

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFÚNGICA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DEL FRUTO DE *Sapindus saponaria* (Pacún)

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR :

CARLOS ANTONIO AMAYA ECHEVERRÍA
NANCY ESMERALDA GUTIÉRREZ PORTILLO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

OCTUBRE DE 2004

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

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

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

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

Dra. María Isabel Rodríguez

SECRETARIA GENERAL

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

Lic. Salvador Castillo Arévalo

SECRETARIA

MSc. Míriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITÉ DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

COORDINADORA DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS

NATURALES

Licda. Ana Arely Cáceres Magaña

COORDINADORA DE ÁREA EN ANÁLISIS DE ALIMENTOS

MICROBIOLÓGICO

Licda. María Evelyn Sánchez de Ramos

DOCENTE DIRECTOR

MSc. Armando Nelson Genovez Leonor

DOCENTE DIRECTOR

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

AGRADECIMIENTOS

A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES:

MSc. Armando Nelson Genovez Leonor e Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda. Por su tiempo, apoyo, paciencia, y dedicación para la realización del presente trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y COORDINADORES DE AREA:

Lic. María Odette Rauda, Lic. María Evelyn Sánchez de Ramos, Lic. Arely Cáceres. Por sus buenas observaciones y evaluación, las cuales ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Marvin Núñez y Lic. Idalia Rosmery Erroa Ramos por su ayuda desinteresada.

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

Nancy y Carlos

DEDICATORIA

- A DIOS:** Por darme la fortaleza espiritual y física para la realización del presente trabajo.
- A MIS PADRES:** María Erundina de Gutiérrez y René Mauricio Gutiérrez Rivas. 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 MIS HERMANOS:** José y Francisco por sacrificar parte de su tiempo y brindarme su apoyo y colaboración.
- A MIS ABUELITOS:** Por su eterno amor. Tanto los que se encuentran físicamente presentes, como los que están en mis recuerdos y corazón.
- A MIS FAMILIARES:** Con aprecio y agradecimiento por su cariño.
- A MI COMPAÑERO:** Carlos por su paciencia, comprensión y apoyo.
- A MIS AMIGAS:** Silvia, Zeyda, Eugenia, Marina y Raquel por hacer de todos estos años más agradables.

SINCERAMENTE Nancy Esmeralda Gutiérrez Portillo.

DEDICATORIA

A Dios por prestarme la vida y darme fortaleza física y mental para poder haber culminado con éxito mi carrera.

A Don José Antonio Echeverría por enseñarme los valores de la vida y haber dedicado su tiempo en mi educación y principalmente por ser un ejemplo a seguir, ya que sin su ayuda espiritual JAMÁS hubiera podido culminar con éxito mis estudios. Que Dios te tenga en el Cielo.

AL Dr. José Carlos Echeverría por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por su paciencia, comprensión y su amor, Por el sacrificio de todos estos años, sin los cuales no hubiera logrado las metas propuestas.

A la Licda. María Lidia Echeverría por todo su amor incondicional y su valioso apoyo durante estos años de estudio.

AL Ing. Mauricio Gutiérrez por su valioso apoyo, dedicación y colaboración en la investigación.

A la Sra. María Erundina de Gutiérrez por todo su apoyo incondicional durante estos años de estudio y por su valiosa colaboración en el presente trabajo.

A José M. Gutiérrez y Francisco R. Gutiérrez por su sincera amistad y por toda su valiosa colaboración en la realización del presente trabajo.

A Nancy Esmeralda Gutiérrez Portillo por todo su amor, comprensión, paciencia y por permitirme estar a su lado y llenar así mis días de alegría y felicidad.

SINCERAMENTE Carlos Antonio Amaya Echeverría

ÍNDICE

	página
Resumen	
Capitulo I.	
1.0 Introducción	xvii
Capitulo II.	
2.0 Objetivos	20
Capitulo III.	
3.0 Marco Teórico	22
3.1 Monografía del <i>Sapindus saponaria</i> (Pacún)	22
3.2 Generalidades de las cepas sometidas a Bioensayo	25
3.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
3.2.2 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	30
3.3 Generalidades de los Compuestos Químicos	32
3.3.1 Glicósidos Saponínicos	32
3.3.2 Sesquiterpenlactonas	33
3.3.3 Glicósidos Flavonoides	34
3.3.4 Alcaloides	35
3.3.5 Taninos	36
3.3.6 Glicósidos Cardiotónicos	37
3.4 Generalidades sobre Cromatografía	39
3.4.1 Tipos de Cromatografía	40
3.4.2 Cromatografía Analítica de Capa Fina	41

Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	49
4.1 Tipo de Estudio	49
4.2 Investigación Bibliográfica	49
4.3 Metodología de Campo	50
4.4 Metodología de Laboratorio	50
4.4.1 Obtención del Extracto Etanólico	50
4.4.2 Análisis Fitoquímico Preliminar	51
4.4.3 Cromatografía de Capa Fina (CCF)	52
4.4.4 Ensayos Microbiológicos	53
4.4.4.1 Pruebas de Identificación de los Microorganismos	
a Ensayar	53
4.4.4.2 Ensayos de Susceptibilidad Microbiana	54
Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	57
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	94
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	98
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla N° 1: Pruebas Fitoquímicas Preliminares realizadas en el Extracto Etanólico de la Cáscara del Fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún).
- Tabla N° 2: Capa Cloroformo – Metanol. Sesquiterpenlactonas
- Tabla N° 3 : Capa Clorofórmica . Alcaloides.
- Tabla N° 4 : Capa Etérea. Esteroides.
- Tabla N° 5 : Capa Cloroformo–Metanol : Glicósidos Cardiotónicos.
- Tabla N° 6 : Capa Etanol-Agua : Taninos y Saponinas.
- Tabla N° 7 : Morfología Macroscópica y Microscópica de los Microorganismos.
- Tabla N° 8 : Resultados de Pruebas Bioquímicas de los Microorganismos.
- Tabla N° 9 : Resultados de la Evaluación Microbiológica del Extracto del Pacún (no seco) en el *Staphylococcus aureus* .
- Tabla N° 10: Resultados de la Evaluación Microbiológica del Extracto del Pacún (secado en estufa) en el *Staphylococcus aureus* .
- Tabla N° 11: Resultado de la Evaluación Antifúngica del Extracto del Pacún (no seco) en el *Trichophyton mentagrophytes*.
- Tabla N° 12: Resultado de la Evaluación Antifúngica del Extracto Pacún (secado en estufa) en el *Trichophyton mentagrophytes*.
- Tabla N° 13: Resultado de la Evaluación Antifúngica del Extracto del Pacún (no seco) por el Método de Placa Vertida en el *Trichophyton mentagrophytes*.
- Tabla N° 14: Resultado de la Evaluación Antifúngica del Extracto del Pacún (secado en estufa) por el Método de Placa Vertida en el *Trichophyton mentagrophytes*.

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: Fotografías del *Sapindus saponaria* (Pacún).

ANEXO N° 2: Pruebas Fitoquímicas Preliminares.

ANEXO N° 3: Fotografías de las Pruebas Fitoquímicas Preliminares.

ANEXO N° 4: Esquema de Marcha Fitoquímica Preliminar.

ANEXO N° 5: Fotografías de las Placas Cromatográficas.

ANEXO N°6: Fotografía de las Colonias de *Staphylococcus aureus* y del
Trichophyton mentagrophytes.

ANEXO N° 7: Pruebas de Identificación del *Staphylococcus aureus*.

ANEXO N° 8: Pruebas de Identificación del *Trichophyton mentagrophytes*.

ANEXO N° 9: Fotografía de Prueba de Coagulasa y Carnada de Pelo.

ANEXO N°10: Esquema del Kirby Bauer Modificado para *Staphylococcus aureus*.

ANEXO N°11: Esquema del Kirby Bauer Modificado para *Trichophyton mentagrophytes*.

ANEXO N° 12: Fotografía, Comparación de Resultados entre el Patrón
(Ketoconazol al 1%) y la Concentración del Extracto al 61.73%.

ANEXO N°13: Material y Equipo.

ANEXO N° 14: Fotografías del Equipo.

ANEXO N° 15: Preparación de Medios de Cultivo.

ANEXO N° 16: Preparación de Reactivos Reveladores.

ANEXO N° 17: Preparación del Estándar Mac Farland.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: Fotografía del Fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún).

FIGURA N° 2: Comparación del Efecto Inhibitorio del Extracto no Seco y del Secado en Estufa en el *Staphilococcus aureus* por Kirby Bauer.

FIGURA N° 3: Porcentaje de Inhibición del Extracto del Fruto no Seco y del Secado en Estufa por el Método de Kirby Bauer en *Trichophyton mentagrophytes*.

FIGURA N° 4: Porcentaje de Inhibición del Extracto del Fruto no Seco y del Secado en Estufa por el Método de Placa Vertida en *Trichophyton mentagrophytes*.

FIGURA N° 5: Fotografías de *Sapindus saponaria* (Pacún).

FIGURA N° 6: Fotografía de Prueba de Hemólisis, Liebermann Burchad, Salkoswski, Legal, Baljet.

FIGURA N° 7: Fotografías Pruebas de Identificación de Taninos.

FIGURA N° 8: Fotografía de Pruebas Keller Killiani, Legal, Dragendorff, Mayer, Wagner.

FIGURA N° 9: Marcha Fitoquímica Preliminar.

FIGURA N° 10: Capa Cloroformo – Metanol. (Sesquiterpenlactonas).

FIGURA N° 11: Capa Clorofórmica.

FIGURA N° 12: Capa Etérea.

FIGURA N° 13: Capa Cloroformo – Metanol. (Glicósidos Cardiotónicos).

FIGURA N° 14: Capa Etanol-Agua.

FIGURA N° 15: Colonias de *Staphilococcus aureus* en Agar Bair Parker.

FIGURA N° 16: Colonias de *Trichophyton mentagrophytes* en Agar Sabouraud.

FIGURA N° 17: Prueba de Coagulasa, Resultado (+) para *Staphilococcus aureus*.

FIGURA N° 18: Prueba de Carnada de Pelo para *Trichophyton mentagrophytes*.

FIGURA N° 19: Diagrama del Método de Kirby Bauer Modificado para *Staphilococcus aureus*.

FIGURA N° 20: Diagrama del Método de Kirby Bauer Modificado para *Trichophyton mentagrophytes*.

FIGURA N° 21: Comparación de Resultados de Inhibición del Crecimiento del *Trichophyton mentagrophytes* entre el Patrón (Ketoconazol 1%) y el Extracto Etanólico de la Cáscara del Fruto de *Sapindus saponaria* (Pacún) a una Concentración de 61.73 %.

FIGURA N° 22: Placas de Evaluación Antifúngica en el *Trichophyton mentagrophytes*.

FIGURA N° 23: Aparato Soxhlet.

FIGURA N° 24: Aparato de Rotavapor (Flash Evaporator).

RESUMEN

El árbol de Pacún (*Sapindus saponaria*) es común en climas cálidos y semicálidos, típico de los bosques secos de Mesoamérica, proporciona un fruto que es una baya, con un diámetro aproximado de 3 cm. Los cuales contienen gran cantidad de saponinas por lo que ha sido utilizado por sus propiedades detergentes.

En el presente estudio, utilizando el equipo del Soxhlet se obtuvieron extractos etanólicos de la cáscara del fruto secado en estufa y no seco de esta especie vegetal, a los cuales se les identificaron la presencia de: Saponinas, Taninos y Sesquiterpenlactonas, a través de un análisis Fitoquímico Preliminar de color y precipitación, los cuales fueron confirmados por Cromatografía en Capa Fina.

Se determina la concentración a la cual se encuentra el extracto por el método gravimétrico, obteniendo así la concentración del extracto etanólico (solución Madre) expresada en porcentaje peso / volumen. De esta solución se parte para realizar una serie de diluciones, a las cuales se les determinó su efectividad antimicrobiana y antifúngica por los métodos de Kirby Bauer Modificado y el de Placa vertida.

A través de los resultados obtenidos se confirma la hipótesis positiva, el extracto etanólico de las cáscaras del fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún) posee actividad antimicrobiana en la bacteria *Staphylococcus aureus* y antifúngica en el *Trichophyton mentagrophytes*.

En la evaluación antifúngica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto del Pacún en el *Trichophyton mentagrophytes* el secado en estufa da mejores resultados que el no seco, debido que se encuentra en mayor cantidad las sustancias activas ya que con el proceso de secado se elimina la humedad.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Existe un alto porcentaje de incidencia de enfermedades causadas por bacterias y hongos en El Salvador, constituyendo así un problema de salud a la sociedad, ya que las infecciones cutáneas son prevalentes en el mundo, y aunque no son debilitantes ni ponen en riesgo la vida si son persistentes y problemáticas y anualmente se gastan millones de dólares en su tratamiento.⁽¹⁰⁾

Las drogas de origen vegetal y las preparaciones medicamentosas a partir de ellas, han servido como medios curativos para el hombre. Los extractos de plantas pertenecen a las formas farmacéuticas mas antiguas utilizadas; lamentablemente, debido a la marginación de la medicina tradicional, se han perdido muchos conocimientos empíricos valiosos sobre las propiedades que poseen. Y aunque el empleo de los fármacos sintéticos constituye uno de los avances de la medicina moderna y son ampliamente utilizados para el control de hongos y bacterias pueden ocasionar una serie de dificultades, como el abuso de estos pueda ocasionar resistencia por parte de los microorganismos, ante esta situación una alternativa prometedora es el uso de productos naturales derivados de plantas, ya que permite encontrar compuestos bioactivos y una de las ventajas de obtener este tipo de sustancias es que se reducen los efectos secundarios, dado que pueden ser metabolizados por uno u otro organismo, a diferencia de los obtenidos por síntesis química comúnmente aplicados hasta ahora.

El país cuenta con una gran riqueza de recursos botánicos, muchos de los cuales no han sido investigados, debido principalmente, a la falta de apoyo y de presupuesto que existe actualmente en esta área.

