

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO
DICLOROMETÁNICO DE LA GOMA-RESINA DE *Eucalyptus citriodora*
(EUCALIPTO)

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
MARÍA CRISTINA MÉNDEZ RIVAS
JESSICA LISSETTE RAMÍREZ MENDOZA

16 DE FEBRERO
DE 1841
PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

JUNIO DE 2006

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.



©2004, DERECHOS RESERVADOS

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

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

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. María Isabel Rodríguez

Secretaria general

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

Decano

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria

Licda. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

Coordinadora General

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Área de Aprovechamiento de recursos Naturales

Licda. Arely Cáceres Magaña

Asesora de Área de Microbiología

Licda. Coralía González de Díaz

Docentes Directores

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Dr. Marvin J. Núñez Rivas

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN MARÍA:

Por habernos brindado sabiduría, entendimiento y habernos permitido culminar una meta más en nuestros estudios.

A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES:

Msc. María Evelyn Sánchez de Ramos, Dr. Marvin Núñez Rivas e Ing. Sergio Armando Maravilla, por todo el tiempo, apoyo, paciencia y dedicación que nos prestaron para la realización del presente trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y COORDINADORAS DE ÁREA:

Licda. María Odette Rauda, Licda. Arely Cáceres y Licda. Coralia de Díaz, por ser objetivas en sus evaluaciones, por su tiempo y dedicación en el desarrollo y culminación del presente trabajo.

A LOS TÉCNICOS DE LABORATORIO:

Dn. Oscar Coreas, Dn. Wilber Guzmán, Lic. Raúl Rodríguez, Licda. Amy y Dn. Juan José, por todo el apoyo brindado durante todo este trabajo de graduación y por su ayuda desinteresada.

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

Cristina y Jessica

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN MARÍA: Por prestarme la vida y darme fortaleza mental y física para poder haber culminado con éxito mi carrera.

A MIS PADRES: Hugo Méndez y América Rivas, por darme todo su amor, paciencia, comprensión y apoyo incondicional durante toda mi vida, los cuales hicieron posible convertir mis ideales en una realidad.

A MI HERMANO: Sergio Méndez, por su apoyo y porque siempre he creído en mí.

A MIS SOBRINOS: Sofía y Sergio, que con su apoyo, ánimo y amor me ayudaron a salir adelante en los momentos más difíciles y así poder conseguir este triunfo.

A MIS FAMILIARES: Con aprecio y agradecimiento por su cariño.

A HUGO STANLEY MARENCO: Por su amor, apoyo incondicional y paciencia; y porque ha sido la persona que me dio ánimos de seguir adelante y llenó mis días de felicidad y alegría.

A MI COMPAÑERA: Jessica, por ser una excelente amiga y compañera, y por toda su comprensión, paciencia y apoyo.

A MIS AMISTADES: Que de una u otra manera estuvieron conmigo apoyándome y ayudándome.

SINCERAMENTE María Cristina Méndez Rivas.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN DE GUADALUPE, que guiaron e iluminaron mi mente durante todos estos años permitiéndome culminar con éxito mis estudios universitarios,

A MIS PADRES: Israel Ramírez y Edomila Mendoza por el sacrificio de todos estos años, por su preocupación, paciencia, amor y apoyo constante sin los cuales no hubiera logrado las metas propuestas.

A MI HERMANO ROBERTO: Por su apoyo y sacrificio, por toda la ayuda que me brindo, ayuda que me sirvió para culminar mis estudios.

A MIS HERMANOS: Antonio, Enrique y Alan por haberme brindado su apoyo y creer siempre en mi.

A MIS SOBRINOS: Rocío, Gabriela, Emerson, César y Bryan que con sus palabras de ánimo, apoyo y cariño me ayudaron en gran manera en los momentos más difíciles para poder conseguir mi triunfo.

A MI FAMILIA Por motivarme en mis momentos de flaqueza para seguir adelante y para alcanzar mis metas.

A MI COMPAÑERA CRISTINA MENDEZ: Por su amistad incondicional, por su apoyo, paciencia y ayuda en la realización de este trabajo.

A MIS AMISTADES: Que de una forma u otras se involucraron en mi vida estudiantil para lograr mis ideales.

SINCERAMENTE: Jessica Lissette Ramírez Mendoza

INDICE

	Página
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 Introducción	xx
CAPITULO II	
2.0 Objetivos	23
CAPITULO iii	
3.0 Marco teórico	25
3.1 Generalidades del EUCALIPTO	25
3.2 Generalidades de los metabolitos secundarios	34
3.2.1 Saponinas	34
3.2.2 Flavonoides	35
3.2.3 Antraquinonas	37
3.2.4 Sesquiterpenlactonas	38
3.2.5 Taninos	39
3.2.6 Cardiotónicos	40
3.2.7 Alcaloides	41
3.3 Generalidades de las cepas sometidas a bioensayo	44
3.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	44
3.3.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	46
3.3.3 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	48
3.4 Fraccionamiento Bioguiado	50

3.5 Generalidades sobre los exudados	52
3.6 Generalidades sobre cromatografía	54
3.6.1 Cromatografía de capa fina	56
3.7 Método de Difusión en placa	64
Capitulo IV	
4.0 Diseño metodológico	66
4.1 Tipo de estudio	66
4.2 Investigación bibliográfica	66
4.3 Metodología de campo	67
4.4 Metodología de laboratorio	67
4.4.1 Caracterización organoléptica	67
4.4.2 Parte fitoquímica	67
4.4.2.1 Obtención del extracto diclorometánico	67
4.4.2.2 Pruebas fitoquímicas preliminares	68
4.4.3 Ensayo Microbiológico	69
4.4.3.1 Pruebas de identificación microbiológicas	69
4.4.3.2 Determinación del potencial de inhibición	71
CAPITULO V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	75
CAPITULO VI	
6.0 Conclusiones	102
CAPITULO VII	
7.0 Recomendaciones	
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE FIGURAS

Figura No.

- 1 Fotografía del Árbol de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto)
- 2 Metabolitos secundarios aislados de las hojas de ***Eucalyptus citriodora***.
- 3 Metabolitos secundarios aislados de la corteza de ***Eucalyptus citriodora***
- 4 ***Staphylococcus aureus***
- 5 ***Streptococcus pyogenes***
- 6 ***Pseudomonas aeruginosa***
- 7 Placa fina (condiciones, dimensiones, etc.)
- 8 Inyección de la muestra
- 9 Introducción de placa en cámara cromatográfica
- 10 Elución de la placa
- 11 Revelación de las placas
- 12 Esquema del cálculo del R_f
- 13 Resultados del método de Kirby Bauer modificado en ***Staphylococcus aureus*** al 7.5%.
- 14 Resultados del método de Kirby Bauer modificado en ***Staphylococcus aureus***
- 15 Resultados del método de Kirby Bauer modificado en ***Streptococcus pyogenes*** al 2.5%.
- 16 Resultados del método de Kirby Bauer modificado en ***Streptococcus pyogenes***

- 17 Resultados del método de Kirby Bauer modificado en ***Staphylococcus aureus*** al 10%
- 18 Resultados del método de Kirby Bauer modificado en ***Staphylococcus aureus***
- 19 Gráfico de comparación del efecto inhibitorio del extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto)
- 20 Árbol de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto)
- 21 Árbol de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto) exudando oleorresina
- 22 Fotografía de muestra de goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto)
- 23 Fotografía de método de extracción: Soxhlet
- 24 Fotografía de rota evaporador
- 25 Diagrama de la metodología general de trabajo
- 26 Esquema del fraccionamiento bioguiado
- 27 Liebermann-Burchard
- 28 Anisaldehído / ácido sulfúrico (terpenos)
29. Anisaldehído / ácido sulfúrico (saponinas)
- 30 Acetato de plomo básico
- 31 Cloruro de hierro (III)
- 32 Reactivo de Kedde
- 33 Reacción de Bornträger
- 34 Reactivo de Dragendorff
- 35 Vainillina / ácido sulfúrico

- 36 Prueba de Baljet
- 37 Vapores de amoníaco
- 38 Prueba de Tollen's
- 39 Prueba de Fehling
- 40 ***Staphylococcus aureus*** en agar Bair Parker
- 41 ***Staphylococcus aureus*** en agar Chapman
- 42 ***Pseudomona aeruginosa*** en agar Cetrimide
- 43 ***Streptococcus pyogenes*** en agar sangre
- 44 Método de extensión
- 45 ***Staphylococcus aureus*** en coloración al Gram
- 46 ***Pseudomona aeruginosa*** en coloración al Gram
- 47 ***Streptococcus pyogenes*** en coloración al Gram
- 48 Prueba de catalasa
- 49 Prueba de coagulasa
- 50 Prueba bioquímica de movilidad
- 51 Prueba bioquímica del Rojo de Metilo
- 52 Prueba bioquímica del Citrato
- 53 Prueba bioquímica del Indol
- 54 Prueba bioquímica de Voges Proskauer
- 55 Prueba bioquímica del TSI
- 56 Prueba de discos de Bacitracina
- 57 Preparación del estándar de Mac Farland
- 58 Esquema del método de Kirby Bauer modificado

INDICE DE CUADROS

Cuadro No.

- 1 Contenido químico, metabolitos secundarios aislados del *Eucalyptus citriodora*
- 2 Características macroscópicas
- 3 Pruebas de identificación microbiológicas
- 4 Características organolépticas del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*
- 5 Fase cloroformo-éter etílico (1:1)
- 6 Volumen del extracto madre necesario para llevar a concentración de trabajo
- 7 Pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus*.
- 8 Morfología microscópica y macroscópica de *Pseudomona aeruginosa*
- 9 Pruebas de identificación y diferenciación de *Pseudomona aeruginosa*
- 10 Pruebas de identificación del *Streptococcus pyogenes*
- 11 Resultado de la evaluación microbiológica de las diferentes concentraciones del extracto de la goma-resina por el método de Kirby Bauer modificado para *Pseudomona aeruginosa*
- 12 Resultado de la evaluación microbiológica de las diferentes concentraciones del extracto de la goma-resina por el método de Kirby Bauer modificado para *Pseudomona aeruginosa*

- 13 Resultado de la evaluación microbiológica de las diferentes concentraciones del extracto de la goma-resina por el método de Kirby Bauer modificado para ***Streptococcus pyogenes***
- 14 Características macroscópicas de los microorganismos
- 15 Características microscópicas de los microorganismos
- 16 Pruebas de identificación y diferenciación de ***Staphylococcus aureus***.
- 17 Pruebas bioquímicas de ***Pseudomonas aeruginosa***
- 18 Interpretación de resultados de la prueba del TSI para ***Pseudomonas aeruginosa***
- 19 Pruebas de identificación para bacterias Gram negativas.
- 20 Pruebas de identificación y diferenciación de ***Streptococcus pyogenes***
- 21 Normatizaciones interpretativas de los diámetros de las zonas basados en el método de KIRBY BAUER modificado
22. Preparación de medios de cultivo

INDICE DE ANEXOS

ANEXO No.

- 1 Fotografía del Árbol de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto)
- 2 Árbol de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto) exudando goma-resina
- 3 Fotografía de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto)
- 4 Fotografía de Equipo utilizado: Soxhlet y rota evaporador
- 5 Metodología de la técnica general de trabajo
- 6 Fraccionamiento bioguiado
- 7 Placas cromatográficas
- 8 Pruebas fitoquímicas de la capa acuosa
- 9 Características macroscópicas de los
microorganismos
- 10 Resultado de morfología microscópica para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*
- 11 Pruebas microscópicas (coloración al Gram)
- 12 Características macroscópicas de los
microorganismos
- 13 Resultado de pruebas microscópicas para *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*
- 14 Pruebas de identificación y diferenciación de *Staphylococcus aureus*.

- 15 Resultado de pruebas de identificación y diferenciación de ***Staphylococcus aureus***.
- 16 Pruebas bioquímicas de ***Pseudomona aeruginosa***
- 17 Resultado de pruebas de identificación y diferenciación para ***Pseudomona aeruginosa***
- 18 Interpretación de resultados de la prueba TSI para ***Pseudomona aeruginosa***
- 19 Pruebas de identificación para bacterias Gram negativas.
- 20 Pruebas de identificación y diferenciación de ***Streptococcus pyogenes***
- 21 Resultado de pruebas de identificación y diferenciación de ***Streptococcus pyogenes***
- 22 Esquema de preparación del estándar de Mac Farland
- 23 Esquema del método de Kirby Bauer modificado
- 24 Normatizaciones interpretativas de los diámetros de las zonas basados en el método de Kirby Bauer modificado
- 25 Preparación de medios de cultivo
- 26 Preparación de reactivos reveladores
- 27 Materiales, equipo, reactivos y solventes

RESUMEN

Eucalyptus citriodora es una especie vegetal que proporciona diferentes usos, entre ellos y quizá uno de los más importantes es en la industria farmacéutica.

Este exuda una goma-resina, que posee diversas propiedades curativas, entre las que puede sobresalir la propiedad antimicrobiana, la que se investigó por medio de un estudio retrospectivo, prospectivo y experimental, dicha propiedad. Para ello se utilizó el equipo soxhelt, con el que se obtuvo el extracto etanólico de la goma-resina del eucalipto, del cual se parte para realizar la partición líquida-líquida agua/diclorometano y así obtener el extracto diclorometánico, el cual se requiere para identificar la posible presencia de flavonoides, antraquinonas, sesquiterpenlactonas, taninos, alcaloides y glicósidos cardiotónicos mediante cromatografía de capa fina.

Además se elaboró la solución madre a una concentración previamente establecida del 10% y de esta se parte para realizar las diluciones para el ensayo.

Se le determinó la actividad antimicrobiana tanto a la solución madre como a las diluciones, mediante el método microbiológico de Kirby Bauer Modificado, utilizando las bacterias ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pyogenes***.

De igual manera se utilizan discos de antibióticos como patrones de comparación. En el caso del ***Staphylococcus aureus*** se utiliza penicilina de

10 unidades, para la *Pseudomona aeruginosa* se usa gentamicina de 10 µg y para el *Streptococcus pyogenes* se utiliza ampicilina de 10 µg.

De acuerdo a los resultados obtenidos se confirma la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

En la flora salvadoreña existen una gran variedad de especies vegetales que se utilizan como base para el desarrollo de nuevos fármacos, por sus propiedades curativas para diversas enfermedades, algunas de las cuales han sido estudiadas con el fin de detectar sus propiedades antimicrobianas, contribuyendo así al desarrollo de preparaciones medicinales elaboradas a partir del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

El “Eucalipto” (*Eucalyptus citriodora*), es una especie muy utilizada por sus diversas propiedades como saporífero, antiséptico, diaforético y expectorante en numerosas afecciones del aparato respiratorio.⁽¹⁷⁾

Además exuda una goma-resina, que posee diversas propiedades curativas, entre las que puede sobresalir la propiedad antimicrobiana, es por esto que se investigó por medio de un estudio retrospectivo, prospectivo y experimental, dicha propiedad, dándole continuación al trabajo realizado anteriormente con el extracto etanólico, que fue obtenido utilizando el equipo soxhlet, del cual se partió para luego realizar una partición líquida-líquida agua/diclorometano de la goma-resina de esta especie vegetal, estudiando así sus propiedades, las que se comprueban experimentalmente a través de una evaluación microbiológica haciendo uso del método Kirby Bauer Modificado utilizando las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*, las cuales atacan el tejido dañado por heridas, quemaduras, golpes e incluso en cirugías causando así infecciones graves.

La importancia de dicha investigación, radica en la utilización de preparados vegetales y contribuir a la investigación de la flora medicinal en el país, fomentando así el hecho de que esta especie vegetal (su extracto diclorometánico), pueda convertirse en el futuro en una alternativa terapéutica, en el tratamiento de infecciones cutáneas o respiratorias causadas por dichos microorganismos y contribuir así a la investigación científica en la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos.



CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Obtener el extracto etanólico y a continuación realizar partición líquida - líquida agua/diclorometano de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

2.2.2. Realizar pruebas fitoquímicas preliminares al extracto diclorometánico de la goma-resina, para comprobar la presencia de sus metabolitos secundarios.

2.2.3. Obtener el extracto madre y realizar diluciones para el ensayo (10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0.5%).

2.2.4. Comprobar la actividad antimicrobiana del extracto diclorometánico por el método Microbiológico Kirby Bauer Modificado, utilizando las bacteria *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0. MARCO TEÓRICO

3.1 GENERALIDADES DEL EUCALIPTO

Nombre común: "Eucalipto limón"

Nombre científico: *Eucalyptus citriodora*

Familia: Myrtaceae

Subfamilia: Leptospermoideae



Figura No. 1. Árbol de *Eucalyptus citriodora*

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol de gran porte que puede superar los 40 metros de altura, con la corteza lisa, caediza, blanca o con ligera tonalidad azulada. Hojas juveniles opuestas, un poco peltadas, pecioladas, de oblongas a oblongo-lanceoladas, con pilosidad abundante. Hojas adultas alternas, pecioladas, estrechamente lanceoladas, de 10-16 cm de longitud y 1-2 cm de anchura. Todas las hojas desprenden un fuerte olor a limón. Inflorescencias terminales corimbosas

formadas por umbelas de 3-5 flores. Pedúnculos cilíndricos. Opérculo hemisférico, ligeramente rostrado, más corto que el tubo del receptáculo. Cápsula urceolada, pedicelada, de 8-10 mm de diámetro, con valvas sin sobresalir. ⁽²⁴⁾

USOS

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

En medicina popular se emplean sus hojas como sudorífico, espasmódico, contra la gripe y los resfriados. En inhalaciones se aprovechan con gran resultado en caso de ronquera, pérdida de la voz y en la sinusitis. ⁽³⁰⁾

OTROS USOS

La madera es de color castaño-oscuro a castaño-grisácea, dura, fuerte y tenaz, siendo empleada en estructuras y armazones, carruajes, tarimas, carpintería naval, apero de labranza, etc. La leña es muy buena, se prepara un carbón industrial y se utiliza para obtener celulosa y pulpa de papel. Las hojas producen un aceite esencial con olor a limón, el cual es rico en citronelal, y muy apreciado en perfumería. ⁽²⁴⁾

TOXICIDAD

El citronelal encontrado en el *Eucalyptus citriodora*, se reporta que es mutagénico. ⁽⁹⁾

CUADRO N° 1 CONTENIDO QUÍMICO, METABOLITOS SECUNDARIOS

AISLADOS DEL *Eucalyptus citriodora*.

