

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE LA OLEORRESINA DEL
Eucalyptus citriodora (EUCALIPTO)

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:
CLAUDIA MARÍA NAJARRO MENDOZA
DINORA JEANNETTE RAMÍREZ HENRÍQUEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

FEBRERO 2005

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

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 TRABAJO DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESOR DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MSc. Armando Nelson Genovez Leonor

ASESORA DE ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

MSc. Coralia Figueroa de Murillo

DOCENTES DIRECTORES

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos

Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda

AGRADECIMIENTOS

A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN MARÍA:

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

A NUESTROS DOCENTES DIRECTORES:

MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos e Ing. Sergio Armando Maravilla Miranda, por ser nuestros asesores y guiarnos por el camino del saber, por brindarnos buena orientación y conocimientos profesionales que fueron de mucha importancia para la elaboración de este trabajo.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE ÁREA:

Lic. María Odette Rauda, MSc. Coralia de Murillo y MSc. Armando Nelson Genovez, por ser objetivos en sus evaluaciones, por su tiempo y dedicación en el desarrollo y culminación del presente trabajo.

A LOS TÉCNICOS DE LABORATORIO: Dn. Oscar Coreas, Dn. Wilber Guzmán y Lic. Raúl Rodríguez, por todo el apoyo brindado durante todo este trabajo de graduación.

Y a todas las personas que se han involucrado directa o indirectamente en hacer posible que este trabajo tenga éxito.

SINCERAMENTE: Claudia María Najarro y
Dinora Jeannette Ramírez

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO Y LA VIRGEN MARÍA: Que guiaron e iluminaron mi mente durante todos estos años, y me brindaron el privilegio de alcanzar y concluir satisfactoriamente mis estudios de grado. A Él todo el honor y la gloria por este logro.

A MIS PADRES: José Najarro y Silvia Mendoza, por darme todo su amor y apoyo incondicional y por el esfuerzo que hicieron con el propósito de convertir mis ideales en una realidad.

A MIS HERMANOS: Wilfredo, Sandra y Francisco, a ellos muchas gracias por todo su apoyo y por que siempre han creído en mí.

A MIS SOBRINOS: Lourdes y Melvin, que con sus palabras de ánimo, apoyo y cariño me ayudaron en gran manera en los momentos más difíciles para poder conseguir este triunfo.

A MI FAMILIA: Que de alguna u otra forma se involucraron en mi vida estudiantil para lograr mis ideales.

A MI NOVIO: Francisco Lázaro, por su amor y apoyo incondicional; y porque ha sido la persona que supo motivarme en mis momentos de flaqueza para seguir adelante y para alcanzar mis metas.

A MI COMPAÑERA: Dinora, por ser una excelente amiga y compañera, y por que juntas aprendimos a trabajar en equipo.

A MIS AMISTADES: Que siempre están en el momento justo para brindarme su ayuda y amistad.

A MIS CATEDRÁTICOS: Que supieron guiarnos tanto en la parte informativa como en la formativa de nuestra carrera para convertirnos en profesionales.

SINCERAMENTE: Claudia María Najarro Mendoza.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO Y A LA VIRGEN MARÍA: por estar siempre conmigo en todo momento e iluminarme con su sabiduría para poder terminar mis estudios universitarios.

A MIS PADRES: Dora Alicia y René Ramírez por que siempre fueron mi apoyo y darme su amor, comprensión y sacrificios para que yo pudiera llegar a este momento.

A MI HERMANA LOURDES: por todo su apoyo y sacrificio, por toda la ayuda que me brindó, ayuda que me sirvió para poder terminar mis estudios.

A MIS HERMANOS: José Amilcar (de grata recordación), William, René y Yazmín por su cariño y apoyo que me brindaron en todo momento.

A MIS CUÑADOS: María Isabel Fernández, Ángela Hernández y Roberto Duarte, por sus consejos, apoyo y por ser parte de mi familia.

A MIS SOBRINAS: Tania María y Stephanny Julissa, por su amor, inocencia y alegría que hicieron de mis días cada vez mejor.

A VALENTÍN ANTONIO BOLAÑOS: por su amor, apoyo, paciencia y por darme ánimos de seguir adelante.

A MI COMPAÑERA CLAUDIA NAJARRO: por su amistad incondicional, por su apoyo y su ayuda en la realización de este trabajo.

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

SINCERAMENTE: Dinora Jeannette Ramírez Henríquez

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	
CAPÍTULO I	
1.0 Introducción	xviii
CAPÍTULO II	
2.0 Objetivos	21
CAPÍTULO III	
3.0 Marco Teórico	23
3.1 Generalidades del Eucalipto	23
3.2 El Kino del Eucalipto	25
3.3 Generalidades de las Cepas sometidas a Bioensayo	26
3.4 Generalidades de los Compuesto Químicos	31
CAPÍTULO IV	
4.0 Diseño Metodológico	38
4.1 Tipo de Estudio	38
4.2 Investigación Bibliográfica	38
4.3 Metodología de Campo	39
4.4 Metodología de Laboratorio	39
4.4.1 Caracterización Organoléptica	39
4.4.2 Parte Fitoquímica	39

4.4.2.1 Obtención del Extracto Etanólico	39
4.4.2.2 Pruebas Fitoquímicas Preliminares	40
4.4.3 Ensayo Microbiológico	40
4.4.3.1 Pruebas de Identificación Microbiológicas	40
4.4.3.2 Determinación del Potencial de Inhibición	42
CAPÍTULO V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	47
CAPÍTULO VI	
6.0 Conclusiones	67
CAPÍTULO VII	
7.0 Recomendaciones	71
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

ÍNDICE DE FIGURAS

No. de Figura

- No. 1: Fotografía del Árbol de ***Eucalyptus citriodora*** (eucalipto).
- No. 2: Fotografía del Árbol de ***Eucalyptus citriodora*** (eucalipto).
- No. 3: Fotografía de Soxhlet.
- No. 4: Fotografía de Flash Evaporator (rotavator).
- No. 5: Diagrama de la Metodología General de Trabajo.
- No. 6: Fotografía de Prueba de identificación de saponinas.
- No. 7: Fotografía de Prueba de Shinoda.
- No. 8: Fotografía de Prueba de Bornträger.
- No. 9: Fotografía de Prueba de Identificación de Glicósidos Cardiotónicos.
- No. 10: Fotografía de Prueba de Identificación de Alcaloides.
- No. 11: Fotografía de Prueba de Identificación de Sesquiterpenlactonas.
- No. 12: Fotografía de Prueba de Identificación de Taninos.
- No. 13: Colonias de ***Staphylococcus aureus*** en Agar Chapman.
- No. 14: Colonias de ***Staphylococcus aureus*** en Agar Bair Parker.
- No. 15: Colonias de ***Pseudomonas aeruginosa*** en Agar Cetrimide.
- No. 16: Colonias de ***Streptococcus pyogenes*** en Agar Sangre.
- No. 17: Método de Extensión.
- No. 18: Prueba de Catalasa de ***Staphylococcus aureus***.
- No. 19: Prueba de Coagulasa de ***Staphylococcus aureus***.
- No. 20: Pruebas de Bioquímicas de ***Pseudomonas aeruginosa***.

- No. 21: Prueba de Bacitracina de ***Streptococcus pyogenes***.
- No. 22: Preparación de Estándar de Mac Farland.
- No. 23: Método de Kirby Bauer Modificado.
- No. 24: Fotografía de los Resultados del Método de Kirby Bauer Modificado en ***Staphylococcus aureus***.
- No. 25: Fotografía de los Resultados de Método de Kirby Bauer Modificado en ***Pseudomonas aeruginosa***.
- No. 26: Fotografía de los Resultados del Método de Kirby Bauer Modificado en ***Streptococcus pyogenes***.

ÍNDICE DE CUADROS

No. Cuadros

- No. 1: Características Macroscópicas de los Microorganismos.
- No. 2: Pruebas de Identificación y Diferenciación de los Microorganismos.
- No. 3: Características Organolépticas del Extracto Etanólico de la Oleorresina de *Eucalyptus citriodora* (eucalipto).
- No. 4: Resultado de las Pruebas Fitoquímicas Preliminares.
- No. 5: Volumen de Extracto Madre necesario para llevar a concentración de trabajo.
- No. 6: Resultado de las Pruebas de Identificación de *Staphylococcus aureus*.
- No. 7: Resultados de las Características Microscópicas y Macroscópicas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- No. 8: Resultados de las Pruebas de Identificación y Diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa*.
- No. 9: Resultados de las Pruebas de Identificación de *Streptococcus pyogenes*.
- No. 10: Resultados de la Evaluación Microbiológica en *Staphylococcus aureus*.
- No. 11: Resultados de la Evaluación Microbiológica en *Pseudomonas aeruginosa*.

No. 12: Resultados de la Evaluación Microbiológica en ***Streptococcus pyogenes***.

No. 13: Procedimientos de pruebas fitoquímicas preliminares.

No.14: Características macroscópicas de los microorganismos.

No. 15: Pruebas de Identificación y Diferenciación de ***Staphylococcus aureus***.

No. 16: Pruebas Bioquímicas.

No.17: Pruebas de Identificación y Diferenciación de ***Streptococcus pyogenes***.

No. 18: Normalizaciones interpretativas de los diámetros de zonas, basadas en el método de Kirby Bauer Modificado.

ÍNDICE DE ANEXOS

No. de Anexo

- No. 1: Fotografía del Árbol de ***Eucalyptus citriodora*** (eucalipto).
- No. 2: Fotografía de Equipo Utilizado.
- No. 3: Metodología General de Trabajo.
- No. 4: Pruebas Fitoquímicas Preliminares.
- No. 5: Resultados de las Pruebas Fitoquímicas Preliminares.
- No. 6: Prueba de Características Macroscópicas de los Microorganismos.
- No. 7: Fotografía de Prueba de Características Macroscópicas de los Microorganismos.
- No. 8: Pruebas Microscópicas (coloración al Gram).
- No. 9: Pruebas de Identificación y Diferenciación de ***Staphylococcus aureus***.
- No. 10: Fotografía de Resultados de las Pruebas de Identificación y Diferenciación de ***Staphylococcus aureus***
- No. 11: Pruebas Bioquímicas de ***Pseudomonas aeruginosa***.
- No. 12: Prueba de Identificación y Diferenciación de ***Streptococcus pyogenes***.
- No. 13: Fotografía de Resultados de las Pruebas de Identificación y Diferenciación de ***Pseudomonas aeruginosa*** y ***Streptococcus pyogenes***

- No. 14: Esquema de Preparación de Estándar de Mac Farland.
- No. 15: Esquema del Método de Kirby Bauer Modificado.
- No. 16: Normalizaciones Interpretativas de los Diámetros de Zona.
- No. 17: Resultados de Kirby Bauer Modificado en ***Staphylococcus aureus***.
- No. 18: Resultados de Kirby Bauer Modificado en ***Pseudomonas aeruginosa***.
- No. 19: Resultados de Kirby Bauer Modificado en ***Streptococcus pyogenes***.
- No. 20: Preparación de los Medios de Cultivo.
- No. 21: Materiales, Equipo y Reactivos.

RESUMEN

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

Este árbol produce una oleorresina a través de su tronco, ésta posee propiedades antifúngicas, lo que promovió a continuar investigándola con el fin de determinar si además posee propiedades antibacterianas. Para ello se utilizó el equipo Soxhlet, con el que se obtuvo el extracto etanólico de la oleorresina del eucalipto, lo que se requería para identificar la posible presencia de Glicósidos Flavonoides, Glicósidos Antraquinónicos, Sesquiterpenlactonas, Taninos, Alcaloides y Glicósidos Cardiótonicos, mediante pruebas fitoquímicas de coloración y precipitación.

Además se determinó la concentración del extracto etanólico por el método gravimétrico expresada en porcentaje peso / volumen.

De esta solución se partió para realizar las diluciones para el ensayo.

Se le determinó la actividad antibacteriana tanto al extracto etanólico como a las diluciones, mediante el método microbiológico Kirby Bauer Modificado, utilizando las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.

Así mismo se utilizaron discos de antibióticos como patrones de comparación.

De acuerdo a los resultados obtenidos se confirmó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la oleoresina del ***Eucalyptus citriodora***.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1. 0 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el descubrimiento de nuevos agentes antibacterianos ha sido producto de numerosas investigaciones y, aunque muchos de estos agentes pueden sintetizarse en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica, constantemente se están buscando nuevas sustancias inhibitorias de origen natural, principalmente vegetal.

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

Una de las especies vegetales que mayor beneficio ha aportado al área de la salud es el Eucalipto (***Eucalyptus citriodora***), el cual exuda una oleorresina del tronco la cual ha sido poco estudiada, está compuesta por varios principios activos dentro de los cuales puede haber uno o algunos que tengan propiedad antibacteriana. ⁽²⁴⁾

En este trabajo se investigó, si el extracto etanólico de la oleorresina de esta especie vegetal posee propiedades antibacterianas, y para ello se realizó una evaluación microbiológica por medio del método de Kirby Bauer Modificado, con las bacterias; ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pyogenes***, las cuales atacan al tejido dañado por heridas, quemaduras, golpes e incluso en cirugía causando así infecciones graves. ⁽¹³⁾

Se espera contribuir con esta investigación comprobando la actividad antibacteriana del extracto etanólico en ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pyogenes***, convirtiéndose en una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por estos microorganismos.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la Actividad Antibacteriana del Extracto Etanólico de la Oleorresina del *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Obtener el Extracto Etanólico de la Oleorresina de *Eucalyptus citriodora*.