Por lo que la presente investigación pretende el aprovechamiento de las propiedades del extracto etanólico de la cáscara del fruto de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún) y su posible actividad antimicrobiana y antifúngica, por lo que el estudio comprende un análisis Fitoquímico preliminar del extracto etanólico y la evaluación microbiológica trabajando para ello con cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, que es una de las especies de hongos mas frecuente causante de infección en cabello, piel y uñas en humanos. Y de *Staphylococcus aureus*, microorganismo responsable de neumonía estafilocócica, síndrome de shock tóxico y otras enfermedades respiratorias; también es causante de infecciones cutáneas como furúnculo o absceso localizado.

Los extractos de plantas son un recurso accesible para la elaboración de formas farmacéuticas, como una alternativa terapéutica para que puedan ser utilizadas por la población, contribuyendo de esta manera a la salud de las grandes mayorías, además de promover así el cultivo de esta especie vegetal e implementando una agroindustria que daría lugar a mejoras económicas en esta área. ⁽⁹⁾

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto etanólico del fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Identificación y recolección del fruto de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún).
- 2.2.2 Extraer con alcohol etílico al 93% las saponinas de la cáscara del fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún).
- 2.2.3 Efectuar un análisis fitoquímico preliminar a los extractos etanólicos.
- 2.2.4 Comprobar la actividad antibacteriana en el *Staphilococcus aureus*, de los extractos etanólicos a diversas concentraciones, por el método de Kirby Bauer Modificado.
- 2.2.5 Comprobar la actividad antifúngica en el *Trichophyton mentagrophytes*, de los extractos etanólicos a diversas concentraciones, por el método de Kirby Bauer Modificado.

CAPITULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 MONOGRAFÍA

Sapindus saponaria

FAMILIA:

Sapindáceas

SINÓNIMOS:

S. inaequalis, *S. Marginatus*,

S. drumondii, *S. Amolli*.

NOMBRES POPULARES:

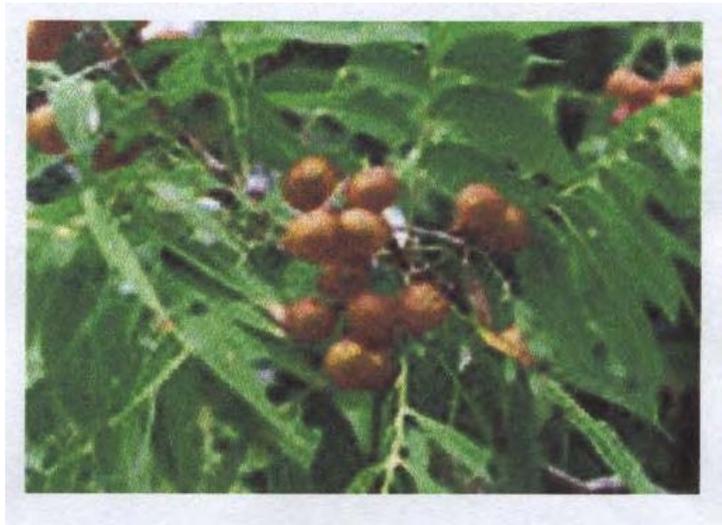
Pacún, Jaboncillo, huiril, jaboncillal, jabonera, bolitario, charapo, matamuchacho, palo blanco.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Árbol de 8 a 10 metros de altura, de hojas compuestas alternas paripinnadas, con 6 -18 folíolos, lanceoladas asimétricas, de color verde mate, de 3 a 4 pulgadas de largo, lisas en su cara superior. Las flores son blancas, pequeñas, en panojas terminales, de suave aroma; el cáliz es de cuatro sépalos e igual número de pétalos en la corola, 8 a 10 estambres. Ovario de tres carpelos, con óvulos envueltos en una capa carnosa que tiene un principio jabonoso abundante. La semilla es redonda, dura, negra, lustrosa.^(9,15) (ver anexo 1)

AGRICULTURA:

El *Sapindus saponaria* es común en climas cálidos y semicálidos; se propaga por estacas, brotes o semillas.⁽³⁾



USOS TERAPÉUTICOS POPULARES:

El cocimiento de las hojas se usa oralmente como diurético sudorífico y contra edemas de origen renal.⁽¹⁷⁾

El fruto ha sido usado como febrífugo y en el tratamiento de reumatismo y enfermedades renales, pero su uso puede ser peligroso.

OTROS USOS:

La capa carnosa amarillenta, contiene gran cantidad de saponina y es la que se emplea en el lavado y en la perfumería. De las semillas se extrae un aceite fijo comestible (Beille).⁽³⁾

Las cortezas machacadas y tiradas en los remansos de los ríos, procuran la toma del pescado como con el barbasco.⁽⁹⁾

Los frutos son utilizados para fabricar collares y rosarios.

La madera se emplea para leña; se usa para la construcción de postes y ocasionalmente para pequeños trabajos de carpintería.

Los frutos contienen aproximadamente 30 % de saponinas y cuando se maceran en agua producen una sustancia jabonosa, por lo que se utiliza para lavar la ropa como sustituto del jabón.

Las flores poseen propiedad melífera por lo que son muy visitadas por las abejas.

En algunos lugares se cultiva como árbol de sombra y ornato, de preferencia a orillas de caminos.

CONTENIDO QUÍMICO:

Las hojas contienen: Sesquiterpenlactonas, Taninos, Glicósidos Saponínicos.

La corteza: contienen los mismos compuestos que las hojas.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y TOXICIDAD:

El extracto etanólico de las hojas presentó marcada actividad inhibitoria en los cultivos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.⁽¹⁷⁾



3.2 GENERALIDADES DE LAS CEPAS SOMETIDAS A BIOENSAYO

3.2.1 *Staphylococcus aureus*

La más patógena de las especies de *Staphylococcus* encontradas en el hombre es el *Staphylococcus aureus*, un microorganismo capaz de causar infección en cualquier sitio del organismo. Las infecciones en la piel pueden ser leves o graves e incluyen abscesos, impétigo, forúnculos, carbunco e infecciones sistémicas graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis. Este tipo de infección se ha denominado: Síndrome de la piel escaldada estafilocócico. El *Staphylococcus aureus* puede complicar la recuperación de infecciones virales, como la influenza, y llegar a ser la causa de infecciones serias en huéspedes inmunosuprimidos. La bacteremia de *Staphylococcus aureus* es común y puede relacionarse con endocarditis valvular mitral y aórtica aguda. Osteomilitis y abscesos pulmonares embólicos, complicando la endocarditis derecha. La bacteremia también puede sembrar a distancia. Y llegar a la formación de abscesos metastásicos en diversos órganos. Entre ellos piel y tejidos celular subcutáneo. Riñones y cerebro.⁽¹¹⁾

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* pueden envenenar los alimentos mediante la producción de enterotoxinas en ciertos productos que han sido almacenados sin refrigeración.

Sus células esféricas de 1 μm de diámetro, aparecen como masas de células arracimadas, aunque se encuentran como células aisladas, en pareja y tetrada, los estafilococos jóvenes son Gram-positivas, sin embargo al envejecer,

muchas células se vuelven Gram-negativas, son no móviles, no forman esporas. Los estafilococos crecen bajo condiciones aerobias 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 van desde el gris, amarillo al amarillo dorado intenso. Cuando se cultivan en Agar sangre la mayoría de las colonias de *Staphylococcus aureus*, aparecen redondas con una zona de β -hemólisis.⁽¹⁰⁾

Los estafilococos producen catalasa, lo que los distingue de los estreptococos. Tienen la particularidad de fermentar con lentitud muchos carbohidratos y producen ácido láctico pero no gas. Y su actividad proteolítica varia de una cepa a otra.

Microorganismos relativamente resistente a la desecación, a ciertos desinfectantes, al calor y al cloruro de sodio 9 %.

El *Staphylococcus aureus* es la única especie que tiene la capacidad y poder enzimático de coagular el plasma oxalatado, en presencia de un factor contenido en muchos sueros, esto se asocia con la formación de la toxina hemolítica que tiene alto grado de virulencia.

Se encuentra como microorganismo de vida libre en el ambiente y vías respiratorias. En los hospitales las zonas de mayor riesgo de infecciones estafilocóccicas graves son las salas de cuna de recién nacidos, unidad de

cuidados intensivos, salas de operaciones y las salas de quimioterapia del cáncer.

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

Los estafilococos son patógenos oportunistas, habitualmente las infecciones producidas por estafilococos son cutáneas, el prototipo de investigación estafilococcica es el furúnculo o cualquier absceso localizado.⁽¹⁰⁾

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

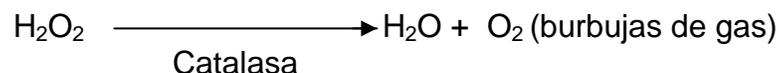
- Identificación de *Staphylococcus aureus* :

- Prueba de la Coagulasa: La coagulasa es una proteína de composición química desconocida con actividad semejante a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina. Produciendo un coágulo visible en un sistema de prueba apropiado. Se cree que la coagulasa actúa in vivo formando una barrera de fibrina en el sitio de la infección estafilocócica. La prueba de coagulasa es la que se emplea con mayor frecuencia para diferenciar *Staphylococcus aureus* de los otros estafilococos.

- Principio: La coagulasa está presente en dos formas, libre y ligada, cada una con diferentes propiedades que requieren el uso de pruebas separadas :
- Coagulasa Ligada (prueba en porta objeto) : La coagulasa ligada también llamada factor de agregación, esta unida a la pared de la célula bacteriana y no se encuentra presente en los filtrados de cultivo la hebras de fibrina se forman entre las células bacterianas suspendidas en plasma, (fibrinógenos), haciendo que se agrupen en agregados visibles cuando se observa en la prueba en el portaobjeto. La actividad de la coagulasa ligada no es inhibida por los anticuerpos formados contra la coagulasa libre.
- Coagulasa Libre (prueba en tubo) : La coagulasa libre es una sustancia semejante a la trombina presente en los filtrados de cultivos. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezclan con igual cantidad de plasma en un tubo de prueba, se forma un coágulo visible como resultado de la utilización de los factores plasmáticos de coagulación de manera semejante cuando se agrega trombina.
- Interpretación :

Prueba en portaobjeto: La reacción positiva por lo general se detecta en 15–20 segundos. Con la aparición de un precipitado granular o la formación de coágulos blancos.

- Prueba en tubo: La reacción se considera positiva si cualquier grado de coagulación es visible dentro del tubo.⁽¹¹⁾
- Prueba de Catalasa: La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Desde el punto de vista químico, es una hemoproteína similar en estructura a la hemoglobina, excepto que en los cuatro átomos de hierro en la molécula están en la forma oxidada en lugar de reducida. Salvo los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. La mayoría de las bacterias anaerobias que descomponen el peróxido de hidrógeno lo hacen mediante de enzimas peroxidadas, en forma semejante a la catalasa, excepto que cada molécula contiene un solo ión férrico.
- Principio: El peróxido de hidrógeno es uno de los productos oxidativos finales en el metabolismo aerobio de los carbohidratos. Si se acumula, el peróxido de hidrógeno es letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, como se muestra en la siguiente reacción :



- La prueba de la catalasa, realizadas por los métodos del portaobjeto o en tubo por lo común se emplea para diferenciar los estreptococos (negativo) de los estafilococos (positivo), o para diferenciar bacilos de microbacterias.

- Interpretación : La rápida aparición y sostenida producción de burbujas de gas o efervescencia constituye un resultado positivo.⁽¹¹⁾

3.2.2 *Trichophyton mentagrophytes* :

Es una de las especies de hongos, mas frecuente, causante de dermatofitosis que se encuentra entre las infecciones mas prevalentes en el mundo.

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

Los dermatofitos se clasifican como geófilos, zoófilos o antropófilos, según su habitat usual, sea el suelo, los animales o los humanos.

El *Trichophyton mentagrophytes* es de las especies antropófilas causante común de infecciones en humanos, ya que pueden infectar cabello, piel o uñas causando enfermedad en la piel: Tiña del cuerpo, tiña del pie (pie de atleta) , tiña de la cabeza, tiña de las uñas, tiña del pelo de la barba.⁽¹⁰⁾ Es una de las seis especies causantes de casi todas las infecciones dermatofíticas humanas producidas en los Estados Unidos, por lo que hay que presentarle un especial interés.

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

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

La apariencia de las colonias y su morfología después de dos semanas de crecimiento a 25 °C sobre Agar Dextrosa Saboraud. Las colonias pueden ser algodonosas o granulares; muestran abundantes microconidios esféricos similares a racimos de uvas sobre ramas terminales. Se observan hifas espirales o enrolladas. ⁽¹⁴⁾

3.3 GENERALIDADES DE COMPUESTOS QUÍMICOS⁽⁵⁾

3.3.1 Glicósidos Saponínicos

Las saponinas son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; el nombre de saponina viene del latín *sapo* (*jabón*); las saponinas químicamente son glicósidos con genina esteroidal o triterpénica, a la parte no azucarada o genina se le denomina sapogenina.

Según la estructura de la genina o sapogenina se conoce dos grupos de saponinas: Esteroidales (generalmente son triterpenoides tetracíclicos) y triterpenoides (generalmente son pentacíclicos). Ambos presentan un enlace heterosídico en el carbono 3 y tienen un origen biogenético común, se forma por la vía del ácido mevalónico.

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

Las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Al concentrar la solución alcohólica. Se separan las saponinas que después se cristalizan en mezclas de alcohol y agua.

Para obtener sapogeninas se pueden hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales, con enzimas de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácido

clorhídrico o ácido sulfúrico. Luego se extraen las sapogeninas, que son poco polares, con benceno, éter de petróleo o acetona y se recristalizan.

Las saponinas se caracterizan principalmente por sus propiedades tensoactivas se disuelven en agua formando soluciones espumantes, aumenta la permeabilidad de las paredes de la célula y destruye los hematíes por hemólisis. Poseen acción hemolizantes y actúan sobre el protoplasma inhibiendo las funciones vitales de las células. Las propiedades detergentes de las plantas han sido explotadas desde la antigüedad por el hombre.

En cuanto a sus usos, muchos saponósidos tienen propiedades antimicrobiana y antifúngica. También se usan para las enfermedades parásitas tropicales. Las propiedades farmacológicas se deben a los saponósidos triterpénicos.