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

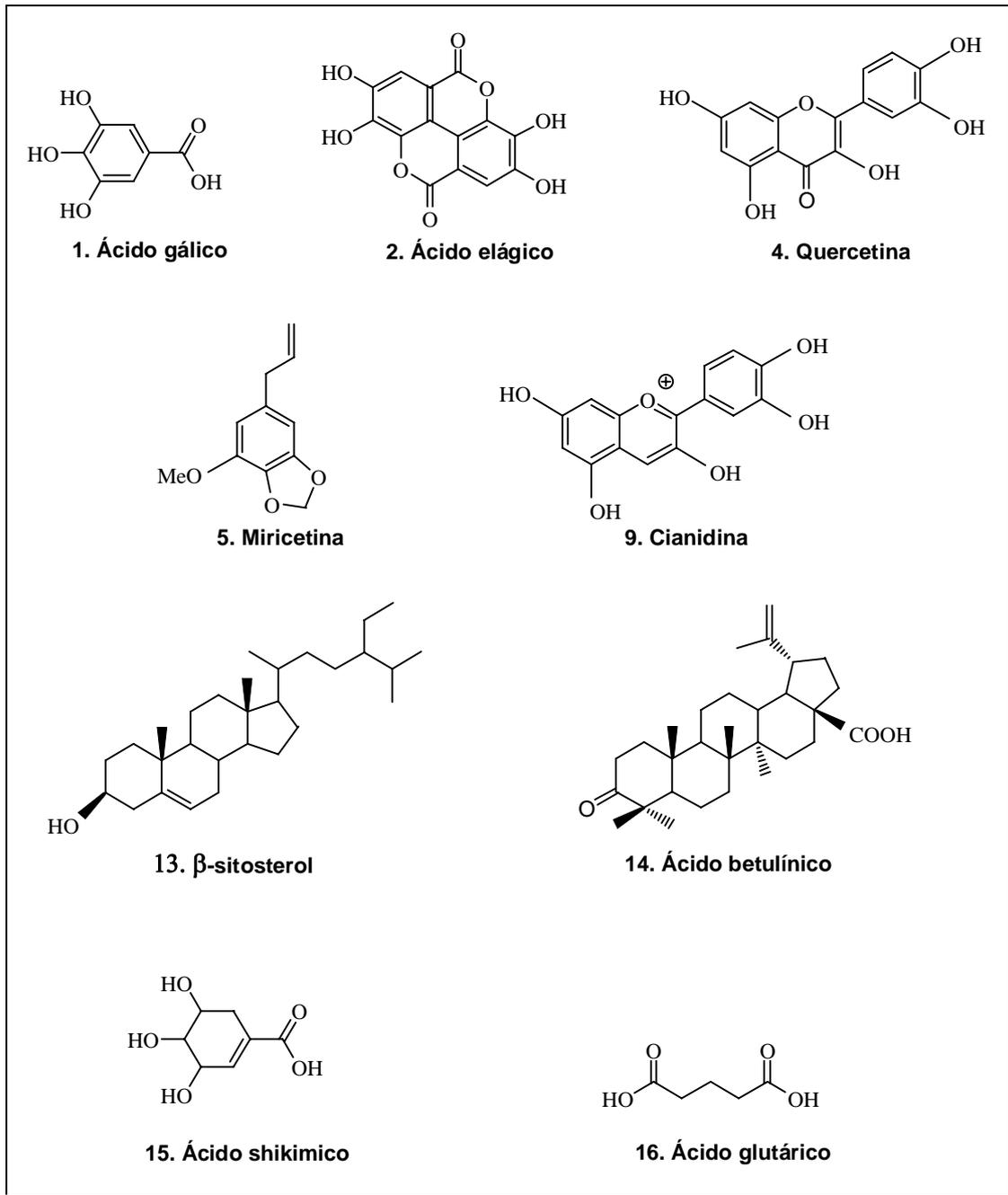


Figura N° 2 Metabolitos secundarios aislados de las hojas de *Eucalyptus citriodora*.

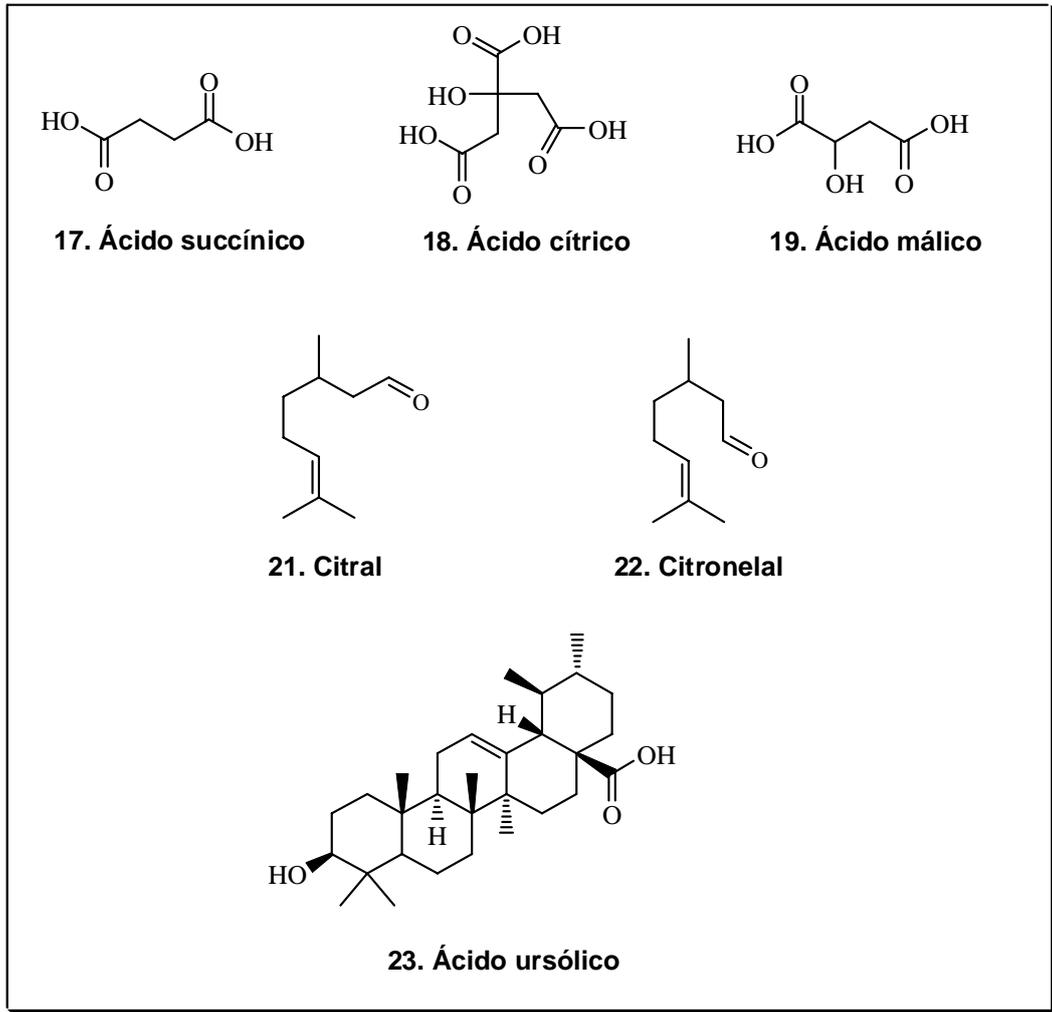


Figura N° 2 Continuación de metabolitos secundarios aislados de las hojas de *Eucalyptus citriodora*.

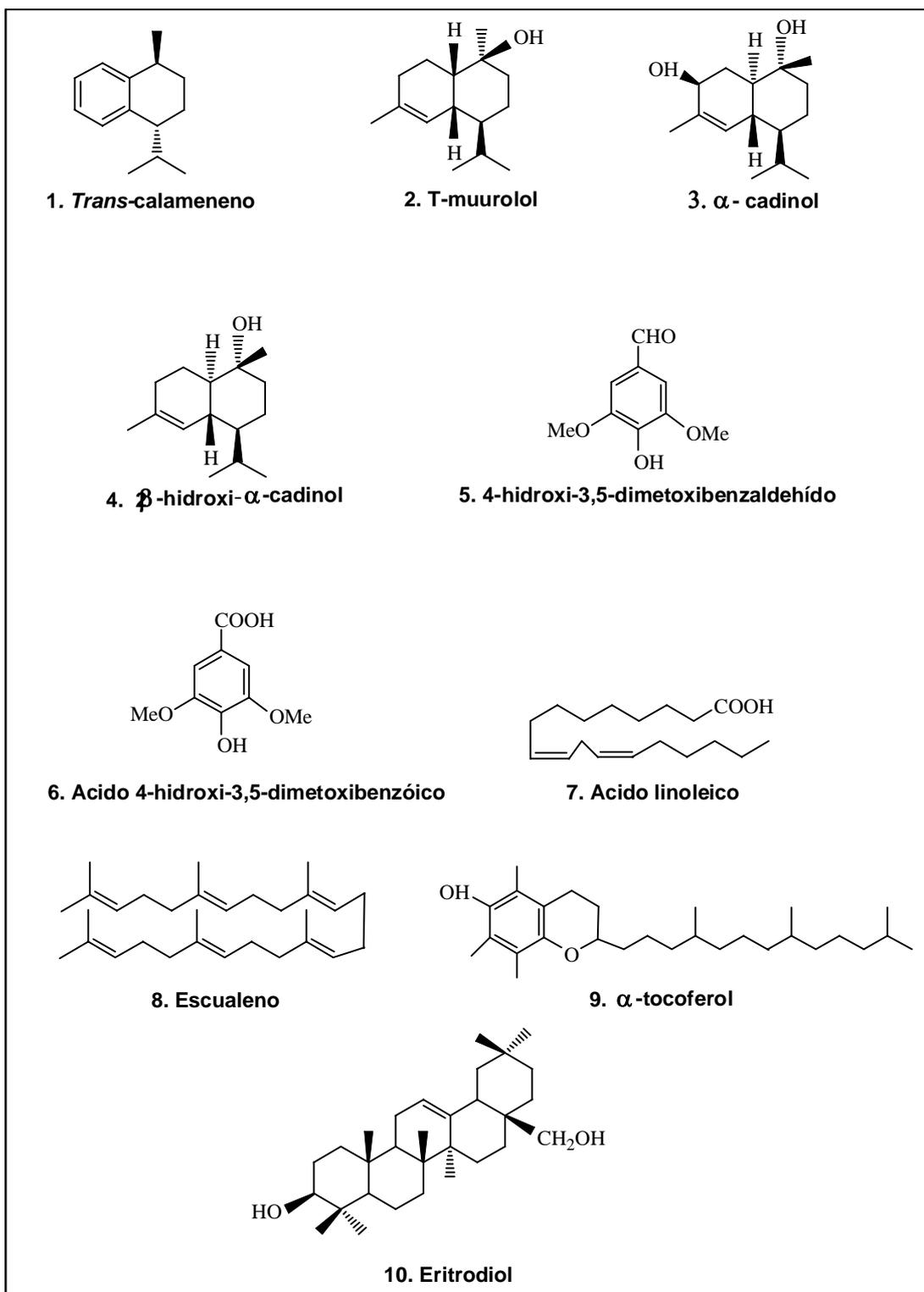


Figura N° 3 Metabolitos secundarios aislados de la corteza de *Eucalyptus citriodora*

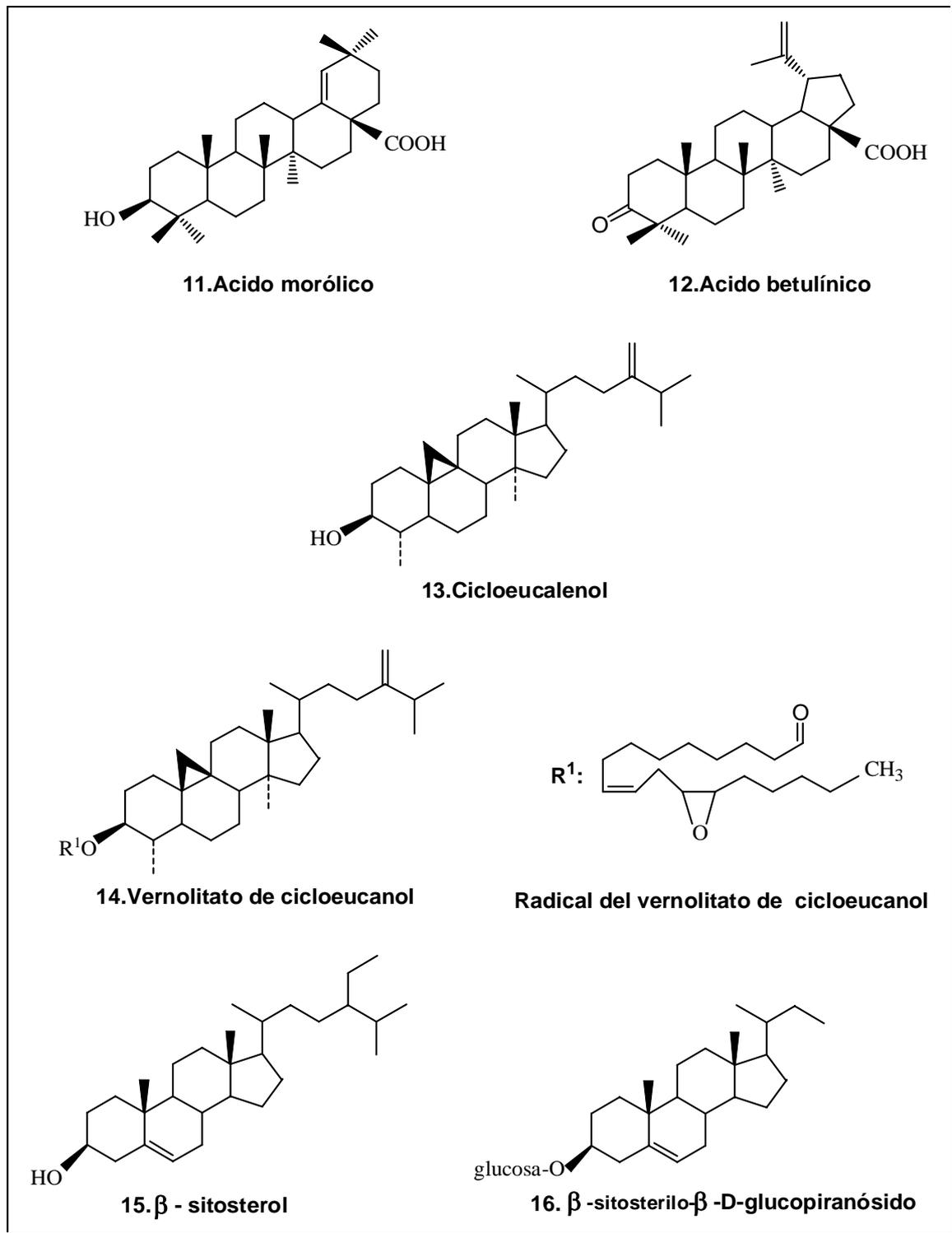


Figura N° 3 Continuación de metabolitos secundarios aislados de la corteza de *Eucalyptus citriodora*.

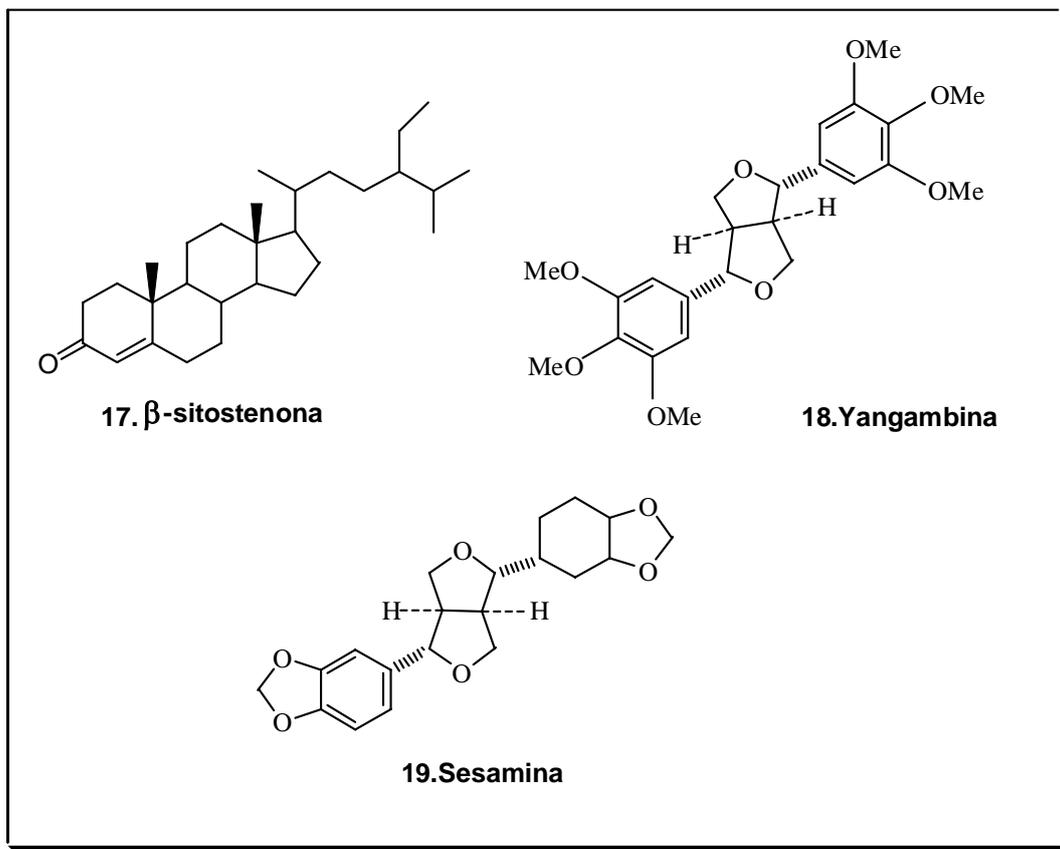


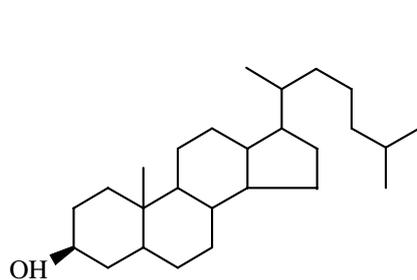
Figura N° 3 Continuación de metabolitos secundarios aislados de la corteza de *Eucalyptus citriodora*.