2.2.2 Efectuar Análisis Fitoquímico Preliminar al Extracto Etanólico de la Oleorresina de *Eucalyptus citriodora*.

2.2.3 Obtener el Extracto Madre y realizar Diluciones para el Ensayo.

2.2.4 Comprobar la Actividad Antibacteriana del Extracto Etanólico por medio del método Microbiológico Kirby Bauer Modificado, utilizando las Bacterias, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1. GENERALIDADES DEL EUCALIPTO

Nombre común: Eucalipto limón

Nombre científico: *Eucalyptus citriodora*

Familia: Myrtaceae

Subfamilia: Leptospermoideae



DESCRIPCIÓN BOTÁNICA:

Árbol de hoja perenne, de 24 a 30 metros de altura, con tronco recto de entre 0.6 y 1.3 metros de diámetro, de copa escasa y caída, el follaje tiene olor característico a limón, su tronco es liso, gris y su ritidoma se desprende en escamas irregulares y delgadas.

USOS:

Antiséptico y antifúngico, tiene acción antiinflamatoria, antiinfecciosa, antiespasmódica y antidiabética. Se utiliza en los tratamientos de las artritis inflamatorias y ciertos tipos de diabetes. La utilización del eucalipto es también recomendada en casos de fiebre, tos, heridas y picaduras de insectos. ⁽²⁷⁾

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

resultado en casos de ronquera y pérdida de la voz y en la sinusitis. Se usan también las hojas contra la fiebre y como insecticida.

El aceite es poderoso antiinflamatorio, se emplea sobre todo para aliviar las artritis y los reumatismos, además se usa como desinfectante y por su olor fresco y agradable se emplea en perfumería.

OTROS USOS:

La madera es muy dura, se utiliza para postes largos, aserrío, herramientas, la leña es muy buena, se prepara un carbón industrial y se utiliza para obtener celulosa y pulpa de papel.

CONTENIDO QUÍMICO:

Reportan ácidos betunílico y ursólico, eucaliptol y β -sitosterol en las hojas, además pueden contener aceite con 65.5% de citronella, 12.2% citronelol y 3.6% isopulegol y ácidos: cítrico, glutámico, málico, quínico, shiquímico (carcinogénico) y succínico. La corteza contiene 9% de taninos, las hojas y frutos dan positiva las pruebas para flavonoides y esteroides. ⁽²⁷⁾

3.2 EL KINO DEL EUCALIPTO

El Kino es el jugo obtenido del árbol por medio de incisiones longitudinales en el tronco, fluye abundantemente, tiene color rojizo y cuando se seca con el sol se vuelve quebradizo, y es así, en masas irregulares que se recoge para su exportación. El Kino Malabar o del este de la India es el reconocido por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXV) su fuente botánica es el ***Pterocarpus marsupium*** de la familia Leguminosae. Pero existen otras muchas exudaciones en el comercio conocidas como Kino, derivadas de plantas pertenecientes a órdenes muy diferentes. Por ejemplo, muchas especies de ***Eucalyptus***, ***Myristica***, etc. Dentro de las más importantes están el Kino africano, Dhak – tree, Botany Bay Kino, Jamaica Kino y el Kino del sur de América.

El Botany Bay Kino, Kino Australiano o Kino de Eucalipto fue descubierto por primera vez por White y Smith en 1790, como un jugo astringente procedente del árbol de ***Eucalyptus resinifer*** de la familia Myrtaceae. La mayoría de las especies de eucaliptos australianos son plantas resinosas, pero solo unas pocas tienen valor comercial. ⁽²⁵⁾

3.2. GENERALIDADES DE LAS CEPAS SOMETIDAS A BIOENSAYO.

3.2.1 *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

Morfología y fisiología. Células esféricas de 1 μm de diámetro, aparecen como masas de células arracimadas, aunque se encuentran como células aisladas, en parejas y tétradas, los estafilococos jóvenes son gram positivas, sin embargo al envejecer, muchas células se vuelven gram negativas, son no móviles, no forman esporas. Los estafilococos crecen bajo condiciones aeróbicas o microaerófilas y con mayor rapidez a 37°C, pero su pigmentación es apreciable a temperatura 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. Tiene 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. ⁽¹⁹⁾

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 de mayor riesgo de infecciones estafilococcicas graves son las salas de cuna de recién nacidos, unidad de cuidados intensivos, salas de operaciones y las salas de quimioterapia del cáncer. ⁽¹⁰⁾

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

Los estafilococos son patógenos oportunistas, habitualmente las infecciones producidas por estafilococos son cutáneas. El prototipo de infección estafilocócica es el furúnculo o cualquier absceso localizado. Entre las enfermedades más comunes producidas por *Staphylococcus aureus* son: Neumonía estafilococcica, síndrome de la piel escaldada, síndrome de shock tóxico y otras enfermedades respiratorias. ⁽⁸⁾

3.2.2 ***ESTREPTOCOCCUS PYOGENES***

Morfología y fisiología. Los estreptococos se presentan en cadenas de tres o más células individuales, esféricas, de 0.5 a 1.0 μm de diámetro. Cuando están recientemente aislados, las células son más ovoides que esféricas y se

presentan en pares, sin embargo, se producirán cadenas en los cultivos subsecuentes en medios líquidos. Estos microorganismos son gram positivos, la mayoría de las cepas son aerobias pero algunas son anaerobias facultativas, no forman esporas y no son móviles.

La hemólisis en agar sangre es de importancia considerable en la sub-división del género. Los estreptococos que producen estreptolisina "o" o "s" (toxinas) producen una gran zona de hemólisis completa de células sanguíneas rojas por lo que se conocen como estreptococos β -hemolíticos; por otra parte muchos estreptococos que no producen hemólisis, origina una zona verde o café alrededor de sus colonias, la cual se debe no a hemólisis verdadera sino a decoloración y pérdida de potasio de las células rojas; estos pertenecen a los estreptococos alfa-hemolíticos.⁽³⁾

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

Según la porción corporal afectada, varían desde infecciones locales como abscesos de diversos tejidos como mucosas, articulaciones y serosas; infección

muscular o celulitis que semejan gangrena gaseosa, procesos supurantes en cualquier clase de heridas, las que generalmente ocasionan sepsis o septicemia. Las infecciones cutáneas piodermas, causadas por estreptococos β -hemolíticos son comunes, particularmente en áreas tropicales y templadas. ⁽⁶⁾

3.2.3 **PSEUDOMONA AERUGINOSA.**

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

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

En el ser humano la bacteria se encuentra implicada en una amplia variedad de afecciones supurativas y de otra naturaleza. Se encuentra en cultivo puro de abscesos de diferentes partes del cuerpo, especialmente el oído medio. También ocurre en caso de endocarditis, neumonía y meningitis, aun que raros,

y en los cuales la ***Pseudomona aeruginosa*** parece ser el único microorganismo causal.

Pueden producirse infecciones después de cirugía y tiene importancia especial en infección de quemaduras, donde tales infecciones son la causa mas frecuente de muerte. Las infecciones por pseudomona son difíciles de tratar, por la resistencia de los microorganismos a los antibióticos. ⁽¹⁰⁾

3.3 GENERALIDADES DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS

3.3.1 Glicósidos Saponínicos

Las saponinas son sustancias que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza; el nombre de *saponinas* (del latín sapon = jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuye la tensión superficial de ésta; por lo tanto, al sacudir sus soluciones, se forma una espuma abundante, y relativamente estable. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina. ⁽⁴⁾

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 tiene un origen biogenético común, se forma por la vía del ácido Mevalónico. ⁽⁵⁾

Las saponinas son sustancias muy polares, y es posible extraerlas en caliente o en frío, con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Los materiales lipoides presentes en estos extractos se separan con benceno. Al concentrar la solución alcohólica se separan las saponinas y después se cristalizan en mezclas de alcohol - agua.

Las propiedades detergentes de las plantas han sido explotadas desde la antigüedad por el hombre.

En cuanto a sus usos, muchos saponósidos tienen propiedades antimicrobianas y antifúngicas. 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 o con varios hidroxilos dan coloraciones con varios reactivos ácidos, como el de Liebermann - Burchard, Salkowski, Cloruro de Tionilo y Tricloruro de Antimonio. ⁽⁴⁾

3.3.2 Glicósidos Flavonoides:

Los flavonoides son pigmentos vegetales que poseen en esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆ como se encuentran en las flavononas, auronas, chalconas, Flavonas, Flavonoles, antocionadinas, catequinas, isoflavonas y neoflavonas.

Los 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 las más frecuentes en tejidos leñosos.

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

Algunos pigmentos flavónicos, desprovistos de toxicidad para el hombre, tienen propiedades diuréticas, antiespasmódicas, antihemorrágicas o hemostáticas, antiarrítmica cardíacas, antiinflamatorio, antirradicales libres, antihepatotóxicos, y antiinfecciosas. ⁽⁵⁾

3.3.3 Glicósidos Antraquinónicos:

Incluye O-heterosidos y C-heterósidos (éstos últimos con enlace carbono-carbono entre el azúcar y el aglicón). Su acción más específica es la de estimular la musculatura lisa del intestino, produciendo peristaltismo. A la vez, inhibe la reabsorción de agua a través del intestino grueso, lo cual llega a ocasionar una mayor dilución del contenido intestinal. En conjunto producen un claro efecto laxante que se manifiesta después de unas 6 ó 7 horas. Las plantas que contienen antraquinonas se comportan como laxantes o purgantes según la dosis. Este tipo de laxantes están contraindicados en casos de embarazo, menstruación y hemorroides. ⁽⁵⁾

3.3.4 Sesquiterpenlactonas:

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

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 amibicidas.

Son sustancias amargas, de farmacología poco estudiada, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales, Se ha sugerido que la actividad citotóxica está relacionada con el grupo exometilenbutenólido y también que este grupo modifica el crecimiento de vegetales. ⁽⁴⁾

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 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 en las sales de hierro, los taninos se clasifican en: taninos catecólicos y pirogalotaninos.

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. ⁽⁵⁾

3.3.6 Glicósidos Cardiotónicos:

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas, derivadas de los esteroides, que actúan sobre el corazón. La porción de azúcar contiene 3-5 moléculas de monosacáridos, por lo general, metilpentosas y desoxiazúcares muy especiales. La glicona esteroidal, 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 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 y ranunculáceas. ⁽⁴⁾

3.3.7 Alcaloides

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

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

En ciertas plantas puede haber un ácido especial asociado a los alcaloides; otros se hallan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable.

Los alcaloides son sustancias más o menos tóxicas que actúan primeramente sobre el sistema nervioso central. Son considerados metabolitos secundarios, contiene 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. En muchos casos son de limitada distribución en el reino vegetal y juegan un rol importante en la fisiología de plantas u organismos. ⁽⁴⁾

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio:

La presente investigación tiene un tipo de estudio Retrospectivo, Prospectivo y Experimental, debido a que dicha investigación se basa en estudios realizados anteriormente y a la vez que propone una nueva alternativa mediante datos obtenidos experimentalmente, además es Hipotético – Deductivo ya que a partir de la información retomada de las referencias bibliográficas, permiten formular la siguiente hipótesis: El extracto etanólico de la oleoresina de ***Eucalyptus citriodora*** posee actividad antibacteriana contra ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Streptococcus pyogenes***.

La investigación del presente estudio se divide en tres etapas:

4.2 Investigación Bibliográfica:

- Se realizaron consultas de libros, trabajos de graduación, revistas, manuales, etc., en las bibliotecas de la Facultad de Química y Farmacia, Facultad Multidisciplinaria de Occidente de la Universidad de El Salvador (UES).
- Entrevistas a Docentes Directores, y otros Docentes entendidos en la materia, de la Facultad de Química y Farmacia.
- Internet.

4.3 Metodología de Campo

La recolección de la oleorresina del árbol de Eucalipto se realizó en el Campus Universitario, durante el verano. La muestra se recolectó en frasco de vidrio color ámbar con tapadera de metal y se almacenó en un lugar fresco y seco.

4.4 Metodología de Laboratorio

4.4.1 Caracterización organoléptica

Se determinarán las características organolépticas de la oleorresina:

Color, olor, sabor y consistencia.

4.4.2 Parte Fitoquímica.

4.4.2.1 Obtención de extracto etanólico de la oleorresina.

La muestra de la oleorresina seca o cristalizada se pulveriza en un mortero, luego se pesan 60 g de dicha muestra, y se realiza la extracción en Soxhlet (ver fig. No.3), utilizando etanol al 93 %. El material pesado se empaqueta en un cartucho elaborado con papel filtro, el cuál se coloca en el dedal del Soxhlet, y luego se le adicionan 400 mL de etanol al 93 % para que realice la primera extracción, la que se lleva a temperatura controlada. La muestra se somete a varios arrastres, se suspende la extracción cuando el solvente que está en el dedal se observa de un color tenue, lo que indica que la muestra ya está agotada, es decir que ya no se extrae más sustancia de la

muestra. Este procedimiento se realiza cuatro veces para obtener la cantidad suficiente de extracto, luego se reúnen los extractos y se prosigue a la concentración, se transfiere a un equipo de concentración al vacío (Flash evaporator), donde se obtiene el extracto madre. Se determinará la concentración a la cual se encuentra el extracto madre por medio del método gravimétrico, luego se realizarán las diluciones con las cuales se trabajará.

4.4.2.2 Pruebas Fitoquímicas Preliminares. ⁽⁴⁾ (ver anexo No.4)

Se realizarán reacciones de identificación a partir del extracto madre, para los siguientes principios activos:

- Glicósidos saponínicos: Liebermann - Burchard, Salkowski, Método de la espuma.
- Glicósidos Flavonoides: Shinoda.
- Glicósidos Antraquinónicos: Prueba de Bornträger.
- Sesquiterpenlactonas: Legal y Baljet.
- Taninos: Cloruro férrico 5%, Solución de gelatina 2%, Agua de bromo 2%, Subacetato de plomo 5%, Dicromato de potasio 5%, Sulfato de atropina 5%.
- Glicósidos cardiotónicos: Legal, Keller Killiani, Kedde, Liebermann - Burchard.
- Alcaloides: Dragendorff, Mayer, Wagner.