PRUEBAS FITOQUÍMICAS:

Las saponinas y sus sapogeninas insaturadas dan coloraciones con varios reactivos ácidos como el de *Liebermann-Burchard*, *Salkowski*, *Cloruro de tionilo* y *Tricloruro de antimonio*. Las saponinas dan positivas las pruebas para carbohidratos como la de *Molish* o la de *Antrona*..⁽⁶⁾

3.3.2 Sesquiterpenlactonas

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metilbutanodieno-1,3), cabeza, cola y algunos productos de transposición; parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólido.

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 acción citotóxica, otras son analgésicas y amebecidas.

Son sustancias amargas, de farmacología poco estudiada, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales, por lo que es probable que sean los agentes medicinales. Se han sugerido que la actividad citotóxica esta relacionada con el grupo exometilenbutenólido y también que este grupo modifica el crecimiento de vegetales.

También se han reportado germacrólidos del género Mikania, con propiedades de inhibición al crecimiento de algunos microorganismos.

3.3.3 Glicósidos Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado $C_6-C_3-C_6$ como se encuentra en las flavononas, auronas, chalconas, flavonas, flavonanoles, flavandioles, antocionadina, catequina, isoflavonal y neoflavonas.

Se conocen unos 5000 ⁽³⁰⁾ flavonoides naturales, se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libre como glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. Las agliconas son mas frecuentes en tejidos leñosos.

Las diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante reacciones de coloración y propiedades de solubilidad.

En términos generales los flavonoides provienen de una larga gama de compuestos naturales llamados polifenoles, esto constituye un grupo de metabolitos secundarios extenso y estructuralmente diverso en el reino vegetal. Algunos pigmentos flavónicos, desprovistos de toxicidad para el hombre, tienen propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antihemorrágicas o hemostáticas, antiarrítmicas cardíacas, antiinflamatorio, antirradicales libres, antihepatotóxicos y antiinfecciosos.

En la última década, se ha dado un incremento en el interés por el conocimiento acerca de la actividad biológica de los flavonoides.⁽⁴⁾

3.3.4 Alcaloides

Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, con acción fisiológica mas o menos intensa sobre animales.

La mayoría de alcaloides se encuentran en los vegetales como sales de ácidos orgánicos.

En ciertas plantas pueden haber un ácido especial asociados a los alcaloides, otros se hayan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable.

Estos 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 isoquinolina, del indol, del imidazol, esteroideo, del lupinano, de las aminas alcaloides y de las purinas. Los alcaloides son sustancias mas o menos tóxicas que actúan primeramente sobre el sistema nervioso central. Son considerados metabolitos secundarios, contienen átomos de nitrógeno, secundario y terciario o cuaternario en su estructura. Ellos tienen la característica de ser básicos y son sintetizados en plantas por medio de aminoácidos o de sus inmediatos derivados. En muchos casos son de limitada distribución en el reino vegetal y juegan un rol importante en la fisiología de plantas u organismos.

3.3.5 Taninos

El término tanino se empleó por primera vez en 1976 para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales que son capaces de combinarse con proteínas de la piel animal evitando su putrefacción y convirtiéndose en cuero.

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

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 con 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.

3.3.6 Glicósidos Cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas, derivadas de los esteroides, que actúan sobre el corazón. La porción del azúcar contienen 3-5 moléculas de monosacáridos, por lo general, metilpentosas y desoxiazúcares muy especiales. La aglicona esteroideal, aunque tóxica, no afecta el corazón, en ella hay varios hidroxilos, uno de ellos en el C₁₄ y otro en el C₃ al cual siempre va unida la porción de azúcar.

La cadena unida al carbono 17, por lo general, corresponde a una γ - lactona α - β insaturada.

Son solubles en agua o alcoholes de bajo peso molecular y son insolubles en éter de petróleo, cloroformo y otros disolventes de lípidos.

Los glicósidos cardiotónicos se han encontrado en plantas de familias muy diversas como apocináceas, asclepiadáceas, liliáceas, moráceas, escrofulariáceas, ranunculáceas.

La acción excitante de los cardiotónicos, no es solo del tipo muscular si no de origen nervioso.⁽⁴⁾

3.4 Generalidades Sobre Cromatografía.⁽¹³⁾

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 sucesivas 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).

3.4.1 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 en 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.

3.4.2 Cromatografía Analítica en 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 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 (adsorbentes, 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 esta 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 su R_f . Por el contrario, los poco 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 hexano. En el caso de compuestos de polaridad media, se aconseja utilizar mezclas hexano-acetato de etilo en distintas proporciones. Los productos más polares, que quedan muy retenidos el adsorbente, requieren un disolvente más polar como el metanol o las mezclas cloruro de metileno-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 a 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.

- Procedimiento Experimental:

Las placas de cromatografía generalmente se comercializan como láminas (20 X 20 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 - 3.0 cm) depende del número de compuestos que se vaya a analizar. El tamaño de la placa también esta 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.

- 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.
- Cortar un trozo de papel de filtro e introducirlo en la cámara cromatográfica. Añadir el disolvente. La misión del papel filtro es absorber disolvente y saturar el interior de la cámara con los vapores de éste para evitar que la fase móvil se evapore de la superficie de la placa.
El nivel de disolvente debe quedar por debajo de la línea en la que se ha depositado la muestra, de manera que no toque la mancha del compuesto

aplicado. Si el origen de la placa quedase cubierto por el disolvente, 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 o ligeramente inclinada. No utilizar cámaras cromatográficas anchas en las que la placa se pueda caer.
- El disolvente ascenderá por capilaridad. Cuando el frente llegue a poca distancia del borde superior de la placa, abrir la cámara, sacar la placa y señalar con un lápiz la distancia recorrida por el disolvente antes de que 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 pistola 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.
- Determinar el R_f , y anotar el disolvente que se ha utilizado.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de Estudio :

La presente investigación es de carácter hipotético-deductivo ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permiten formular las siguientes hipótesis: ⁽¹⁹⁾

Hipótesis positiva: El extracto etanólico obtenido del fruto de la especie vegetal *Sapindus saponaria* posee actividad antimicrobiana y antifúngica.

Hipótesis negativa: El extracto etanólico obtenido del fruto de la especie vegetal *Sapindus saponaria* no posee actividad antimicrobiana y antifúngica.

De igual forma es un estudio retrospectivo-prospectivo. Retrospectivo porque se realiza una medición actual y se compara con datos ya obtenidos; es prospectivo porque se basa en datos obtenidos actualmente de los cuales se obtendrán conclusiones para proyectarlas a futuro.

Es también analítico experimental ya que se obtendrán datos interpretables, que conducen a conclusiones mas claras y pueden aplicarse instrumentos para medirlos, que permite explicar fenómenos en estudio.

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

4.2 Investigación Bibliográfica

La cual comprende la consulta de libros, trabajos de graduación, revistas, manuales etc. En las bibliotecas de las Facultades de Química y Farmacia y la

de Ingeniería Agronómica, de la Universidad de El Salvador, así como también investigaciones en Internet .

Consulta a docentes entendidos en la materia de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

4.3 Metodología de Campo :

El árbol de *Sapindus saponaria* se encuentra en la zona verde de la Facultad de Ingeniería Agronómica, este proporciona un fruto globoso el cual se cosecha directamente del árbol o del que ha caído al suelo para poder recolectarlo. Dicha recolección se realiza en el mes de abril aprovechando que aún prevalece la época seca (verano), ya que es durante este tiempo el mas recomendable para su recolección y por encontrarse este libre de humedad.

Luego de haber identificado el material vegetal se procede a su recolección, la cual se hace manualmente, se usa sobres de papel para almacenarlo con el objetivo de protegerlo de insectos y del ambiente; el material vegetal se almacena en los sobres de papel a temperatura ambiente hasta el momento en el cual se pretende utilizar.

4.4 Metodología de Laboratorio :

4.4.1 Obtención del Extracto Etanólico del Fruto del Pacún: (ver anexo 14)

Partir el fruto de la de la especie vegetal *Sapindus saponaria*, separar la cáscara de la semilla y fraccionar esta cuidadosamente, dividir la cáscara en

dos porciones de 700 gramos cada una, secar una de las porciones en una estufa a temperatura de 60 grados por un espacio de dos horas, secar la otra porción a temperatura ambiente.

Luego de tener seco el material vegetal proceder a hacer la extracción en el equipo Soxhlet, utilizando etanol al 93 % como solvente. Colocar el material en un cartucho de papel filtro en el dedal del equipo, hacer pasar etanol frío para que realice la primera extracción, posteriormente se lleva a temperatura controlada. Someter el material vegetal a cinco arrastres, suspender la extracción cuando el solvente que se encuentra en el dedal presente un color tenue lo que indica que ya no se esta extrayendo mas sustancias de la planta; pasar el extracto obtenido al equipo del rotavapor (Flash Evaporator), el cual proporciona las condiciones adecuadas para eliminar el disolvente en el proceso de concentración, obteniendo un extracto concentrado (solución madre), permitiendo recuperar el etanol utilizado.

4.4.2. Análisis Fitoquímico Preliminar. (Ver Anexo 2)

Se realizan pruebas fitoquímicas a los extractos obtenidos, para identificar la presencia de los principios activos:⁽⁶⁾

Glicósidos Saponínicos: Liebermann-Burchard, Salkowski, Método de la espuma y la Prueba de hemólisis.

Glicósidos Cardiotónicos: Legal, Kedde, Keller Killiani, Liebermann- Burchard.

Glicósidos Flavonoides: Shinoda

Glicósidos Antraquinónicos: Prueba de Bornträger

Taninos: Cloruro Férrico, Subacetato de plomo, Solución de gelatina, Dicromato de potasio, Clorhidrato de quinina, Agua de bromo.

Alcaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner.

Sesquiterpenlactonas: Legal y Baljet.

4.4.3.- Cromatografía de Capa Fina (CCF)

PROCEDIMIENTO :

La cromatografía de capa fina se hace con el objetivo de comprobar con mas carácter químico fino las pruebas fitoquímicas preliminares, para evitar resultado falso-positivo, ya que la mayoría son reacciones de color o precipitación y el extracto tiene un color característico (amarillo intenso).

En placas cromatográficas con silica gel de 6.0 cm de largo por 1.0 cm de ancho se inyecta con un capilar el extracto previamente tratado (ver anexo 4), del fruto del Pacún para poder extraer las diversas sustancias, que con los diferentes reactivos reveladores se determinan. Luego de inyectar se colocan las placas en cámaras cromatográficas previamente saturadas con la fase móvil n-hexano :acetato de etilo (0.5:9.5), se desarrolla el cromatograma, las placas, se sacan de la cámara y se secan, posteriormente se rocían con reactivos reveladores para los productos específicos (ver anexo 16), se dejan secar y se observan al ultravioleta, detectándose manchas fluorescentes

coloreadas las cuales se les determina su Relación entre la distancia recorrida por los diferentes componentes de la muestra y el eluyente (R_f).

Las sustancias encontradas por cromatografía de capa fina son: Glicósidos saponínicos, taninos y antrona. Por lo que se comprueba los datos obtenidos por las pruebas de color y precipitación, exceptuando las sesquiterpenlactonas que solo se determinaron por las pruebas de color y precipitación.

4.4.4 - Ensayos Microbiológicos

4.4.4.1- Prueba de Identificación de los Microorganismos de Ensayo

-Prueba de identificación para *Staphylococcus aureus* :(ver anexo 7)

- Características Microscópicas: Utilizando el método de coloración de Gram, para observar la morfología.
- Pruebas Bioquímicas: Catalasa y coagulasa.
- Características Macroscópicas: La identificación se basa en el crecimiento que tienen los diferentes microorganismos en medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Realizar una nueva resiembra de la bacteria para evitar su muerte.

- Prueba de Identificación para *Trichophyton mentagrophytes*: (ver anexo 8)

La cepa original de *Trichophyton mentagrophytes* se resiembra en tubos de Agar Sabouraud inclinado, para obtener un mayor crecimiento. De este crecimiento se realizan las pruebas de identificación.

-Morfología Macroscópica.

-Morfología Microscópica.

-Prueba del Cebo de Pelo.

Realizar una nueva resiembra del hongo para evitar su muerte.

4.4.4.2 -Ensayos de Susceptibilidad Microbiana:

- Método de Kirby Bauer Modificado.

Este método se basa en la difusión del antimicótico desde un cilindro vertical hacia el agar solidificado en la caja de petri, en una extensión tal que el crecimiento del microorganismo es inhibido enteramente en un área circular alrededor del cilindro conteniendo la solución.

a) Preparación de la suspensión del hongo (*Trichophyton mentagrophytes*)

Usar una suspensión del hongo, comparando la turbidez de éste con un patrón nefelométrico Mac Farland, el cual se prepara: 0.1 mL de BaCl₂ 1% + 9.9 mL H₂SO₄ 1%. obteniéndose una densidad celular aproximada de 3.0×10^8 mo/mL (microorganismos/ miliLitro).

b) Siembra del Microorganismos de Prueba

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

c) Inoculación con la solución de Prueba.

Se colocan 4 cilindros de acero inoxidable en cada placa de petri, a intervalos de 90 ° entre cada uno, y se llenan con los extractos de prueba utilizando una micropipeta.

El número total de placas será de 3 replicas por cada dilución del extracto siendo un total de 46 placas.

Se utiliza como patrón de comparación solución de Ketoconazol al 1%. Llevar también un blanco que es alcohol etílico al 93% y una placa control positivo y negativo.

d) Incubación y Lectura

Se incuban las placas a temperatura ambiente por cinco días. Posteriormente se observa la formación de halos de inhibición alrededor de los cilindros, se miden con Pie de Rey los halos, determinando si es sensible o resistente.

Este procedimiento es aplicado por separado para ambos microorganismos, primero con el moho dermatofítico *Trichophyton mentagrophytes* el cual se incuba a una temperatura de 20-25 grados de 5-7 días (ver anexo11).

Después con *Staphylococcus aureus* con la variante que el medio sembrado es el Mueller-Hinton y la temperatura de incubación a 37 °C por 24 horas. Utilizando como patrón de comparación solución de yodo al 2%. (ver anexo 10).

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 - Resultados del Análisis Fitoquímico del Extracto Etanólico del Pacún.

Tabla N° 1: Pruebas Fitoquímicas Preliminares realizadas en el Extracto Etanólico de la Cáscara del Fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún).