3.2. GENERALIDADES SOBRE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

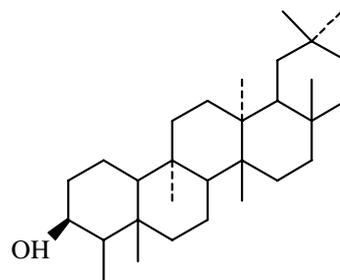
3.2.1 SAPONINAS

Las saponinas son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se les da el nombre de **saponinas** (del latín sapon = jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuye la tensión superficial de ésta, por lo tanto, al sacudir sus soluciones, se forma una espuma abundante, y relativamente estable. Las saponinas son glicósidos vegetales que presentan unión entre la cadena azucarada y la genina mediante un enlace heterosídico en el carbono 3 del núcleo fundamental y que por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina.⁽⁸⁾

Según la estructura de la genina o sapogenina se conocen dos grupos de saponinas: esteroidales y triterpénicas. Ambas presentan un enlace heterosídico en el carbono 3 y tienen un origen biogénico común, la vía del ácido meválonico.⁽¹⁰⁾



ESQUELETO ESTEROIDE



ESQUELETO TRITERPÉNICO

Las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o con alcoholes de bajo peso molecular. Los

materiales lipídicos presentes en estos extractos se separan con *n*-hexano. Al concentrar la solución alcohólica se separan las saponinas y después se cristalizan en mezclas de alcohol-agua. La extracción más empleada es extrayendo las saponinas en medio acuoso, posteriormente, variando la polaridad del extracto con etanol para obtener saponinas con mayor pureza, donde el contenido de saponinas se cuantifica por el método afrosimétrico, midiendo la altura de la espuma. ⁽⁸⁾

Las azúcares que constituyen los glicósidos saponínicos son: glucosa, arabinosa, ramnosa, galactosa y xilosa.

Este tipo de glicósidos se utilizan como productos mucolíticos en el caso de toses crónicas, el mucus denso se aclara y resulta más sencilla su expectoración, poseen también efecto diurético y se utilizan con frecuencia para la depuración de la sangre, tienen propiedades antimicrobianas y antifúngicas, antiinflamatorias, para la síntesis de progesterona y para la elaboración de emulsiones. Las propiedades farmacológicas se deben sobre todo a la saponina triterpénica. ⁽¹¹⁾

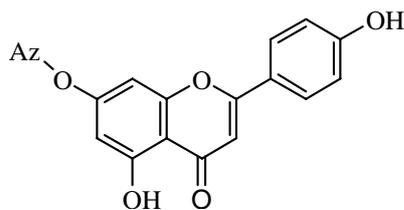
PRUEBAS FITOQUÍMICAS: Las saponinas y sus sapogeninas insaturadas o con varios hidroxilos dan coloraciones con varios reactivos ácidos, como el de Liebermann-Burchard, Salkowski, cloruro de tionilo y tricloruro de antimonio. ⁽⁸⁾

3.2.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son pigmentos vegetales que se encuentran en forma libre y en forma de glicósidos, poseen en esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆ como se

encuentran en la flavonona, aurona, chalcona, flavona, flavanonol, antocionadina, catequina, isoflavona, antocianidina y neoflavonas. Los flavonoides naturales se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, flores, frutos y hojas en su mayoría están en forma de glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. ⁽¹⁰⁾

Se conocen como diez tipos de flavonoides, cada una de las clases suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos con una o tres unidades de azúcar, las cuales se unen en los C₃ y/o C₇. Los diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante reacciones de coloración y propiedades de solubilidad.



FLAVONOIDE
(NANGENINA)

Proviene de unidades de acetato y fenilpropano, el primer flavonoide formado fue la Chalcona, a partir del cual se derivan los otros tipos de flavonoides por modificaciones que ocurren en varias etapas.

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

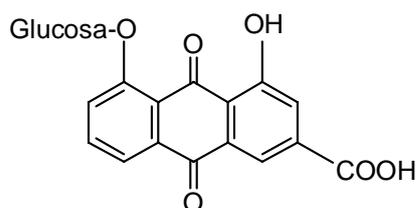
Los disolventes empleados en la extracción de estos compuestos son desde muy polares como el agua, etanol, para glicósidos o aglicones muy hidroxilados, hasta menos polares como el éter y el cloroformo para flavonas altamente metoxiladas. ⁽¹¹⁾

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

PRUEBAS FITOQUÍMICAS: Reacción de Shinoda, prueba de Marini-Bettóllo, prueba de Asahina y prueba con el reactivo de Dimroth. ⁽⁸⁾

3.2.3 ANTRAQUINONAS

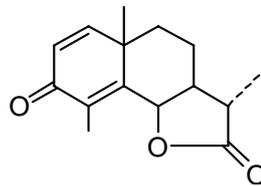
Incluye O-heterósidos y C- heterósidos (estos últimos son enlace carbono-carbono entre el azúcar y el aglicón) su acción más específica es la de estimular la musculatura lisa del intestino, produciendo peristaltismo, a la vez, inhibe la reabsorción de agua a través del intestino grueso, la cual llega a ocasionar una mayor dilución del contenido intestinal. En conjunto producen un claro efecto laxante que se manifiesta después de unas 6 a 7 horas. Las plantas que contienen antraquinonas se comportan como laxantes o purgantes según la dosis. Este tipo de laxantes está contraindicado en caso de embarazo, menstruación y hemorroides. ⁽¹⁰⁾



GLUCOSIDO DE LA RHEINA

3.2.4 SESQUITERPENLACTONAS

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono. ⁽⁸⁾ Biogénicamente son derivados del ácido mevalónico, formados por condensación cabeza-cola de tres unidades de pirofosfato de isoprenilo y ciclizaciones posteriores, producen anillos insaturados *cis* ó *trans*, la presencia de un γ -lactona en la posición 7 se unen *cis* ó *trans* a la posición 6 u 8. ⁽¹¹⁾



SESQUITERPENLACTONA

(SANTONINA)

Las sesquiterpenlactonas se han encontrado principalmente en extractos de flores o partes aéreas de las compuestas, siendo lo suficientemente típicos para tener cierto valor quimiotaxonómico. También se han encontrado en algunas umbelíferas.

Algunas sesquiterpenlactonas poseen actividad antineoplásica, propiedades citotóxicas y antitumorales, algunos germacranólidos del género *Mikania*, tienen propiedades de inhibición al crecimiento de algunos microorganismos y algunas sesquiterpenlactonas de la familia de las compuestas causan dermatitis al contacto con la piel.

Son lo suficientemente polares para ser insolubles en éter de petróleo y también en agua, las disuelve el etanol ó metano caliente y aún más el cloroformo ó éter etílico.

Son sustancias amargas de farmacología poco estudiada. Pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales. Se ha sugerido que la actividad citotóxica esta relacionada con el grupo exometilenbutenólido y también que este grupo modifica el crecimiento de vegetales. ⁽⁸⁾

PRUEBAS FITOQUÍMICAS: Reacciones de coloración como el reactivo de Legal, reactivo de Tollens, reactivo de Baljet e Hidróxidos de Hierro. ⁽⁸⁾

3.2.5 TANINOS

El termino tanino se empleó por primera vez en 1976, llamando así a ciertos componentes vegetales que evitan la putrefacción de la piel animal al combinarse con sus proteínas, convirtiéndola en cuero.

Son compuestos no cristalizables que forman soluciones coloidales de reacción ácida y sabor muy acre. Se presentan como polifenoles en mezcla, las cuales son difíciles de separar porque no cristalizan. Son detectables cualitativamente mediante un ensayo de gold-beater's skin. ⁽¹¹⁾

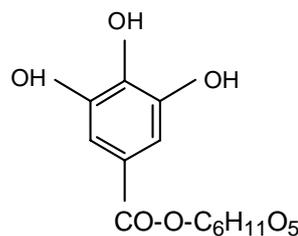
Los taninos comprenden un gran grupo de sustancias complejas que están ampliamente distribuidas en el reino vegetal, casi en todas las familias vegetales existen especies que los contienen, cuando se presentan en cantidades considerables, los taninos suelen localizarse en determinadas partes de las plantas, como las hojas, fruto, corteza o tallo.

De acuerdo a los colores obtenidos en las sales de hierro, los taninos se clasifican en: taninos catecólicos y pirogalotánicos.

Los taninos precipitan las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas. Aplicada a los tejidos vivos,

esta acción se conoce como acción astringente y constituye la base para la acción terapéutica de los taninos. Se emplea en medicina como astringente del tracto gastrointestinal y de las escoriaciones de la piel. ⁽¹⁰⁾

Los taninos son solubles en agua, álcalis diluidos, alcohol y acetona, precipitan en soluciones con metales pesados, alcaloides, heterósidos y gelatina. ⁽¹¹⁾



GLUCOGALINA

(GLUCÓSIDO DEL ÁCIDO GÁLICO)

PRUEBAS FITOQUÍMICAS: Ensayo de piel de venza, ensayo de la gelatina ensayo de la fenazona, ensayo de la catequina y ensayo del ácido clorogénico.

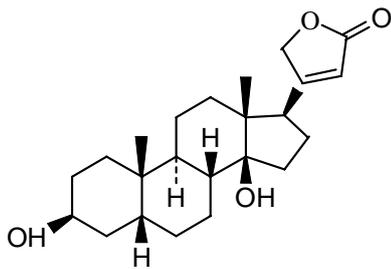
⁽¹¹⁾

3.2.6 GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

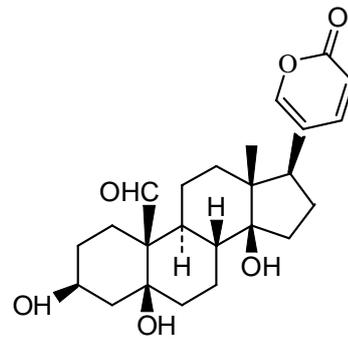
La acción terapéutica de los glicósidos cardiotónicos depende de la estructura de la aglicona y del tipo y número de unidades de azúcar unidos a ella. Su acción la ejercen sobre:

- **CORAZÓN:** aumentan la fuerza de la contracción del miocardio, disminuyen la frecuencia cardíaca y disminuyen la velocidad de conducción a través del nodo aurículo-ventricular.
- **CIRCULACIÓN GENERAL:** la mejoran.
- **FILTRACIÓN RENAL:** la aumentan y se produce un efecto diurético.

Se han reconocido 2 tipos de aglicona. Cardenólidos, por ej. la digitoxigenina de la *Digitalis purpurea*, la cual esta compuesta de C₂₃ y los Bufadienólidos, por ej. helebrigenina del *Helleborus níger*, cuya estructura tiene C₂₄. La estereoquímica es muy importante para la actividad y estos compuestos tienen uniones *cis* en ambos anillos el A/B y el C/D, los grupos 3β y 14β- hidroxilo con la función glicósido en el C-3 y una α- β-lactona insaturada unida en el C-17β. El anillo lactónico de 5 miembros se denomina cardenólido y el de 6 miembros bufadienólido. ⁽⁶⁾



CARDENÓLIDO



BUFADIENÓLIDO

PRUEBAS FITOQUÍMICAS: Liebermann-Buchard (grupo esteroidal), Carr Price, Keller Killiani, Pesez, Kedde, Legal, Raymond y ácido tricloroacético. ⁽⁸⁾

3.2.7 ALCALOIDES

Los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas con carácter básico y mayoritariamente de origen vegetal. Tienen una estructura generalmente compleja y ejercen acciones fisiológicas diversas incluso a dosis muy bajas. Son tóxicos y capaces de precipitar con ciertos reactivos característicos.

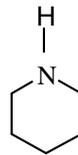
La mayoría de alcaloides se encuentran en los vegetales, proceden del metabolismo secundario y se forman generalmente a partir de los aminoácidos,

aunque hay también alcaloides de origen diverso, como los esteroideos y las bases xánticas. En ciertas plantas puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides, otros se hayan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable.

Los alcaloides suelen clasificarse de acuerdo a la estructura del anillo o núcleo del alcaloide principal presente, así tenemos: grupos derivados de la piridina y la piperidina, grupo del tropano, de la quinolina, de la isoquinolona, del indol, del imidazol, de esteroides, del lupinano y de las purinas. Ejemplos:



PIRIDINA



PIPERIDINA

En los vegetales suelen estar localizados en tejidos periféricos, corteza, raíces, hojas, frutos y semillas. Las proporciones varían desde ppm (partes por millón), para ciertas especies hasta valores que oscilan entre el 0.1% y el 3%, pudiendo ser incluso superiores en algunas drogas vegetales (como la corteza de quina, que puede tener hasta un 10%).

Son un grupo muy heterogéneo de compuestos con estructuras muy variadas. Todos contienen C, H y N, algunos tienen oxígeno y pocos azufre. El nitrógeno que contienen puede formar parte de un ciclo (con N-heterociclo) o no (con N no heterociclo).

Los alcaloides que carecen de oxígeno suelen ser líquidos, volátiles, olorosos y arrastrables en corriente de vapor de agua; los oxigenados son generalmente sólidos y cristalizables, incoloros e inodoros, rara vez coloreados.

Todos son en general amargos, en su forma libre son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos polares (alcoholes) y apolares (éter, cloroformo, *n*-hexano).

Todos los que están en forma de sal son solubles en agua y mezclas hidroalcohólicas e insolubles en disolventes orgánicos apolares. ⁽²³⁾

PRUEBAS FITOQUÍMICAS: anhídrido acético, yoduro de metilo, ácido nitroso, Hersing-Meyer, Meyer, Bouchardat, Dragendorff, Hager y Wagner. ⁽²¹⁾

3.3 GENERALIDADES DE LAS CEPAS SOMETIDAS A BIOENSAYO

3.3.1 *Staphylococcus aureus*

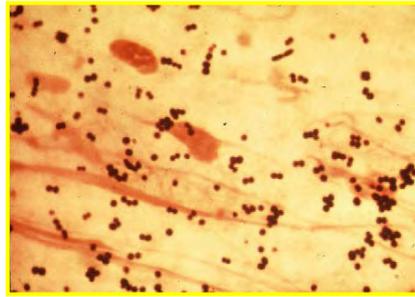


Figura N° 4 *Staphylococcus aureus*

Son microorganismos patógenos que se encuentran en todas partes y son la causa más común de infecciones.

Morfología y fisiología. Células esféricas de 1 μm de diámetro, aparecen como masas de células arracimadas, aunque se encuentran como células aisladas, en parejas y tétradas, los estafilococos jóvenes son gram positivos, sin embargo al envejecer, muchas células se vuelven gram negativas, son no móviles, no forman esporas. Los estafilococos crecen bajo condiciones aeróbicas o microaerófilas y con mayor rapidez a 37°C, pero su 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 va 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.⁽¹⁵⁾

Son microorganismos relativamente resistentes a la desecación, a ciertos desinfectantes, al calor y al cloruro de sodio 9%. Son sensibles a la actividad bacteriostática del trifenilmetano y otros colorantes, además a los antibióticos.

Los estafilococos producen catalasa, lo que los distingue de los estreptococos. Tiene 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.⁽³¹⁾

El ***Staphylococcus aureus*** es la única especie que tiene la capacidad y poder enzimático de coagular el plasma oxalado, 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 de mayor riesgo de infecciones estafilococcicas graves son las salas de cuna de recién nacidos, unidad de cuidados intensivos, salas de operaciones y las salas de quimioterapia del cáncer.⁽¹⁵⁾

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

Los estafilococos son patógenos oportunistas, habitualmente las infecciones producidas por estafilococos son cutáneas. El prototipo de infección estafilococcica es el furúnculo o cualquier absceso localizado. Entre las enfermedades más comunes producidas por ***Staphylococcus aureus*** son:

Neumonía estafilococcica, síndrome de la piel escaldada, síndrome de shock tóxico y otras enfermedades respiratorias. ⁽¹²⁾

3.3.2 *Streptococcus pyogenes*

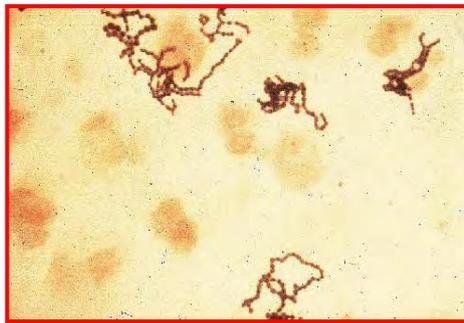


Figura N° 5 *Streptococcus pyogenes*

Morfología y fisiología: Los estreptococos se presentan en cadena de tres o más células individuales, esféricas, de 0.5 a 1.0 μ m de diámetro. Cuando están recientemente aislados, las células son más ovoides que esféricas y se presentan en pares, sin embargo, se producirán cadenas en los cultivos subsecuentes en medios líquidos. Estos microorganismos son gram positivos, la mayoría de las cepas son aerobias pero algunas son anaerobias facultativas, no forman esporas y no son móviles.

La hemólisis en agar sangre es de importancia considerable en la sub-división del genero. Los estreptococos que producen estreptolisina 'O' o 'S' (toxinas) producen una gran zona de hemólisis completa de células sanguíneas rojas por lo que se conocen como estreptococos β - hemolíticos; por otra parte muchos estreptococos que no producen hemólisis, originan una zona verde o café alrededor de sus colonias, la cual se debe no a hemólisis verdadera sino a

decoloración y pérdida de potasio de las células rojas; estos pertenecen a los estreptococos alfa- hemolíticos. ⁽⁵⁾

Los estreptococos son también clasificados en grupos inmunológicos con base a la presencia de antígenos carbohidratos específicos. Estos grupos antígenos (o grupos Lancefield) son designados por letras; actualmente se reconocen de A a O, los estreptococos β - hemolíticos son los mas virulentos, por lo que la mayor parte de las infecciones para el ser humano pertenecen al grupo A (***Streptococcus pyogenes***). La patogenicidad de estas bacterias se debe en grado considerable a la producción de sustancias tóxicas solubles (toxinas).

Según la porción corporal afectada, varían desde infecciones locales como abscesos de diversos tejidos como mucosas, articulaciones y serosas; infección muscular o celulitis que semejan gangrena gaseosa, procesos supurantes en cualquier clase de heridas, las que generalmente ocasionan premia o septicemia. Las infecciones cutáneas piodermas, causadas por estreptococos β -hemolíticos son comunes, particularmente en áreas tropicales y templadas. ⁽¹³⁾

3.3.3 *Pseudomona aeruginosa*



Figura N° 6 *Pseudomona aeruginosa*

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

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

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

Una de las características más especiales de *Pseudomona aeruginosa* es la producción de pigmento soluble, verde azulado que no tiñe las colonias u otras

masas en desarrollo, sino que se difunde en el medio. Algunas cepas tienen actividad hemolítica. Entre los pigmentos producidos por ***Pseudomona aeruginosa*** están la piocianina, una sustancia azulosa soluble en agua y en cloroformo, que posee cierta actividad antimicrobiana, y la fluoresceína una sustancia verdosa, fluorescente, hidrosoluble, insoluble en cloroformo.