4.4.3 Ensayos Microbiológicos.

4.4.3.1 Pruebas de identificación microbiológica.

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

- Características macroscópicas. (Ver anexo No.6)

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

Cuadro No. 1 Características Macroscópicas

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

- Características microscópicas.

Utilizando el método de coloración de Gram, para observar la morfología de los microorganismos a ensayar. (Ver anexo No.8)

- Pruebas de identificación. (Ver anexo No. 9, 11 y 12)

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

Cuadro No.2 Pruebas de Identificación Microbiológica

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

Para conservar las cepas, se harán resiembras semanales en placas conteniendo Tripticasa Soya Agar (TSA), a excepción del ***Streptococcus pyogenes***, que se resembrará en Agar Sangre, y se mantendrán en refrigeración a 5°C.

4.4.3.2 Determinación del Potencial de Inhibición

Para determinar la susceptibilidad de un microorganismo a una sustancia antibacteriana en particular, existen varios métodos; los mas comúnmente empleados, son el método de Dilución Seriada y el de Difusión en Agar desde discos de papel. Alternativamente, el agente antibacteriano puede colocarse en cilindros de vidrio, porcelana o acero inoxidable sobre la superficie del medio, en lugar de discos de papel

absorbente (método Cilindro Placa). Este último método es el que se utiliza para el desarrollo del presente estudio.

Método Cilindro Placa

(Método de Kirby Bauer Modificado)

El fundamento de este método es la difusión de la sustancia en investigación, colocada en un cilindro vertical sobre una capa de agar (Muller-Hinton) solidificado, que contiene en la superficie el microorganismo de prueba, de tal manera, que si es susceptible, se formará un halo de inhibición alrededor del cilindro. ⁽¹⁰⁾

- Preparación de la suspensión de microorganismo

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

Este procedimiento se repetirá hasta que se obtenga una turbidez equivalente al estándar Mc Farland de 0.5%, el cual se preparará así: 0.05 mL de BaCl₂ + 9.95 mL de H₂SO₄. Obteniéndose una densidad celular aproximada de 1.5×10^8 MO /mL. De igual manera se realizara para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*.

- Inoculación de las placas

Por el método del extendido, utilizando hisopos estériles impregnados con la suspensión del microorganismo equivalente a 1.5×10^8 MO/mL se inocula uniformemente la superficie del medio Agar Muller Hinton para ***Pseudomona aeruginosa***, y ***Staphylococcus aureus*** para el ***Streptococcus pyogenes*** el medio Agar Muller Hinton se modifica añadiéndole 7% de sangre, con la finalidad de cubrir los requerimientos de dichas bacterias.

El medio se deja secar con la suspensión de microorganismo durante 10 minutos a temperatura ambiente, en condiciones estériles.

- Inoculación con la solución de prueba.

Se colocan sobre la superficie del medio inoculado cuatro cilindros de acero inoxidable, a intervalos de 90° entre cada uno; luego se llena con una micropipeta con la solución de prueba y se incuba a 37°C por 24 y 48 horas.

Los diámetros de inhibición, si los hubiera, se miden con una regla milimetrada transparente especial, usada en la lectura de resultados de antibiogramas. Las pruebas se harán seis veces, tanto para el extracto madre, como para las diluciones. Así mismo se colocaron discos de Gentamicina para ***Pseudomona aeruginosa***, de Amoxicilina para ***Streptococcus pyogenes*** y Penicilina para ***Staphylococcus aureus***, los cuales servirán como parámetro para comparar la eficacia del extracto etanólico. Además de los parámetros antes mencionados,

se agregara otro que contenga en los cilindros únicamente etanol, en presencia del microorganismo inoculado en las placas, como blanco.

Ver Procedimiento y Esquema del Método Kirby Bauer Modificado (anexo No. 14)

Los parámetros de referencia de los halos de inhibición son: halos menores de 12 mm resistentes, halos mayores de 12 mm se consideran susceptibles. ⁽³⁰⁾

El número de placas a ensayar para cada microorganismo fue el siguiente:

Extracto al 41.31%: 6 Placas

Extracto al 30% : 6 placas

Extracto al 20% : 6 placas

Extracto al 15% : 6 placas

Extracto al 7.5% : 6 placas

Solución de yodo 2% : 6 placas

Blanco de alcohol al 93% : 6 placas

Discos de antibióticos : 2 placas

Placa control positivo : 2 placas

Placa control negativo : 2 placas

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Caracterización organoléptica del extracto etanólico de la oleorresina de *Eucalyptus citriodora*.

Una vez obtenido el extracto etanólico de la oleorresina por medio de equipo soxhlet, se determinaron las características organolépticas como son: color, olor, sabor y consistencia.

Cuadro No.3 Características organolépticas del extracto etanólico de la oleorresina del *Eucalyptus citriodora*.

CARACTERÍSTICAS	EXTRACTO ETANÓLICO
Color	Café
Olor	Agradable
Sabor	Dulce
Consistencia	Viscoso

5.2 Resultados del Análisis Fitoquímico Preliminar del Extracto Etanólico de la Oleorresina del *Eucalyptus citriodora*.

Cuadro No.4 Pruebas Fitoquímicas Preliminares realizadas en el Extracto Etanólico de la Oleorresina del *Eucalyptus citriodora*.

SUSTANCIA	PRUEBA	RESULTADOS
Glicósidos Saponínicos	Lieberman-Burchard	+
	Salkowski	+
	Método de Espuma	-
Glicósidos Flavonoides	Prueba de Shinoda	+
Glicósidos Antraquinónicos	Bornträger	+
Glicósidos Cardiotónicos	Keller.Killiani	+
	Lieberman-Burchard	+
	Kedde	+
	Legal	+
Sesquiterpenlactonas	Baljet	+
	Legal	+
Taninos	Cloruro Férrico 5%	+
	Solución de Gelatina 2%	+
	Subacetato de Plomo 5%	+
	Dicromato de Potasio 5%	+
	Sulfato de Atropina 5%	+
	Agua de Bromo 2%	+
Alcaloides	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Wagner	-

(+) = Positivo

(-) = Negativo

- Resultados del Análisis Fitoquímico Preliminar.

Al extracto etanólico de la oleorresina del *Eucalyptus citriodora* (eucalipto), se les realizó el análisis fitoquímico preliminar, mediante pruebas cualitativas de coloración y precipitación para la identificación de sustancias activas:

Glicósidos Saponínicos: De las tres pruebas químicas realizadas, las de Salkowski y Liebermann-Burchard resultaron positivas, ambas identifican la presencia de la base esteroidal del Ciclopentanoperhidrofenantreno, pero la prueba de la Espuma dio negativa por lo tanto se confirma la ausencia de Saponinas en la oleorresina, por ser esta prueba clave en la detección de las misma. La presencia de la base esteroidal se debe a los glicósidos Cardiotónicos encontrados.

Para Glicósidos Flavonoides, Antraquinonas, Glicósidos Cardiotónicos, y Sesquiterpenlactonas todas las pruebas realizadas resultaron positivas, por lo que se confirma la presencia de éstas en la oleorresina del eucalipto.

En la determinación de Taninos, en todas las pruebas se obtuvieron los resultados esperados, ya que en las pruebas de precipitación o coloración, indica presencia de Taninos catecólicos.

No obstante para los alcaloides donde las cuatro pruebas de precipitación resultaron negativas, significa que están ausentes en la oleorresina o se encuentran en una concentración tan baja que habría que hacer un análisis químico más fino para obtener datos más significativos.

5.3 Determinación de la concentración a la cual se encuentra el extracto madre por el método gravimétrico.

Procedimiento: Este método se basa en diferencias de peso, el cual se lleva a cabo de la siguiente manera:

Se coloca la cápsula de porcelana en una estufa calibrada a 105°C por 1 hora. Retirar la cápsula y dejar enfriar por 30 minutos en un desecador que contenga sílica gel, luego se pesa la cápsula y se registra el peso. Con una pipeta volumétrica se miden 5.0 mL de extracto madre y se adicionan a la cápsula, pesar la cápsula con los 5.0 mL del extracto. Secar el extracto en la estufa a 105°C durante 2 horas. Enfriar el extracto en el desecador, durante 30 minutos. Pesar la cápsula con el extracto seco y anotar el resultado. ⁽²²⁾

Para la determinación de la concentración del extracto madre se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración madre} = \frac{\text{Peso cápsula muestra secada} - \text{peso cápsula vacía}}{\text{Peso cápsula muestra sin secar} - \text{Peso cápsula vacía}} \times 100$$

CÁLCULOS

DATOS:

1. Peso de cápsula vacía = 66.3880 g
2. Peso de cápsula + muestra (5.0 mL) = 71.5625 g
3. Peso de cápsula + muestra secada = 68.4535 g

$$\text{Concentración extracto madre} = \frac{(3 - 1)}{(2 - 1)} \times 100$$

$$\text{Concentración extracto madre} = \frac{(68.4535 - 66.3880)}{(71.5625 - 66.3880)} \times 100$$

$$\text{Concentración extracto madre} = \frac{2.0655}{5.1745} \times 100$$

$$\text{Concentración extracto madre} = 39.91\%$$

Expresada en gramos por mililitros de Extracto:

$$P / V = \frac{\text{Peso de muestra desecada}}{5 \text{ mL}}$$

$$P / V = \frac{2.0655 \text{ g}}{5 \text{ mL}}$$

$$P / V = 0.4131 \text{ g/mL}$$

La cantidad de extracto madre obtenida fue de 280 mL de 240 g de oleorresina,
por lo que:

$$\begin{array}{r} 0.4131 \text{ g} \quad \text{_____} \quad 1 \text{ mL} \\ \times \quad \text{_____} \quad 280 \text{ mL} \\ \hline x = 115.668 \text{ g} \end{array}$$

$$0.4131 \text{ g} \text{ ————— } 1 \text{ mL}$$

$$x \text{ ————— } 100 \text{ mL}$$

$$x = 41.31\% \text{ P/V}$$

La concentración del extracto madre obtenido fue de 41.31% P/V.

Rendimiento (R):

$$R = \frac{115.668 \text{ g}}{240 \text{ g}} \times 100$$

$$R = 48.195 \%$$

Conociendo la concentración del extracto madre se procedió a realizar las diluciones siguientes: 30%, 20%, 15% y 7.5%, utilizando la fórmula $C_1 V_1 = C_2 V_2$.

PROCEDIMIENTO

CÁLCULOS:

EXTRACTO AL 30%

DATOS: $C_1 = 41.31\%$

$$V_1 = X$$

$$C_2 = 30\%$$

$$V_2 = 50 \text{ mL}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

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

$$V_1 = \frac{(30\%) (50 \text{ mL})}{41.31\%} = 36.31 \text{ mL de extracto madre}$$

La preparación de la dilución del extracto madre para una concentración al 30% se realizó de la siguiente manera: Utilizando una bureta volumétrica, se adicionaron 36.31 mL de extracto madre en un balón volumétrico de 50.0 mL, que se aforó con alcohol etílico al 93 %. Luego se homogenizó la solución. Para el resto de las diluciones que se elaboraron, se realizó el mismo procedimiento, lo único que varió fue la cantidad de extracto madre. ⁽²²⁾

CUADRO No.5 Volumen de extracto madre necesario para llevar a concentración de trabajo.

CONCENTRACIÓN FINAL (C ₂)	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO MADRE (C ₁)	VOLUMEN FINAL (V ₂)	VOLUMEN DE EXTRACTO MADRE PARA LLEVAR A CONCENTRACIÓN FINAL (V ₁)
EXTRACTO AL 30%	41.31%	50 mL	36.31 mL de extracto madre
EXTRACTO AL 20%	41.31%	50 mL	24.20 mL de extracto madre
EXTRACTO AL 15%	41.31%	50 mL	18.15 mL de extracto madre
EXTRACTO AL 7.5%	41.31%	50 mL	9.1 mL de extracto madre

5.4 Resultados de la Evaluación Microbiológica.

5.4.1 Pruebas de Identificación de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.

Cuadro No. 6 Resultado de las Pruebas de identificación del *Staphylococcus aureus*. (ver anexo No.6 y 9)

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

- Resultados de las pruebas de identificación de las cepas.

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

Morfología Macroscópica: La bacteria después de sembrarse en medio selectivo de Agar Chapman mostró colonias cremosas, de color amarillo dorado, también se sembró en Agar Bair-Parker donde se observó colonias de color negro.

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

En las pruebas de Identificación y Diferenciación: De la Catalasa y Coagulasa resultaron positivas, asegurando así la identificación del ***Staphylococcus aureus***.

Cuadro No. 7 Resultado de las características microscópica y macroscópica de la *Pseudomona aeruginosa*. (ver anexo No.6)

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

Cuadro No. 8 Resultado de las Prueba de identificación y diferenciación de *Pseudomona aeruginosa*. (ver anexo No.11)

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	RESULTADO
TSI	K / K
Citrato	+
Indol	-
Rojo de metilo	-
Voges proskauer	-
Movilidad	+

K / K = Pico de flauta alcalina / Profundidad alcalina

(+) = Positivo

(-) = Negativo

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

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

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

En las pruebas de identificación y Diferenciación: Se realizaron las pruebas bioquímicas donde la pruebas de TSI dio como resultado K / K bisel alcalino y fondo alcalino; la prueba de movilidad y citrato dieron positivas, las cuales confirman que la bacteria analizada se encuentra en óptimas condiciones y sin contaminación de otro microorganismo.

Cuadro No. 9 Resultado de las Pruebas de identificación del ***Streptococcus pyogenes***. (ver anexo No.6 y 12)

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

Identificación de ***Streptococcus pyogenes***.

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

Morfología Microscópica: Al realizar una preparación de la coloración al Gram de la bacteria, en el microscopio se observan bacterias en forma de cocos,

unidos en cadenas cortas, de color azul oscuro, lo que indica que es Gram positivo.

