

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 CEPAS

Se utilizaron las siguientes cepas provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología de la UDLA-P:

Tabla 1. Cepas utilizadas en el proyecto

No.**	Cepa	Descripción	Sensibilidad
43	<i>S. typhimurium</i>		No determinada
45	<i>S. flexneri</i>		No determinada
46	<i>E. coli</i>		e, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u ♦
84	<i>S. aureus</i>		No determinada
14(3)	<i>P. aeruginosa</i>		a, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
15(4)	<i>Myroides spp.</i>		No determinado
16(5)	<i>P. aeruginosa</i>	Exudado nasal Px 62a	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
18(7)	<i>P. aeruginosa</i>	Urocultivo Px 77a	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k *
19(8)	<i>P. aeruginosa</i>	Suelo	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
27(9)	<i>P. putida</i>	Héctor UDLA-P 2XYT	a, b, d, e, h, j *
29(12)	<i>P. aeruginosa</i>	IMSS Sn. José 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
30(13)	<i>P. aeruginosa</i>	Coprocultivo Hombre 2a 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
31(14)	<i>P. aeruginosa</i>	Coprocultivo Hombre 62a 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
32(15)	<i>P. aeruginosa</i>	Coprocultivo Mujer 1a 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
33(16)	<i>P. aeruginosa</i>	Coprocultivo Hombre 53a 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
34(17)	<i>P. aeruginosa</i>	Quiste hepático Mujer 72a 2XYT	b, c, d, f, h, i, j *
35(18)	<i>P. aeruginosa</i>	Urocultivo Mujer 2a 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
49(21)	<i>P. putida</i>	2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *

Tabla 1 (Continuación).

No.	Cepa	Descripción	Sensibilidad
50(22)	<i>P. cepacia</i>	Líquido drenovac 2XYT	a, c, e, f, g, h, i, j, k *
51(23)	<i>P. aeruginosa</i>	Herida, quemadura 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
52(25)	<i>P. aeruginosa</i>	Herida, quemadura 2XYT	b, c, d, f, h, j *
53(34)	<i>P. aeruginosa</i>	Exudado faríngeo 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
54(35)	<i>P. fluorescens</i>	Exudado faríngeo 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
55(36)	<i>P. aeruginosa</i>	Agua de máquina hemodiálisis 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
56(37)	<i>P. aeruginosa</i>	Herida 2XYT	No determinada
61(30)	<i>P. fluorescens</i>	Herida 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
65(38)	<i>P. aeruginosa</i>	Exudado faríngeo 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
66(39)	<i>P. aeruginosa</i>	Úlcera varicosa 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
68(41)	<i>P. aeruginosa</i>	Coprocultivo	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
71(44)	<i>P. aeruginosa</i>	Herida 2XYT	f *
72(45)	<i>P. aeruginosa</i>	Herida 2XYT	f *
74(47)	<i>P. aeruginosa</i>	Expectoración 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, i, j, k *
75(48)	<i>P. aeruginosa</i>	Máquina de hemodiálisis 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
76(49)	<i>P. aeruginosa</i>	Exudado faríngeo 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
77(50)	<i>P. aeruginosa</i>	Secreción de herida 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k *
79(52)	<i>P. aeruginosa</i>	Exudado faríngeo 2XYT	a, b, c, d, e, f, g, h, k *
	<i>P. aeruginosa</i> <i>multi-resistente</i>		No determinada

♦ Resultados obtenidos de ATCC número 25922

* Martínez, 2004. [Tesis]

** Números asignados en el cepario del Laboratorio de Microbiología de la UDLA-P

^aAkamicina, ^bAztreonam, ^cCefepime, ^dCeftizidina, ^eGentamicina, ^fImipenem, ^gNetilmicina, ^hOfloxacina, ⁱPiperacilina, ^jTicarcilina, ^kTobramicina, ^lCefamadol, ^mCefalexin, ⁿCefaloglicina, ^oCefaloridina, ^pCefalotina, ^qCloranfenicol, ^rColistina(Colimicina), ^sÁcido Nalidíxico, ^tNeomicina, ^uTetraciclina

6.1.2 PLANTAS MEDICINALES

Las plantas que se utilizaron son:

Tabla 2. Plantas del proyecto

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	PARTE UTILIZADA
Árnica	<i>Heterotheca inuloides</i>	Flor
Gordolobo	<i>Gnaphalium oxyphyllum</i>	Flor
Pasiflora	<i>Passiflora incarnata</i>	Tronco, tallos, hojas, guías
Romero	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Hojas
Ruda	<i>Ruta graveolens</i>	Flor, tallo

6.2 METODOLOGÍA

6.2.1 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS

Para la extracción de compuestos de plantas con posible actividad antimicrobiana, típicamente se inicia con el uso de crudos acuosos o extracción etanólica y puede ser seguida por varios métodos de extracción orgánica (Cowan, 1999).

