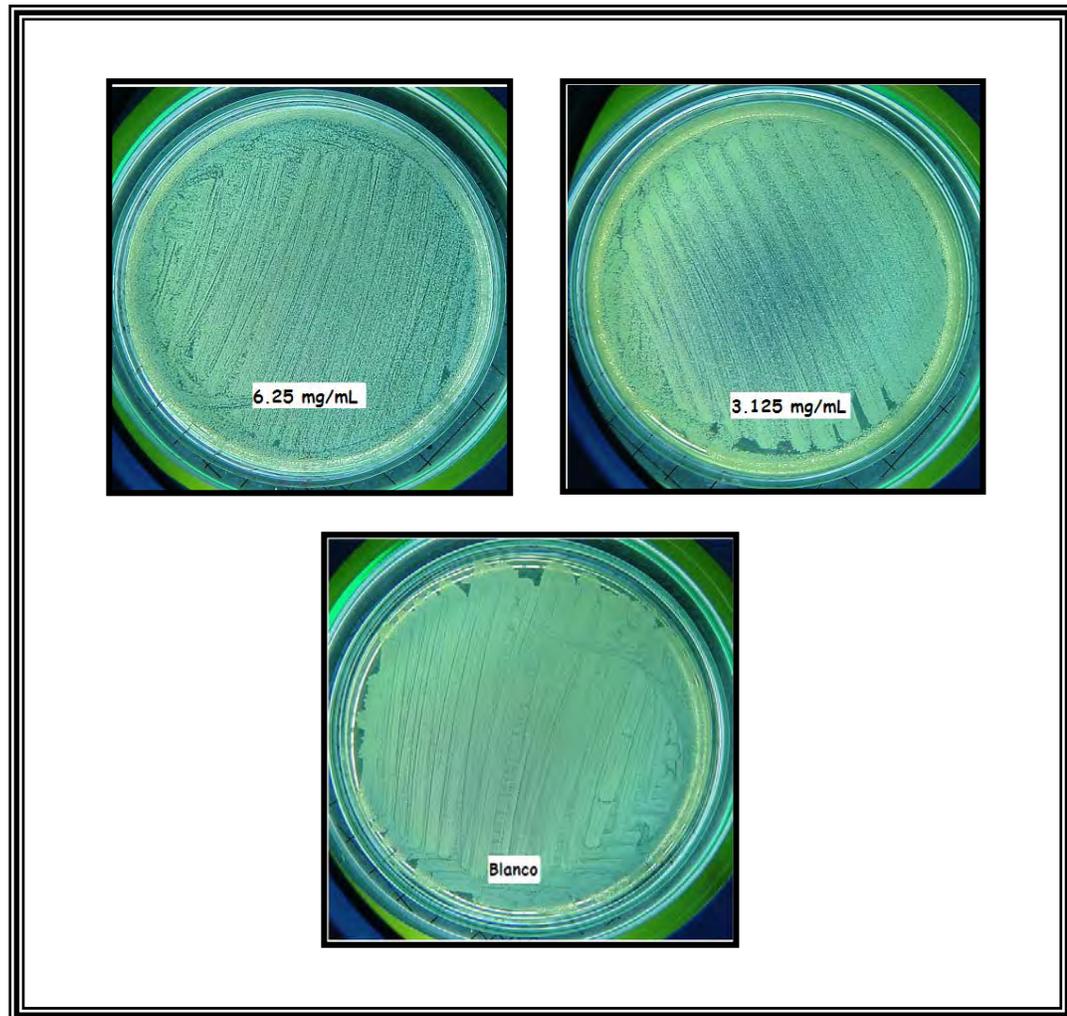


Figura No. 28 Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en caldo en Agar Tripticasa Soya (TSA) para *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL y blanco.