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

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL DE INHIBICIÓN

Cuadro No.10 Resultados de la evaluación microbiológica, de las diferentes concentraciones del extracto de la oleoresina por el método de Kirby Bauer Modificado para el ***Staphylococcus aureus***.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO % V / V	RESULTADOS LECTURA DE PLACAS
EXTRACTO AL 41.31 %	Formación de halo entre 18 a 23 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 30 %	Formación de halos entre 18 a 21 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 20 %	Formación de halos de entre 19 a 21 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 15 %	Formación de halos entre 19 a 21 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 7.5 %	Formación de halos entre 15 a 16 mm de diámetro. MO Susceptible
BLANCO: ETANOL AL 93 %	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa. MO resistente
PATRÓN: YODO AL 2%	Formación de halos de 23 mm de diámetro. MO susceptible
PATRÓN: DISCO DE ANTIBIÓTICO DE PENICILINA 10 Unidades	Formación de halo de 29 mm de diámetro. MO Susceptible
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

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

- Resultados de la Evaluación Microbiológica, del extracto de la oleorresina del ***Eucalyptus citriodora*** (eucalipto), por el método de Kirby Bauer Modificado con ***Staphylococcus aureus***.

Según el cuadro de resultados se considera la bacteria Susceptible en extracto etanólico concentrado y sus diluciones, ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición.

Para confirmar el efecto antibacteriano del extracto etanólico y sus diluciones se determina que este se debió a la oleorresina y no al alcohol etílico 93%, ya que se llevó un blanco de éste. Presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que el ***Staphylococcus aureus***, es resistente al alcohol etílico.

A modo de comparación entre la oleorresina y sustancias de conocida actividad antibacteriana, se llevaron como patrón: Solución de Yodo 2% y Disco de Antibiótico (Penicilina), en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antibacteriana del Yodo y la Penicilina, en comparación con el extracto madre y sus diluciones.

También se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, en la primera se observó un crecimiento en toda la placa y en el segundo no, lo que indica que la bacteria no está contaminada.

Cuadro No.11 Resultados de la evaluación microbiológica, de los diferentes extractos de la oleoresina por el método de Kirby Bauer modificado *Pseudomona aeruginosa*.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO % V / V	RESULTADOS LECTURA DE PLACAS
EXTRACTO AL 41.31 %	Formación de halos de 28 a 30 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 30 %	Formación de halos de 28 a 30 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 20 %	Formación de halos de 28 a 30 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 15 %	Formación de halos de 26 a 28 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 7.5 %	Formación de halos de 26 a 28 mm de diámetro. MO Susceptible
BLANCO: ETANOL AL 93 %	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa. MO Resistente
PATRÓN: YODO AL 2%	Formación de halos de 26 mm de diámetro. MO Susceptible
PATRÓN :DISCO DE ANTIBIÓTICO DE GENTAMICINA 10 µg	Formación de halo de 16 mm de diámetro. MO Susceptible
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa.
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

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

- Resultados de la Evaluación Microbiológica, del extracto de la oleorresina del ***Eucalyptus citriodora*** (eucalipto), por el método de Kirby Bauer Modificado en ***Pseudomona aeruginosa***.

Según el cuadro de resultados se considera la bacteria Susceptible en extracto etanólico concentrado y sus diluciones, ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición.

Para confirmar el efecto antibacteriano del extracto etanólico y sus diluciones se determina que este se debió a la oleorresina y no al alcohol etílico 93%, ya que se llevó un blanco de éste. Presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que la ***Pseudomona aeruginosa***, es resistente al alcohol etílico.

A modo de comparación entre la oleorresina y sustancias de conocida actividad antibacteriana, se llevaron como patrón: Solución de Yodo 2% y Disco de Antibiótico (Gentamicina), en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antibacteriana del Yodo y la Gentamicina, en comparación con el extracto madre y sus diluciones.

También se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, en la primera se observó un crecimiento en toda la placa y en el segundo no, lo que indica que la bacteria no está contaminada.

Cuadro No.12 Resultados de la evaluación microbiológica, de los diferentes extractos de la oleorresina por el método de Kirby Bauer modificado *Streptococcus pyogenes*.

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO % V / V	RESULTADOS LECTURA DE PLACAS
EXTRACTO AL 41.31 %	Formación de halos de 25 a 28 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 30 %	Formación de halos de 24 a 27 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 20 %	Formación de halos de 22 a 26 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 15 %	Formación de halos de 15 a 25 mm de diámetro. MO Susceptible
EXTRACTO AL 7.5 %	Formación de halos de 20 a 23 mm de diámetro. MO Susceptible
BLANCO: ETANOL AL 93 %	No hay formación de halos. Crecimiento en toda la placa. MO Resistente
PATRÓN: YODO AL 2%	Formación de halos de 19 a 26 mm de diámetro. MO Susceptible
PATRÓN: DISCO DE ANTIBIOTICO DE AMOXICILINA 10 µg	Formación de halo de 28 mm de diámetro. MO Susceptible
PLACA CONTROL POSITIVO	Crecimiento total en toda la placa
PLACA CONTROL NEGATIVO	No hay crecimiento en la placa

MO: Microorganismo

SUSCEPTIBLE: Formación de halo de inhibición alrededor del cilindro.

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

- Resultados de la Evaluación Microbiológica, del extracto de la oleorresina del ***Eucalyptus citriodora*** (eucalipto), por el método de Kirby Bauer Modificado en ***Streptococcus pyogenes***.

Según el cuadro de resultados se considera la bacteria Susceptible en extracto etanólico concentrado y sus diluciones, ya que hay formación de halos con medidas considerables de inhibición.

Para confirmar el efecto antibacteriano del extracto etanólico y sus diluciones se determina que este se debió a la oleorresina y no al alcohol etílico 93%, ya que se llevó un blanco de éste. Presentando crecimiento abundante en toda la placa sin zona de inhibición, por lo que el ***Streptococcus pyogenes***, es resistente al alcohol etílico.

A modo de comparación entre la oleorresina y sustancias de conocida actividad antibacteriana, se llevaron como patrón: Solución de Yodo 2% y Disco de Antibiótico (Amoxicilina), en cuyas placas hubo formación de halos de inhibición, haciendo notar la actividad antibacteriana del Yodo y la Amoxicilina, en comparación con el extracto madre y sus diluciones.

También se llevaron placas de control de crecimiento positivo y negativo, en la primera se observó un crecimiento en toda la placa y en el segundo no, lo que indica que la bacteria no está contaminada.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. De acuerdo al análisis fitoquímico preliminar de color y precipitación realizado al extracto etanólico de la oleorresina de ***Eucalyptus citriodora***, se encontraron presentes los siguientes principios activos: Glicósidos Flavonoides, Glicósidos Antraquinónicos, Glicósidos Cardiotónicos, Sesquiterpenlactonas y Taninos.
2. De los compuestos químicos encontrados las Sesquiterpenlactonas, Taninos, y Flavonoides actúan sinérgicamente presentando actividad antimicrobiana.
3. Tomando en cuenta los resultados de las pruebas de susceptibilidad microbiana, la inhibición del crecimiento de las cepas, probablemente se deba al contenido de taninos, sesquiterpenlactonas y flavonoides ya que son astringentes y antisépticos.
4. En la evaluación microbiológica del extracto etanólico de la oleorresina de ***Eucalyptus citriodora*** y sus diferentes diluciones, los tres microorganismos resultaron susceptibles ya que presentaron halos de inhibición en el rango de susceptibilidad, frente al blanco resultaron

resistentes, lo que indica que el efecto antibacteriano se debe a las sustancias extraídas de la oleorresina y no del etanol al 93%.

5. Los extractos etanólicos de la oleorresina de *Eucalyptus citriodora* a concentraciones de 41.31%, 30%, 20%, 15% y 7.5% se asemeja al patrón de comparación, disco de antibiótico de Amoxicilina 10 µg. utilizado contra *Streptococcus pyogenes*.
6. Los halos de inhibición que presentaron los extractos etanólicos de la oleorresina de *Eucalyptus citriodora* a concentraciones de 41.31%, 30%, 20%, 15% y 7.5% frente a la *Pseudomona aeruginosa* son mayores que los establecidos para el patrón de comparación utilizado (disco de antibiótico de Gentamicina 10 µg), por lo cual los extractos a esas concentraciones pueden ser más efectivos al tratamiento contra *Pseudomona aeruginosa*.
7. La especie vegetal estudiada en su mayoría posee propiedad antibacteriana que se relaciona con su composición química determinada, ya que las plantas son una fuente natural de principios activos útiles para el tratamiento y curación de enfermedades.

8. A través de los resultados obtenidos se confirma la hipótesis planteada en el diseño metodológico, ya que el extracto etanólico de la oleorresina de ***Eucalyptus citridora*** en las concentraciones de 41.31%, 30%, 20%, 15% y 7.5% posee actividad antibacteriana contra las bacterias analizadas.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Para que la población obtenga beneficios del extracto etanólico de la oleoresina de *Eucalyptus citriodora* se debe de normalizar las concentraciones para poder formular un producto farmacéutico, y dar nuevas y mejores alternativas medicinales.
2. Fomentar el cultivo de esta especie vegetal, ya que se comprobó su efecto antibacteriano, además se debe llevar un desarrollo ordenado de las plantaciones de eucalipto, por ser un árbol que absorbe mucho agua lo que ocasiona la aridez de los suelos, esto con el fin de no provocar un impacto ambiental negativo en la zona de siembra.
3. Realizar un análisis cuali-cuantitativo más detallado de esta especie vegetal que permita la identificación, separación, purificación y cuantificación de los compuestos activos responsables de la actividad antibacteriana.
4. En base a los resultados, se recomienda posteriores investigaciones para elaborar productos fitofarmacéuticos, que ayuden al tratamiento de infecciones causadas por los microorganismos evaluados como una

alternativa natural de la medicina, a los cuales además se les realicen sus estudios de estabilidad y su etapa clínica.

5. Previo a la evaluación de susceptibilidad se recomienda siempre realizar un estudio macro y microscópico de las cepas, esto con el fin de verificar la pureza de las mismas.
6. Se deberán hacer algunas modificaciones con la viscosidad adecuada del extracto, para ser utilizada en la técnica microbiológica, en las investigaciones futuras y así evitar los inconvenientes que se presentaron como fue la difusión del extracto desde los cilindros hacia las placas.
7. Realizar nuevas investigaciones del extracto etanólico de la oleorresina del ***Eucalyptus citriodora*** sobre otros microorganismos, para ampliar su utilización en diferentes afecciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarado Ramírez, R. E. 2003. Investigación de la actividad microbiana de 25 extractos de especies vegetales utilizadas por la población materno-infantil. Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A. Pág. 44
2. Beatty, W. K. 1993. Diccionario de ciencias médicas. 25^a ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. Pág. 37, 69, 163, 165 y 438.
3. Brock, T. D & Madigan, V. M. 1987. Microbiología. 4^a ed. México. Prentice – Hall. Pág. 906
4. Domínguez, A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. 9^a ed. México. Editorial Limusa. Págs. 84 – 153.
5. Evans, W. C. Trease, G. E. 1991. Farmacognosia. 13^a ed. Editorial Interamericana McGraw – Hill. México. Pág. 519-540, 901.
6. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Microbiología y Parasitología. 1994. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
7. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Farmacognosia. 2004. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.

8. Facultad de Química y Farmacia. Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada III. 2001. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
9. Font Quer, P. 1993. Diccionario Botánico. 9^a reimpresión. Barcelona. Editorial Labor S. A. Tomo 1. Pág. 326, 365, 941.
10. Freman, B. A. 1984. Tratado de Microbiología de Burrows. 21^a ed. México, D.F. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V. Pág. 446, 447.
11. Gilg, Ernesto. 1926. Farmacognosia. Traducido de la 3^a ed. Alemania. Editorial Labor S.A. Barcelona, España. Pág. 240-241.
12. Guzmán, D. J. 1975. Especies Útiles de la Flora Salvadoreña. Médico Industrial. Ministerio de Educación. San Salvador, El Salvador. Impreso en los talleres de la Dirección de Publicaciones.
13. Jawets, E, y otros. 1992. Microbiología Médica. 14^a ed. México, D.F. Editorial Manual Moderno.
14. Koneman, E. W. y Otros. 1992. Diagnostico Microbiológica. 3^a ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana S. A.. Pág. 565-604.
15. Martínez Guerrero, R. E. Quinteros M. T. 2003. Comprobación de la actividad antimicótica in-vitro de la tintura elaborada con oleorresina de Eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). Trabajo de Graduación. Facultad de

Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.

16. Mena Zablah, M. L. 1997. Estudio sobre las propiedades antifungicas de *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) en *Candida albicans*. Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador, C. A.
17. Merck. 1994. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt. Alemania. Pág. 74, 127,144, 807.
18. Organización de los Estados Americanos (OEA), Universidad de El Salvador (UES), Ministerio de Salud Publica y Asistencia social (MSPAS). Planter. 1994. Obtención y Aprovechamiento de Extractos Vegetales de La Flora Salvadoreña. 2^a ed. San Salvador. Editorial Universitaria. Pág. 354-355.
19. Pelczar, M. J. y otros. 1992. Microbiología. 4^a ed. México, D. F. Editorial McGraw-Hill. Pag. 206-271.
20. Real Academia Española. 1970. Diccionario de la Lengua Española. 19^a ed. Madrid. Editorial Espasa-Calpe, S.A. Pág. 940.
21. Remington. 1998. Farmacia. 19^a ed. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Tomo I y II.
22. Skoog, D. A. y Otros. 2001. Química Analítica. 7^a ed. México D.F. Editorial McGraw-Hill.