SUSTANCIA	PRUEBA	RESULTADO
Glicósidos Saponínicos	Liebermann – Burchard	+
	Salkowski	+
	Prueba de Hemólisis	+
	Prueba de la Espuma	+
Glicósidos Flavonoides	Prueba de Shinoda	-
Glicósidos Antraquinónicos	Bornträger	-
Glicósidos Cardiotónicos	Keller Killiani	-
	Liebermann – Burchard	+
	Kedde	-
	Legal	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet	+
	Legal	+
Taninos	Tricloruro de hierro 5%	+
	Subacetato de plomo 5%	+
	Solución de gelatina 2%	+
	Dicromato de potasio 5%	+
	Sulfato de atropina 5%	+
	Agua de bromo 2%	+
Alcaloides	Dragendorff	-
	Wagner	-
	Mayer	-

+ : prueba positiva

- : prueba negativa

Para los Glicósidos Saponínicos : Las pruebas químicas de Salkowski y Liebermann – Burchard se obtuvo un resultado positivo, ambas pruebas identifican la porción esteroidal que poseen las saponinas, otras de las pruebas realizadas fueron la del índice de la espuma y la prueba de hemólisis las cuales resultaron positivas, indicando así que el extracto etanólico de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún) se encuentra presentes sustancias como saponinas.

Para Glicósidos Cardiotónicos las pruebas de Keller Killiani y Kedde resultaron negativas, pero la prueba de Liebermann – Burchard así como la de Legal resultaron positivas debido a que sustancias como saponinas presentan esqueleto esteroidal y la prueba de Legal indica la presencia de sesquiterpenlactonas por ser una prueba específica para este tipo de sustancias, por lo que las prueba específicas para Glicósidos Cardiotónicos (Keller Killiani y Kedde), resultaron negativas lo que indica que el extracto etanólico de especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún) no posee sustancias como Glicósidos Cardiotónicos.

Para sesquiterpenlactonas las pruebas de Baljet y Legal resultaron positivas indicando así la presencia de estas sustancias en el extracto etanólico de la especie vegetal.

La prueba de Bornträger que es específica para Glicósidos Antraquinónicos resulto negativa indicando así la ausencia de estas sustancias en el extracto etanólico de la especie vegetal.

Para Alcaloides se realizaron las pruebas con los reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer, las cuales resultaron negativas indicando que en el extracto etanólico de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún), no se encuentran presentes este tipo de sustancias.

Para Flavonoides se realizó la reacción de Shinoda siendo esta la prueba específica característica más usual para este tipo de sustancias, resultando negativa, indicando la ausencia de estas en el extracto etanólico de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún).

En la determinación de Taninos en todas las pruebas se obtuvo los resultados esperados ya sea de precipitación o de coloración indicando la presencia de este tipo de sustancias en el extracto etanólico de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún).

5.2 – Resultados de la Cromatografía de Capa Fina realizadas al Extracto Etanólico de la Cáscara del Fruto *Sapindus saponaria* (Pacún).

Tabla N° 2 : Capa Cloroformo–Metanol. Sesquiterpenlactonas (ver anexo 4).

Reactivo revelador	Sustancia detectada	Número de componentes	R _f	Observación
Liebermann-burchard	Esteroles, esteroides, glicósidos triterpénicos	2	C ₁ = 0.16 C ₂ = 0.33	Manchas fluorescentes a la luz U.V –Onda larga (365 nm)
Anisaldehído-ácido sulfúrico	Azúcares, esteroides, terpenos	3	C ₁ = 0.16 C ₂ = 0.25 C ₃ = 0.42	Colores violeta a la luz U.V –Onda larga (365 nm)
Acetato de plomo	Flavonoides	0	–	–
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	0	–	–
Cloruro de hierro III	Compuestos fenólicos	3	C ₁ = 0.2 C ₂ = 0.46 C ₃ = 0.73	Coloración verde al U.V
Dragendorff	Alcaloides	0	–	–
Ácido sulfúrico – vainillina	Fenoles y esteroides	3	C ₁ = 0.16 C ₂ = 0.25 C ₃ = 0.42	Coloración violeta intensa.
Bornträger	Cumarinas (azul), antrona (amarilla) antraquinona (rojo)	3	C ₁ = 0.83 C ₂ = 0.28 C ₃ = 0.38	Coloración amarilla, visto al U.V – Onda larga (365nm)
Anisaldehído-ácido sulfúrico	Glicósidos saponínicos	4	C ₁ = 0.16 C ₂ = 0.28 C ₃ = 0.42 C ₄ = 0.63	Fluorescencia al U.V Onda larga (365nm)

C₁: componente 1

C₃: componente 3

C₂: componente 2

C₄: Componente 4

Tabla N° 3 : Capa Clorofórmica. Alcaloides. (ver anexo 4)

Reactivo revelador	Sustancia detectada	Número de componentes	R _f	Observación
Liebermann-burchard	Esteroles, esteroides, glicósidos triterpénicos	1	C ₁ = 0.71	Manchas fluorescentes a la luz U.V –Onda larga (365 nm)
Anisaldehido-ácido sulfúrico	Azúcares, esteroides, terpenos	0	–	–
Acetato de plomo	Flavonoides	0	–	–
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	0	–	–
Cloruro de hierro III	Compuestos fenólicos	2	C ₁ = 0.16 C ₂ = 0.60	Coloración verde al U.V
Dragendorff	Alcaloides	0	–	–
Ácido sulfúrico – vainillina	Fenoles y esteroides	0	–	–
Bornträger	Cumarinas (azul), antrona (amarilla) antraquinona (rojo)	1	C ₁ = 0.76	Coloración amarilla, visto al U.V –Onda larga (365nm)
Anisaldehido-ácido sulfúrico	Glicósidos saponínicos	0	–	–

C₁: componente 1

C₂: componente 2

Tabla N° 4 : Capa Etérea. Esteroides. (ver anexo 4)

Reactivo revelador	Sustancia detectada	Número de componentes	R _f	Observación
Liebermann-burchard	Esteroles, esteroides, glicósidos triterpénicos	4	C ₁ = 0.2 C ₂ = 0.43 C ₃ = 0.65 C ₄ = 0.76	Manchas fluorescentes a la luz U.V –Onda larga (365 nm)
Anisaldehído-ácido sulfúrico	Azúcares, esteroides, terpenos	2	C ₁ = 0.12 C ₂ = 0.68	Colores violeta a la luz U.V –Onda larga (365 nm)
Acetato de plomo	Flavonoides	0	–	–
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	0	–	–
Cloruro de hierro III	Compuestos fenólicos	0	–	–
Dragendorff	Alcaloides	0	–	–
Ácido sulfúrico-vainillina	Fenoles y esteroides	3	C ₁ = 0.12 C ₂ = 0.22 C ₃ = 0.32	Coloración violeta
Bornträger	Cumarinas (azul), antrona (amarilla) antraquinona (rojo)	2	C ₁ = 0.38 C ₂ = 0.70	Coloración amarilla, visto al U.V –Onda larga (365nm)
Anisaldehído-ácido sulfúrico	Glicósidos saponínicos	4	C ₁ = 0.2 C ₂ = 0.35 C ₃ = 0.58 C ₄ = 0.68	Fluorescencia al U.V Onda larga (365nm)

C₁: componente 1C₃: componente 3C₂: componente 2C₄: componente 4

Tabla N° 5 : Capa Cloroformo–Metanol. Glicósidos Cardiotónicos.

Reactivo revelador	Sustancia detectada	Número de componentes	R _f	Observación
Liebermann-burchard	Esteroles, esteroides, glicósidos triterpénicos	1	C ₁ = 0.12	Manchas fluorescentes a la luz U.V – Onda larga (365 nm)
Anisaldehido –ácido sulfúrico	Azúcares, esteroides, terpenos	1	C ₁ = 0.75	Colores violeta a la luz U.V –Onda larga (365 nm)
Acetato de plomo	Flavonoides	0	–	–
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	0	–	–
Cloruro de hierro III	Compuestos fenólicos	3	C ₁ = 0.28 C ₂ = 0.53 C ₃ = 0.77	Coloración verde al U.V
Dragendorff	Alcaloides	0	–	–
Ácido sulfúrico – vainillina	Fenoles y esteroides	0	–	Coloración violeta
Bornträger	Cumarinas (azul), antrona (amarilla) antraquinona (rojo)	1	C ₁ = 0.8	Coloración amarilla, visto al U.V – Onda larga (365nm)
Anisaldehido –ácido sulfúrico	Glicósidos saponínicos	1	C ₁ = 0.70	Fluorescencia al U.V onda larga (365nm)

C₁: componente 1C₃: componente 3C₂: componente 2

Tabla N° 6 : Capa Etanol : Agua. Taninos y Saponinas.

Reactivo revelador	Sustancia detectada	Número de componentes	R _f	Observación
Liebermann-burchard	Esteroles, esteroides, glicósidos triterpénicos	3	C ₁ = 0.38 C ₂ = 0.70 C ₃ = 0.87	Manchas fluorescentes a la luz U.V –Onda Larga (365nm)
Anisaldehido –ácido sulfúrico	Azúcares, esteroides, terpenos	1	C ₁ = 0.78	Colores violeta a la luz U.V –Onda larga (365 nm)
Acetato de plomo	Flavonoides	0	–	–
Kedde	Glicósidos cardiotónicos	0	–	–
Cloruro de hierro III	Compuestos fenólicos	3	C ₁ = 0.53 C ₂ = 0.62 C ₃ = 0.77	coloración verde al U.V
Dragendorff	Alcaloides	0	–	–
Ácido sulfúrico – vainillina	Fenoles y esteroides	1	C ₁ = 0.83	Coloración violeta
Bornträger	Cumarinas (azul), antrona (amarilla) antraquinona (rojo)	1	C ₁ = 0.82	Coloración amarilla, visto al U.V –Onda larga (365nm)
Anisaldehido –ácido sulfúrico	Glicósidos saponínicos	1	C ₁ = 0.80	Fluorescencia al U.V onda larga (365nm)

C₁: componente 1C₃: componente 3C₂: componente 2

La cromatografía de capa fina se hace con el objetivo de comprobar las pruebas fitoquímicas preliminares para evitar resultado falso-positivo, ya que la mayoría son reacciones de color o precipitación y el extracto tiene un color característico (amarillo intenso).

El análisis de cromatografía en capa fina muestra los resultados esperados debido a que se confirma la presencia de las sustancias encontradas en las pruebas fitoquímicas preliminares como lo son: Glicósidos Saponínicos, Sesquiterpenlactonas y Taninos; ya que las manchas encontradas por este método corresponden a este tipo de sustancias.

5.3 – Determinación de las concentraciones de los diferentes extractos (seco y no seco) por el método Gravimétrico.

Procedimiento :

Este método se basa en diferencias de pesos en el cual se utiliza una cápsula, la cual se pesa obteniendo un primer peso, se agrega cierta cantidad de extracto y se pesa teniendo así un segundo peso, luego se somete a temperatura controlada en estufa hasta eliminar toda humedad del extracto, se pesa este teniendo un tercer peso, teniendo así los pesos. Por la fórmula siguiente se determina la concentración a la cual está la muestra.

$$[\text{conc}] = \frac{\text{peso de la cápsula con muestra desecada} - \text{peso de la cápsula vacía}}{\text{peso de la cápsula con muestra sin secar} - \text{peso de la cápsula vacía}} \times 100$$

RESULTADOS :

Muestra sin secar :

DATOS :

1. peso de la cápsula vacía = 74.6877 g
2. peso de cápsula + Mx (5mL de extracto) = 79.6051g
3. peso de cápsula + Mx desecada = 76.9431 g

por lo tanto :

$$[\text{conc}] = \frac{\text{peso de la cápsula con muestra desecada} - \text{peso de la cápsula vacía}}{\text{peso de la cápsula con muestra sin secar} - \text{peso de la cápsula vacía}} \times 100$$

$$[\text{conc}] = \frac{76.9431 - 74.6877}{79.6051 - 74.6877} \times 100$$

$$[\text{conc}] = \frac{2.2554 \text{ g}}{4.9174 \text{ g}} \times 100$$

[conc] de solución madre = 45.8657 %

Expresada en gramos por miliLitro de Extracto :

$$[\text{conc}] = \frac{2.2554 \text{ g}}{5.0 \text{ mL}} = 0.45108 \text{ g/mL}$$

Se obtuvo 415 mL de extracto de 700 g de cáscara del fruto (sin secar) de

Pacún por lo que :

$$\begin{array}{r} 0.45108 \text{ g} \text{ _____ } 1 \text{ mL} \\ X \text{ _____ } 415 \text{ mL} \\ X = 187.1982 \text{ g} \end{array}$$

Por lo que :

$$\begin{array}{r} 0.45108 \text{ g} \text{ _____ } 1 \text{ mL} \\ X \text{ _____ } 100 \text{ mL} \\ X = 45.108 \% \text{ P / V} \end{array}$$

RENDIMIENTO (R) :

$$R = \frac{187.1982 \text{ g}}{700 \text{ g}} \times 100\%$$

$$R = 26.7426 \%$$

A partir de la concentración madre se realizaron las siguientes diluciones :

NOTA: A la solución madre se le subió la concentración ya que la de 45.8657% resultaba muy baja, por medio del rotavapor (Flash Evaporator) y aplicando el método gravimétrico se llegó a la siguiente concentración 73.704 % P/V, de esta se partió para hacer las diferentes diluciones:

-EXTRACTO AL 60% :

Datos :

$C_1 = 73.704 \%$ (concentración de la solución Madre)

$V_1 = X$ (volumen de solución madre necesario)

$C_2 = 60 \%$ (concentración deseada)

$V_2 = 50 \text{ mL}$ (volumen deseado)

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

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

$$V_1 = \frac{(60\%)(50 \text{ mL})}{(73.704\%)} = 40.70 \text{ mL} \quad \text{de solución madre}$$

-EXTRACTO AL 50% :

Datos :

$C_1 = 73.704 \%$ (concentración de la solución Madre)

$V_1 = X$ (volumen de solución madre necesario)

$C_2 = 50\%$ (concentración deseada)

$V_2 = 50 \text{ mL}$ (volumen deseado)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(50\%)(50 \text{ mL})}{(73.704\%)} = 33.9 \text{ mL} \quad \text{de solución madre}$$

-EXTRACTO AL 45 %

Datos :

$C_1 = 73.704 \%$ (concentración de la solución Madre)

$V_1 = X$ (volumen de solución madre necesario)

$C_2 = 45\%$ (concentración deseada)

$V_2 = 50 \text{ mL}$ (volumen deseado)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(45\%)(50 \text{ mL})}{(73.704\%)} = 30.5 \text{ mL} \quad \text{de solución madre}$$

-EXTRACTO AL 30 %

Datos :

$C_1 = 73.704 \%$ (concentración de la solución Madre)

$V_1 = X$ (volumen de solución madre necesario)

$C_2 = 30\%$ (concentración deseada)

$V_2 = 50 \text{ mL}$ (volumen deseado)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(30\%)(50 \text{ mL})}{(73.704\%)} = 20.35 \text{ mL} \quad \text{de solución madre}$$

-EXTRACTO AL 15%

Datos :

$C_1 = 73.704 \%$ (concentración de la solución Madre)

$V_1 = X$ (volumen de solución madre necesario)

$C_2 = 15\%$ (concentración deseada)

$V_2 = 50 \text{ mL}$ (volumen deseado)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(15\%)(50 \text{ mL})}{(73.704\%)} = 10.17 \text{ mL} \quad \text{de solución madre}$$

-EXTRACTO AL 7.5%

Datos :

$C_1 = 73.704 \%$ (concentración de la solución Madre)

$V_1 = X$ (volumen de solución madre necesario)

$C_2 = 7.5\%$ (concentración deseada)

$V_2 = 50 \text{ mL}$ (volumen deseado)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(7.5\%)(50 \text{ mL})}{(73.704\%)} = 5.0 \text{ mL de solución madre}$$

NOTA: Todos los volúmenes uno (V_1), son la cantidad de solución madre necesaria para tener las diferentes concentraciones, estos se llevan a un balón de 50 mL y se aforan con etanol al 93 %.