ANEXO 24

**RESULTADO DE LA EVALUACION ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO
DICLOROMETANICO DEL PERICARPIO DEL FRUTO *Sapindus saponaria*
FRENTE A *Trichophyton mentagrophytes***

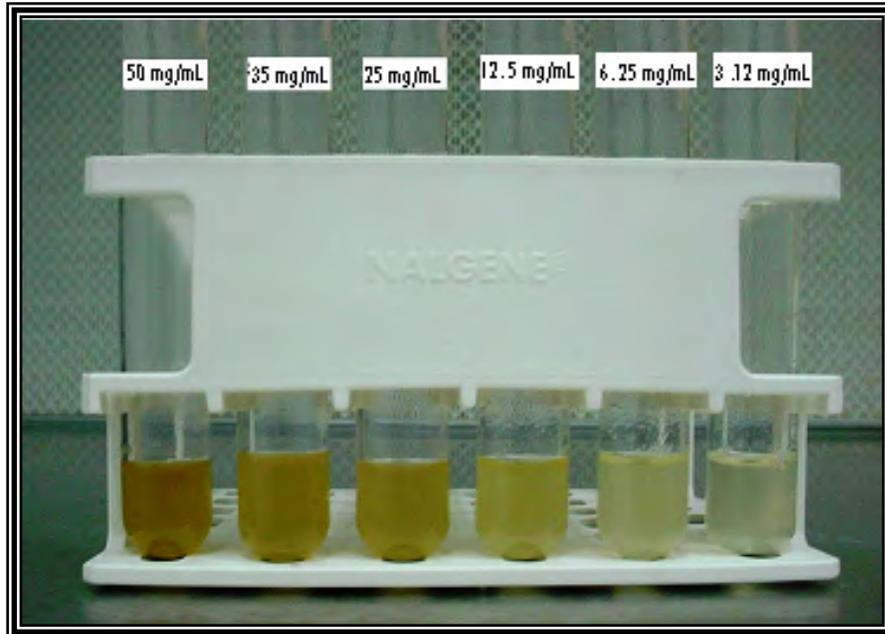


Figura No.29 Evaluación del extracto diclorometánico de pacún realizada por el Método de Dilución en Caldo para *Trichophyton mentagrophytes* en concentraciones de 50 mg/mL, 35 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL.

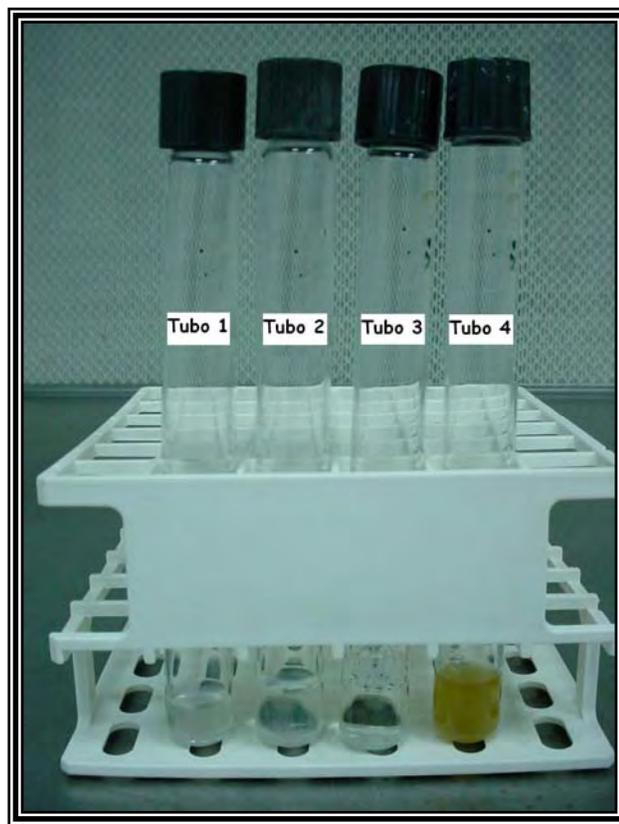


Figura No. 30 Blancos utilizados para la evaluación antimicrobiana del Extracto Diclorometánico del pericarpio del fruto *Sapindus saponaria* (Pacún).

BLANCO Y CONTROLES:

- Tubo No. 1 (control positivo 1): Caldo inoculado (*T. mentagrophytes*) + solución salina estéril 0.9%.
- Tubo No. 2 (control positivo 2): Caldo inoculado (*T. mentagrophytes*) + diluyente (Tween al 10% en Buffer Fosfato pH 7.2)
- Tubo No. 3 (control negativo): Caldo
- Tubo No. 4 (blanco): Caldo + extracto.