23. United States Pharmacopeial Convention USP 25. NF 20. 2002. The Official Compendia of Standards. 25^a Revisión (USP) y 20^a ed. (NF)., Inc. Canadá. Pág 883, 2221 y 2234.
24. www.Botanical.com/botanical/mgmh/eucaly14.html
25. www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/kings/pterocarpus_mars.html
26. <http://www.inc.org/rial/div/britania/a205.html>
27. www.naturamedic.com/eucalipto.htm
28. <http://personales.ya.com/erfac/practi/microbi1.html>
29. <http://www.sbg.org.br/ranteriors/a205.html>
30. www.upm.edu/biology/cursos/micro/pruebas

GLOSARIO (2, 9, 11, 20,21,)

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

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

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

Asepsia: Una condición libre de microorganismos patógenos viables.

Antiséptico: Sustancia que sirve para lograr la desinfección.

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

Dermatitis: Diversas afecciones de la piel.

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

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

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

Febrífugo: Agente que tiende a reducir la fiebre.

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

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

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

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

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

ANEXOS

ANEXO No. 1



Figura No. 1. Árbol de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto) exudando oleorresina

ANEXO No.1 Continuación



Figura No. 2. Árbol de *Eucalyptus citriodora* (Eucalipto)

ANEXO No. 2



Figura N. 3. Aparato Soxlhet



Figura No. 4. Flash evaporator (rotavapor)

ANEXO No. 3

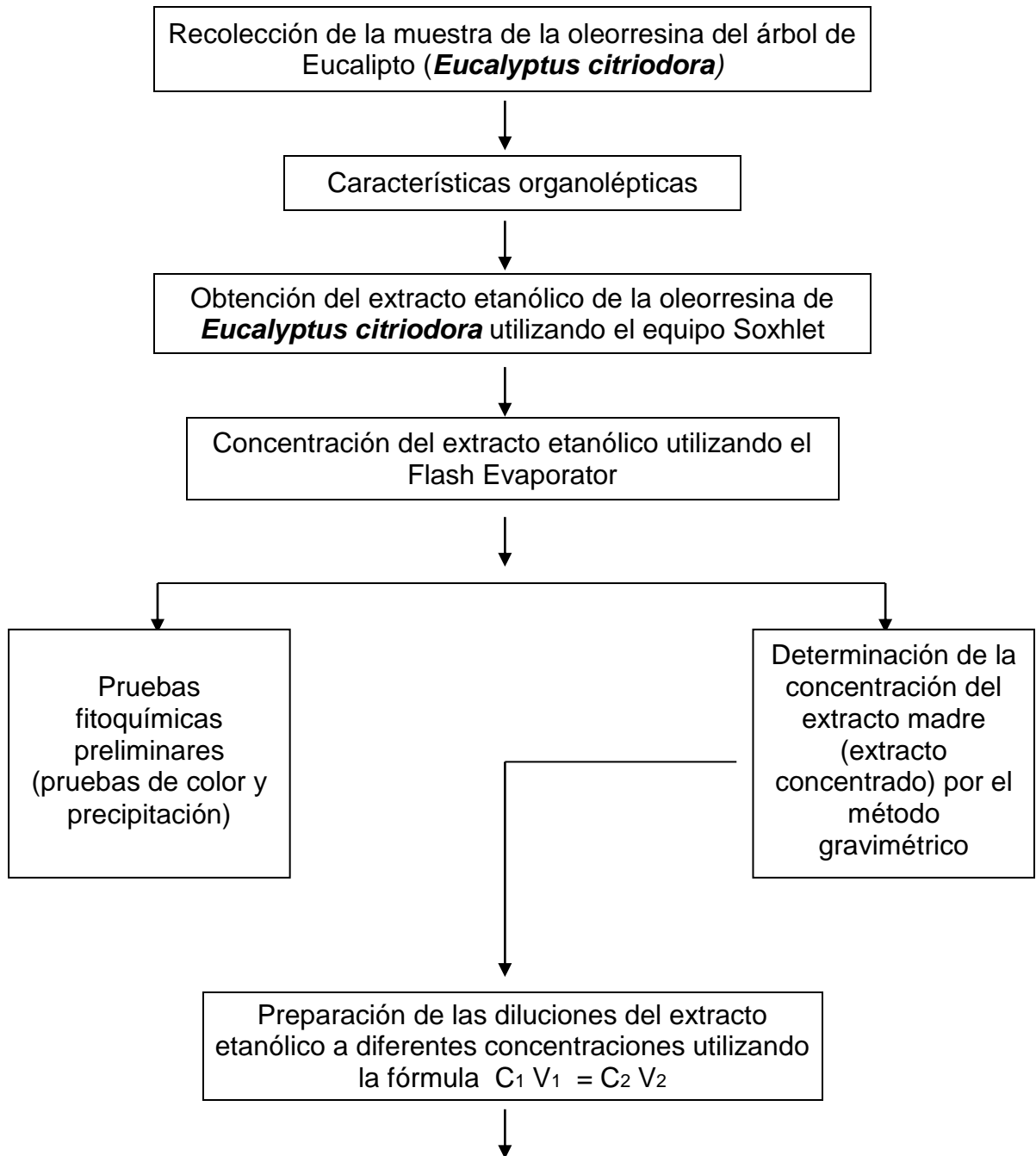


Figura No. 5. Diagrama de la Metodología General de Trabajo.

ANEXO No. 3 Continuación

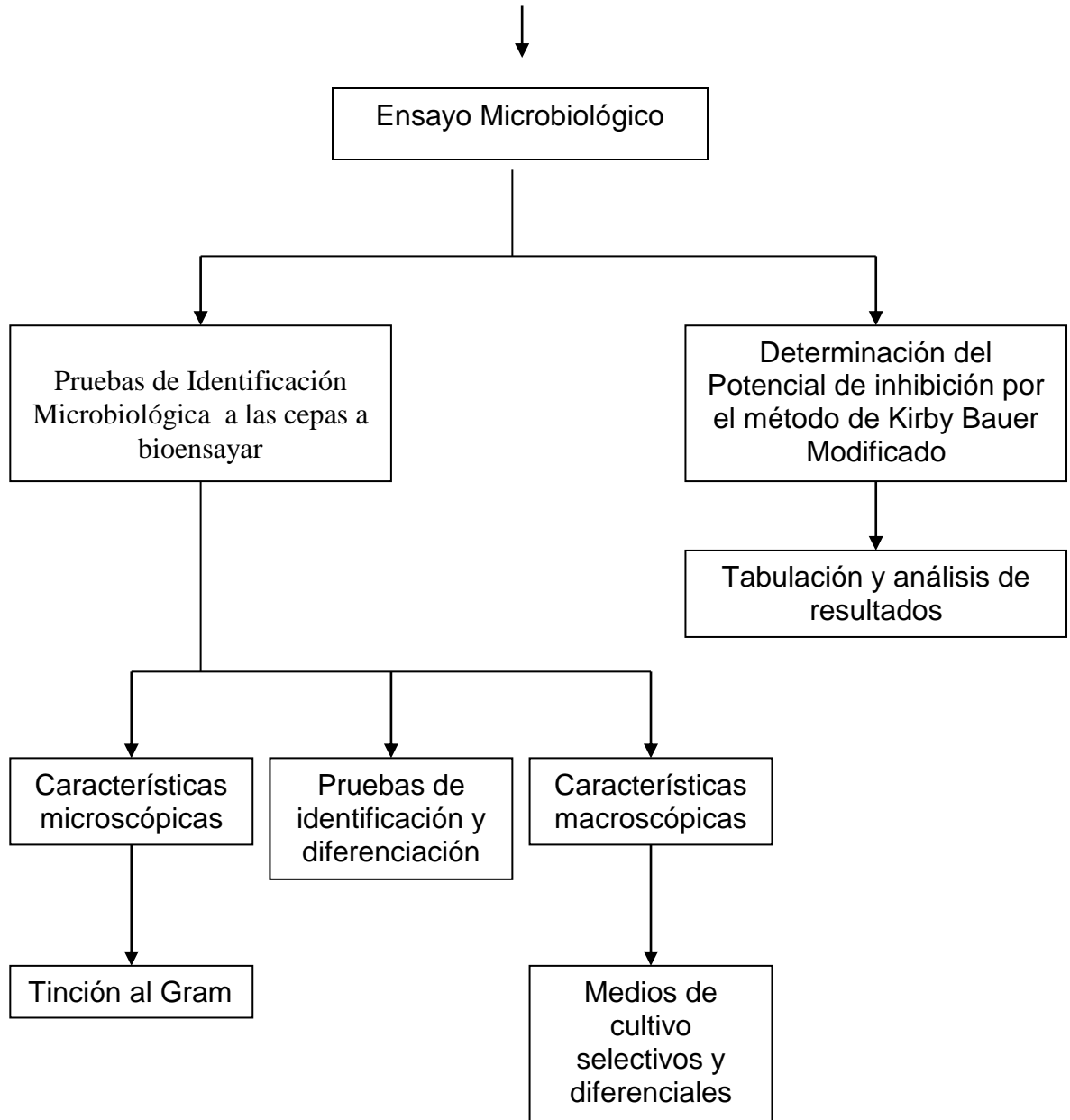


Figura No. 5. Diagrama de la Metodología General de Trabajo

CUADRO No. 13 PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES (4, 7)

SUSTANCIA	PRUEBA	PROCEDIMIENTO	RESULTADO ESPERADO
Glicósidos saponínicos	Liebertmann-Burchard	10 mL de extracto +5 mL H ₂ SO ₄ diluido hervir 10 minutos y enfriar. Agregar 20 mL de cloroformo y agita. Concentrar hasta 2 mL el extracto clorofórmico y agregar 1 mL de anhídrido acético + 3 gotas H ₂ SO ₄]	Saponinas esferoidales: coloración violeta. Saponinas triterpenoides: Coloración verdosa.
	Salkowski	3mL de extracto + 5 gotas de H ₂ SO ₄] gota a gota por las paredes	Cambio de color inmediato. Formación de un anillo de color rojo.
	Método de la espuma	1 gramo de muestra + 5 mL H ₂ O destilada, agitar por 30 segundos y dejar reposar.	Formación de espuma de 3cm. arriba de la superficie del líquido que persiste por más de 15 minutos.
Glicósidos flavonoides	Shinoda	5 mL de extracto + trocito de Mg ⁰ + 1 mL HCL]	Coloración anaranjada, roja, roja azulosa o violeta.
Glicósidos antraquinónicos	Bornträger	Evaporar a sequedad 15 mL de extracto + 30 mL de H ₂ O destilada. Filtrar. Extracto + 10 mL de Benceno. Tomar capa bencénica y agregar 5 mL de amoníaco.	Coloración roja, rosa o violeta

ANEXO No. 4

CUADRO No. 13 PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES (4, 7)

SUSTANCIA	PRUEBA	PROCEDIMIENTO	RESULTADO ESPERADO
Alcaloides	Reacciones de precipitación con:		
	Dragendorff	Agregar gotas del reactivo de Dragendorff a 2 mL del extracto	Precipitado anaranjado
	Mayer	Agregar gotas de reactivo de Mayer a 2 mL del extracto	Precipitado blanco
	Wagner	Agregar gotas de reactivo de Wagner a 2 mL de extracto	Precipitado rojo
Glicósidos cardiotónicos	Legal	Llevar a sequedad 1-2 mL de extracto, agregar 3 gotas de Piridina, 2 gotas de Nitroprusiato de sodio al 0.5 % y 3 gotas de NaOH 2N	Color rojo intenso
	Keller-Killiani	Evaporar a sequedad 2 mL de extracto, agregar 2 mL de reactivo de Keller y gotas de reactivo de Killiani	Coloración roja
	Kedde	Evaporar en baño de maría 2 mL de extracto, agregar 2 mL de Alcohol, 1 mL de sln. alcohólica de NaOH 1N y 2 mL de sln. de ácido 3,5 Dinitrobenzónico en etanol al 2%	Coloración purpura
	Liebermann-Burchard	A 2 mL de extracto agregar 1 mL de Cloroformo, agitar suavemente y añadir 1 mL de anhídrido acético y 3 gotas de H ₂ SO ₄ []	Formación de un anillo violeta

ANEXO No. 4 Continuación

CUADRO No. 13 PROCEDIMIENTOS DE PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES. (4, 7)

SUSTANCIA	PRUEBA	PROCEDIMIENTO	RESULTADO ESPERADO
Sesquiterpenlactonas	Legal	2 mL de extracto + 3 gotas de Piridina + 5 gotas de Nitroprusiato de sodio al 0.5 % + gotas de NaOH 2N	Coloración rosa
	Baljet	2 mL de extracto + 4 gotas de reactivo formado por volúmenes iguales de sln. A (Ácido pícrico en sln. etanólica) y sln. B (Hidróxido de sodio en sln, acuosa)	Anillo anaranjado o rojo oscuro
Taninos	Cloruro férrico 5%	2 mL de extracto + 3 gotas de Cloruro férrico 5%	Coloración negro azulado o verdoso
	Precipitación de proteínas	2 mL de extracto + 2 mL de sln. de Gelatina 2%	Precipitado beige
	Subacetato de plomo 5%	2 mL de extracto + 2 mL de Subacetato de plomo 5%	Precipitado coloidal beige
	Dicromato de potasio 5%	2 mL de extracto + 2 mL de Dicromato de potasio 5%	Precipitado café pardo
	Precipitación de Alcaloides	2 mL de extracto + 2 mL de Sulfato de atropina 5%	Precipitado blanco
	Agua de Bromo 2%	2 mL de extracto + 3 gotas de Agua de Bromo	Pirogalotaninos no precipitan, Catecólicos si precipitan