Muestra secada en estufa a 60 °C

DATOS :

1. peso de la cápsula vacía = 74.6850 g
2. peso de cápsula + Mx (5mL de extracto) = 80.2025g
3. peso de cápsula + Mx desecada = 77.7718 g

por lo tanto :

$$[\text{conc}] = \frac{\text{peso de la cápsula con muestra desecada} - \text{peso de la cápsula vacía}}{\text{peso de la cápsula con muestra sin secar} - \text{peso de la cápsula vacía}} \times 100$$

$$[\text{conc}] = \frac{77.7718 - 74.6850}{80.2025 - 74.6850} \times 100\%$$

$$[\text{conc}] = \frac{3.0868 \text{ g}}{5.5172 \text{ g}} \times 100\%$$

[conc] de solución madre = 55.9456 %

Expresada en gramos por mililitro :

$$[\text{conc}] = \frac{3.08684 \text{ g}}{5.0 \text{ mL}} = 0.6173 \text{ g/mL}$$

Se obtuvo 325 mL de extracto de 700 g de cáscara del fruto (secado en estufa a 60 ° C) de Pacún por lo que :

$$\begin{array}{l} 0.6173 \text{ g} \text{ _____ } 1 \text{ mL} \\ X \text{ _____ } 325 \text{ mL} \\ X = 200.6225 \text{ g} \end{array}$$

Por lo que :

$$\begin{array}{l} 0.6173 \text{ g} \text{ _____ } 1 \text{ mL} \\ X \text{ _____ } 100 \text{ mL} \\ X = 61.73 \% \text{ P / V} \end{array}$$

RENDIMIENTO (R) :

$$R = \frac{200.6225 \text{ g}}{700 \text{ g}} \times 100\%$$

$$R = 28.66 \%$$

A partir de la concentración madre = 61.73 % P/V se realizaron las siguientes diluciones:

-EXTRACTO AL 55% :

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Datos :

$C_1 = 61.73\%$ (concentración de la solución Madre)

$V_1 = X$ (volumen de solución madre necesario)

$C_2 = 55\%$ (concentración deseada)

$V_2 = 50$ mL (volumen deseado)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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

$$V_1 = \frac{(55\%)(50\text{mL})}{(61.73\%)} = 4.5 \text{ mL de solución madre}$$

De la misma manera se prepararon concentraciones al 50 %, 40%, 30%, 15% y al 7.5% , llevándolas a los volúmenes deseados y aforando con etanol al 93 %.

5.4 Resultados de la Evaluación Microbiológica.

5.4.1 Pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Tabla N° 7 : Morfología Macroscópica y Microscópica (ver anexo 7,8)

PRUEBA	RESULTADO
Morfología Macroscópica	<p><i>Staphylococcus aureus</i> : En agar Bair-Parker colonias color negro, lustroso redondo de borde convexo.</p> <p><i>Trichophyton mentagrophytes</i>: En agar sabouraud colonias vellosas o granulares. Color blanco a rosado, ocasionalmente con bordes amarillos, algunas cepas producen pigmentación rojo marrón.</p>
Morfología Microscópica	<p><i>Staphylococcus aureus</i>: Por la coloración al Gram se observa bacterias en forma de cocos, unidos en racimos Gram positivo.</p> <p><i>Trichophyton mentagrophytes</i>: Tinción con Lactofenol azul de algodón microconodias en abundancia.</p>

Tabla N° 8 : Pruebas Bioquímicas (ver anexo 7,8)

Microorganismo	Prueba	Resultado
<i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa: Identifica la enzima catalasa que descompone el H ₂ O ₂ por lo que se produce un burbujeo intenso con el H ₂ O ₂ al 30%.	POSITIVO
	Coagulasa: Evidencia la reacción de coagulación del plasma sanguíneo que produce la enzima.	POSITIVO

Las pruebas de identificación realizadas resultan positivas. En base a la morfología colonial, la tinción con lactofenol azul de algodón (características microscópicas) y la prueba de carnada de pelo se puede comprobar la identificación de *Trichophyton mentagrophytes*. Al igual que las pruebas realizadas al *Staphylococcus aureus*. La morfología macroscópica observada en los medios de cultivo selectivos y diferenciales, morfología microscópica y pruebas bioquímicas. No se detecta la presencia de ningún otro microorganismo durante las pruebas por lo que se afirma que la cepas analizadas son puras, no presenta contaminación de ningún tipo.

5.4.2 – Resultado de la Evaluación Microbiológica, Método de Kirby Bauer.

El parámetro de los halos de inhibición son: Halos menores de 12 mm resistentes, halos mayores de 12 mm sensibles.⁽²⁰⁾

Tabla N° 9 : Resultados de la Evaluación Microbiológica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto (no seco) del Pacún por el método de Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus* :

Concentración del Extracto	Lectura de las placas
Extracto al 73.7 %	Formación de halos entre 29 y 31mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 60 %	Formación de halos entre 28 y 29mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 50 %	Formación de halos entre 23 y 25mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 45 %	Formación de halos entre 20 y 22mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 30 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Extracto al 15 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Extracto al 7.5 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Patrón : yodo al 2 %	Inhibición en toda la placa MO sensible

Tabla N° 9 continuación.

Blanco : Alcohol etílico al 93 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Placa control positivo	Crecimiento total en toda la placa
Placa control negativo	No hay crecimiento en la placa

MO: Microorganismo

En la evaluación microbiológica se observa que la bacteria es sensible en las diluciones preparadas del extracto etanólico de 73.7%, 60.0%, 50.0% y 45.0% ya que se observa la formación de halos definidos con el tamaño requerido para afirmar que la bacteria es sensible a estas concentraciones, no así en las concentraciones de 30.0%, 15.0% y 7.5% ya que se observa resistencia por parte de la bacteria ya que esta crece en toda la placa y no hubo formación de ningún halo de inhibición.

Tabla N° 10 : Resultados de la Evaluación Microbiológica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto (secado en estufa) del Pacún
Método de Kirby Bauer Modificado en *Staphilococcus aureus*

Concentración del Extracto	Lectura de las placas
Extracto al 61.73 %	Formación de halos entre 29 y 30mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 55 %	Formación de halos entre 27 y 29mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 50 %	Formación de halos entre 24 y 26mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 40 %	Formación de halos entre 15 y 17mm de diámetro MO sensible.
Extracto al 30 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Extracto al 15 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Extracto al 7.5 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Patrón : Yodo al 2 %	Inhibición en toda la placa MO sensible
Blanco : Alcohol etílico al 93 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO resistente
Placa control positivo	Crecimiento total en toda la placa
Placa control negativo	No hay crecimiento en la placa

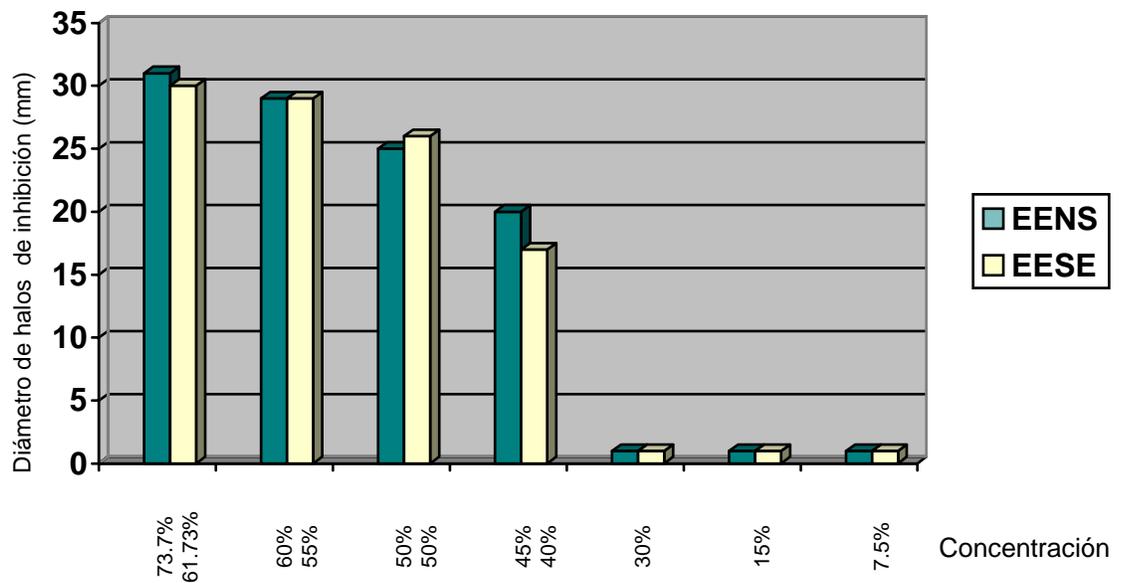
En la evaluación microbiológica de los extractos de la cáscara del fruto secado en estufa se observa que la bacteria es sensible en las diluciones preparadas del extracto etanólico de 61.73%, 55%, 50% y 40% ya que se observa la formación de halos definidos con el tamaño requerido para afirmar que la bacteria es sensible a estas concentraciones, no así en las concentraciones del 30%, 15% y 7.5% ya que se observa resistencia por parte de la bacteria debido a que esta crece en toda la placa y no hubo formación de ningún halo de inhibición.

Otro aspecto ha considerar es que se lleva al mismo tiempo una placa control positivo y negativo, un blanco que es etanol al 93 %, una placa patrón la cual es solución de yodo al 2%.

En el control positivo crece por completo la bacteria en 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.

El blanco se hace con el objetivo de asegurar que no es el alcohol al 93 % el que ejerce el efecto inhibitorio en la bacteria; se observa un crecimiento de la bacteria en toda la placa.

El patrón se hace con el objetivo de compararlo con la solución en prueba; se observa una inhibición total de la bacteria en toda la placa.



EESE: Extracto Etanólico Secado en Estufa

EENS: Extracto Etanólico No Seco

Figura N° 2. Comparación del Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de la cáscara del Fruto del Pacún (No Seco y del Secado en Estufa) en el *Staphylococcus aureus* por el método de Kirby Bauer Modificado.

Tabla N° 11: Resultados de la Evaluación Antifúngica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto (no seco) del Pacún
Método de Kirby Bauer Modificado en *Trichophyton mentagrophytes*

Concentración del Extracto	Lectura de las placas
Extracto al 73.7 %	No hay formación de halos definidos pero hay una inhibición del crecimiento en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 60 %	No hay Formación de halos definidos pero hay inhibición en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 50 %	No hay Formación de halos definidos pero hay inhibición del crecimiento en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 45 %	No hay formación de halos definidos; no hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa, hay contaminación por otros hongos. MO Resistente
Extracto al 30 %	No hay formación de halos definidos; no hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente

Tabla N° 11 continuación.

Extracto al 15 %	No hay formación de halos definidos; no hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa, hay contaminación por otros hongos. MO Resistente
Extracto al 7.5 %	No hay formación de halos definidos; no hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa, hay contaminación por otros hongos. MO Resistente
Patrón : Ketoconazol 1 %	Inhibición en toda la placa. MO Sensible
Blanco: Alcohol etílico al 93 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO Resistente
Placa control positivo	Crecimiento total en toda la placa
Placa control negativo	No hay crecimiento en la placa

MO: Microorganismo

En la evaluación antifúngica no se observa la formación de halos de inhibición pero el hongo crece muy escasamente en forma de colonias aisladas por lo que se considera sensible en las concentraciones de: 73.7%, 60.0% y 50.0%; en las concentraciones de 45 %, 30.0%, 15.0 % y 7.5% existe crecimiento en toda la placa por lo que se considera que el hongo es resistente a estas concentraciones.