ANEXO No. 25

RESULTADOS DE LAS SIEMBRAS EN PLACAS CON AGAR DEXTROSA
SABOURAUD DE LA SERIE DE DILUCIÓN EN CALDO PARA
Trichophyton mentagrophytes

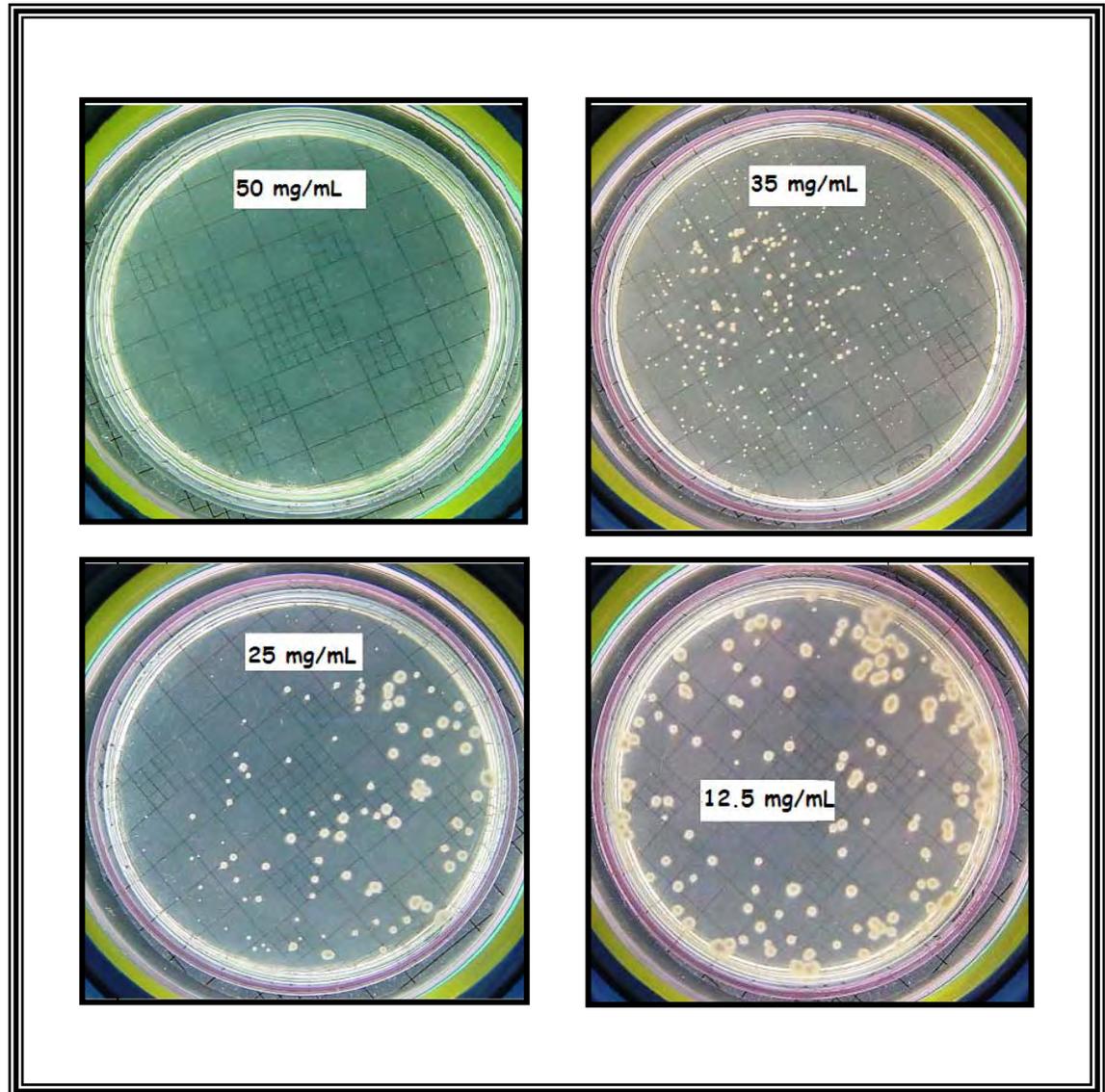


Figura No. 31 Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en Caldo en agar Dextrosa sabouraud para *Trichophyton mentagrophytes* en concentraciones de 50 mg/mL, 35mg/mL, 25 mg/mL y 12.5 mg/mL.