ANEXO No. 4 Continuación

ANEXO No. 5

RESULTADO DE PRUEBAS FITOQUÍMICAS

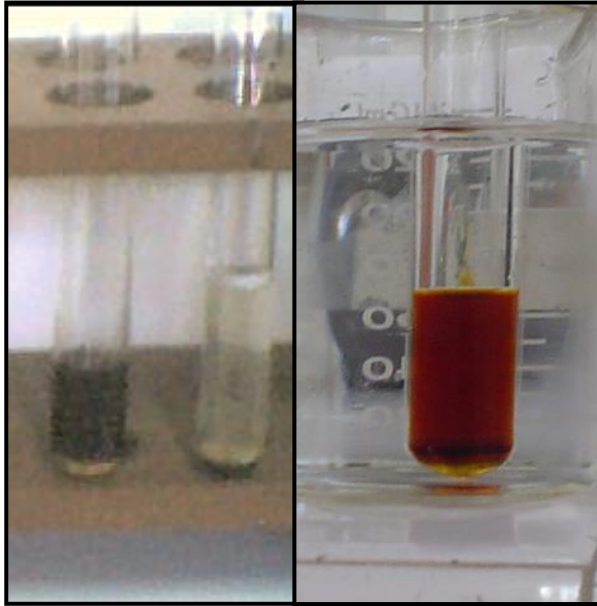


Figura No.6. Prueba de identificación de Saponinas: Liebermann- Burchard, Método de la espuma y Salkoski



Figura No.7. Prueba de Shinoda



Figura No.8. Prueba de Borner

ANEXO No. 5 Continuación
RESULTADO DE PRUEBAS FITOQUÍMICAS



Figura No. 9. Pruebas de identificación de Glicósidos Cardiónicos: Keller-killiani, Liebermann-Burchard y Kedde

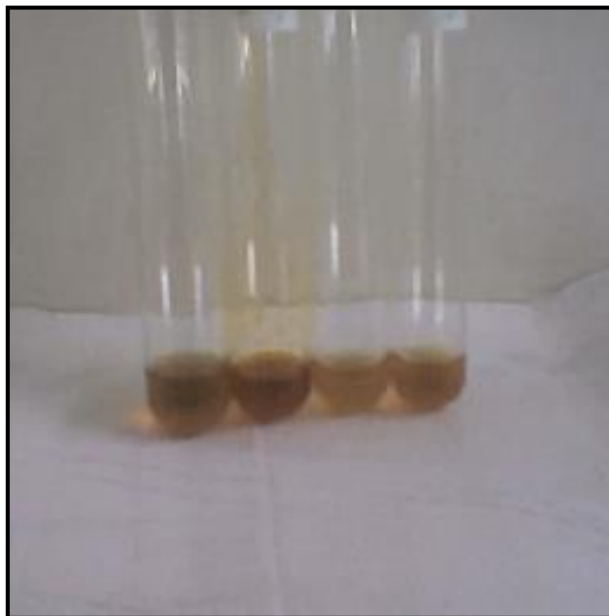


Figura No.10. Prueba de identificación de Alcaloides: Control, Dragendorff, Mayer y Wagner.

ANEXO No. 5 Continuación
RESULTADO DE PRUEBAS FITOQUIMÍCAS

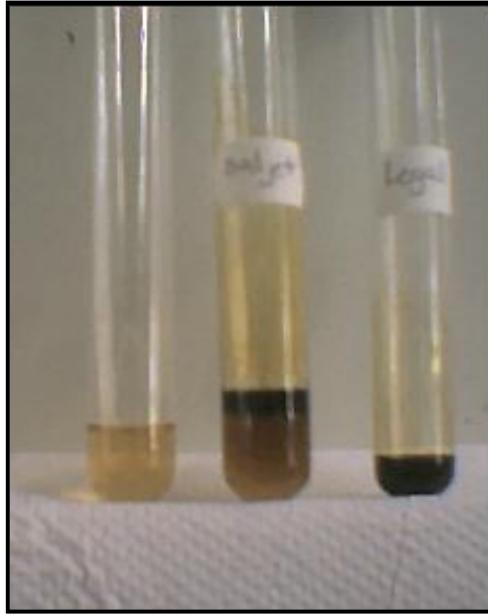


Figura No.11 Pruebas de identificación de Sesquiterpenolactonas: Control, Baljet y Legal

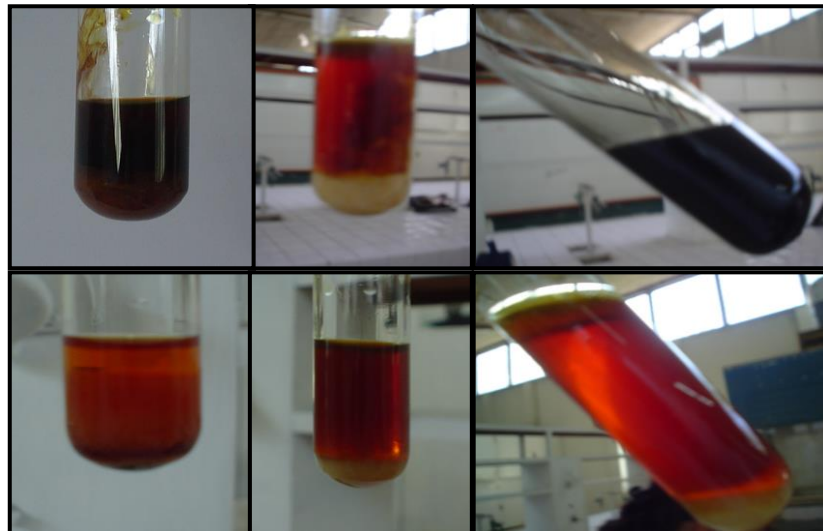


Figura No.12 Pruebas de identificación de Taninos: Dicromato de potasio, Precipitación de proteínas, Cloruro férrico, Agua de bromo, Subacetato de plomo, Precipitación de Alcaloides.

CUADRO No. 14 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LOS MICROORGANISMOS ⁽¹³⁾

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

ANEXO No. 7

RESULTADO DE MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA

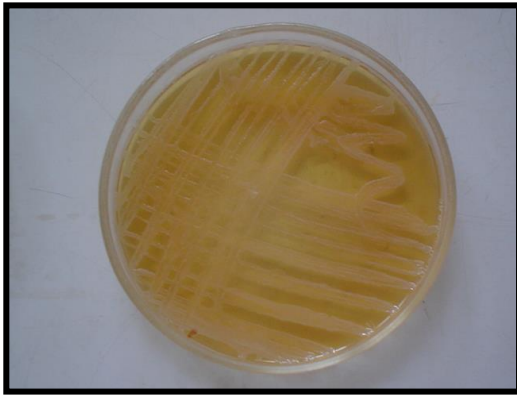


Figura No. 13 *Staphylococcus aureus*
en Agar Chapman



Figura No. 14 *Staphylococcus aureus*
en Agar Bair Parker

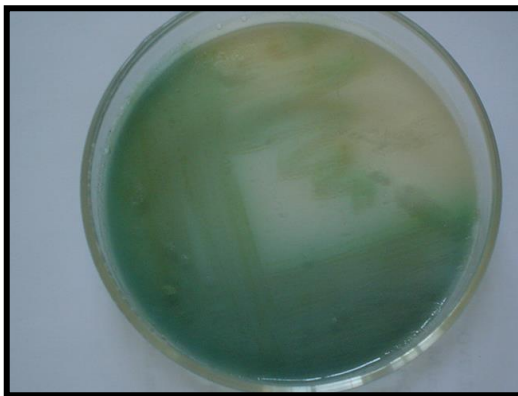


Figura No.15 *Pseudomonas aeruginosa*
en Agar Cetrimide



Figura No. 16 *Streptococcus pyogenes*
en Agar Sangre

ANEXO No. 8 ⁽²⁸⁾

PRUEBAS MICROSCÓPICAS (COLORACIÓN AL GRAM)

Este método hace uso de colorantes orgánicos catiónicos como Cristal Violeta o Safranina con fuerte afinidad por materiales celulares con carga negativa como los ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos.

MÉTODO:

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

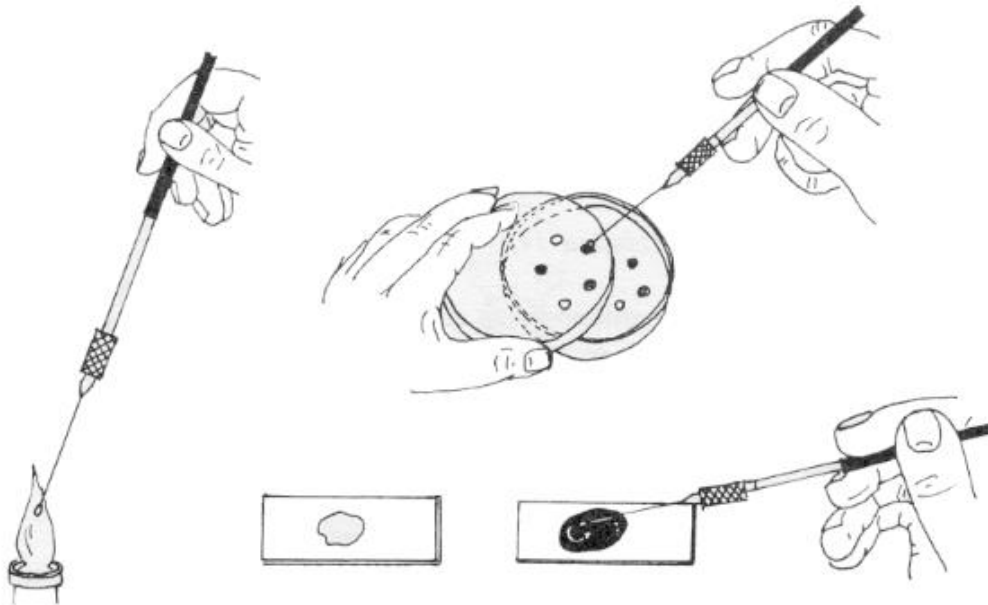


Figura No. 17. Método de extensión

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

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

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

CUADRO No. 15 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN (1)

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Catalasa	Identifica la enzima catalasa que descompone el H ₂ O ₂ , característica que permite diferenciar los <i>Staphylococcus</i> de los <i>Streptococcus</i> .	Colocar una gota de H ₂ O ₂ al 30 % sobre una lámina portaobjeto que contiene una porción de colonia del microorganismo.	Se produce un burbujeo vigoroso de peróxido que indica la presencia de <i>Staphylococcus</i>
	Coagulasa	Evidencia la reacción de coagulación del plasma sanguíneo que produce la enzima.	Colocar 0.5 mL de plasma citratado. Inocular una colonia de microorganismo e incubar a 37 ^o C por 24 horas	Observar coagulación total o parcial del plasma, se interpreta como presencia de coagulasa, enzima característica producida por <i>Staphylococcus aureus</i> .

ANEXO No. 9

ANEXO No. 10

RESULTADO DE PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN

Staphylococcus aureus

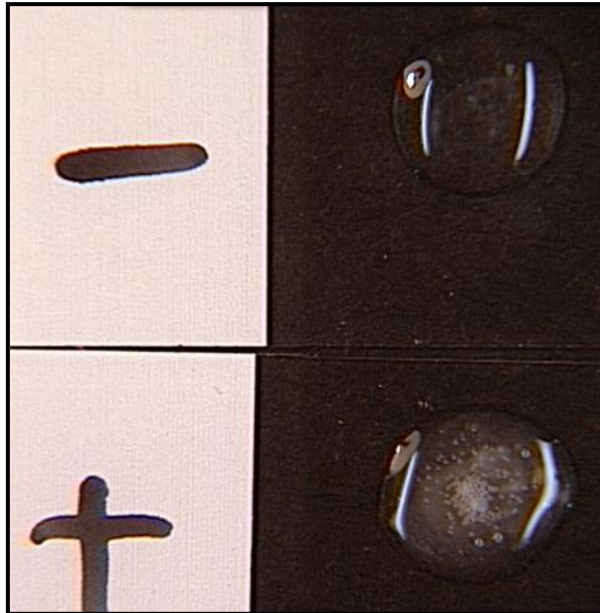


Figura No.18. Prueba de la Catalasa



Figura No. 19. Prueba de la coagulasa

CUADRO No. 16 PRUEBAS BIOQUÍMICAS A REALIZAR ⁽⁶⁾

MICRO - ORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Agar triple azúcar y hierro (TSI)	Mide la fermentación de azúcares a través del pH que cambia de color al acidificarse el medio. Determina la producción de H ₂ , CO ₂ y H ₂ S.	Inocular el medio con cultivo puro, en la superficie inclinada y en el fondo del agar. Se incuban de 24 a 48 horas a 37 °C.	Los MO capaces de fermentar glucosa causan la formación del ácido dentro del agar, los que fermentan la sacarosa y la lactosa causan la formación de ácido en la parte alta del medio. La fractura indica la formación de gas, el medio ennegrecido indica la formación de H ₂ S.
	Citrato	Identifica la utilización del Citrato como fuente de carbono que se visualiza por la elevación del pH del colorante indicador.	Inocular la superficie del medio e incubar 24 horas a 37 °C.	Prueba positiva permite el crecimiento en el medio y el cambio de color es de verde a azul.
	Indol	Caldo de Peptona con alto contenido de triptófano el cual es convertido en Indol.	Inocular el caldo con el MO e incubar de 24 a 48 horas a 37°C. Añadir reactivo de Erlich (P-Dimetil Amino Benzaldehído) por las paredes del tubo y ver la formación de anillo.	Prueba positiva da la formación de anillo violáceo en la interfase que identifica la presencia del Indol.