Tabla N° 12 Resultados de la Evaluación Antifúngica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto (secado en estufa) del Pacún
Método de Kirby Bauer Modificado en *Trichophyton mentagrophytes*

Concentración del Extracto	Lectura de las placas
Extracto al 61.73 %	No hay formación de halos definidos pero hay una total inhibición del crecimiento en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 55 %	No hay Formación de halos definidos pero hay inhibición total en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 50 %	No hay Formación de halos definidos pero hay inhibición total del crecimiento en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 40 %	No hay formación de halos definidos; no hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa, hay contaminación por otros hongos. MO Resistente
Extracto al 30 %	No hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente

Tabla N°12 continuación :

Extracto al 15 %	No hay formación de halos definidos; no hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa, hay contaminación por otros hongos. MO Resistente
Extracto al 7.5 %	No hay formación de halos definidos; no hay inhibición del hongo, se observa crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa, hay contaminación por otros hongos. MO Resistente
Patrón: Ketoconazol 1 %	Inhibición en toda la placa. MO Sensible
Blanco: Alcohol etílico al 93 %	No hay formación de halos, crecimiento en toda la placa MO Resistente
Placa control positivo	Crecimiento total en toda la placa
Placa control negativo	No hay crecimiento en la placa

MO: microorganismo.

En la evaluación antifúngica de los extractos etanólicos de la cáscara del fruto secado en estufa no se observa la formación de halos de inhibición pero el hongo crece muy escasamente en forma de colonias aisladas por lo que se considera sensible en las concentraciones de: 61.73%, 55.0% y 50.0%; en las concentraciones de 40 %, 30.0%, 15.0 % y 7.5% hay crecimiento en toda la placa por lo que se considera que el hongo es resistente a estas concentraciones.

Tabla N° 13 Resultados de la Evaluación Antifúngica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto (no seco) del Pacún. Método de Placa Vertida en *Trichophyton mentagrophytes* :

Concentración del Extracto	Lectura de las placas
Extracto al 73.7 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 60 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 50 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 45 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 30 %	hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente
Extracto al 15 %	hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente

Tabla N° 13 continuación :

Extracto al 7.5 %	Se observó crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente
Patrón : Ketoconazol 1 %	Inhibición en toda la placa. MO Sensible
Blanco : Alcohol etílico al 93 %	Crecimiento en toda la placa MO Resistente
Placa control positivo	Crecimiento en toda la placa
Placa control negativo	No hubo crecimiento en la placa

MO: Microorganismo

En la evaluación antifúngica por el método de Placa Vertida se observa una mayor inhibición del hongo comparado con el método de Kirby Bauer Modificado ya que en las concentraciones de: 73.7%, 60.0% y 50.0% y 45.0% existe una total inhibición del hongo, es decir no hay crecimiento de este en todas las placas, no así en las concentraciones de 30.0%, 15.0 % y 7.5% ya que se observa un crecimiento en toda la placa por lo que se considera que el hongo es resistente a estas concentraciones.

Tabla N° 14 Resultados de la Evaluación Antifúngica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto (secado en estufa) del Pacún
Método de Placa Vertida en *Trichophyton mentagrophytes*

Concentración del Extracto	Lectura de las placas
Extracto al 61.73 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 55 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 50 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 40 %	Inhibición total, no hubo crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Sensible
Extracto al 30 %	Se observó crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente
Extracto al 15 %	Se observó crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente

Tabla N° 14 continuación.

Extracto al 7.5 %	Se observó crecimiento de <i>T. mentagrophytes</i> en toda la placa. MO Resistente
Patrón : Ketoconazol 1 %	Inhibición en toda la placa. MO Sensible
Blanco : Alcohol etílico al 93 %	Crecimiento en toda la placa MO Resistente
Placa control positivo	Crecimiento en toda la placa
Placa control negativo	No hay crecimiento en la placa

MO: microorganismo.

En la evaluación antifúngica por el método de Placa Vertida de los extractos de la cáscara del fruto secado en estufa se observa una mayor inhibición del hongo comparado con el método de Kirby Bauer Modificado debido a que en las concentraciones de: 61.73%, 55.0% y 50.0% y 40.0% existe una total inhibición del hongo, es decir no hay crecimiento de este en todas las placas, no así en las concentraciones de 30.0%, 15.0 % y 7.5% ya que se observa un crecimiento en toda la placa por lo que se considera que el hongo es resistente a estas concentraciones.

Al igual que en la evaluación microbiológica se lleva al mismo tiempo una placa control positivo y negativo, un blanco que es etanol al 93 %, una placa patrón que es con solución de Ketoconazol al 1 %.

En el control positivo crece por completo el hongo en toda la placa, no así en el control negativo, este sirve para asegurar que no exista ningún tipo de contaminación por parte de otros hongos.

El blanco se hace con el objetivo de asegurar que no es el alcohol al 93 % el que ejerce el efecto inhibitorio en el hongo; se observó un crecimiento del hongo en toda la placa.

El patrón se hace con el objetivo de compararlo con la solución en prueba, se observa una inhibición del hongo en toda la placa.

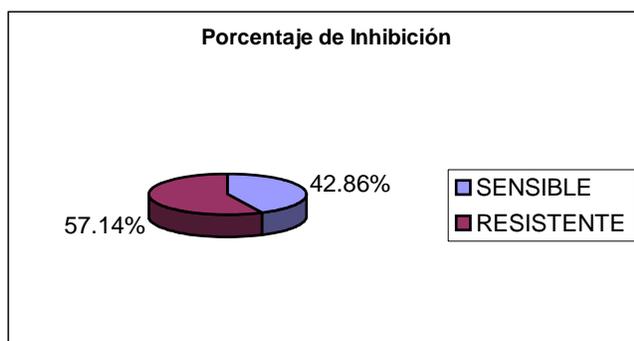


Figura N° 3. Porcentaje de Inhibición del Extracto Etanólico del Fruto seco y no seco por el método de Kirby Bauer Modificado en *Trichophyton mentagrophytes*

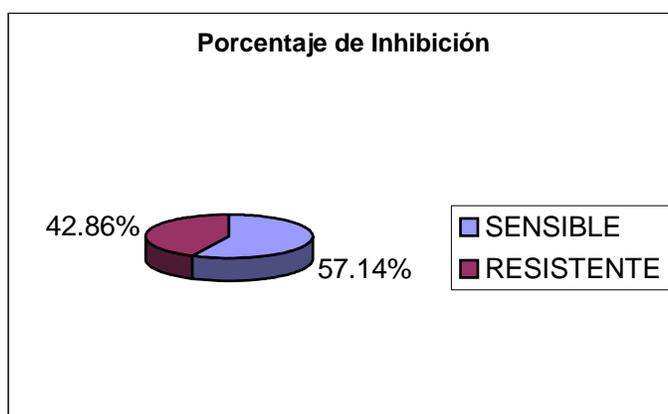


Figura N° 4. Porcentaje de Inhibición del Extracto Etanólico del Fruto seco y no seco por el método de Placa Vertida en el *Trichophyton mentagrophytes*

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo a los análisis fitoquímicos preliminares de color y precipitación realizados a los extractos etanólicos de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún), se determina la presencia de: Glicósidos Saponínicos, Sesquiterpenlactonas y Taninos. Los cuales fueron confirmados por cromatografía en capa fina.
2. En la evaluación microbiológica de los diferentes extractos etanólicos de la cáscara del fruto (no seco) del Pacún en el *Staphylococcus aureus* este resulta sensible a partir de la concentración de 45 % (ver tabla N°9) obteniéndose mayores halos de inhibición a una concentración de 73.7 % siendo ésta la más efectiva por encontrarse en mayor cantidad los principios activos.
3. El extracto de la cáscara del fruto secado en estufa del Pacún resulta más efectivo que el de la cáscara del fruto no seco, ya que el secado inhibe hasta la concentración de 40.0% en cambio la no seco inhibe hasta el 45.0% para el *Staphylococcus aureus*.(ver tabla N°9 y N°10).
4. Se obtiene un mayor rendimiento del extracto etanólico del fruto previamente secado en estufa.
5. El efecto antimicrobiano del extracto del Pacún posiblemente es a que contiene Saponinas, Sesquiterpenlactonas y Taninos, estas sustancias ejercen un sinergismo para poder llevar a cabo dicho efecto.

6. El *Staphylococcus aureus* resulta resistente frente al blanco lo que indica que el efecto antimicrobiano es debido a las sustancias extraídas del Pacún y no al alcohol etílico 93 %.
7. En la Evaluación Antifúngica de los diferentes extractos de la cáscara del fruto del Pacún en *Trichophyton mentagrophytes* el secado en estufa da mejores resultados que el no seco, debido a que se encuentra en mayor cantidad las sustancias activas ya que con el proceso de secado se elimina la humedad.
8. En la evaluación antifúngica el método de Placa Vertida es mas eficiente que el Kirby Bauer Modificado ya que inhibe por completo al hongo, debido a que el extracto entra en contacto directo con el *Trichophyton mentagrophytes*, mientras que en el Kirby Bauer Modificado se tiene que esperar a que el extracto difunda desde los cilindros.
9. Los extractos etanólicos del Pacún a una concentración 73.7 %, 61.73 % se asemejan con el patrón de comparación (Ketoconazol 1%) en la inhibición del hongo por el método de Placa Vertida, ya que el hongo es inhibido en su totalidad a estas concentraciones.
10. El efecto inhibitorio del *Trichophyton mentagrophytes* es debido a las sustancias que se encuentran presentes en el extracto del Pacún y no al alcohol, ya que en el blanco hubo crecimiento del hongo en toda la placa.
11. Los datos obtenidos en la investigación permiten hacer una contribución en el área de la Salud Pública, específicamente en Atención Primaria en

Salud, debido a que se pueden fabricar preparaciones farmacéuticas a partir del *Sapindus saponaria* (Pacún), dando así una alternativa a la población, para el tratamiento de patologías causadas por los microorganismos que se han estudiado.

12. A través de los resultados obtenidos se confirma la hipótesis positiva planteada en el diseño metodológico ya que el extracto etanólico de las cáscaras del fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún) posee actividad antimicrobiana y antifúngica en las concentraciones del 73.7%, 60.0%, 50.0%, 45% (no seco) y 61.73%, 55%, 50%, 40% el secado en estufa para la bacteria, con respecto al hongo es sensible a las concentraciones de 73.7%,60.0%, 50.0%, (no seco) y 61.73%, 55%, 50%, el secado en estufa por el método Kirby Bauer Modificado.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Se deben realizar investigaciones Fármaco-Toxicológicas así como también análisis cuantitativos y cualitativos del extracto etanólico de la cáscara del fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún), para poder formular un producto farmacéutico de buena calidad que brinde beneficios a la población.
2. Fomentar el cultivo de esta especie vegetal debido a que esta posee un gran potencial agroindustrial y es fuente de compuestos químicos que puedan ser materia prima en la elaboración de nuevos productos farmacéuticos.
3. Para la obtención de materia prima de buena calidad se deben considerar factores como la recolección, conservación y almacenamiento de la especie vegetal *Sapindus saponaria* (Pacún).
4. Ampliar la investigación del extracto etanólico de las cáscaras del fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún) sobre otros microorganismos de interés clínico y así poder ampliar su utilización para diferentes afecciones.
5. Extraer con otros solventes como cloroformo, diclorometano, N-butanol, acetato de etilo ya que muchos principios activos de las plantas se extraen mejor con este tipo de solventes debido a la polaridad que poseen.

6. Es necesario la investigación de nuevas propiedades del extracto etanólico de las cáscaras del fruto del *Sapindus saponaria* (Pacún), debido a que se encontraron importantes sustancias: Saponinas, Sesquiterpenlactonas y Taninos.
7. Para próximas investigaciones es necesario separar y purificar los componentes del extracto que proporcionan la actividad antimicrobiana y antifúngica, además de caracterizar la estructura de los compuestos activos mediante técnicas espectrofotométricas.
8. En investigaciones posteriores se deberán hacer algunas modificaciones en los extractos etanólicos del Pacún, como lo es la viscosidad para que pueda difundir sin ninguna dificultad desde los cilindros hacia las placas, pudiendo evitar así los inconvenientes que se presentaron en la investigación.
9. Para investigaciones futuras que se trabajen con cepas de hongos es recomendable la utilización del Método de Placa Vertida en lugar del Kirby Bauer Modificado, debido a que el crecimiento del hongo no es homogéneo y dificulta la determinación de los halos de inhibición.
10. Es preferible para una evaluación antimicrobiana y antifúngica utilizar el Método de Placa Vertida ya que el extracto entra en contacto directamente con los microorganismos en prueba, en cambio el Kirby Bauer Modificado es de esperar que difunda desde los cilindros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado Ramírez, R.E.2003.Investigación de la Actividad Antimicrobiana de 25 extractos de especies Vegetales Utilizadas por la población Materno Infantil. Trabajo de Graduación. Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 97 p.
2. Beatty ,W.K.1993. “Diccionario de Ciencias Médicas” 25^a ed. Buenos Aires . Editorial Médica Panamericana p. 69, 163, 165, 437.
3. Calderón S. Flora Salvadoreña.1941. Lista preliminar de Plantas de El Salvador. 2 Edición. Imprenta Nacional. p. 178. 450 p.
4. Domínguez, X.A. 1963 “Métodos de Investigación Fitoquímica” . primera Edición. Editorial Limusa. México D.F. p. 84 – 100.
5. Evans, W. C. Trease, G. E. 1991. Farmacognosia.13 Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. p. 519-540. 901 p.
6. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Farmacognosia. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Sección de Investigación Aplicada y Tesis Profesional Universidad de El Salvador. 2004.
7. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Microbiología y parasitología. Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental. Universidad de El Salvador. 2003.

8. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada III. Departamento de Bioquímica y Contaminación Ambiental. Universidad de El Salvador. 2003.
9. Guzmán, D. J. 1975. Especies Útiles de la Flora Salvadoreña Médico Industrial. Ministerio de Educación. Impreso en los talleres de la Dirección de Publicaciones. San Salvador. p. 167-168.
10. Jawets. E.; Melnick, J. L. Alderberg, E. 1992. Microbiología Médica. 14 Edición. Editorial el Manual Moderno. México DF. p. 243. 368 p.
11. Koneman, E. W. 1997. Diagnóstico Microbiológico. 3 Edición. Editorial Médica Panamericana. México D. F. p.582-587, 612-613. 909 p.
12. Lock de Ugaz, Olga. Investigación Fitoquímica. Segunda Edición. Pontificia Universidad Católica de Perú. Fondo Editorial. P.6-7, 255-267.
13. Martínez Grau, M. A. Técnicas experimentales en Síntesis Orgánicas. Editorial Sítesis. S. A. España P. 168 – 174.
14. Martínez Guerrero, R E. Quinteros Pérez, M. T. 2003. Comprobación de La Actividad Antimicótica in Vitro de Una Tintura Elaborada con Oleorresina de Eucalipto. Trabajo de Graduación. Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.45 p.
15. Martínez, M. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Editorial Fondo de Cultura Económico. México. p. 483.
16. Merck.1994. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt. Alemania. P. 144, 74, 127. 807 p.