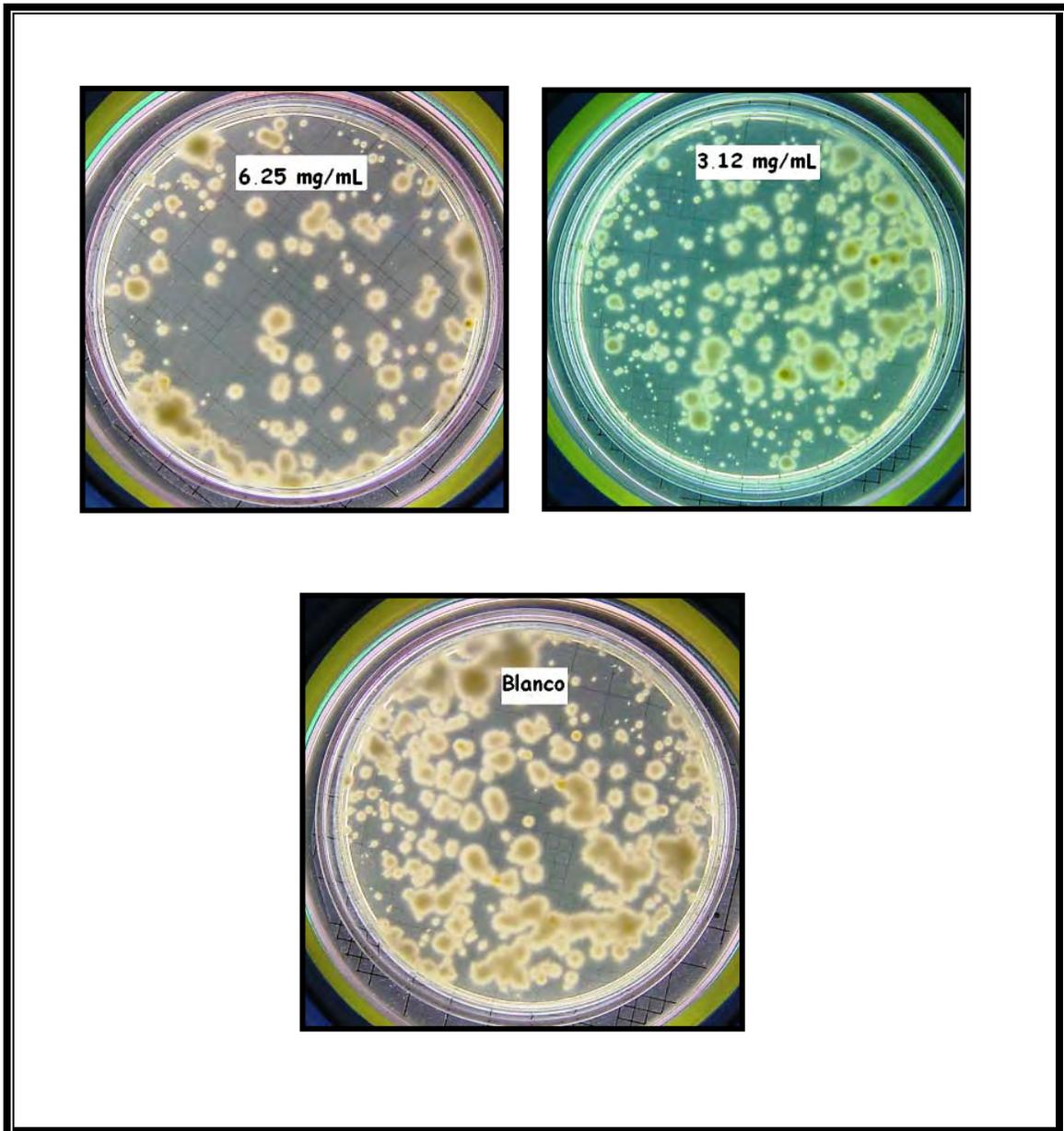


Figura No. 32 Resultado de la siembra en placa de la serie de dilución en caldo en Agar Dextrosa Sabouraud para *Trichophyton mentagrophytes* en concentraciones de 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL y blanco