6.2.1.1 EXTRACCIÓN CON AGUA

Para esta extracción, las plantas son generalmente maceradas en agua destilada, posteriormente se filtran (Cowan, 1999). En este proyecto cada planta (árnica, gordolobo, pasiflora, romero y ruda) se molieron y maceraron 50 grs. durante una noche a 5°C, después se filtró (papel filtro No. 4) y centrifugó a 13000 rpm/5 min., posteriormente se volvió a filtrar en acrodiscos estériles con poro de 45 µm.

6.2.1.2 EXTRACCIÓN CON ETANOL

En la extracción etanólica, la planta seca se tritura y se macera en etanol por un largo período, dicho macerado es filtrado y secado bajo una presión reducida, para su posterior dilución en etanol a una determinada concentración (Cowan, 1999). En este proyecto, el extracto etanólico se obtuvo para las pruebas de actividad antimicrobiana y pruebas fitoquímicas preliminares de manera muy similar:

- a) Prueba de actividad antimicrobiana: Se trituraron y maceraron 100 grs. de cada planta durante 3 días (ver Tabla 3); después se filtró, se llevó a sequedad mediante rotavapor (60°C) y posteriormente en vacío, finalmente se almacenó en tubos eppendorff (conteniendo cada tubo 0.1 grs. de extracto) a una temperatura de -70°C (ultracongelador).

- b) Pruebas fitoquímicas preliminares: Se trituraron y maceraron 100 grs. de cada parte (flor, tallo, tronco, hojas y guías, según corresponde) de las plantas durante 3 días (ver Tabla 4); posteriormente se filtró y se llevó a sequedad en un 90% mediante rotavapor (60°C), finalmente se almacenó en tubos de ensaye a una temperatura de 5°C.

6.2.1.3 EXTRACCIÓN CON HEXANO

Se obtuvo de forma similar al extracto etanólico utilizado en las pruebas de actividad antimicrobiana, variando sólo la temperatura a la que se llevó a sequedad en

rotavapor (45°C). Obteniéndose diferentes cantidades de extracto mencionadas en los resultados (ver Tabla 5), las cuales se almacenaron a -70 °C (ultracongelador).

6.2.2 PRUEBAS FITOQUÍMICAS PRELIMINARES

Para estas pruebas se utiliza el extracto etanólico y los resultados se registran como abundante (+++), moderado (++) , escaso (+), dudoso (+/-) y negativo (-) (Domínguez, 1973). Los reactivos se prepararon de acuerdo a Barba (1997), Domínguez, (1973) y Farnsworth (1966) (ver apéndice).

ANTRAQUINONAS

Reacción de Borntraeger. Por cinco minutos se hierven 0.3 g de planta pulverizada con 10 ml de KOH 0.5 N y 1 ml de peróxido de Hidrógeno al 6 %. La suspensión se enfría, se filtra o centrifuga. Posteriormente se acidula con ácido acético (unas 10 gotas) y después se le extrae con 10 ml de Benceno. La fase bencénica se pone amarilla, se separa y unos 5 ml de la solución bencénica se agitan con 2.5 ml de NH₄OH. Las antraquinonas colorean de rojo la capa alcalina (Domínguez, 1973; Gutiérrez, 2003).

ALCALOIDES

Extracto etanólico. Una porción del extracto etanólico se disuelve en ácido clorhídrico, se agita y se filtra hasta que el filtrado sea completamente transparente. El filtrado se ensaya con los reactivos para alcaloides: Mayer, Dragendorff, Wagner y Hager. Se considera positivas en las que aparece un precipitado (Barba, 1997; Domínguez, 1973).

Método rápido de Webb. Mezclar 5 g de material seco y pulverizado con suficiente HCl al 1% para formar una suspensión, esta se vierte a un matraz Erlenmeyer

y se coloca a Baño María a 80°C y se calienta durante 4 horas, agitando periódicamente. Posteriormente se deja enfriar y se filtra obteniendo 2 ml, si el filtrado es menor, se añade suficiente HCl al 1% para ajustar el filtrado a 2 ml. Por separado se toman alícuotas de 0.2 ml del filtrado y se ensayan con 0.1 ml de reactivos de Mayer, Wagner, Dragendorff y Hager. Se considera positivas las pruebas en las que aparece un precipitado (Domínguez, 1973).

Método de Cain y colaboradores. Aproximadamente 5 grs. del material seco se tritura en una licuadora o un mortero y se lleva a ebullición con etanol sobre una parrilla durante 30 minutos, tratando de no evaporar el etanol o si es necesario se agrega más alcohol. Se filtra y el etanol se evapora al vacío, el residuo rojo-café, semisólido se disuelve en un tubo de ensayo con HCl 2N saturado con NaCl, durante 15-30 minutos. La mezcla se filtra y se ensaya con los reactivos de Mayer, Dragendorff, Wagner y Hager. Se considera positiva si aparece un precipitado (Domínguez, 1973).

CUMARINAS

Las cumarinas sublímales se detectan calentando los extractos acuosos en un tubo de ensayo tapado con papel filtro impregnado de una solución alcalina. Las cumarinas se recogerán en el papel. Si el papel exhibe puntos fluorescentes bajo luz UV se considera positiva la prueba (Domínguez, 1973).