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

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

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

3.4 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 la falta de conocimientos de las propiedades químicas de los compuestos. El proceso de aislamiento debe por tanto ser monitoreado por pruebas de todas las fracciones aisladas para la determinación de la actividad. Sólo las fracciones que den un resultado positivo a la prueba estarán sujetas a más pasos en la búsqueda de la sustancia química responsable de su actividad biológica. Este proceso es llamado **FRACCIONAMIENTO BIO-GUIADO** (anexo N° 5). Como se tiene un gran número de fracciones para ser probadas, el método de prueba usado debe ser fácil de llevar a cabo y la cantidad de sustancia requerida para la prueba debe ser pequeña.

Cuando se comienza un fraccionamiento bio-guiado a partir de un extracto, no se conoce ninguna de las propiedades químicas de él o los compuestos causantes del efecto farmacológico demostrado en el sistema de prueba usado. Es por tanto importante obtener alguna información preliminar acerca de la polaridad, carga, peso molecular y estabilidad de los compuestos activos a fin de diseñar un proceso de aislamiento adecuado. Los métodos descritos también pueden ser usados para adquirir los conocimientos deseados ensayando todas las fracciones obtenidas por actividad en el sistema de prueba farmacológico escogido. ⁽³³⁾

3.5 GENERALIDADES SOBRE EXUDADOS

Los exudados son producidos por células y se forman sobre la superficie de las plantas, usualmente como el resultado de una herida producida a la planta, pueden tener una apariencia física y propiedades muy similares, pero estructuras moleculares muy diferentes.

Los **exudados vegetales**, son mezclas naturales sólidas o semisólidas químicamente complejas de origen vegetal, como los bálsamos, las gomas, las oleorresinas y las resinas. La proporción de los compuestos puede variar según el clima, la época del año y otros factores.

Estos pueden clasificarse de la siguiente manera:

Resinas, son mezclas insolubles en agua compuestas en mayor parte por terpenos (derivados orgánicos compuestos de componentes de isopreno), o se definen también como los compuestos químicos extraídos en la fase orgánica. La fosilización vuelve a las resinas extremadamente resistentes a la disolución, y cada uno de estos materiales son referidos usualmente como fósiles de resinas ó inapropiadamente en el sentido general como ámbar.

Gomas, son mezclas de polisacáridos de alto peso molecular solubles en agua ó dispersables en agua. El ejemplo más famoso es probablemente la goma arábica de la especie *Acacia*.

Goma-resina, son una mezcla de componentes como terpenos y carbohidratos. Se obtiene del árbol por medio de incisiones longitudinales en el tronco, fluye abundantemente, tiene color rojizo y cuando se seca con el sol se

vuelve quebradizo, y es así masas irregulares que se recogen para su utilización.

Látex, son usualmente fluidos lechosos consistentes de pequeñas gotas de compuestos orgánicos suspendidos o dispersados en un medio acuoso.

Oleoresina, son una mezcla de aceites esenciales y terpenos insolubles en agua.⁽²²⁾

3.6 GENERALIDADES SOBRE CROMATOGRAFÍA ⁽²⁵⁾

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).

Tipos de cromatografía:

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

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

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

- Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un sólido polar capaz de adsorber a los componentes de la mezcla mediante interacciones de tipo polar.
- Cromatografía de partición. La separación se basa en diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en las fases estacionaria y móvil, que son ambas líquidas. Si la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil, se denomina cromatografía en fase inversa.
- Cromatografía de intercambio iónico. La fase estacionaria es un sólido que lleva anclado grupos funcionales fijos ionizables, cuya carga está

contrabalanceada por iones móviles que se pueden intercambiar por aquellos presentes en la fase móvil.

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

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

3.6.1 CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

La fase estacionaria (adsorbente) se encuentra depositada, formando una capa fina de espesor uniforme (0.1–0.2 mm), sobre una placa de vidrio, plástico, o una lámina 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.

- 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 (adsorbente, disolvente, 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 ésta es excesivamente grande (diámetro mayor de 4.0 mm) se obtendrá un valor erróneo del R_f .

Cuanto más polar es un compuesto, más retenido queda en el adsorbente y menor será el 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 probar 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 mas o menos polar.

Para compuestos poco polares, que se desplazan del origen con mucha facilidad, se debe utilizar un disolvente apolar como el *n*-hexano. En el caso de compuestos con polaridad media, se aconseja utilizar mezclas de *n*-hexano-acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, que quedan muy retenidos al 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 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 la 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 la 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.

- Método Experimental:

Las placas de cromatografía generalmente se comercializan como láminas (20x20 cm) que hay que cortar al tamaño adecuado, preferiblemente con cuchilla o con tijeras 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 a 30 cm, depende del número de compuestos que se vayan a analizar. El tamaño de la placa también está en función de la cámara cromatográfica en la que se va a realizar la elución.

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

En la superficie del adsorbente (fase estacionaria), señalar con un lápiz tantos puntos como muestras se vayan a aplicar, dejando espacio suficiente entre ellas. Estos deben estar a la misma altura desde la base de la placa (1.0 cm aproximadamente), por lo que resulta útil trazar una línea recta antes de señalar los puntos. Marcar con suavidad, sin levantar el adsorbente.

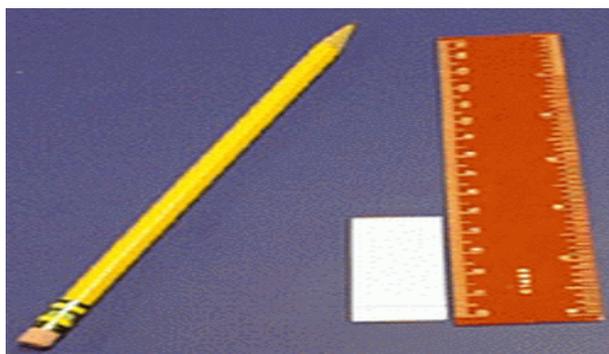


Figura N° 7 Placa fina (condiciones, dimensiones, etc.).

- 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 sería 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 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.



Figura N° 8 Inyección de la muestra.

- Cortar un trozo de papel de filtro e introducirlo en la cámara cromatográfica. Añadir el disolvente. La misión del papel filtro es absorber el disolvente y saturar el interior de la cámara con los vapores de éste para evitar que la fase móvil se evapore de la superficie de la placa.

El nivel del 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, éste disolvería el compuesto en lugar de eluirlo.

- Introducir la placa en posición vertical en la cámara cromatográfica, que durante la elución debe permanecer tapada, para evitar la evaporación del disolvente, y sin moverse. Apoyar la placa contra la pared de la cámara, de manera que quede vertical ó ligeramente inclinada. No utilizar cámaras cromatográficas anchas en las que la placa se pueda caer.

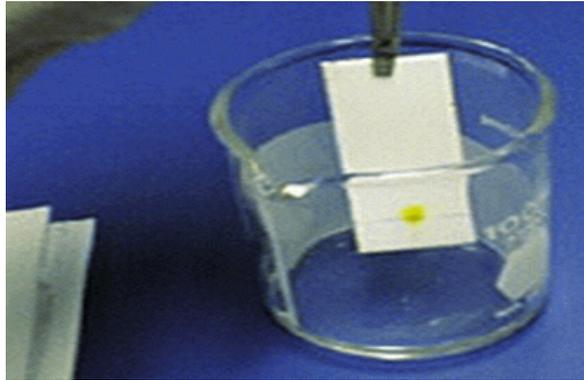


Figura N° 9 Introducción de placa en cámara cromatográfica.

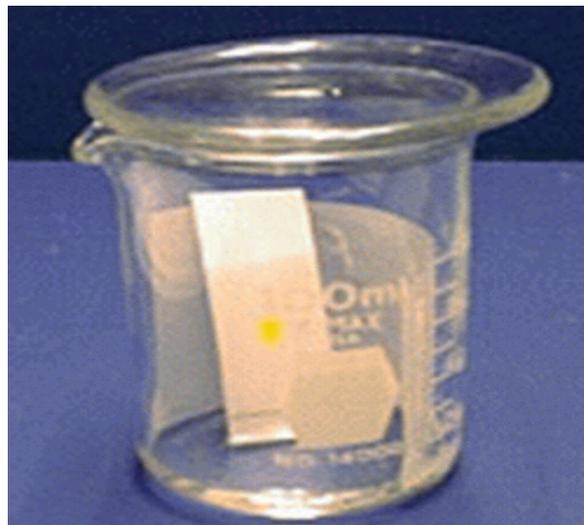


Figura N° 10 Elución de la placa

- 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 éste 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 UV. Marcar con un lápiz el contorno de las manchas observadas. 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 a 100-150 °C en placa eléctrica o con pistolada de aire caliente. 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.

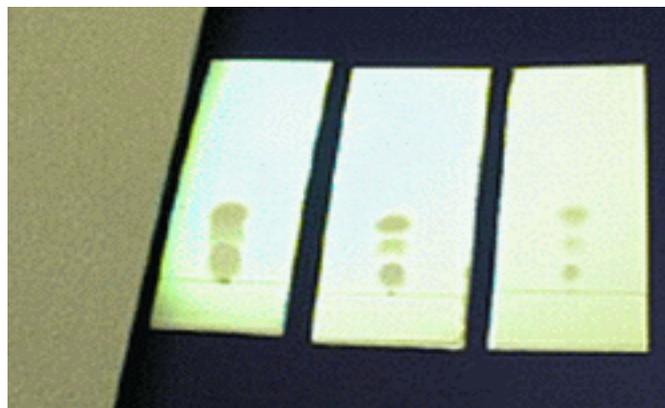


Figura N° 11 Revelación de las placas.

-Determinar el R_f , y anotar el disolvente que se ha utilizado. ⁽²⁹⁾

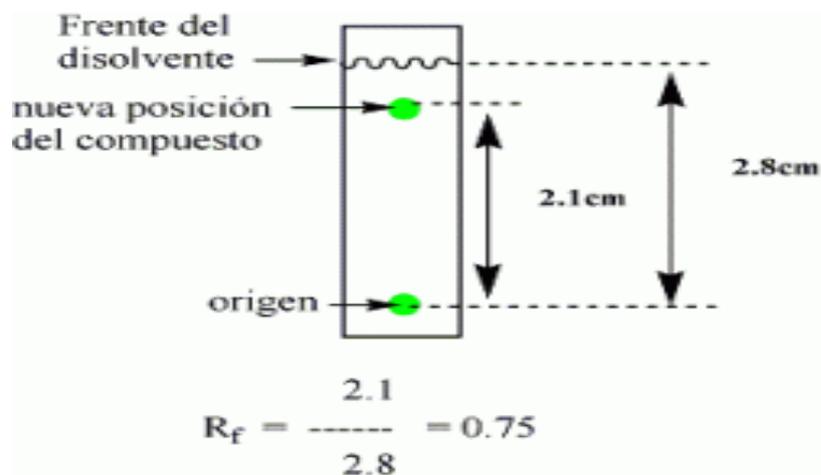


Figura N° 12 Esquema del cálculo del R_f .

3.7 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN PLACA

Probablemente la técnica de ensayo más ampliamente utilizada, aunque no necesariamente la mejor, es el método de **difusión en agar**, también conocido como método de **Kirby-Bauer Modificado**, se inocula (“siembra”) uniformemente toda la superficie de una placa de Petri, que contiene un medio con agar, con una cantidad normalizada del microorganismo a ensayar. A continuación se colocan sobre la superficie del agar solidificado discos de papel de filtro con concentraciones conocidas de agentes quimioterapéuticos. Durante la incubación los agentes quimioterapéuticos difunden por el agar a partir de los discos. Cuanto más lejos del disco difunde más baja es su concentración. Si el quimioterápico es eficaz se forma un halo de inhibición que rodea al disco 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, económico y tiene un valor considerable en la práctica médica. ⁽³⁷⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio:

Retrospectivo, Prospectivo y Experimental, debido a que dicha investigación se basa en estudios realizados anteriormente y a la vez que propone una nueva alternativa mediante datos obtenidos experimentalmente, además es Hipotético-Deductivo ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permite formular la siguiente hipótesis: El extracto diclorometánico de la oleoresina de *Eucalyptus citriodora* posee actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.

La investigación del presente estudio se divide en tres etapas:

4.2 Investigación Bibliográfica:

- Se realizaron consultas de libros, trabajos de graduación, manuales, etc. en la biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- Revistas científicas (*Australian Journal of Chemistry*, *Journal of the Chinese Chemical Society*, *Journal of Bioscience*, etc.)
- Scifinder scholar (base de datos mundial)
- Internet

4.3 Metodología de campo

El universo de trabajo son todas las especies vegetales del Campus Universitario. El muestreo de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora*** se realizó al azar, en la zona del parqueo de la Facultad de Química y Farmacia y la Facultad de Ciencias Agronómicas durante la época seca. La muestra se recolectó en frascos de vidrio color ámbar con tapadera de metal y se almacenó en un lugar fresco y seco.

4.4 Metodología de Laboratorio

4.4.1 CARACTERIZACIÓN ORGANOLÉPTICA

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

4.4.2 PARTE FITOQUÍMICA

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

La muestra de la goma-resina seca o cristalizada se pulverizó en un mortero, luego se pesó la muestra, y se realizó la extracción con etanol al 95% en un Soxhlet (Figura N° 23). La muestra se sometió a numerosas extracciones, el color tenue en el dedal indica que la muestra se encuentra ya agotada. Se concentra el extracto etanólico a sequedad usando el rota evaporador (Figura

Nº 24), obteniendo el extracto madre y se realizó posteriormente la separación líquido-líquido agua/diclorometano, obteniendo así el extracto diclorometánico. Se realizaron las diluciones con las cuales se trabajó. Para esto se prepararon seis diluciones de diferentes concentraciones (10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%), con el fin de comprobar si estas poseen actividad antimicrobiana.

4.4.2.2 Pruebas fitoquímicas preliminares.

Se realizó la identificación por medio de cromatografía de capa fina de los siguientes metabolitos secundarios:

- Saponinas.
- Flavonoides.
- Antraquinonas.
- Sesquiterpenlactonas.
- Taninos.
- Cardiotónicos.
- Alcaloides.

4.4.3 Cromatografía de capa fina (CCF)

PROCEDIMIENTO :

En placas cromatográficas de sílica gel de 6.0 cm de largo por 3.0 cm de ancho se inyecta con un capilar el extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***. Luego de inyectar se colocaron las placas en cámaras cromatográficas previamente saturadas con la fase móvil seleccionada, se desarrolla el cromatograma, las placas se sustraen de la cámara y se secan, se

observan a la luz U.V. y posteriormente se rocían con reactivos reveladores para los productos específicos (Anexo N° 26) y se determina el R_f de cada mancha.

4.4.4 ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS

4.4.4.1 Pruebas de identificación microbiológicas.

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

- Características macroscópicas.

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

Cuadro N ° 2 Características macroscópicas (Anexo N° 9)

MICROORGANISMOS	MEDIO DE CULTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i>	Agar Chapman Agar Bair Parker
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Agar Cetrimide
<i>Estreptococcus pyogenes</i>	Agar Sangre

- Características microscópicas. (Anexos N° 11 y 12)

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

- Resultados de pruebas de identificación. (Anexos N° 14, 16 y 20)

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

Cuadro N° 3. Pruebas de identificación microbiológica (Anexos N° 15, 17 y 21).

MICROORGANISMO	PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa, Coagulasa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pruebas bioquímicas: Agar triple azúcar y hierro(TSI), Citrato, Indol; Rojo de Metilo; Movilidad; Voges-Proskauer
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Discos de Bacitracina

Para conservar las cepas, se hicieron resiembras semanales en placas conteniendo Trypticase soya agar (TSA), a excepción del *Streptococcus pyogenes*, que se resembró en Agar Sangre, y se mantuvo en refrigeración a 5°C.

4.4.4.2 Determinación del potencial de inhibición

Para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a una sustancia antimicrobiana en particular, existen varios métodos; los más comúnmente empleados, son el método de Dilución Seriada y el de Difusión en Agar desde discos de papel. Alternativamente, el agente antibacteriano puede colocarse en cilindros de vidrio, porcelana o acero inoxidable sobre la superficie del medio, en lugar de discos de papel absorbentes (método Cilindro Placa). Este último método es el que se utilizó para el desarrollo del presente estudio.

Método Cilindro Placa

(Método de Kirby Bauer Modificado)

El fundamento de este método es la difusión de la sustancia, colocada en un cilindro vertical sobre una capa de agar (Müller-Hinton) solidificado, que contiene en la superficie el microorganismo de prueba, de tal manera, que si es susceptible, se formara un halo de inhibición alrededor del cilindro ⁽¹⁷⁾

- Preparación de la suspensión de microorganismos

Del cultivo de *Pseudomona* mantenido en la placa de agar TSA: se transfiere cierto número de colonias a un tubo de ensayo utilizando un asa bacteriológica. El tubo contiene 10 ml de solución salina isotónica estéril 0.85%.

Este procedimiento se repitió hasta que se obtuvo una turbidez equivalente al estándar Mc Farland de 0.5%, el cual se prepara así 0.05ml de BaCl₂ al 1% + 9.95 ml de H₂SO₄ al 1%. Obteniéndose una densidad celular aproximada de

1.5 x10⁸ MO/ml. De igual manera se realizó para ***Staphylococcus aureus*** y ***Streptococcus pyogenes***.

-Inoculación de las placas

Por el método del extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalente a 1.5 x 10⁸ MO/ml se inoculó uniformemente la superficie del medio Agar Müller Hinton para ***Pseudomona aeruginosa***, y ***Staphylococcus aureus***. Para el ***Streptococcus pyogenes*** el medio Agar Muller Hinton se modifica añadiéndole 7% de sangre, con la finalidad de cubrir los requerimientos de dichas bacterias.

El medio se deja secar con la suspensión de microorganismos durante 10 minutos a temperatura ambiente. En condiciones estériles.

-Inoculación con la solución de prueba.