ANEXO No. 26**CUADRO No. 14 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS. ⁽¹⁹⁾**

MEDIO	PREPARACION
CHAPMAN	Disolver 146,5 g/litro, esterilizar en auto clave (15 minutos a 121°C) y verter en placas. pH: 7,0 ± 0,2 Las placas con el medio de cultivo son claras e incoloras.
SABOURAUD	Disolver 30 g/litro y esterilizar en autoclave (15 min. a 121° C). no sobrecalentar pH: 5.6 ± 0.1. las placas con medio de cultivo son claras e incoloras.
MUELLER HINTON	Disolver 34 g/litro, esterilizar con cuidado en autoclave, enfriar eventualmente a 45-50°C para incorporar del 5 al 10% de sangre desfribinada. Verter en placas. pH : 7.4 ± 0.2 Las placas con medio de cultivo sin sangre son claras y de color amarillento.
BAIR PARKER	Disolver 58 g en 0.95 litros, 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/litro de sulfametacina. PH: 6.8± 0.2
TSA	Suspender 40 g/Lt. Esterilizar en autoclave por 15 min. A 121 °C

ANEXO No. 27

PREPARACIÓN DE REACTIVOS REVELADORES.

- **Reactivo de Liebermann – Burchard:** Mezclar 5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Esta mezcla se agrega con cuidado y enfriando, a 50 mL de etanol (preparar poco antes de uso). Aspersar y calentar 10 min. a 110°C . Mancha fluorescente a luz ultravioleta a 365 nm.

Detección de esteroides; y otros esteroides y glicósidos triterpénicos

- **Anisaldehído – ácido sulfúrico:** 0.5 de Anisaldehído se mezcla con 10 mL de ácido acético glacial, seguido por 85 mL de metanol y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, (en ese orden; el reactivo es de limitada estabilidad por ello descartar si el color se torna violeta).

Aspersar la placa, calentar a 100°C por 5 – 10 min. y evaluar el **VIS o UV – 365 nm**. En el visible los componentes de los aceites esenciales muestran coloraciones intensas: azul, verde, roja y marrón, algunos compuestos fluorescen bajo UV – 365 nm. Detección: aceites esenciales, saponinas, principios amargos, etc.

- **Anisaldehído – ácido sulfúrico:** Solución recién preparada de 0.5 mL de Anisaldehído en 50 mL de HOAC glacial, con adición de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Aspersar y calentar a 100 – 105 °C. Colores violeta, azul, roja, gris o verde. Evaluar en Vis o UV – 365 nm. Detección: azúcares, esteroides y terpenos.

- **Acetato de plomo básico:** Solución de acetato de plomo básico (25% en agua), aspersar y observar manchas fluorescentes a la luz UV de onda larga.

Detección: flavonoides.

- **Cloruro de hierro (III):**

A: solución de cloruro de hierro (III) al 1 o 5% en ácido clorhídrico 0.5N.

B: solución de cloruro de hierro (III) al 10% en agua.

Detección: fenoles y ácidos hidroxámicos.

- **Ácido 3,5-dinitrobenzoico (reactivo de Kedde):** 1 g de ácido 3,5-dinitrobenzoico se disuelve en una mezcla de 50 mL de metanol y 50 mL de solución de KOH 2N. Aspersar y evaluar en el visible manchas violetas – azuladas. Detección: glicósidos cardiotónicos.

- **Hidróxido de potasio** (reacción de Borntrager): Solución de hidróxido de potasio al 5% o 10% en etanol o metanol. Aspersar y evaluar en visible o UV- 365 nm Detección: Cumarinas (azul), antrona (amarilla), antraquinona (roja).

- **Reactivo de Dragendorff:**

Solución A: disolver 1.7g de nitrato básico de bismuto en 20 g de ácido tartárico en 80 mL de agua.

Solución B: disolver 16 g de yoduro de potasio en 40 mL de agua.

Solución de reserva: mezclar volúmenes iguales de las soluciones A y B, conservar en refrigeración.