17. Organización de los Estados Americanos (OEA), Universidad de El Salvador (UES), Ministerio de Salud Pública Y Asistencia Social (MSPAS). Obtención y Aprovechamiento de Extractos de Vegetales de La Flora Salvadoreña. Planter. Volumen 1. 1989. Editorial Universitaria, Universidad de El Salvador. total de 564 p.
18. Pelczar, Michael J. 1932. Microbiología 4 Edición. Editorial McGrawHill. México. p. 426-429., 515, 826 p.
19. Tamayo Mario. El proceso de la Investigación Científica 3° Edición, Editorial Limusa, S.A de C.V México D.F pag 105 –108.
20. www.hama/medac.ip/w1a/microbio/micro/pract.feles.
21. www.upm.edu/biology/cursos/micro/pruebas.
22. www.hiuto.udea.edu.co/farmacog
23. www.medicinanaturista.com.

GLOSARIO ^(2,11,12)

- Absceso: Cavity que contiene pus y está rodeada de tejido inflamado formado como consecuencia de la supuración en una infección localizada.
- Aerobio: Microorganismo que vive y crece en presencia de oxígeno.
- Anaerobio: Microorganismo que solo puede vivir y crecer en ausencia de oxígeno.
- Bacteriostático: Cualquier proceso o agente que inhiba el crecimiento bacteriano.
- Citotóxica: Nocivo o destructivo para las células.
- Edema: Acumulación de cantidades excesivas de líquido acuoso en células, tejidos o cavidades cerosas.
- Endotoxina: Toxina intracelular bacterial que no es ordinariamente liberada como la exotoxina, puede causar "Shock" y fiebre.
- Elución: Fenómeno de migración de los componentes de una mezcla a lo largo de la fase estacionaria impulsados por la fase móvil.
- Exotoxina: Una toxina que es secretada y actúa sobre objetivos celulares específicos.
- Febrífugo : Agente que tiende a reducir la fiebre.
- Furúnculo: Infección cutánea estafilococcica de carácter localizado supurativo que se origina en una glándula o folículo piloso y se caracteriza por dolor enrojecimiento e hinchazón.

- Inoculación: Implantación de microorganismos dentro o sobre de un medio de cultivo.
- Lisis: Es la ruptura física o deterioro de una célula.
- Necrosis: Muerte de una porción de tejido a consecuencia de una enfermedad o lesión.
- Patógeno: Cualquier agente, usualmente un virus, bacteria, hongo, protozoo o helminto que causa enfermedades.

ANEXOS

ANEXO 1



FRUTOS



SEMILLA



HOJA



ÁRBOL



ARBOLEDA

FIGURA N° 5. FOTOGRAFÍAS DE *Sapindus saponaria* (Pacún)

CUADRO N° 1. PRUEBAS FITOQUIMICAS PRELIMINARES (AL EXTRACTO ETANOLICO)

SUSTANCIA	PRUEBA	PROCEDIMIENTO	RESULTADO
Glicósidos Saponínicos	Liebermann- Burchard	10 mL del extracto+ 5 mL H ₂ SO ₄ diluido. Hervir 10 min. y enfriar. extracto+20 mL CHCl ₃ y agitar. Concentrar hasta 2 mL de extracto clorofórmico y agregar 1 mL de anhídrido acético+ 3 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado.	Saponinas esteroidales: coloración violeta. Saponinas triterpenoides: coloración verdosa.
	Salkowski	3 mL de extracto + 5 gotas H ₂ SO ₄ concentrado, gota a gota por las paredes	Cambio de color inmediato o gradual. Formación de un anillo rojo.
	Método de la espuma	1 gramo de muestra+ 5 mL de H ₂ O destilada. Agitar 30 min.y dejar reposar	Formación de espuma de 3 cm arriba de la superficie del líquido que persiste por mas 10 min
Glicósidos Flavonoides	Shinoda	5 mL de extracto+ trocito de Mg ^o + 1 mL de HCL concentrado	Coloración anaranjada-roja, roja o azulosa
Glicósidos Antraquinónicos	Bornträger	Evaporar a sequedad 15 mL del extracto + 30 mL deH ₂ O destilada. Filtrar. Extracto + 10 mL de benceno. Agitar tomar 10 mL de capa bencénica y agregar 5 mL de amoniaco	Coloración roja, rosa o violeta.

ANEXO 2

SUSTANCIA	PRUEBA	PROCEDIMIENTO	RESULTADO
Sesquiterpen- lactonas	Legal	2 mL de extracto + 3 gotas de piridina + 5 gotas de nitroprusiato de sodio al 0.5 % + 5 gotas de NaOH 2N	Coloración rosa
	Baljet	2 mL de extracto + 4 gotas de reactivo formando por volúmenes iguales de solución A (ácido pícrico en solución etanólica) y solución B (hidróxido de sodio en solución acuosa)	Coloración anaranjada o roja oscura
Alcaloides	Dragendorff	Agregar gotas del reactivo de Dragendorff a 2 mL de extracto	Precipitado naranjada
	Mayer	Agregar gotas del reactivo de Mayer a 2 mL del extracto	Precipitado púrpura
	Wagner	Agregar gotas del reactivo de Wagner a 2 mL del extracto	Precipitado marrón
Glicósidos cardiotónicos	Legal	Llevar a sequedad 1-3 mL de extracto. Agregar 3 gotas de piridina, 2 gotas de nitroprusiato de sodio al 0.5 % y 3 gotas de NaOH 2N	Coloración rojo intenso
	Keller Killiani	Evaporar a sequedad 2 mL del extracto. Agregar 2 mL de reactivo de Keller y con cuidado Gotas de reactivo de Killiani.	Coloración roja

ANEXO 2 (continuación)

SUSTANCIA	PRUEBA	PROCEDIMIENTO	RESULTADO
Taninos	Cloruro Férrico	2 mL de extracto + 3 gotas de cloruro férrico 5%	Coloración negro azulado o verdoso
	Precipitación de Proteína	2 mL de extracto + 2 mL de Solución de Gelatina 2%	Precipitado beige
	Subacetato de plomo	2 mL de extracto + 2 mL de Subacetato de plomo 5%	Precipitado coloidal beige
	Dicromato de Potasio	2 mL de extracto + 2 mL de dicromato de potasio 5%	Precipitado café pardo
	Precipitación de Alcaloides	2 mL de extracto + 2 mL de clorhidrato de quinina 5%	Precipitado beige
	Agua de Bromo	2 mL de extracto + 3 gotas de agua de bromo 2%	Pirogalotánicos no precipitan catecólicos si precipitan

ANEXO 2 (continuación)

ANEXO 3
Pruebas Fitoquímicas Preliminares



Figura N°6. Prueba de hemólisis, Liebermann Burchard, Salkowski, Legal, Baljet



Figura N° 7. Cloruro férrico, Solución de gelatina, Subacetato de plomo, Dicromato de potasio, Sulfato de atropina, agua de bromo.

ANEXO 3 CONTINUACIÓN



Figura N° 8. Prueba de Keller Killiani, Legal, Dragendorff, Mayer, Wagner

ANEXO 4
MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR⁽⁹⁾

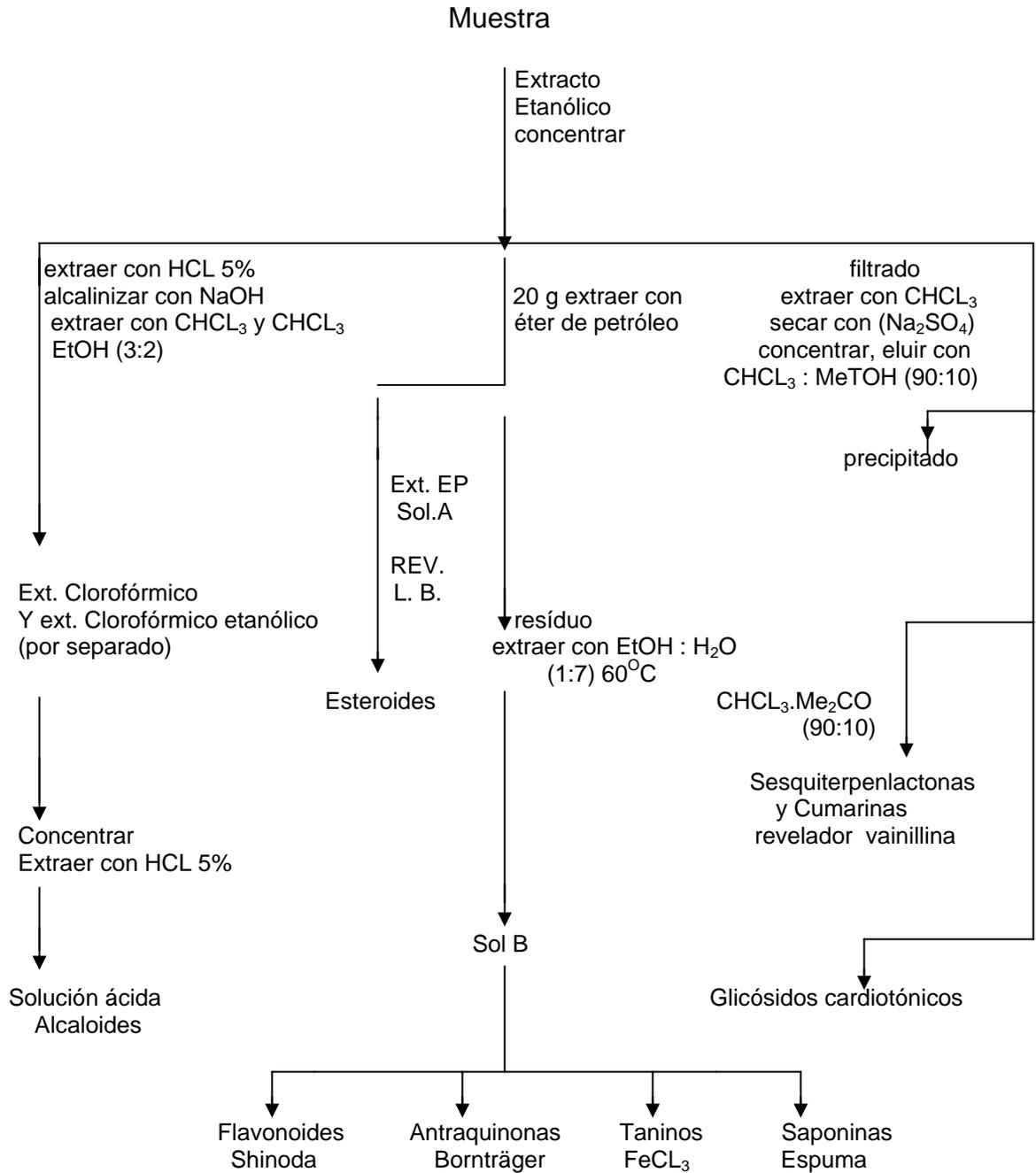


Figura N° 9 Marcha Fitoquímica Preliminar

ANEXO 5
Placas Cromatográficas



Figura N° 10. Capa Cloroformo-Metanol



Figura N° 11. Capa Clorofórmica

ANEXO 5 CONTINUACIÓN



Figura N° 12. Capa Etérea



Figura N° 13. Capa Cloroformo- Metanol

ANEXO 5 CONTINUACIÓN



Figura N°14. Capa Etanol-Agua

ANEXO 6



Figura N° 15. Colonias de *Staphylococcus aureus* en Agar Bair Parker



Figura N° 16. Colonias de *Trichophyton mentagrophytes* en Agar Sabouraud

ANEXO 7
CUADRO N° 2. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN
Staphylococcus aureus⁽¹¹⁾

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	PRUEBAS BIOQUÍMICAS	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS
<p style="text-align: center;">Por el método de coloración al Gram se observan bacterias en forma de cocos, unidos en racimos Gram positivos</p>	<p style="text-align: center;">Catalasa: identifica la enzima catalasa que descompone el H₂O₂. por lo que se produce un burbujeo vigoroso con el H₂O₂ al 30 %</p>	<p style="text-align: center;">En el medio Selectivo Baird Parker colonias color negras, lustrosas, convexas.</p> <p style="text-align: center;">En el medio selectivo Chapman colonias color amarillo dorado, lisas, redonda de borde convexo.</p>
	<p style="text-align: center;">coagulasa: Evidencia la reacción de coagulación del plasma sanguíneo que produce la enzima.</p> <p style="text-align: center;">procedimiento: colocar 0.5 mL de plasma citratado. inocular una colonia del microorganismo e incubar a 37 °C por 24 horas</p>	

ANEXO 8
CUADRO N° 3. PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN
Trichophyton mentagrophytes⁽¹¹⁾

MORFOLOGÍA DE LAS COLONIAS	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	OTRAS CARACTERÍSTICAS
<p>En agar Sabouraud colonias vellosas y/o granulares. Color blanco a rosado. Reverso ante a marrón rojizo. ocasionalmente con bordes amarillos. algunas cepas producen pigmentación rojo marrón. incubar a temperatura ambiente por 1-2 semanas</p>	<p>Tinción con Lactofenol azul algodón: microconidias en abundancia, globosas en forma de racimos de uvas. rara vez se ve macroconidias, si están, son de paredes delgadas, lisas y en forma de lápiz.</p>	<p>Prueba de la carnada de pelo positiva: en una caja de petri conteniendo pelos y agua esterilizados, se inocula directamente una porción de la colonia. incubar a 25 °C / 10-14 días se observa invasión de la cutícula del pelo en forma Cónica.</p>