Se colocaron sobre la superficie del medio inoculado cuatro cilindros de acero inoxidable, a intervalos de 90° entre cada uno; luego se llenaron con una micropipeta con la solución de prueba y se incubaron a 37°C por 24 y 48 horas. Los diámetros de inhibición: se miden con una regla milimetrada transparente especial, usada en la lectura de resultados de antibiogramas. Las pruebas se hicieron tres veces, tanto para el extracto madre, como para las diluciones: se colocaron discos de Gentamicina para ***Pseudomona aeruginosa***, de Ampicilina, para ***Streptococcus pyogenes*** y Penicilina para ***Staphylococcus aureus***, los cuales sirvieron como parámetro para comparar la eficacia del extracto diclorometánico. Además de los parámetros antes

mencionados; se agregaron otros que contenían en los cilindros únicamente alcohol, en presencia del microorganismo inoculado en las placas como blanco. Ver procedimiento y esquema del Método de Kirby Bauer Modificado (Anexo N° 23).

Como parámetros de referencia de los halos de inhibición, se utilizaron normatizaciones interpretativas de los diámetros de las zonas, basados en el método de Kirby Bauer Modificado (Anexo N° 24).

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

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

La goma-resina de *Eucalyptus citriodora* sin haber recibido tratamiento alguno posee una consistencia pastosa ó quebradiza al haber estado expuesta a la luz solar, un color rojizo y se obtiene del tronco del árbol de eucalipto especialmente durante la época de verano.

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

Cuadro N° 4 Características organolépticas del extracto diclorometánico de la oleorresina del *Eucalyptus citriodora* (Anexo N° 3)

CARACTERÍSTICAS	EXTRACTO DICLOROMETÁNICO
Color	Amarillo
Olor	Agradable
Consistencia	Sólido

5.2 Resultados del Análisis Fitoquímico realizado por medio de Cromatografía de Capa Fina en el Extracto diclorometánico de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

Cuadro N° 5 Fase Cloroformo-Éter etílico (1:1). (Anexo N° 7)

Reactivo revelador	Sustancia detectada	Número de Manchas (componentes)	R _f	Observación
Vainillina- Ácido Sulfúrico	Reactivo Universal	6	M ₁ = 0.66 M ₂ = 0.55 M ₃ = 0.46 M ₄ = 0.36 M ₅ = 0.26 M ₆ = 0.15	Manchas Fluorescentes A la luz UV- 365nm o coloración óptima al Vis.
Anisaldehído- Ácido Sulfúrico	Terpenos	6	M ₇ = 0.61 M ₈ = 0.43 M ₉ = 0.37 M ₁₀ = 0.27 M ₁₁ = 0.21 M ₁₂ = 0.16	Colores violeta, azul, Rojo, gris, o verde a la luz UV- 365 nm
Acetato de Plomo básico	Flavonoides	5	M ₁₃ = 0.65 M ₁₄ = 0.56 M ₁₅ = 0.48 M ₁₆ = 0.30 M ₁₇ = 0.16	Manchas fluorescentes a la luz UV- 365 nm
Cloruro de Hierro III	Fenoles (azul, verde), Ácidos Hidroxicinámicos (roja)	2	M ₁₈ = 0.53 M ₁₉ = 0.43	Colores azules, verdes o rojos al Vis
Bornträger	Antrona(amarilla) Antraquinona(roja)	4	M ₂₀ = 0.75 M ₂₁ = 0.64 M ₂₂ = 0.51 M ₂₃ = 0.38	Coloraciones azul, amarillo o roja al Vis o UV-365 nm
Liebermann- Burchard	Esteroles, Triterpenos	6	M ₂₄ = 0.65 M ₂₅ = 0.60 M ₂₆ = 0.54 M ₂₇ = 0.47 M ₂₈ = 0.39 M ₂₉ = 0.16	Manchas variadas de coloración óptima al Vis
Vapores de Amoníaco	Flavonoides	3	M ₃₀ = 0.38 M ₃₁ = 0.23 M ₃₂ = 0.16	Manchas de blanco a amarillo al Vis

M₁ : mancha 1; M₂ : mancha 3; M₃ : mancha 5 y así sucesivamente.

La cromatografía de capa fina se hace con el objetivo de comprobar la presencia de los diversos metabolitos secundarios y evitar resultados falsos positivos, que se podrían dar si se llevaran a cabo en tubo de ensayo, debido al color amarillo del extracto.

El análisis de cromatografía de capa fina muestra como resultados la presencia de: Antraquinonas, Compuestos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos, Terpenos, Flavonoides y Esteroles. Puesto que las manchas ó componentes encontrados por este método corresponden a este tipo de sustancia.

También se realizó el método de la espuma, obteniendo resultados negativos puesto que no se observó la formación de espuma, por lo que podemos asegurar que el extracto diclorometánico de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora*** no posee saponinas, de la misma manera se llevó a cabo la prueba de Legal que también dio resultado negativo comprobando la ausencia de sesquiterpenlactonas.

5.3 PRUEBAS FITOQUÍMICAS REALIZADAS A LA CAPA ACUOSA

Con respecto a la capa acuosa que se obtuvo por medio de la partición líquido-líquido agua/diclorometano, se le realizaron pruebas para azúcares con el fin de comprobar la presencia de carbohidratos en esta. Las pruebas realizadas fueron Fehling y Tollen's, observando en ambos resultados positivos, para Fehling un precipitado rojo-ladrillo de óxido cuproso y para Tollen's un precipitado color plateado, por lo que podemos asegurar que la capa acuosa de dicho extracto posee carbohidratos (Anexo N° 8).

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

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

Cantidad de muestra = 1,996.65 gramos

Cantidad de extracto etanólico obtenido = **1,017.24 gramos**

Porcentaje de rendimiento =

$$1,996.65 \text{ g} \text{ ————— } 100 \%$$

$$1,017.24 \text{ g} \text{ ————— } X$$

$$X = \mathbf{50.95 \%$$

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

Cantidad de extracto etanólico = 1,017.24 gramos.

Cantidad de extracto diclorometánico obtenido = **83.73 gramos**

Porcentaje de rendimiento =

$$1,017.24 \text{ g} \text{ ————— } 100 \%$$

$$83.73 \text{ g} \text{ ————— } X$$

$$X = \mathbf{8.23 \%$$

- RESULTADOS:

Para la obtención del extracto etanólico se realizaron dos extracciones con tres equipos soxhlet, debido a la gran cantidad de muestra recolectada y la poca capacidad de los equipos proporcionados. El porcentaje de rendimiento práctico obtenido fue del 50.95%, esto pudo deberse a que la muestra posee la característica de que es muy difícil de extraer puesto que posee una gran variedad de metabolitos secundarios de manera que aunque se realizara la extracción por más de tres días con la misma muestra esta seguía coloreada o sea que no se había agotado.

En cuanto a la obtención del extracto diclorometánico, se realizaron tres particiones, y en este caso se obtuvo un porcentaje de rendimiento de (8.23 %), debido a que hay más sustancias polares presentes en la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora*** que se van para la capa acuosa, y así al realizar la separación por medio de la ampolla de separación se realiza una mayor purificación del extracto obteniendo así sólo los metabolitos secundarios deseados.

5.5 Preparación de la dilución del extracto madre a partir del extracto diclorometánico de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora*.

La preparación de la dilución del extracto madre se realizó basándonos en el artículo de Ordóñez y col. ("Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC)". Revista Cubana Plant Med 9(2),2004). En este se estipula que la actividad antimicrobiana se evaluó en un rango de concentraciones entre 0.04 y 10 mg/mL, por lo que se decidió experimentar con una concentración de 100 mg/mL (10%) para la realización de la preparación de la dilución del extracto madre, a partir de la cual se procede a realizar las siguientes diluciones: 7.5%, 5%, 2.5%, 1%, 0.5%, por medio de la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$.

PROCEDIMIENTO

CÁLCULOS

EXTRACTO AL 7.5%

DATOS: $C_1 = 10\%$

$V_1 = X$

$C_2 = 7.5\%$

$V_2 = 50 \text{ mL}$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

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

$$V_1 = \frac{(7.5\%) (50 \text{ mL})}{10\%} = 37.5 \text{ mL de extracto madre}$$

La preparación de la dilución del extracto madre para una concentración al 10% se realiza de la siguiente manera: Se pesan en una balanza analítica exactamente 10 g de extracto y se diluyen en etanol al 90.6 % hasta llevar a volumen en un balón volumétrico de 100 mL, luego se homogeniza la solución y para el resto de las diluciones que se elaboraron, se utilizaron pipetas morh, se adicionó la cantidad adecuada de extracto madre en un balón volumétrico de 50 mL, que se aforó con alcohol etílico al 90.6%. Luego se homogeniza la solución y así sucesivamente para cada una de las diluciones.

CUADRO N° 6 Volumen del extracto madre necesario para llevar a concentración de trabajo.

CONCENTRACIÓN FINAL (C₂)	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO MADRE (C₁)	VOLUMEN FINAL (V₂)	VOLUMEN DE EXTRACTO MADRE PARA LLEVAR A CONCENTRACIÓN FINAL (V₁)
EXTRACTO AL 7.5 %	10 %	50 mL	37.5 mL
EXTRACTO AL 5 %	10 %	50 mL	25 mL
EXTRACTO AL 2.5 %	10 %	50 mL	12.5 mL
EXTRACTO AL 1 %	10 %	50 mL	5 mL
EXTRACTO AL 0.5 %	10 %	50 mL	2.5 mL

5.6 Resultados de la evaluación microbiológica (comprobación de la actividad antimicrobiana).

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

Cuadro N° 7 Pruebas de identificación del ***Staphylococcus aureus***.

(Anexos N° 10, 13 y 15)

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

- Resultados de las pruebas de identificación de las cepas.

- Identificación de ***Staphylococcus aureus***.

Morfología Macroscópica: La bacteria después de sembrarse en medio selectivo de Agar Chapman mostró colonias, de color amarillo dorado, también se sembró en Agar Bair-Parker donde se observaron colonias de color negro, lustrosas, redondas y de bordes convexos.

Morfología Microscópica: Al realizar una preparación de la coloración al Gram de la bacteria, en el microscopio se observan bacterias en forma de cocos unidos en pares y en racimos, de color azul oscuro, lo que indica que es Gram positivo.

Pruebas de identificación y diferenciación: Las pruebas de la Catalasa y la Coagulasa resultaron positivas, asegurando así la identificación del ***Staphylococcus aureus***.

Cuadro N° 8 Morfología microscópica y macroscópica de la *Pseudomona aeruginosa*. (Anexos N° 10 y 13)

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

Cuadro N° 9 Prueba de identificación y diferenciación de *Pseudomona aeruginosa*. (Anexos N° 17 y 18)

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

K / K = Pico de flauta alcalina / Profundidad alcalina (Anexo N°18)

(+) = Positivo

(-) = Negativo

- Identificación de ***Pseudomona aeruginosa***.

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

Morfología microscópica: Al realizar la preparación de la coloración al Gram de la bacteria, en el microscopio se observan bacterias en forma de bacilos pequeños, unidos en pares y cadenas cortas, de color rosa, lo que indica que es Gram negativo.

En las pruebas de identificación y diferenciación, se realizaron las pruebas bioquímicas donde las pruebas de TSI dio como resultado K/K bisel alcalino y fondo alcalino; las pruebas de movilidad y rojo de metilo dieron positivas, por lo cual se confirma que la bacteria analizada se encuentra en óptimas condiciones y sin contaminación de otro microorganismo.

Cuadro N° 10 Pruebas de identificación del *Streptococcus pyogenes*.

(Anexos N° 10, 13 y 20)

PRUEBA	RESULTADO
Características microscópicas	Coloración al Gram: Microorganismo Gram positivo, se observan bacterias en forma de cocos, unidos en cadenas cortas, color azul. Prueba positiva (+)
Características macroscópicas	En medio Agar Sangre, se observan colonias pequeñas, de color gris, rodeada de una zona de hemólisis. Prueba positiva (+)
Identificación y diferenciación	En una placa de Agar Sangre, se colocan disco de Bacitracina, el cual presenta zona de inhibición alrededor de éste. Prueba positiva (+)

- Identificación de *Streptococcus pyogenes*.

Morfología microscópica: La bacteria después de sembrarse en medio selectivo de Agar Sangre, mostró colonias pequeñas, de color gris rodeado de una zona de hemólisis.

Morfología microscópica: Al realizar una preparación de la coloración al Gram de la bacteria, en el microscopio se observan bacterias en forma de cocos, unidos en cadenas cortas, de color azul oscuro, lo que indica que es Gram positivo.

Prueba de identificación y diferenciación: Se realizó la prueba de disco de Bacitracina, el cuál se considera positiva ya que hay un halo de inhibición alrededor de éste, lo que confirma la identificación de la bacteria.

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN.

Cuadro N ° 11 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes concentraciones del extracto de la goma-resina por el método de Kirby Bauer Modificado para el *Staphylococcus aureus*.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO % V/V	RESULTADOS LECTURA DE PLACAS
EXTRACTO AL 10 %	Formación de halo entre 35 a 38 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 7.5 %	Formación de halo entre 34 a 35 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 5.0 %	Formación de halo entre 32 a 35 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 2.5 %	Formación de halos de 32 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 1.0 %	Formación de halo entre 30 a 32 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 0.5 %	Formación de halo de 30 mm de diámetro MO Susceptible.
BLANCO: ETANOL AL 90.6 %	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO resistente.
PATRÓN: YODO AL 2 %	Formación de halos inmedibles. No hay crecimiento en toda la placa MO susceptible.
PATRÓN: DISCO DE ANTIBIÓTICO DE PENICILINA 10 Unidades	Formación de halos de 48 mm de diámetro MO Susceptible.
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa.

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

RESISTENTE: No hay formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

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

Según el cuadro de resultados se considera la bacteria susceptible al extracto diclorometánico concentrado (10%) y sus diluciones (7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0.5%), ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición. Para confirmar el efecto antimicrobiano del extracto diclorometánico y sus diluciones se determinó que este se debió a la goma-resina y no al alcohol etílico al 90.6%, ya que se llevó un blanco de éste último, presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que el *Staphylococcus aureus*, es resistente al alcohol etílico.

A manera de comparación entre la goma-resina y sustancias de conocida actividad antimicrobiana, se llevaron como patrones: solución de yodo al 2% y un disco de antibiótico (penicilina), en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antimicrobiana del yodo y de la penicilina, en comparación con el extracto madre y sus diluciones.

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

Los halos de inhibición observados oscilan entre los 30 a 38 mm de diámetro.



Figura N° 13 Resultado del método de Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*, concentración del 7.5 %.

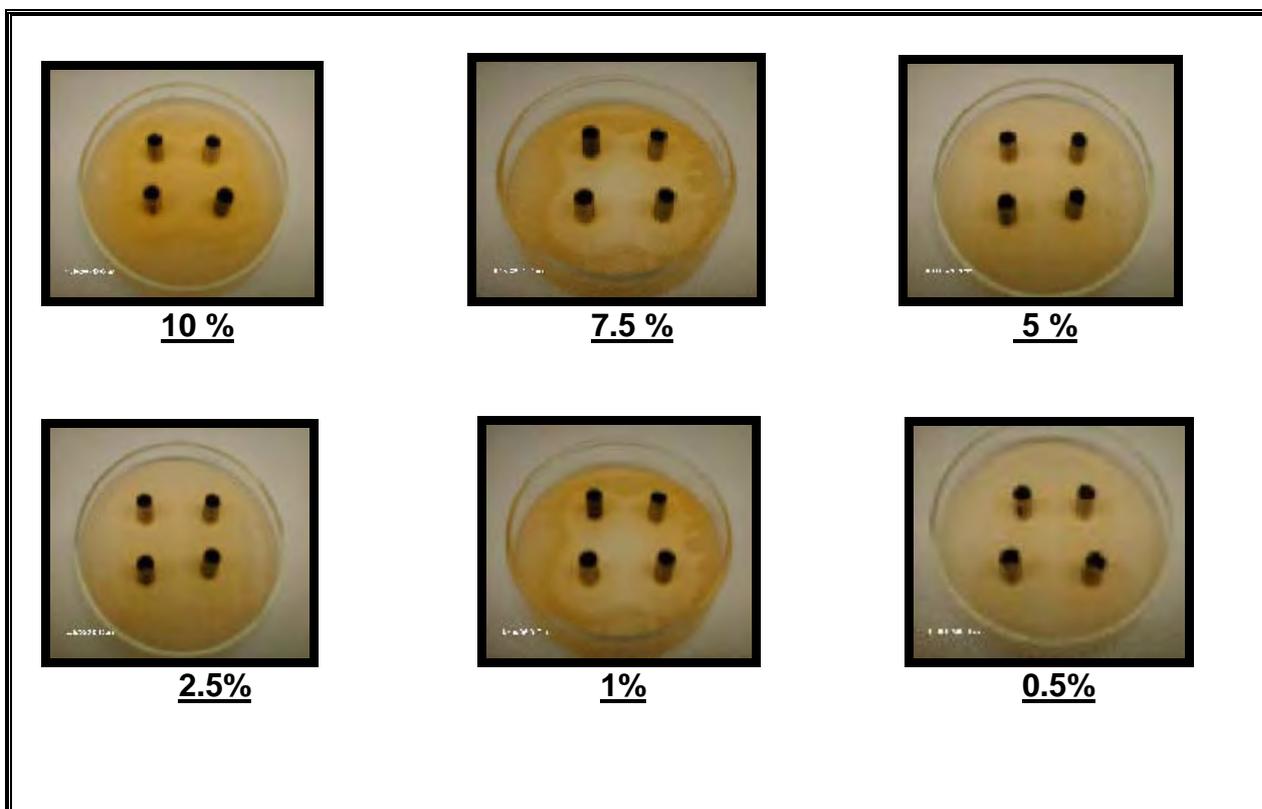


Figura N° 14 Resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*



Penicilina



Alcohol



Yodo



Control Negativo



Control Positivo

Figura N° 14 Continuación Resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*.

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN.

Cuadro N° 12 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes concentraciones del extracto de la goma-resina por el método de Kirby Bauer Modificado para el *Pseudomona aeruginosa*.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO % V/V	RESULTADOS LECTURA DE PLACAS
EXTRACTO AL 10 %	Formación de halo entre 30 a 32 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 7.5 %	Formación de halo entre 29 a 30 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 5.0 %	Formación de halo entre 26 a 28 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 2.5 %	Formación de halos de 25 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 1.0 %	Formación de halo entre 20 a 22 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 0.5 %	Formación de halos de 20 mm de diámetro MO Susceptible.
BLANCO: ETANOL AL 90.6 %	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO resistente.
PATRÓN: YODO AL 2 %	Formación de halo entre 35 a 38 mm de diámetro MO Susceptible.
PATRÓN: DISCO DE ANTIBIÓTICO DE GENTAMICINA 10 Unidades	Formación de halos de 16 mm de diámetro MO Susceptible.
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa.