Para usar: disolver 10 g de ácido tartárico en 50 mL de agua y agregar 5mL de solución de reserva.

Detección: alcaloides y otros compuestos nitrogenados.

Vainillina - ácido sulfúrico:

Disolver 1 g de vainillina en 100 mL de H₂SO₄ concentrado o disolver 0.5 g de vainillina en una mezcla de H₂SO₄ : etanol (40:10).

Aspersar y calentar a 120°C hasta intensidad de coloración óptima de manchas.

Detección: reactivo universal.

Prueba de Legal:

2 mg de sustancia se disuelven en 2-3 gotas de piridina, en seguida se añade una gota de una solución reciente de nitroprusiato de sodio al 0.5% y después se añade gota por gota, cuatro gotas de KOH 2N.

Detección: Sesquiterpenlactonas.

Prueba de Baljet:

Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100 mL de etanol

Solución B: 10 g de NaOH en 100 mL de agua

Mezclar las soluciones en volúmenes iguales

Aspersar y observar la formación de colores, anaranjado o rojo oscuro

Detección: Sesquiterpenlactonas.

Prueba de Shinoda:

Tomar una alícuota del extracto del pericarpio de *S. saponaria* (Pacún) y concentrarlo hasta 5 mL, añadirle una laminilla de magnesio metálico y 1

mL de HCl concentrado. Observar el desarrollo del color, lo cual es resultado positivo para flavonoides.

ANEXO No. 28

MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL VEGETAL:

- Pericarpio del fruto de *S. saponaria* (Pacún)

CEPAS DE REFERENCIA:

- *Staphylococcus aureus* ATCC No. 65923
- *Trichophyton mentagrophytes* Cepa salvaje

MATERIAL:

- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Beakers
- Agitadores
- Erlenmeyer
- Cajas petri
- Hisopos estériles
- Asas
- Pipetas Morh
- Micropipetas
- Pipeteadores
- Pinzas
- Cilindros de acero inoxidable

- Vidrio de reloj
- Tubos de ensayo con rosca
- Ampolla de separación
- Soporte
- Pinza sostén
- Pinza de extensión
- Aro metálico
- Malla de asbesto
- Mechero
- Kitazato
- Probetas

EQUIPO:

- Autoclave: de vapor húmedo, Webeco 1978, serie 72244, de aire seco, presión, modelo 25 EG, serie 9903-005.
- Estufa: Thelco, modelo 3542, serie 21-AF-10.
- Balanza analítica: Mettler, modelo PM 400, serie SNR 1243297.
- Incubadora: Napto, modelo 332, serie 6-83-1822-20.
- Flash evaporator: Bushler, instrument, modelo 50-60 cy, serie 4865445.
- Soxhlet de 1500 mL.

REACTIVOS Y DISOLVENTES:

- Alcohol etílico
- Ácido sulfúrico diluido 10%
- Tiras de magnesio Ácido clorhídrico concentrado
- Acetato de plomo al 10%
- Acetato de etilo
- Tricloruro de hierro al 5%
- Piridina
- Nitroprusiato de sodio 0.5%
- Hidróxido de sodio 2N
- Kéller Killiani
- Solución de ácido 3,5 – dinitrobenzoico 5%
- Cloroformo
- Diclorometano
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Dicromato de potasio
- Dragendorff
- Mayer
- Wagner
- Benceno
- Amoníaco
- Solución de gelatina al 2%

- Solución de cafeína al 10%
- Clorhidrato de quinina al 5%
- Agua de bromo al 2%
- Borntrager
- Vainillina
- Sílica gel
- Hidróxido de potasio 2N
- Baljet-ácido pícrico
- Anisaldehído
- Ácido acético
- Solución de acetato de plomo básico al 25%
- Solución de cloruro de hierro (III) al 1, 5 y 10%
- Reactivo de Kedde
- Reactivo de Lieberman-Burchard
- Cloruro de bario
- Buffer fosfato pH 7.2
- Solución salina
- Lugol
- Safranina
- Cristal violeta
- Agua destilada
- Acetona

MEDIOS DE CULTIVOS:

- Chapman
- Dextrosa Sabouraud
- Muller Hinton
- Baird Parker