ANEXO 9



Figura N °17. Prueba de Coagulasa resultado (+) para *Staphilococcus aureus*



Figura N° 18. Prueba de carnada de pelo para *Trichophyton mentagrophytes*

ANEXO 10

Método Kirby Bauer Modificado para *Staphilococcus aureus*

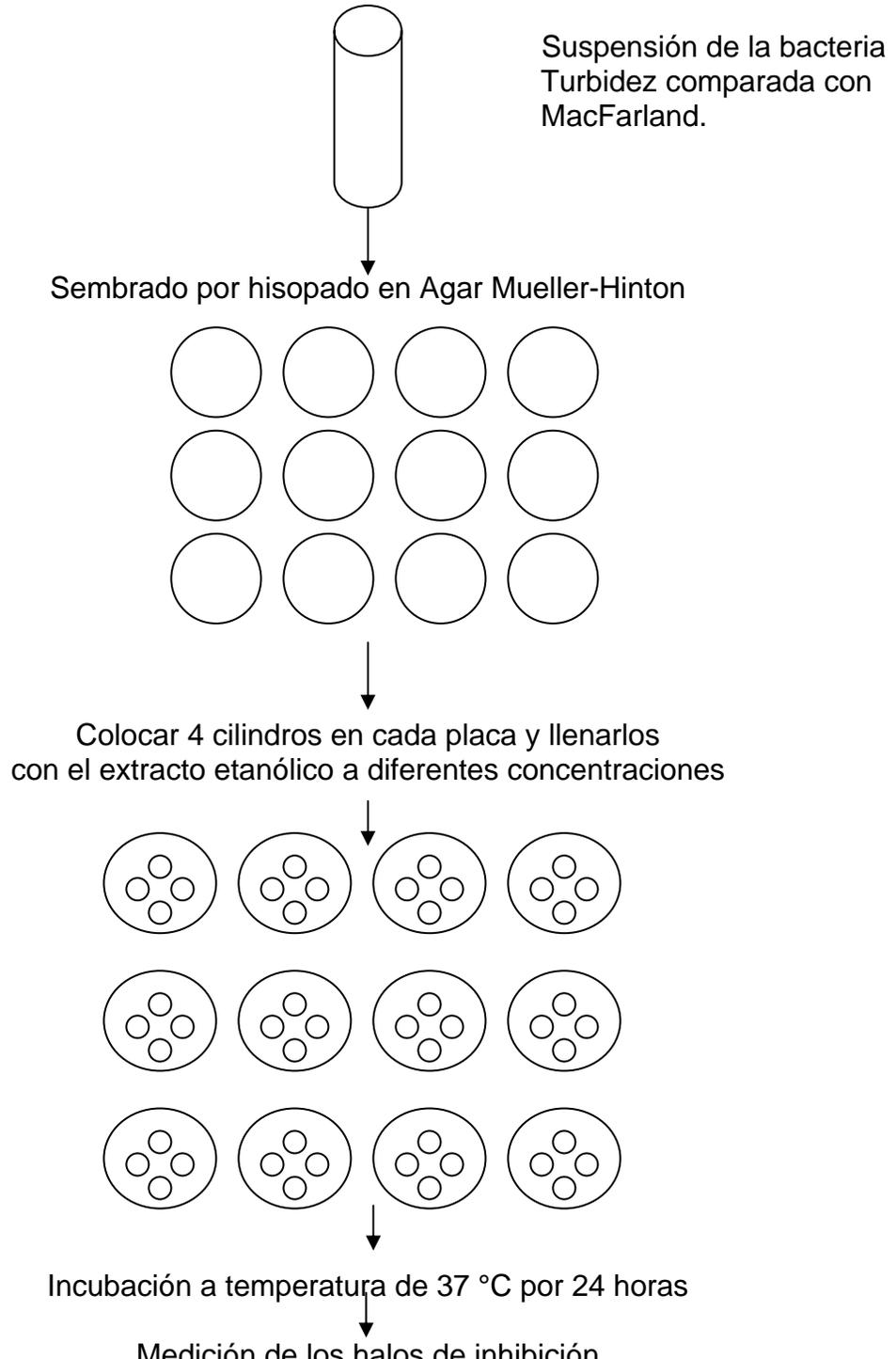


Figura N° 19. Diagrama del método de Kirby Bauer Modificado

ANEXO 11

Método Kirby Bauer Modificado para *Trichophyton mentagrophites*

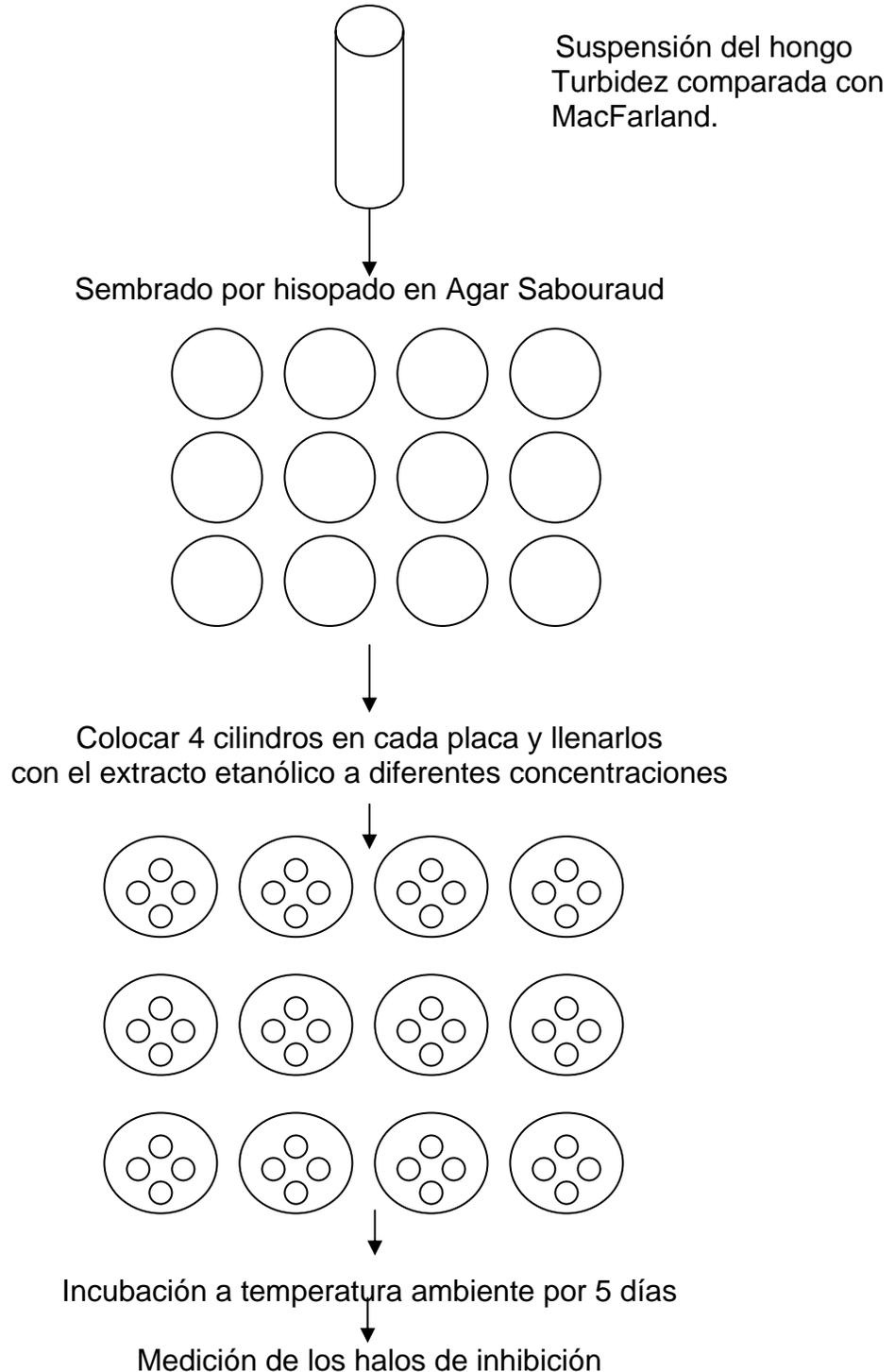


Figura N° 20. Diagrama del método de Kirby Bauer Modificado

ANEXO 12



Figura N° 21. Comparación de resultados de inhibición de crecimiento del *Trichophyton mentagrophytes* entre el patrón Ketoconazol 1% (A) y el Extracto Etanólico de la cáscara del fruto de *Sapindus saponaria* (Pacún) a una concentración de 61.73 % (B)



Figura N°22. Placas de evaluación antifúngica en el *Trichophyton mentagrophytes*

ANEXO 13

Material

- Tubos de Ensayo
- Gradilla para Tubos de Ensayo
- Beakers
- Agitadores
- Erlenmeyer
- Cajas Petri
- Hisopos Estériles
- Azas
- Pipetas Morh
- Micropipetas
- Pipeteadores
- Pinzas
- Cilindros de Acero Inoxidable
- Vidrio Reloj
- Tubos de Ensayo con Rosca
- Ampolla de Separación
- Soporte
- Pinza Sostén
- Pinza de Extensión
- Aro Metálico

-Malla de Asbesto

-Mechero

-Kitasato

-Probetas

Equipo

AUTOCLAVE : de vapor húmedo, webeco 1978, serie 72244. de aire seco, presión, modelo 25EG, serie 9903 – 005.

ESTUFA THELCO: modelo 3542, serie 21 – AF – 10

BALANZA ANALÍTICA METTLER : modelo PM 400, serie SNR 1243297.

HOT PLATE FISHER : modelo – 75h , serie 57101947

INCUBADORA NAPTO : modelo 332, serie 6 –83-1822-20.

FLASH EVAPORATOR. Buchler, instrument, modelo 50 – 60 cy, serie 4865445.

SOXHLET.

Reactivos y Disolventes

-Alcohol etílico

-Ácido sulfúrico diluido 10 %

-Tiras de Magnesio

-Ácido Clorhídrico Concentrado

-Acetato de plomo al 10 %

- Acetato de etilo
- Tricloruro de hierro 5 %
- Piridina
- Nitroprusiato de Sodio 0.5%
- Hidróxido de Sodio 2N
- Keller - Killiani
- Solución de ácido 3,5- dinitrobenzoico 5 %
- Cloroformo
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Dicromato de potasio 5 %
- Solución de Gelatina 2 %
- Solución de Cafeína 10 %
- Clorhidrato de Quinina 5 %
- Agua de Bromo 2 %
- Dragendorff
- Mayer
- Wagner
- Benceno
- Amoníaco
- Bornträger

**ANEXO 14
EQUIPO UTILIZADO**



Figura N° 23. Aparato Soxhlet



Figura N° 24. Aparato de Rotavapor (Flash Evaporator)

ANEXO 15
CUADRO N° 4. PREPARACIÓN DE MEDIOS ⁽¹⁶⁾

MEDIO	PREPARACIÓN
CHAPMAN	<p align="center">Disolver 146,5 g/litro, esterilizar en autoclave (15 min. a 121 °C) y verter en placas. pH: 7,0 ± 0,2 las placas con el medio de cultivo son claras e incoloras.</p>
SABOURAUD	<p align="center">Disolver 30 g/litro y esterilizar en autoclave (15 min. A 121 °C) no sobrecalentar pH: 5.6 ±0,1 las placas con medio de cultivo son claras e incoloras.</p>
MUELLER-HINTON	<p align="center">Disolver 34 g/litro, esterilizar con cuidado en autoclave, enfriar eventualmente a 45-50 °C para incorporar del 5 al 10 % de sangre defibrinada. Verter en placas. pH: 7,4 ±0,2 las placas con medio de cultivo sin sangre son claras y de color amarillento.</p>
BAIRD PARKER	<p align="center">Disolver 58 g. En 0.95 litros, esterilizar en autoclave (15 min. a 121 °C), enfriar a 45- 50 °C, añadir mezclando 50 mL de emulsión de yema de huevo telurito y eventualmente, 50 mg/litro De sulfametacina. PH: 6.8±0.2.</p>

ANEXO 16

PREPARACIÓN DE REACTIVOS REVELADORES⁽¹²⁾

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-365 nm.
- Detección: esteroides; otros esteroides y glicósidos triterpénicos.

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 H₂SO₄ concentrado, (en ese orden)(el reactivo es de limitada estabilidad por ello descartar si el color se torna violeta).
- Aspersar la placa, calentar a 100 °C por 5-10 min. y evaluar el Vis o UV-365 nm. En el visible los componentes de los aceites esenciales muestran coloraciones intensas: azul, verde, roja y marrón, algunos compuestos fluorescen bajo UV-365 nm.
- Detección: aceites esenciales, saponinas, principios amargos, etc.

ANEXO 16 CONTINUACIÓN

Anisaldehído-ácido sulfúrico

- Solución recién preparada de 0,5 mL de anisaldehído en 50 mL de HOAC glacial, con adición de 1 mL de H₂SO₄ concentrado.
- Aspersar y calentar a 100-105 °C. colores violeta, azul, roja, gris o verde.
Evaluar en Vis o UV-365 nm.
- Detección: azúcares, esteroides y terpenos.

Acetato de plomo básico

- Solución de acetato de plomo básico (25 % en agua).
- Aspersar y observar manchas fluorescentes a la luz UV de onda larga.
- Detección: flavonoides.

Cloruro de hierro (III)

- A. Solución de Cloruro de hierro (III) al 1 ó 5 % en ácido clorhídrico 0.5 N, o
- 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.

ANEXO 16 CONTINUACIÓN

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

- A. Disolver 1 g de vainillina en 100 mL de H₂SO₄ conc., o B. Disolver 0.5 g de vainillina en una mezcla de H₂SO₄: etanol (40:10).
- Aspersar y calentar a 120 °C hasta intensidad de coloración óptima de manchas.
- Detección: alcoholes superiores, fenoles y esteroides.

ANEXO 17

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR MAC FARLAND



9.5 mL de H_2SO_4 + 0.5 mL de BaCl_2

- Densidad aproximada: 15×10^8 microorganismos/ mL
- Preparación de la suspensión para *Staphiloccus aureus*:
10 mL de caldo nutritivo + cantidad necesaria de bacteria.



9.9 mL de H_2SO_4 + 0.1 mL de BaCl_2

- Densidad aproximada: 3×10^8 microorganismos/ mL
- Preparación de la suspensión para *Trichophyton mentagrophytes*: 10 mL de caldo nutritivo + cantidad necesaria del hongo.