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

RESISTENTE: No hay formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

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

Según el cuadro de resultados se considera la bacteria susceptible al extracto diclorometánico concentrado (10%) y sus diluciones preparadas de 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0.5% ya que se observa la formación de halos definidos con el tamaño requerido (≥ 15 mm), para afirmar que la bacteria es sensible a estas concentraciones.

Para confirmar el efecto antimicrobiano del extracto diclorometánico y sus diluciones se determina que este se debió a la goma-resina y no al alcohol etílico al 90.6%, ya que se llevó un blanco de éste último, presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que la *Pseudomona aeruginosa*, es resistente al alcohol etílico.

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

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



Figura N° 15 Resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Pseudomona aeruginosa*, concentración al 2.5%.

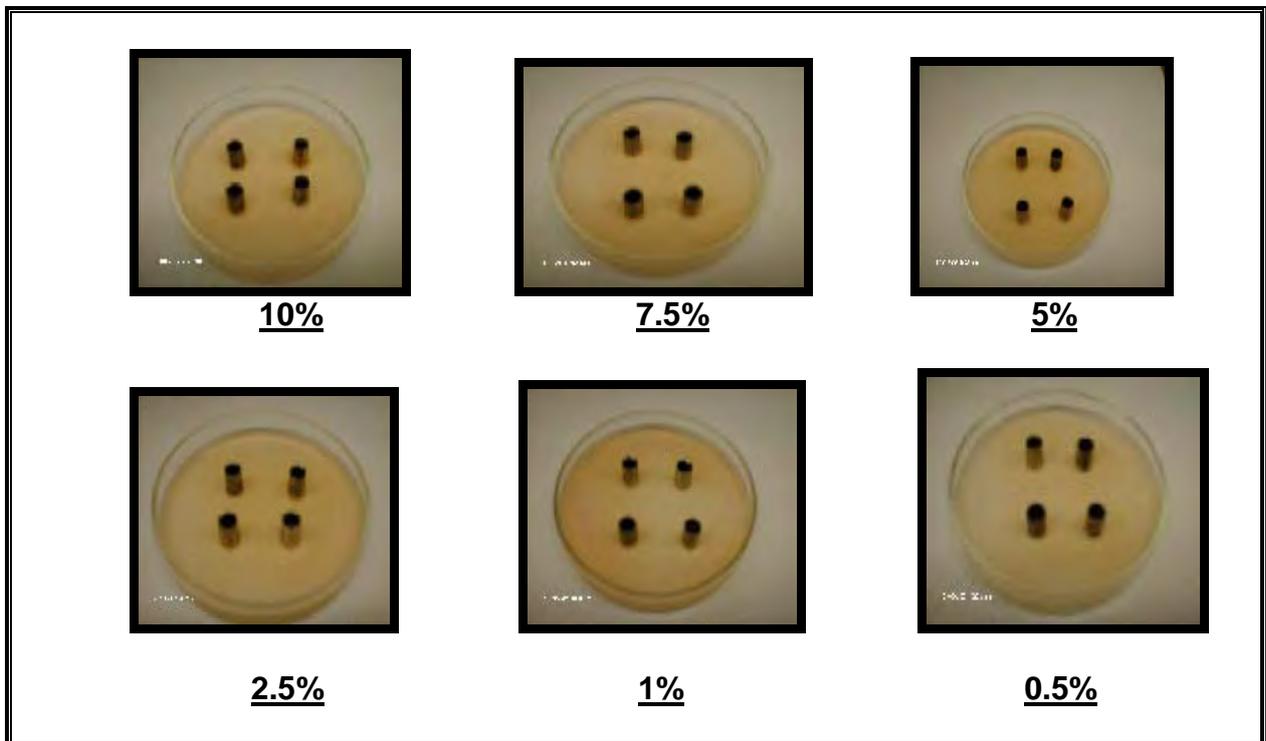


Figura N° 16 Resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Pseudomona aeruginosa*.

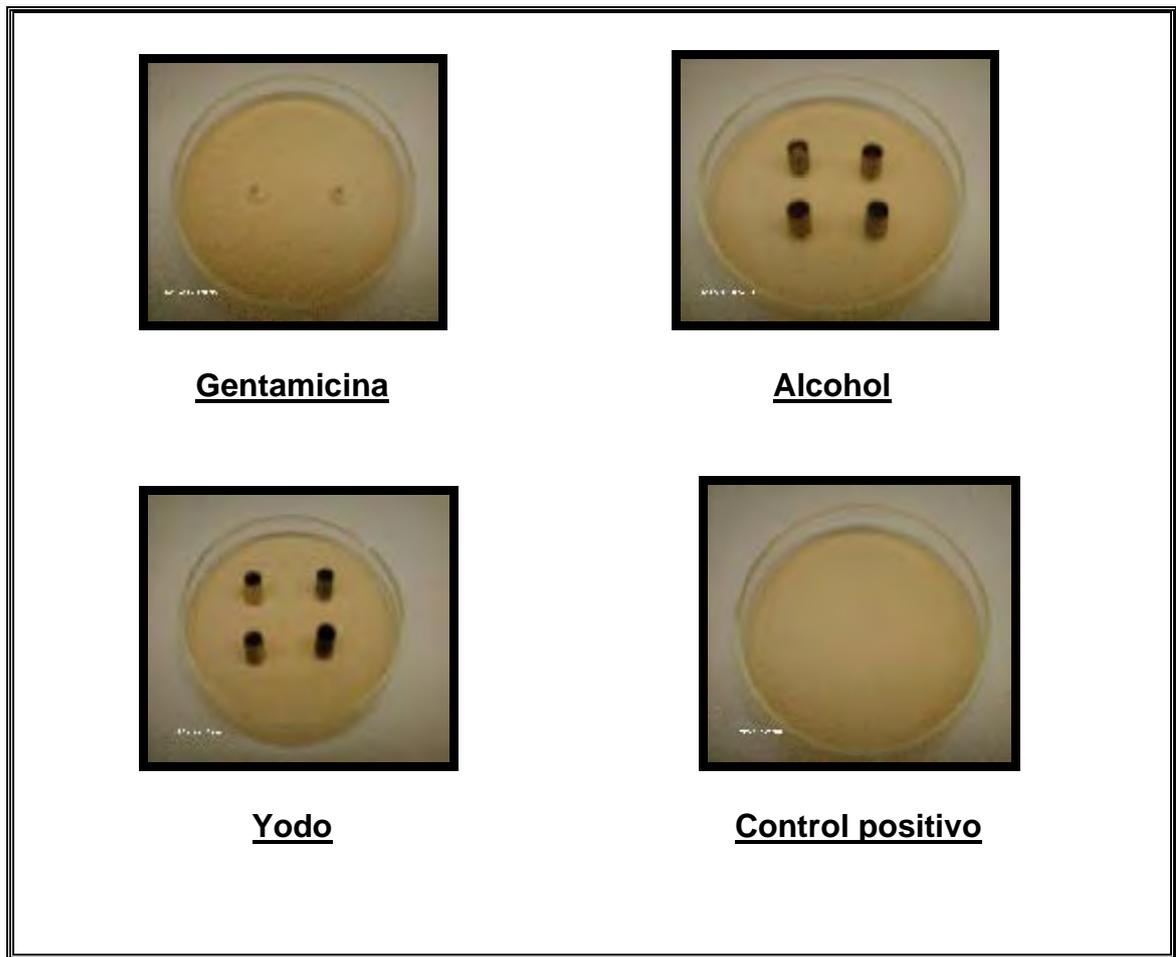


Figura N ° 16 Continuación resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Pseudomonas aeruginosa*.

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN.

Cuadro N ° 13 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes concentraciones del extracto de la goma-resina por el método de Kirby Bauer Modificado para el *Streptococcus pyogenes*.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO % V/V	RESULTADOS LECTURA DE PLACAS
EXTRACTO AL 10 %	Formación de halo entre 22 a 25 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 7.5 %	Formación de halo entre 20 a 21 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 5.0 %	Formación de halo entre 20 a 21 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 2.5 %	Formación de halo entre 18 a 20 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 1.0 %	Formación de halo entre 16 a 18 mm de diámetro MO Susceptible.
EXTRACTO AL 0.5 %	Formación de halo entre 16 a 17 mm de diámetro MO Susceptible.
BLANCO: ETANOL AL 90.6 %	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa MO resistente.
PATRÓN: YODO AL 2 %	Formación de halo entre 38 a 40 mm de diámetro MO Susceptible.
PATRÓN: DISCO DE ANTIBIÓTICO DE AMPICILINA 10 Unidades	Formación de halos de 44 mm de diámetro MO Susceptible.
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa.

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

RESISTENTE: No hay formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

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

Según el cuadro de resultados se considera la bacteria susceptible al extracto diclorometánico concentrado y sus diluciones, ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición, las cuales se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

Otro aspecto a considerar es que se lleva al mismo tiempo un blanco con alcohol etílico al 90.6%, presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que el *Streptococcus pyogenes*, es resistente al alcohol etílico.

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

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



Figura N° 17 Resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pyogenes*, concentración al 10%.

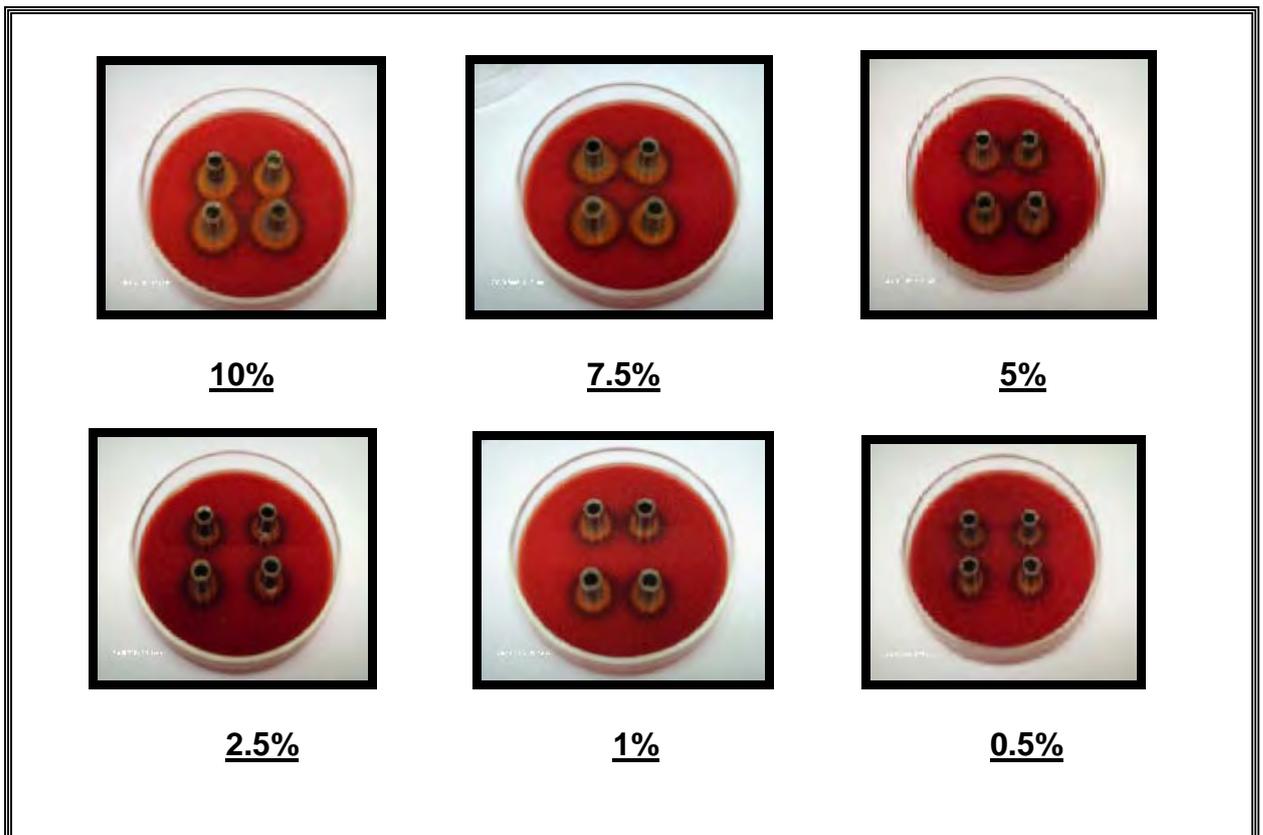


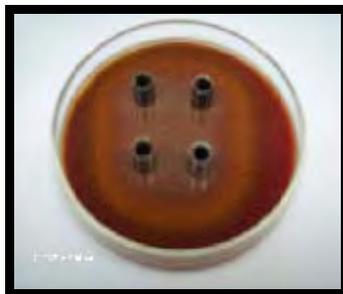
Figura N° 18 Resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pyogenes*.



Ampicilina



Alcohol



Yodo



Control negativo

Figura N ° 18 Continuación resultados del método de Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pyogenes*.

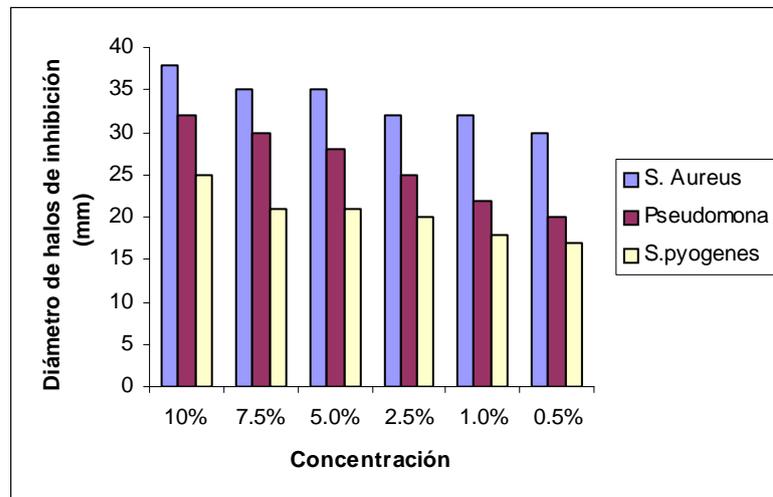


Figura N° 19 Comparación del efecto inhibitorio del extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* en *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.

En esta figura se observan los diferentes niveles de actividad antimicrobiana que presenta el extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, de acuerdo a los resultados obtenidos podemos establecer que el *Staphylococcus aureus* resultó mucho más susceptible que los otros microorganismos presentando halos de un diámetro de 30 mm, la *Pseudomona aeruginosa* presentó mediana susceptibilidad frente a este extracto observándose halos de 20 mm de diámetro y el *Streptococcus pyogenes* fue el que presentó menor susceptibilidad presentando halos de un diámetro de entre 16-17 mm, cuando se trabajó con la concentración del 0.5%.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo al análisis fitoquímico preliminar realizado al extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora*, están presentes los siguientes metabolitos secundarios: flavonoides, antraquinonas, terpenos, esteroides, compuestos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos.
2. De la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* se presume que la actividad antimicrobiana se debe a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, los cuales actúan sinérgicamente.
3. Para la elección de la fase móvil a utilizar se llevaron a cabo ensayo con varios disolventes a diferentes proporciones hasta encontrar uno que mostró resultados óptimos, por lo que se utiliza cloroformo: éter etílico (1:1), ya que esta proporciona una mejor separación de las manchas.
4. La cromatografía de capa fina se realizó con el objetivo de comprobar la presencia de los metabolitos secundarios presentes en el extracto diclorometánico de la goma-resina de *Eucalyptus citriodora* y así poder evitar los resultados falsos positivos que presentan las reacciones de color y precipitación.
5. A través de la revelación de las placas cromatográficas se observaron múltiples manchas, por lo que se puede asegurar que en cada una de estas manchas se encuentra presente un compuesto ó una mezcla de compuestos.

6. De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas realizadas con la capa acuosa de la partición líquido-líquido agua/diclorometano, podemos asegurar que la muestra utilizada no es una oleorresina sino una goma-resina, puesto que esta última se define como una mezcla de terpenos y carbohidratos ó componentes afines a la fase orgánica de una extracción, que fue lo que se encontró presente en dicho extracto.
7. Los halos de inhibición que presentaron los extractos diclorometánicos de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** a concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0.5% frente a la ***Pseudomona aeruginosa*** son mayores que los establecidos por el patrón de comparación utilizado (disco de antibiótico de gentamicina 10µg), por lo que los extractos a esas concentraciones son muy efectivos en el tratamiento de ***Pseudomona aeruginosa***.
8. En la evaluación microbiológica del extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** y sus diferentes diluciones, los tres microorganismos resultaron susceptibles ya que presentaron halos de inhibición en el rango de susceptibilidad, frente al blanco resultaron resistentes, lo que indica que el efecto antimicrobiano se debe a las sustancias extraídas y no al etanol al 90.6%.
9. A través de los resultados obtenidos se confirma la hipótesis planteada en el diseño metodológico, ya que el extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** en las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0.5% poseen actividad antimicrobiana contra las bacterias analizadas.

10. El efecto inhibitorio que presenta el extracto diclorometánico de la goma-resina del *Eucalyptus citriodora* resultó ser mas activo en contra de *Staphylococcus aureus* (concentración de menor inhibición 0.5% y presentó halos de 30 mm de diámetro), seguido por *Pseudomona aeruginosa* (concentración de menor inhibición 0.5% y presentó halos de 20 mm de diámetro) y menos activo con el *Streptococcus pyogenes* (concentración de menor inhibición 0.5% y presentó halos entre 16-17 mm de diámetro).

CAPÍTULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Continuar con investigaciones que involucren el fraccionamiento bioquímico del extracto diclorometánico de la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora***, mediante cromatografía de columna, a fin de determinar que fracción o fracciones son responsables de la actividad antimicrobiana.
2. Fomentar el cultivo de esta especie vegetal, debido a que esta es fuente de una gran variedad de metabolitos secundarios que pueden ser utilizados como materia prima en la elaboración de nuevos productos farmacéuticos.
3. Que se deben considerar factores como la recolección, conservación y almacenamiento de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora***, para la obtención de materia prima de buena calidad.
4. Realizar ensayos previos a la determinación de la fase móvil a utilizar en la cromatografía de capa fina con varios disolventes a diferentes proporciones hasta encontrar uno con el cual se observen resultados óptimos, para este extracto en particular se debe utilizar la fase móvil cloroformo: éter etílico (1:1).
5. Ensayar el extracto diclorometánico de la goma-resina del ***Eucalyptus citriodora*** (Eucalipto) en otros microorganismos de interés clínico y así poder ampliar su utilización para diferentes afecciones.
6. Previo a la evaluación de susceptibilidad, siempre se debe realizar un estudio macro y microscópico de las cepas, esto con el fin de verificar la pureza de estas y evitar resultados falsos positivos.