CUADRO No. 16 PRUEBAS BIOQUÍMICAS A REALIZAR ⁽⁶⁾

MICRO-ORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Rojo de Metilo	Indica fermentadores ácido-mixtos que producen suficiente ácido para disminuir el pH por debajo de 4.3.	Inocular el caldo con el MO en estudio de 24 a 48 horas a 37 °C. Añadir gotas de indicador rojo de metilo.	La aparición de un rojo intenso que se mantiene es inicio de la caída de pH.
	Movilidad	Determina la capacidad de las bacterias de desplazarse en medios sólidos por medio de flagelos peritricos característicos de las Enterobacterias.	Inocular el medio hasta el fondo con el microorganismo con una asa en punta e incubar durante 24 a 48 horas a 37 °C.	Si las bacterias no son móviles, el crecimiento no se difunde más allá de la línea de puntura. Pero si es móvil el crecimiento se difunde visualmente formando turbidez.
	Voges-Proscauer	Determina la presencia de Acetil Carbinol que es una acetona producida por la fermentación de la dextrosa.	Inocular el caldo con el cultivo del MO e incubar de 24 a 48 horas a 37 °C. Añadir gotas de Alfa Naftol, alcohol absoluto y KOH 40 %.	El desarrollo de una coloración roja que perdura de 15 a 30 minutos, indica la presencia de Acetil Carbinol.

ANEXO No.11 Continuación

CUADRO No. 17 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN ⁽²⁶⁾

MICROORGANISMO	PRUEBA	PRINCIPIO	PROCEDIMIENTO	INTERPRETACIÓN
<p align="center"><i>Streptococcus pyogenes</i></p>	<p align="center">Bacitracina</p>	<p>Identifica los estreptococos β-hemolíticos del grupo A. Suelen ser sensibles a bajas concentraciones de Bacitracina.</p>	<p>Inocular por diseminación la superficie de Agar sangre con el microorganismo a prueba, dejar reposar por 15 minutos. Colocar los discos de Bacitracina en la placa inoculada. Incubar a 35-37 °C por 24 horas.</p>	<p>Se considera prueba positiva cuando hay inhibición del desarrollo bacteriano alrededor del disco de Bacitracina.</p>

ANEXO No. 13

RESULTADO DE PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE
Pseudomona aeruginosa y *Streptococcus pyogenes*

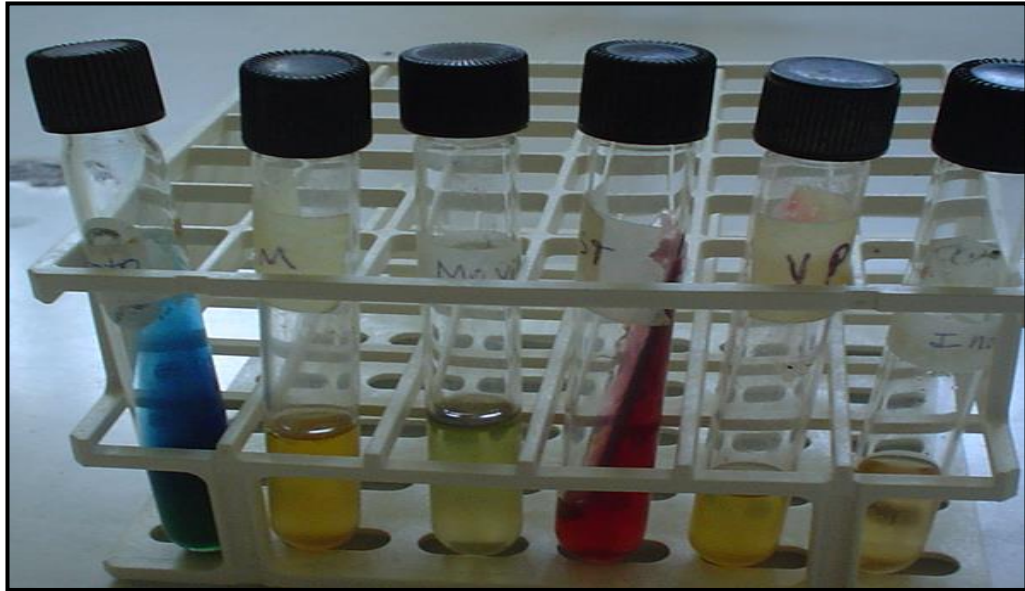


Figura No. 20. Pruebas Bioquímicas: Citrato, Rojo de Metilo, Movilidad, TSI, Voges Proskauer, Indol (*Pseudomona aeruginosa*)

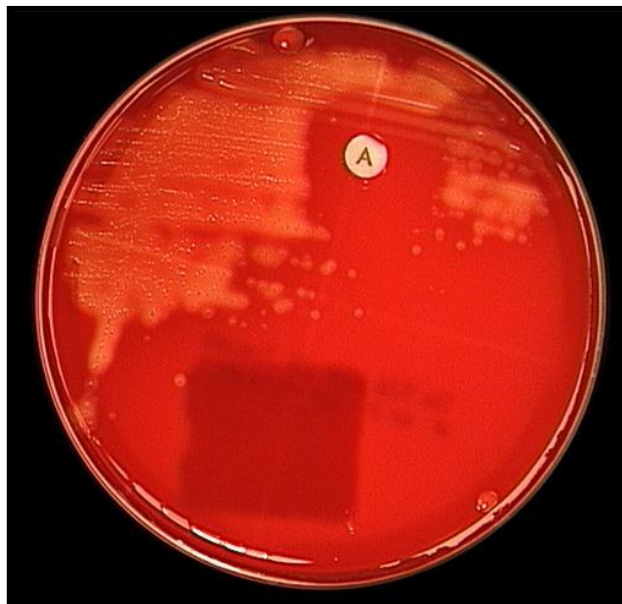


Figura No. 21. Prueba de la Bacitracina (*Streptococcus pyogenes*)

ANEXO No. 14⁽⁶⁾

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE MAC FARLAND

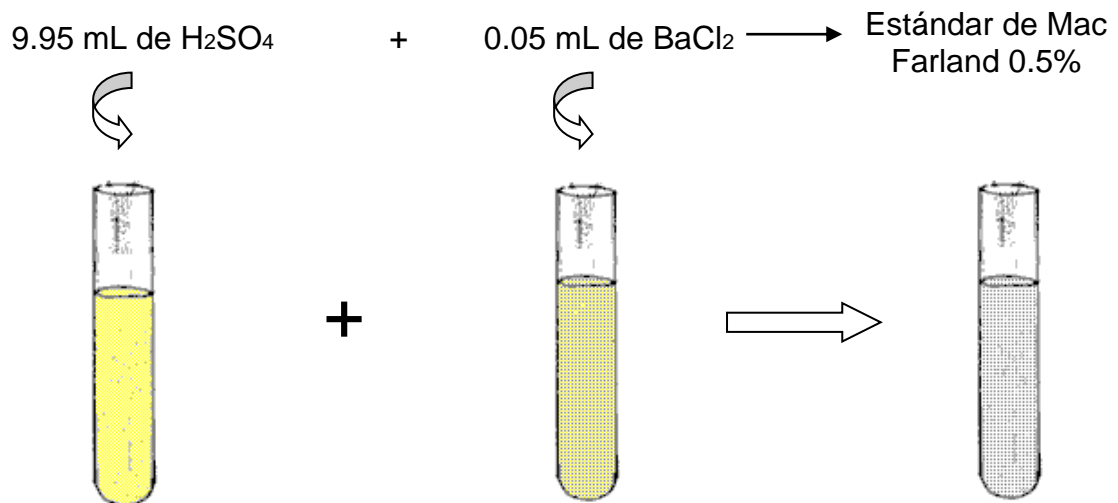


Figura No. 22 Preparación del Estándar de Mac Farland.

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

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

ANEXO No. 15

MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO ⁽²⁸⁾

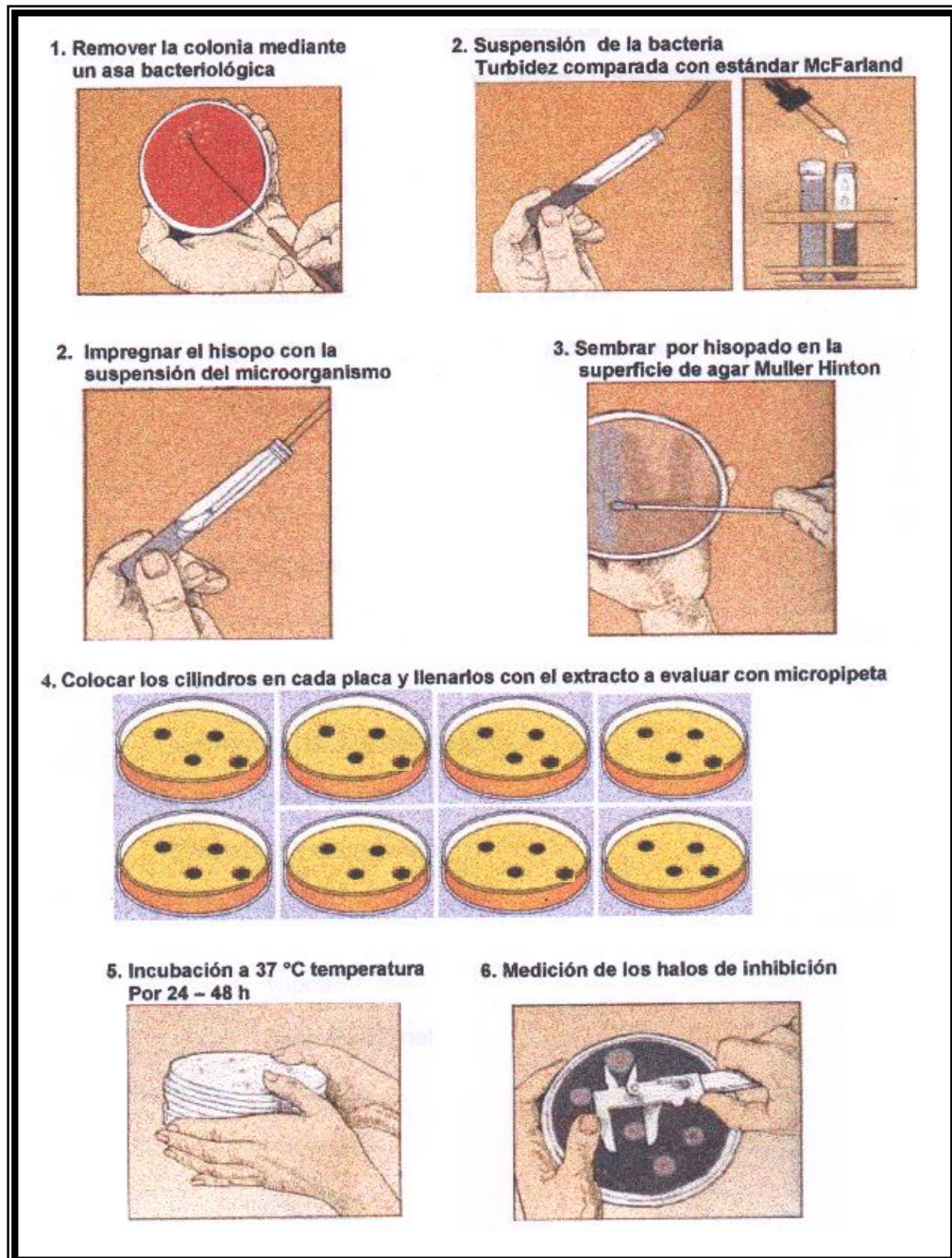


Figura No. 23 Esquema del Método de Kirby Bauer Modificado

**CUADRO No. 18 NORMALIZACIONES INTERPRETATIVAS DE LOS DIÁMETROS DE ZONAS,
BASADOS EN EL MÉTODO DE KIRBY BAUER MODIFICADO. ⁽¹⁴⁾**

AGENTE ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIÁMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN , EN mm		
		RESISTENTE	INTERMEDIO	SUSCEPTIBLE
Amoxicilina	10 µg	≤19	--	≥20
Gentamicina	10 µg	≤12	13-14	≥15
Penicilina	10 Unidades	≤28	--	≥29

≤ = Menor o igual

≥ = Mayor o igual

-- = No se clasifica dentro de estos parámetros

ANEXO No. 17

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO

Staphylococcus aureus

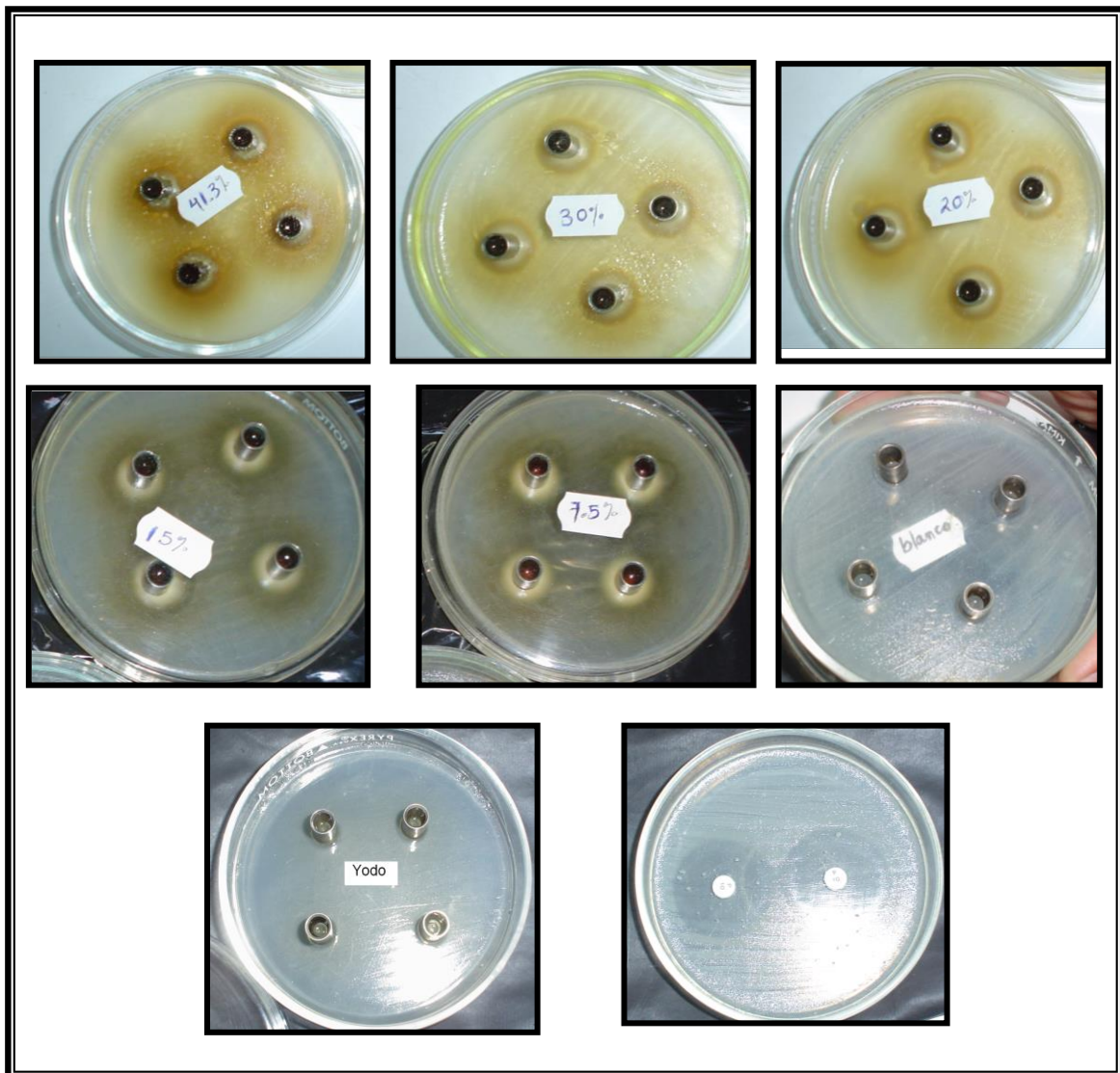


Figura No. 24. Resultado del método de Kirby Bauer Modificado en *Staphylococcus aureus*.