7. Elaborar una forma farmacéutica tomando como materia prima la goma-resina de ***Eucalyptus citriodora*** para que sea utilizada en el tratamiento de infecciones cutáneas y respiratorias causadas por el ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pyogenes***.
8. Fomentar el desarrollo de preparaciones medicinales elaboradas a partir de especies vegetales, puesto que se ha demostrado que estas pueden contribuir de gran manera en el tratamiento de diversas afecciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acortes J. 2003. Prácticas de Laboratorio de Microbiología. España. Consultado 3 de Abril 2005. Disponible en:
www.upm.edu/biology/cursos/micro/pruebas
2. Anet, E. y otros. 1957. The isolation of shikimic acid from *Eucalyptus citriodora*. Univ. Sydney, *Australian Journal of Chemistry*, 10 93-4.
3. Beatty, W. 1993. Diccionario de ciencias médicas 25^a ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana. Pág. 37, 69, 163, 165 y 438.
4. Brock, T. y otros. 1987. Microbiología. 4^a ed. México. Prentice-Hall. Pág. 906
5. Dayal, R. y otros. 1980. Chemical components of *Eucalyptus citriodora* leaves. Forest Res Lab., Bangalore, India. **Current Science**, 49(3), 116.
6. Dewick, P. 2002. Medicinal Natural Products. Editorial John Wiley. Toronto, Canadá. Págs. 219, 220 y 221.
7. Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas. 1974. Undécima edición. Salvat Mexicana de ediciones, S.A. de C.V.
8. Domínguez, X. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. 9^a ed. México. Editorial Limusa. Págs. 84, 153.
9. Duke, J. 1983. ***Eucalyptus citriodora*** Hook. Myrtaceae-Lemon-scented gum. Francia, Purdue University. Consultado 22 de Febrero del 2005. Disponible en:
[http : // www.hort.purdue.edu / newcrop /duke_energy / Eucalyptus citriodora.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/duke_energy/Eucalyptus_citriodora.html)
10. Evans, W. y otros. 1991, Farmacognosia, 13^a ed. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. Pág. 519.

11. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Farmacognosia. 2004. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
12. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada III. 2001. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
13. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Microbiología y Parasitología. 1994. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
14. Font Quer, P. 1993. Diccionario Botánico. 9ª. Reimpresión. Barcelona. Editorial Labor S. A. Tomo 1. Págs. 326, 365, 941.
15. Freman, B. 1984. Tratado de Microbiología de Burrows. 21ª. Ed. México, D. F. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V. Pág. 446, 447.
16. Gilg, E. 1926. Farmacognosia. Traducido de la 3ª. Ed. Alemania. Editorial Labor S. A. Barcelona, España. Págs. 240-241.
17. Grieve M. 1998. Eucalipto. Estados Unidos. Missouri Botanical. Consultado 22 de Febrero 2005. Disponible en: www.Botanical.com/botanical/mgmh/eucaly14.html
18. Guzmán, D. J. 1975. Especies Útiles de la Flora Salvadoreña. Médico Industrial. Ministerio de Educación, San Salvador, El Salvador. Impreso en los talleres de la Dirección de Publicaciones. Pág. 361
19. Jawets, E, y otros. 1992. Microbiología Médica. 14ª ed. México, D. F. Editorial Manual Moderno. Págs. 217, 218, 237, 238 y 239.
20. Koneman, E. y otros. 1992. Diagnóstico Microbiológica. 3ª ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana S. A. Pág. 565-604

21. Kuklinski, C. 1996. Farmacognosia. Ediciones Omega. Págs. 167,168 y 169.
22. Lambert, J. y otros. 2005. Taxonomic and chemical relationships revealed by nuclear magnetic resonance spectra of plant exudates. Journal of natural products. Vol. 68 (5).
23. Lock, O. 2001. Investigación Fitoquímica. Segunda edición. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Págs. 256-262.
24. López, A. y otros. 2004. Árboles en España, Manual de identificación. Ediciones mundi - Prensa. 2ª. Edición, revisada y ampliada.. Pág. 654.
25. Martínez, M. 2001. Técnicas experimentales en síntesis orgánicas. Editorial Síntesis. Págs. 168-177.
26. Martínez, R. y otros. 2003. Comprobación de la actividad antimicótica *in-vitro* de la tintura elaborada con oleorresina de Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
27. Merck. 1994. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt. Alemania. Pág. 74, 127, 144, 807.
28. Najarro, C. y otros. 2004. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la oleorresina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto). Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
29. Naturamedic. 2002. El Eucalipto. Argentina. Consultado 3 de Abril 2005. Disponible en:
www.naturamedic.com/eucalipto.htm
30. OEA (Organización de los Estados Americanos), UES (Universidad de El Salvador), MSPAS (Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social). Planter. 1994. Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. 2ª ed. San Salvador. Editorial Universitaria. Pág. 354-355.

31. Pelczar, M. y otros, 1992. Microbiología. 4^a ed. México, D. F. Editorial McGraw-hill. Pág. 206-271.
32. Real Academia Española. 1970. Diccionario de la Lengua Española. 19^a ed. Madrid. Editorial Espasa-Calpe, S. A. Pág. 940
33. Samuelsson, G. 1995. Drugs of natural origin a Textbook of pharmacognosy. Cuarta edición. Págs. 57, 58 y 59.
34. Shen, Z. y otros. 1987. Isolation and identification of citriodorin. Res, Inst, Chem, Proc, Util, Forest Pod, *Chinese Acad, Forestry*, Nanjing, Peop, Rep, China, **Linchan Huaxue Yu Gongye**; 7(2), 35-43.
35. Shen, Z. y otros. 1987. Isolation and identification of flavonoid compounds. Res, Inst, Chem, Proc, Util. Forest, *Chinese Acad. Forestry*, Nanjing, Peop, Rep. China. **Linchan Huaxue yu Gongye**, 7(2) 28-34
36. Skoog, D. y otros. 2001. Química Analítica. 7^a ed. México D. F. Editorial McGraw-Hill. Págs. 203, 204.
37. Tortora, G. y otros. 1993. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia, S.A. Pág. 494.
38. United States Pharmacopeial convention USP 25. NF 20. 2002. The Official Compendia of Standars 25^o Revisión (USP) y 20^o ed. (NF), Inc. Canadá. Págs. 883, 2221 y 2234.

GLOSARIO (1, 26, 6, 12)

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

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

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

Antiespasmódico: Agente que cura o alivia los espasmos.

Antiséptico: Sustancia que sirve para lograr la desinfección.

Asepsia: Una condición libre de microorganismos patógenos viables.

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

Dermatitis: Diversas afecciones de la piel.

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

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

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

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

Exudados vegetales: Mezclas naturales sólidas o semisólidas químicamente complejas de origen vegetal, como los bálsamos, las gomas, las oleorresinas y las resinas. La proporción de los compuestos puede variar según el clima, la época del año y otros factores.

Febrífugo: Agente que tiende a reducir la fiebre

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

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

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

Goma-resina: mezcla larga de terpenos y carbohidratos insolubles en agua.

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

Patógeno: Productor o causante de enfermedad.

Resistente: No hay formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

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

Susceptible: formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

ANEXOS

ANEXO N° 1



Figura N° 20 Árbol de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

ANEXO N° 2



Figura N° 21 Árbol de *Eucalyptus citriodora* exudando goma-resina.

ANEXO N° 3



Figura N° 22 Goma-resina de *Eucalyptus citriodora* pulverizada, obtenida después de la partición líquido-líquido agua/diclorometano.

ANEXO N° 4



Figura N° 23 Aparato Soxhlet



Figura N° 24 Rota evaporador (modelo)

ANEXO N° 5

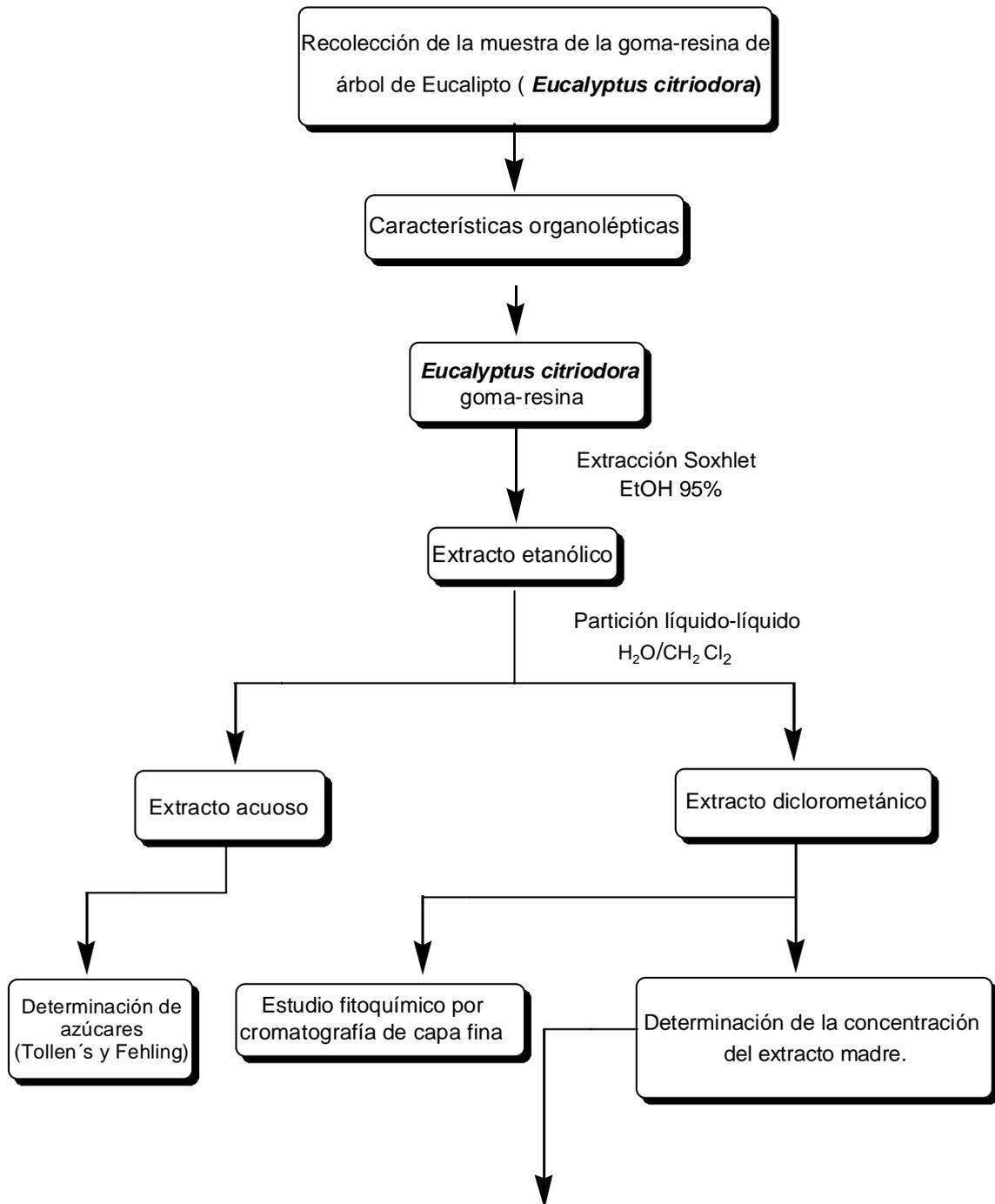


Figura N° 25 Diagrama de la Metodología General de Trabajo.

ANEXO N° 5 CONTINUACIÓN

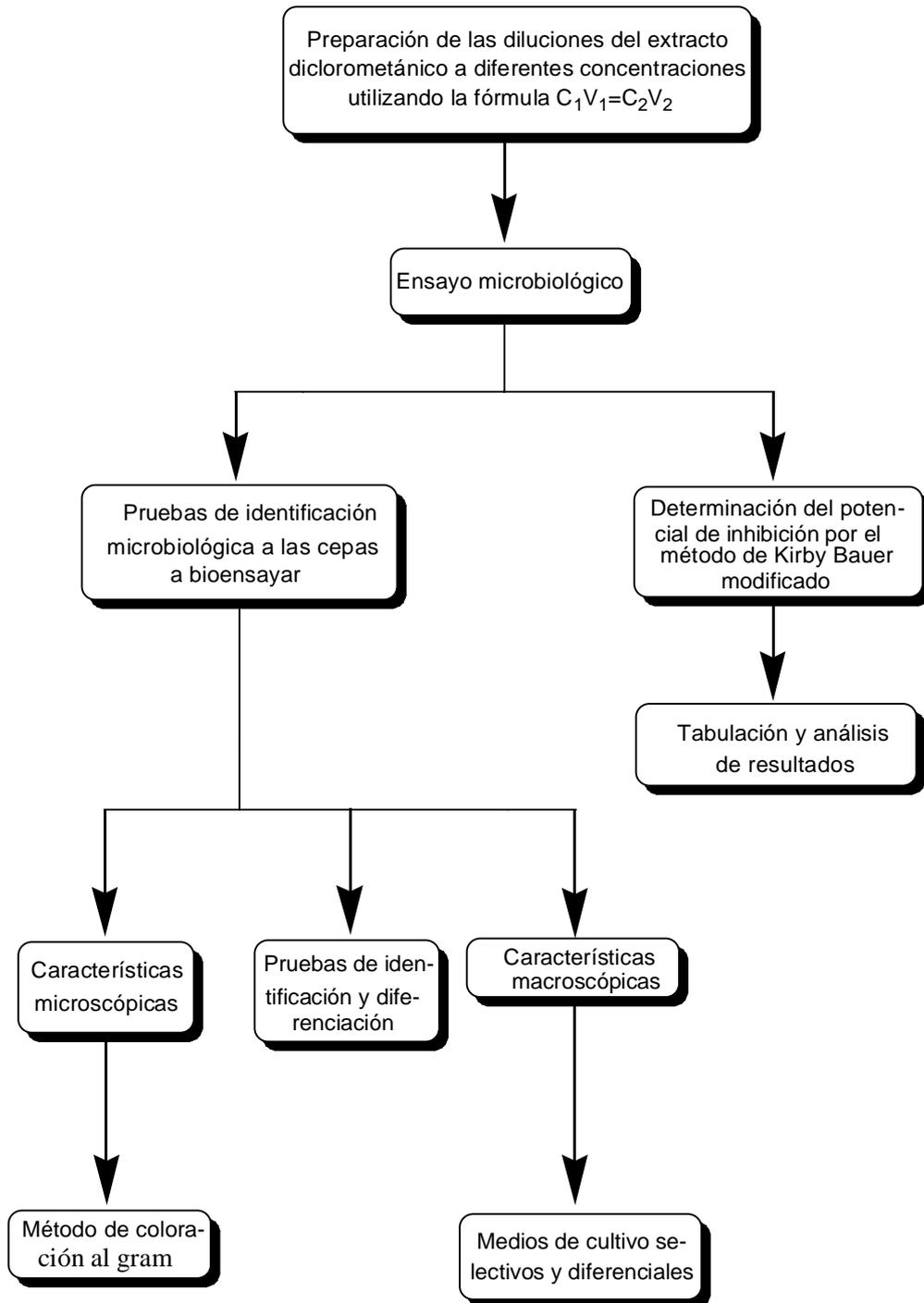


Figura N° 25 Diagrama de la Metodología General de Trabajo.

ANEXO N° 6

FRACCIONAMIENTO BIOGUIADO

Recolección



**Extracción
(Soxhlet)**



**Extracto
Etanólico**



Partición H_2O/CH_2Cl_2



**Extracto
diclorometánico**



**Actividad
biológica**

Figura N° 26 Esquema del Fraccionamiento Bioguiado.

ANEXO N° 7

Placas cromatográficas



Figura N° 27 Liebermann-Burchard.
(Triterpenos) (+)



Figura N° 28 Anisaldehído/ ácido
sulfúrico (Terpenos)
(+)



Figura N° 29 Anisaldehído/ ácido
sulfúrico (Saponinas).
(+)



Figura N° 30 Acetato de plomo
básico (Flavonoides)
(+)

ANEXO N° 7 Continuación



Figura N° 31 Cloruro de hierro (III)
(Fenoles) (+)



Figura N° 32 Reactivo de Kedde
(Glicósidos
cardiotónicos) (-)



Figura N° 33 Reacción de
Bornträger (+)
(Antraquinonas)



Figura N° 34 Reactivo de
Dragendorff (-)
(Alcaloides)

ANEXO N ° 7 Continuación



Figura N° 35 Vainillina / ácido (+)
sulfúrico (Universal)



Figura N° 36 Prueba de Baljet (-)
(Sesquiterpenlactonas)



Figura N° 37 Vapores de amoníaco (+)
(Flavonoides)

ANEXO N° 8

Pruebas Fitoquímicas de la capa acuosa



Figura N° 38 Prueba de Tollen's
Precipitado color plateado (+)



Figura N° 39 Prueba de Fehling
Precipitado rojo-ladrillo de óxido cuproso (+)

ANEXO N ° 9

CUADRO N° 14 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LOS
MICROORGANISMOS ⁽¹⁸⁾

MICROORGANISMOS	AGAR	CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bair-Parker	Colonias color negras, con halo alrededor, lustrosas y convexas
	Chapman	Colonias cremosas con crecimiento abundante de color amarillo
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Cetrimide	Colonias redondas y lisas de color verde fluorescente
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Sangre	Colonias blancas o grises de 2 mm de diámetro, rodeadas de zonas lisis.

ANEXO N° 10

RESULTADO DE MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA



Figura N° 40 *Staphylococcus aureus*
en Agar Bair Parker.



Figura N° 41 *Staphylococcus aureus* en Agar
Chapman.



Figura N° 42 *Pseudomonas aeruginosa*
en Agar Cetrimide.



Figura N° 43 *Streptococcus pyogenes* en
Agar Sangre.

ANEXO N° 11 ⁽²⁾

PRUEBAS MICROSCÓPICAS (COLORACIÓN 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.