ANEXO No.18

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN MICROBIÓLOGICA MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO

Pseudomona aeruginosa

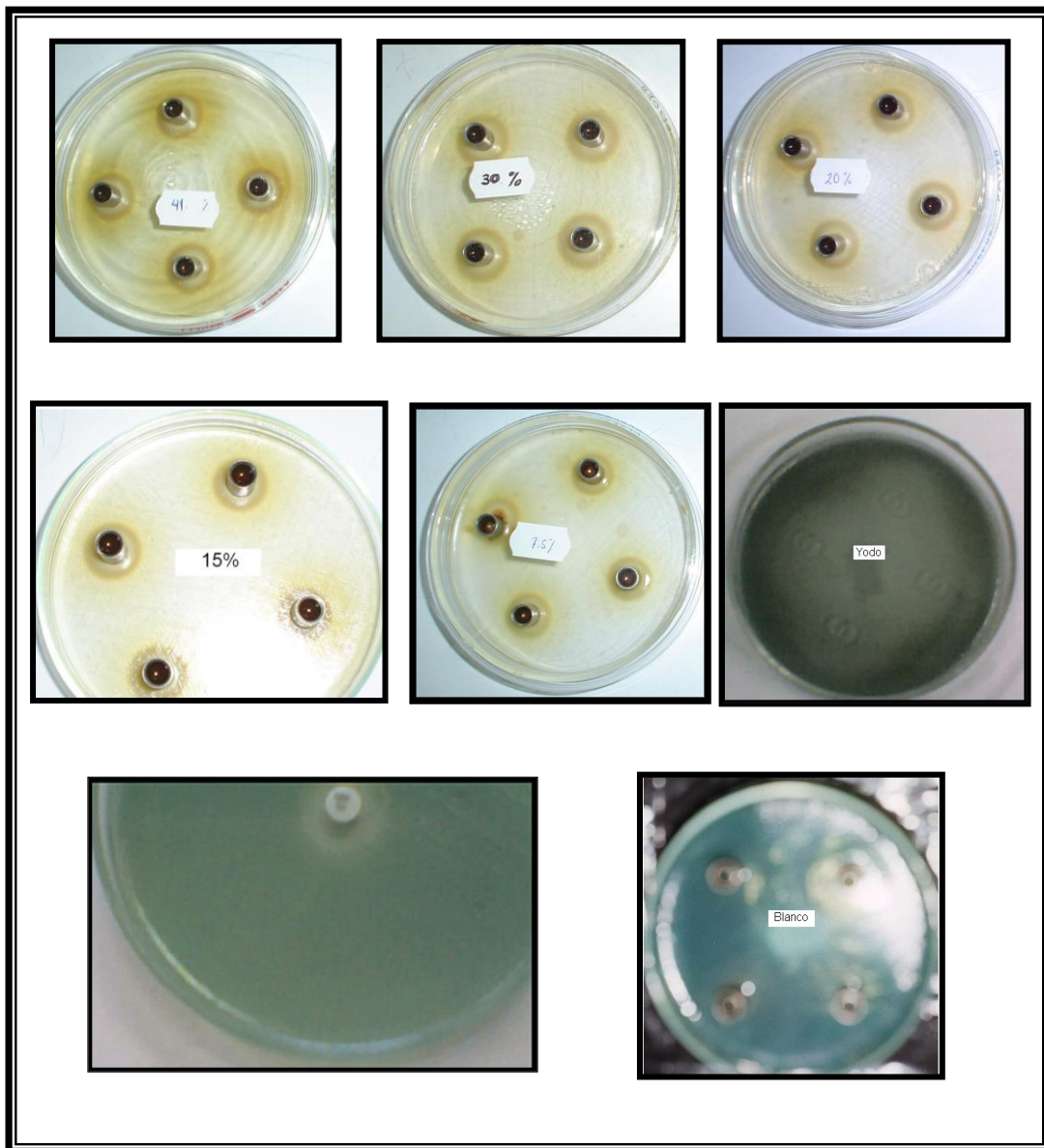


Figura No. 25. Resultado del método de Kirby Bauer Modificado en *Pseudomona aeruginosa*.

ANEXO No. 19

RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO

Streptococcus pyogenes

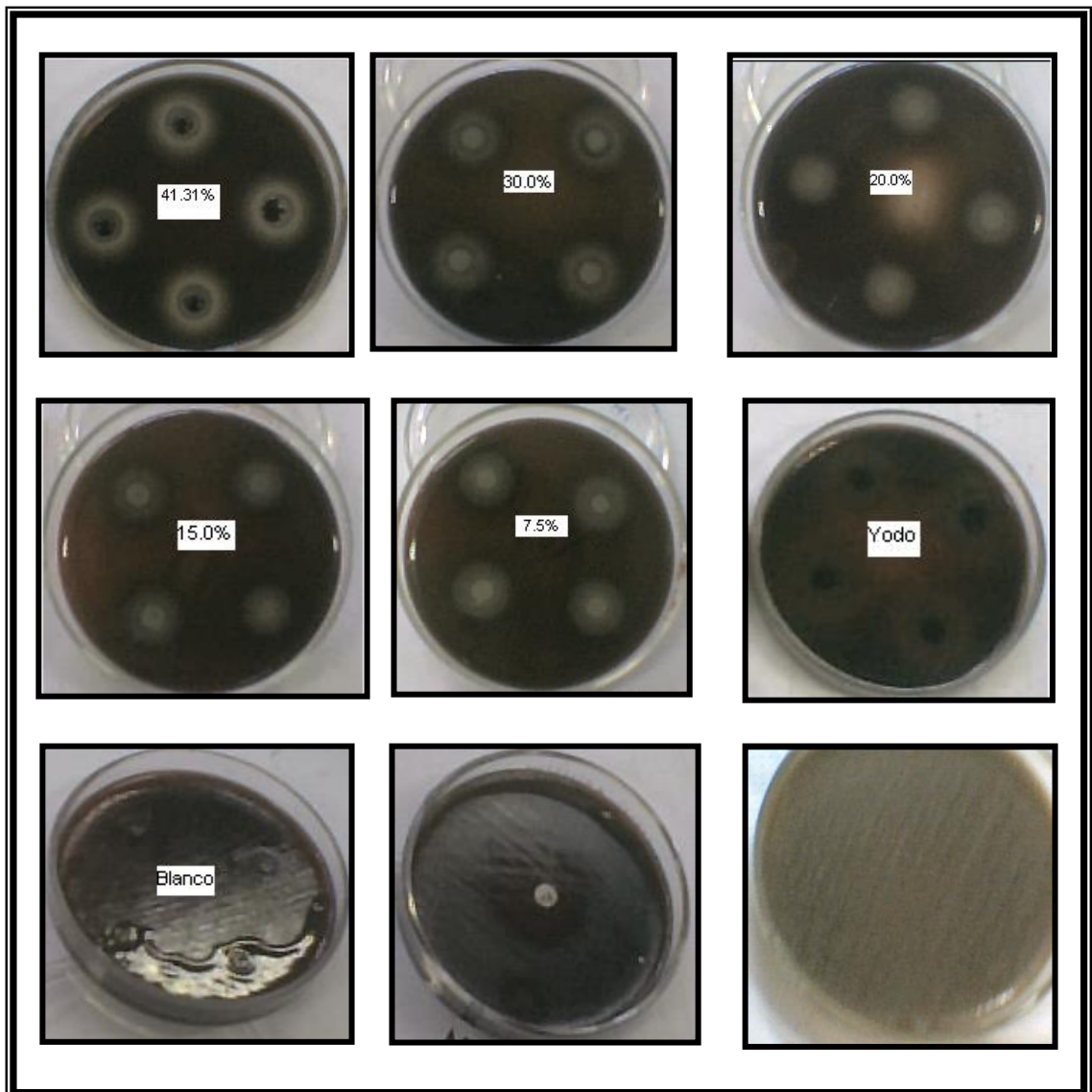


Figura No. 26. Resultado del método de Kirby Bauer Modificado en *Streptococcus pyogenes*.

ANEXO No. 20

Cuadro No. 19 Preparación de medios de cultivo. ⁽¹⁷⁾

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

ANEXO No. 21

Materiales, Equipos, Reactivos y Solventes

1.1 Material Vegetal.

- Oleorresina de *Eucalyptus citriodora*

1.2 Cepas de Referencia.

- *Streptococcus pyogenes*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomona aureoginosa*

1.3 Material de Laboratorio

- Agitadores de vidrio
- Beakers (250, 100, 50, 30 mL)
- Embudos de vidrio
- Ampollas de separación (125, 60 mL)
- Erlenmeyers (500, 250 mL)
- Probetas (100, 25, 10 mL)
- Vidrio reloj
- Tubos de ensayos
- Tubos de ensayos con rosca
- Pipetas Mohr (5, 1 mL)

- Pipetas volumétricas (5.0, 1.0 mL)
- Balón fondo redondo de 500 mL
- Cajas de petri
- Láminas portaobjetos
- Frasco de vidrio color ámbar con tapón de rosca (500 mL)
- Asas bacteriológicas
- Guantes de asbesto
- Pipeteadores
- Mechero Bunsen
- Aros metálicos
- Trípode
- Cápsula de porcelana
- Mortero y pistilo
- Espátula metálica
- Microespátulas
- Gradilla para tubos
- Malla de asbesto
- Baño maría
- Pinzas (Para crisol, de extensión y de soporte)
- Papel filtro
- Papel toalla
- Tirro

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

1.4 Equipo

- Autoclave: de vapor húmedo, Webeco 1978, serie 72244. De aire seco, presión, modelo 25EG, serie 99033-005.
- Estufa Thelco: modelo 3542, serie 21-AF-10
- Balanza analítica metteler: modelo PM 400, serie SNR 1243297.
- Balanza granataria: marca Cenco Central Scientific Company. Triple Beam Balance USA. PAT.No. 2,729.439 capacity 2610g.
- Hot plate fisher: modelo – 75h, serie 557101947
- Microscopio: marca Tisher Micromaster, modelo Input: 11GU EOH₂ 125
- Refrigeradora marca CETRON
- Flash evaporator – Buchler, instrument, modelo 50 – 60, serie 4865445.
- Soxhlet

1.5 Reactivos y Solventes

- Ácido Sulfúrico 10%
- Cloroformo

- Anhídrido Acético
- Ácido Sulfúrico concentrado
- Acetato de Plomo 10%
- Acetato de Etilo
- Piridina
- Nitroprusiato de Sodio al 0.5%
- Hidróxido de Sodio 2N
- Ácido Acético glacial
- Tricloruro de Hierro (Trazas)
- Sulfato Ferroso
- Hidróxido de Sodio 1N
- Ácido 3, 5-Dinitrobenzoico
- Alcohol Etilico 2%
- Laminillas de Magnesio metálico
- Tricloruro de Hierro 5%
- Sub-Acetato de Plomo solución 5%
- Dicromato de Potasio 5%
- Solución de gelatina 2%
- Sulfato de Atropina 5%
- Agua de Bromo 2%
- Ácido Clorhídrico 1N
- Keller-Killiani

- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Alcohol Etílico 93%
- Reactivo de Erlich
- Indicador rojo de metilo
- Alfa-Naftol
- Hidróxido de Potasio 40%
- Peróxido de Hidrógeno 30%
- Cristal violeta sólido
- Alcohol-Cetona
- Lugol
- Safranina
- Amoníaco
- Agua destilada
- Yodo 2%

1.6 Medios de Cultivo

- Agar Muller-Hilton
- Agar Tripticasa Soya
- Agar Citrato
- Agar staphylococcus 110

- Agar tres Azúcares y Hierro
- Caldo Rojo de Metilo
- Caldo Voges Proskauer
- Caldo Urea
- Medio de Movilidad
- Agar sangre
- Agar Cetrimide
- Plasma Sanguíneo
- Solución salina estéril