MÉTODO:

1. Extensión: En un portaobjetos limpio con etanol 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 se seque.

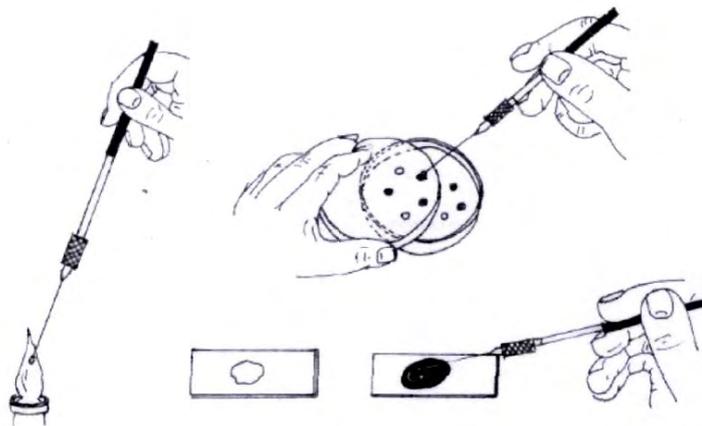


Figura N° 44 Método de extensión.

2. Coloración: Se llevan acabo 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 de 95° (decolorante),
- e) Se lava con agua destilada,
- f) Un minuto en Safranina (colorante de contraste),
- g) Se lava con agua corriente y
- h) Se seca suavemente y sin frotar con papel de filtro.

Cuando la preparación está totalmente seca, poner una gota muy pequeña de aceite de inmersión y observar al microscopio con el objetivo de inmersión (100x).

ANEXO N° 12

CUADRO N° 15 CARACTERÍSTICAS MICROSCOPICAS DE LOS
MICROORGANISMOS ⁽¹⁸⁾

MICROORGANISMO	INTERPRETACION	COLORACION
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positivo	Azul
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Gram positivo	Azul
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Gram negativo	Rosado

ANEXO N° 13

RESULTADOS DE PRUEBAS MICROSCÓPICAS

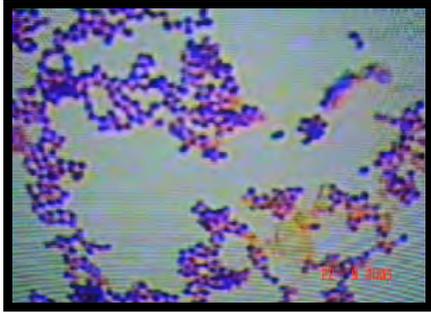


Figura N° 45 ***Staphylococcus aureus***
en coloración al Gram.

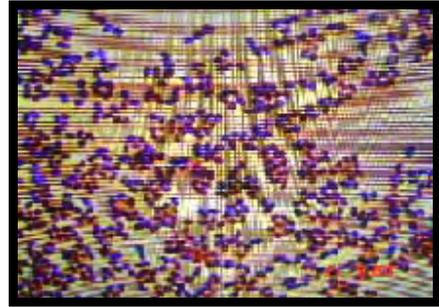


Figura N° 46 ***Pseudomonas aeruginosa*** en
coloración al
Gram.

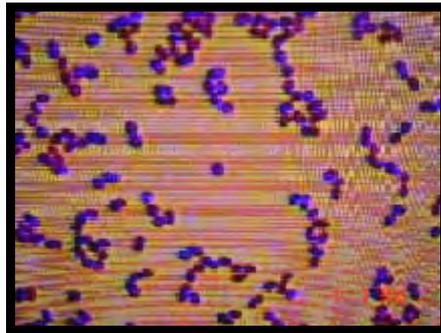


Figura N° 47 ***Streptococcus pyogenes***
en coloración al Gram.

ANEXO N° 15

RESULTADO DE PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

Staphylococcus aureus

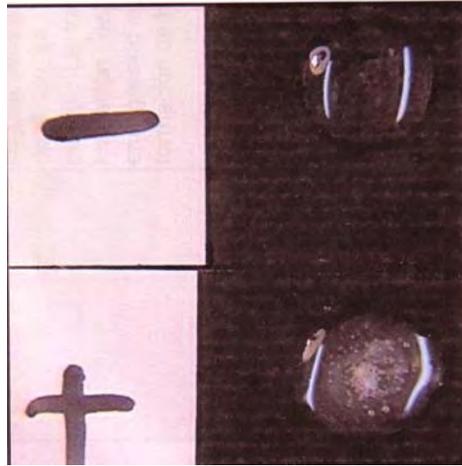


Figura N° 48 Prueba de la Catalasa.
Positivo(+) Burbujeo vigoroso de peróxido



Figura N° 49 Prueba de la Coagulasa.
Positivo(+) Coagulación parcial del plasma

ANEXO N° 17

RESULTADO DE PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

Pseudomona aeruginosa



Figura N° 50 Prueba bioquímica de Movilidad.
Positivo(+) Formación de turbidez.



Figura N° 51 Prueba bioquímica del Rojo de metilo.
Positivo(+) Aparición de un color rojo intenso



Figura N° 52 Prueba bioquímica del Citrato.
Positivo(+) Crecimiento de la bacteria en el medio y cambio de color Verde-azul.



Figura N° 53 Prueba bioquímica del Indol.
Negativo(-) Formación de anillo violáceo en la interfase.

ANEXO N ° 17 Continuación.



Figura N° 54 Prueba bioquímica de
Voges Proskauer.
Negativa (-) Coloración roja que
Perdura de 15-30 minutos.



Figura N° 55 Prueba bioquímica
del TSI.
Positivo(+)
Coloración rosado.

ANEXO N° 18

**CUADRO N° 18 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE LA PRUEBA
DEL TSI PARA *Pseudomona aeruginosa* ⁽¹²⁾**

SIGLA	INTERPRETACIÓN
K	Rosado (sin cambio)
A	Amarillo
K/A	Fermentación exclusiva de glucosa.
A//A	Fermentación de glucosa y uno de 2 azúcares.
K/K	Bacterias no fermentadoras
O	Producción de gas
HS	Producción de sulfuro de Hidrógeno.

ANEXO N ° 21

RESULTADOS DE PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

Streptococcus pyogenes



Figura N° 56 Prueba de discos de Bacitracina.

Positivo (+) Inhibición del desarrollo bacteriano.

alrededor del disco de Bacitracina

ANEXO N° 22 ⁽⁶⁾

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE MAC FARLAND

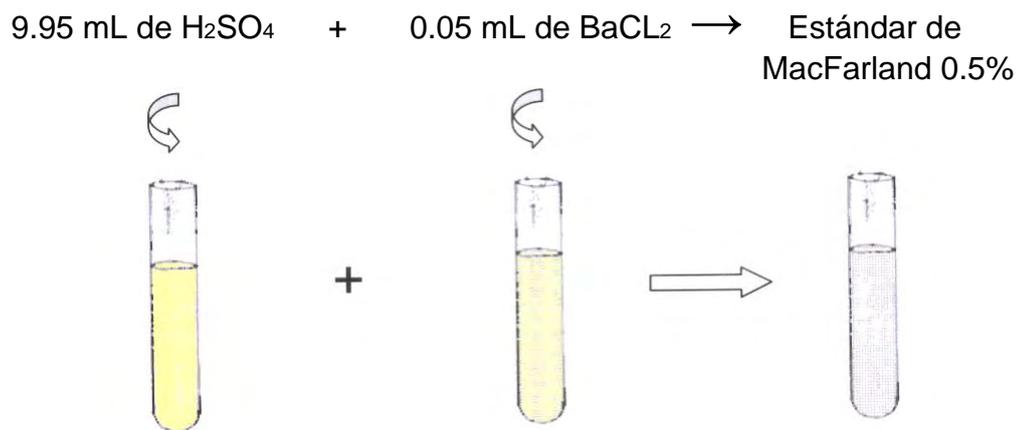


Figura N° 57 Preparación del estándar de Mac Farland.

Densidad celular aproximada de 1.5×10^8 Microorganismos/mL.
Preparación de la suspensión de ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pyogenes***: 10 mL de caldo nutritivo + cantidad necesaria de microorganismos.

ANEXO N° 23

MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO

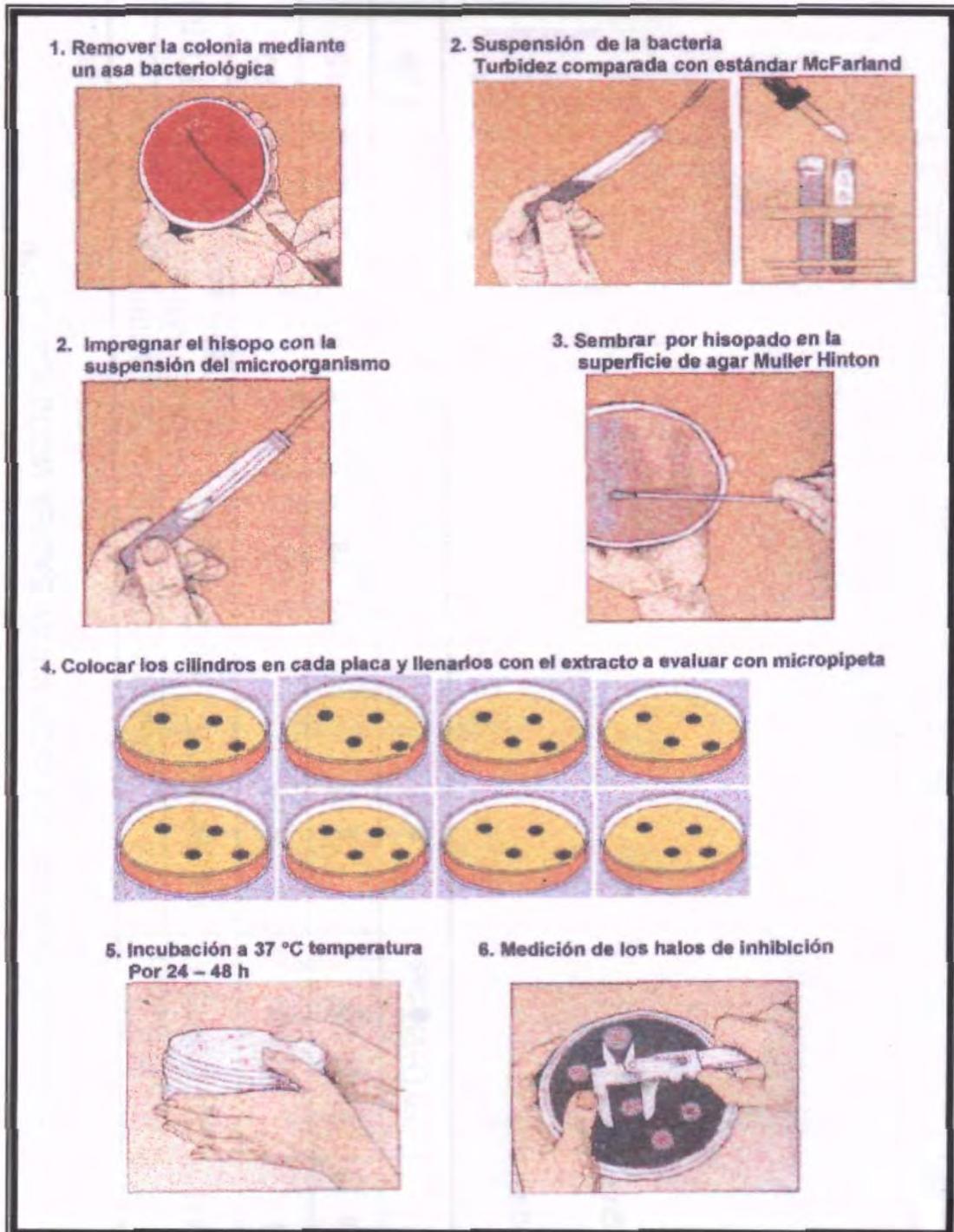


Figura N° 58 Esquema del Método de kirby Bauer Modificado

ANEXO N° 25

Cuadro N° 22 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO ⁽²⁴⁾

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

ANEXO N° 26

PREPARACIÓN DE REACTIVOS REVELADORES.⁽¹⁹⁾

Reactivo de Liebermann-Burchad

- 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 su uso).
- Aspersar y calentar 10 min. A 110 °C, mancha fluorescente a luz UV-365nm.
- Detección: esteroides; otros esteroides y triterpenos.

Anisaldehído-ácido sulfúrico

- 0.5 mL 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 visible 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: Universal

Anisaldehído-ácido sulfúrico

- Solución recién preparada de 0.5 mL de anisaldehído en 50 mL de ácido acético glacial, con adición de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado.

- Aspersar y calentar a 100-105 °C, colores violeta, azul, rojo, 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 ó 5 % en ácido clorhídrico 0.5 N ó
- 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 2 N.
- Aspersar y evaluar en el Visible, manchas violeta-azuladas.
- Detección: glicósidos cardíacos.

Hidróxido de potasio (reacción de Bornträger)

- Solución de hidróxido de potasio al 5 % ó 10 % en etanol (o metanol)
- Aspersar y evaluar en Vis o UV-365 nm.
- Detección: cumarinas (azul), antrona (amarilla), antraquinona (roja).

Reactivo de Dragendorff

- Solución A: disolver 1.7 g 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 5 mL de solución de reserva.
- Detección: alcaloides y otros compuestos nitrogenados.

Vainillina-ácido sulfúrico

- Solución A: solución etanólica de ácido sulfúrico al 5%.
- Solución B: solución etanólica de vainillina al 1%.
- Aspersar con A y luego con B. Calentar 5-10 min. a 110 °C . Evaluar la placa en el Vis. Las coloraciones obtenidas son violeta, azul, rojo, gris o verde.
- Detección: alcoholes superiores, fenoles y esteroides.

Prueba de Legal

2 mg de sustancia se disuelven en 2-3 gotas de piridina, enseguida 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 hidróxido de potasio 2N. Se detectan las sesquiterpenlactonas.

Prueba de Baljet

- Solución A: 1g de ácido pícrico en 100 mL de etanol
- Solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua
- Mezclar las soluciones en volúmenes iguales
- Aspersar y observar la formación de colores, anaranjado ó rojo oscuro.
- Detección: Sesquiterpenlactonas.

Método de la espuma

Colocar en un tubo de ensayo cierta cantidad de muestra y añadirle 5 mL de agua destilada y agite bien por 30 seg., deje reposar. Si es una espuma de 3 cm arriba de la superficie del líquido y persiste por más de 15 min., se presume la presencia de saponinas.

Prueba de Shinoda

Tomar una alícuota del extracto de la oleoresina del *Eucalyptus citriodora* y concentrarlo hasta 5 mL, añadirle una laminilla de magnesio metálico y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. Observar el desarrollo del color, lo cual es resultado positivo para flavonoides.

Vapores de amoníaco

Exponer a vapores de amoníaco la placa cromatográfica. Si hay presencia de flavonas o flavonoles, se observan manchas que viran de blanco a amarillo, ó en caso de antraquinonas de amarillo a rosado.

ANEXO N° 27

MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y SOLVENTES.

1.1 Material Vegetal.

- Goma-resina de *Eucalyptus citriodora*.

1.2 Cepas de Referencia.

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*

1.3 Material de Laboratorio

- Agitadores de vidrio
- Beakers (250, 100, 50, 30 mL)
- Embudos de vidrio
- Ampollas de separación (125, 60 mL)
- Erlenmeyers (500, 250 mL)
- Probetas (100, 25, 10 mL)
- Vidrio reloj
- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con rosca
- Pipetas Mohr (5 y 1 mL)
- Pipetas volumétricas (5.0, 1.0 mL)
- Balón fondo redondo de 500 mL
- Cajas de petri

- Láminas portaobjetos
- Frasco de vidrio color ámbar con tapón de rosca (500 mL)
- Asas bacteriológicas
- Guantes de asbesto
- Pipeteadores
- Mecheros bunsen
- Aros metálicos
- Trípode
- Cápsula de porcelana
- Mortero y pistilo
- Espátula metálica
- Microespátulas
- Gradilla para tubos
- Malla de asbesto
- Baño de maría
- Pinzas (para crisol, de extensión y de soporte)
- Papel filtro
- Papel toalla
- Tirro
- Etiquetas
- Plumones
- Fósforos
- Mangueras para entrada y salida de agua
- Gabacha, mascarilla, gorro y guantes estériles

1.3 Equipo

- Autoclave: de vapor húmedo, Webeco 1978, serie 72244. De aire seco, presión, modelo 25EG, serie 99033-005.
- Estufa Thelco: modelo 3542, serie 21-AF-10
- Balanza analítica metteler: modelo PM400, serie SNR1243297.
- Balanza granataria: marca Cenco Central Scientific Company. Triple Beam Balance USA. PAT.No.2, 729.439 capacity 2610 g.
- Hot plate fisher: modelo -75h, serie 557101947
- Microscopio: marca Tisher Micromaster, modelo Input:11GUEOH₂ 125
- Refrigeradora marca CETRON
- Flash evaporator
- Soxhlet de 1.5 Lts.

1.5 Reactivos y Solventes

- Ácido sulfúrico 10%
- Cloroformo
- Diclorometano
- Alcohol etílico 95%
- Anisaldehído 5%
- Anhídrido acético
- Ácido acético glacial
- Ácido sulfúrico concentrado
- Acetato de etilo

- Hidróxido de sodio 2N
- Tricloruro de hierro 10%
- Sulfato ferroso
- Vainillina 1%
- Yoduro de potasio
- Ácido tartárico 1%
- Hidróxido de sodio 1N
- Ácido 3,5-Dinitrobenzóico 1%
- Acetato de plomo 5%
- Alcohol Etílico 2%
- Ácido clorhídrico 1N
- Indicador rojo de metilo
- α -Naftol
- Hidróxido de potasio 5 ó 10 %
- Nitrato básico de bismuto
- Éter etílico
- *n*-hexano
- Tolueno
- Acetona calidad reactivo
- Acetona industrial
- Metanol
- Peróxido de hidrógeno 30%
- Cristal violeta sólido
- Alcohol-cetona

- Lugol
- Safranina
- Amoníaco concentrado
- Agua destilada

1.6 Medios de Cultivo

- Agar Müller-Hilton
- Agar Trypticase soya
- Agar citrato
- Agar *Staphylococcus* 110
- Agar tres azúcares y hierro
- Caldo rojo de metilo
- Caldo Voges Proskauer
- Caldo urea
- Medio de movilidad
- Agar sangre
- Agar Cetrimide
- Plasma sanguíneo
- Solución salina estéril