FLAVONOIDES

Para esta prueba, una porción del residuo etanólico se diluye con más etanol y se ensaya con las siguientes pruebas:

Hidróxido de sodio. En un tubo con extracto etanólico diluido se le agregan unas gotas de Hidróxido de Sodio diluido. La aparición de colores amarillo o naranja se considera indicativa de la presencia de flavonoides (Barba, 1997).

Pew's. En un tubo con extracto diluido se le agrega polvo de Zinc y unas gotas de Ácido Clorhídrico 5 N. Sólo los dihidroflavonoles reaccionan para dar colores que van del rojo púrpura al rojo cereza. Flavonas, dihidrochalconas y otros flavonoides dan coloración rosa o café (Barba 1997; Harbone, 1989).

Reacciones con vapores de amoniaco. Una tira de papel filtro es impregnada con el extracto etanólico diluido, se deja secar a temperatura ambiente, para luego someterla a la acción de los vapores de amoniaco. El desarrollo de una coloración amarilla ocre en el papel se considera positiva (Barba, 1997).

Shinoda. En un tubo con extracto diluido se le agrega un trocito de viruta de magnesio, amalgamado y unas gotas de HCl concentrado. La aparición de colores del rojo profundo al magenta es indicativa de la presencia de una flavona o dihidroflavonol. No reaccionan las Dihidrochalconas y los flavonoides (Barba, 1997; Harbone, 1989).

GLUCÓSIDOS CARDIOTÓNICOS Y LACTONAS SESQUITERPENICAS

Baljet. A 2 o 3 ml del extracto etanólico se le adicionan 3 o 4 gotas de reactivo. Se considera positiva si se forma una coloración anaranjada o roja oscura (Domínguez, 1973).

Cloruro de Antimonio. El cloruro de antimonio se disuelve en cloroformo y se le añaden gotas al extracto etanólico. Es positiva si aparece un color violeta azulado (Villar, 1999).

Legal. En una porción del extracto etanólico se disuelven 2 o 3 gotas de piridina. Posteriormente se añaden una gota de solución reciente al 5% de nitroprusiato de sodio en agua y de 1-3 gotas de NaOH 2 N. Se considera positivo cuando aparece color rojo intenso (Domínguez, 1973).

GLUCÓSIDOS CIANOGENÉTICOS

Se puede observar la presencia de ácido cianhídrico en este grupo de compuestos por su reacción con picrato de sodio. Se impregna una tira con reactivo de Grignard, la cual se pone en la boca de un tubo que contenga una pequeña cantidad del extracto etanólico con unas gotas de cloroformo. Se calienta a 30-35 °C unas 3 horas. Se observa la coloración que parece en el papel, considerándose positiva si es color rojo o rosa (Barba, 1997; Domínguez, 1973; Farnsworth, 1966).

SAPONINAS

Ensayo con agua caliente. Una porción del residuo se disolvió en H₂O caliente durante 15 a 30 minutos, luego se agitó vigorosamente por 3-5 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja, estable por 30 minutos, se consideró prueba positiva (Domínguez, 1973):

Rosenthaler. A una porción del residuo, se añade una gota del reactivo de Rosenthaler y una gota de ácido sulfúrico concentrado. Las saponinas de triterpenos pentacíclicos dan color violeta (Barba, 1997).

TANINOS

Disolver en agua una porción del residuo etanólico, filtrar y tomar alícuotas de 1 ml para las pruebas con Cloruro férrico y con reactivo de gelatina. Considerando positiva, en ambos casos, la aparición de un precipitado. Los taninos hidrolizables y condensados se diferencian según el color o precipitación con las sales férricas; los hidrolizables dan coloración y precipitados azul-negruzcos y los taninos condensados dan precipitados pardo-verdosos (Barba, 1997; Trease, 1986)

TRITERPENOS

Disolver una porción del residuo etanólico en 1 ml de cloroformo. Se agrega, resbalando por las paredes del tubo, 1 ml de anhídrido acético y se deja reposar en frío. La aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase al añadir 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado es considerada positiva (Barba, 1997; Domínguez, 1973).

6.2.3 PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las cepas se sembraron en agar McConkey* y en Sal y Manitol* según la cepa. Posteriormente se probó la actividad antimicrobiana mediante el método modificado de Bauer-Kirby (Koneman *et al*, 1985), utilizando agar Mueller- Hinton* (*BIOXON, preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante), en placas de 4 mm de grosor (Collins *et al* 1989; Koneman *et al*, 1985).

6.2.3.1 ELABORACIÓN DE SENSIDISCOS

Para la elaboración de sensidiscos, los discos de papel filtro No. 4 se hicieron con una perforadora (diámetro de 5 mm), se esterilizaron y se impregnaron con los extractos correspondientes, que previamente obtenidos y almacenados (ultracongelador) se prepararon de la siguiente manera:

- a) **Extracto acuoso:** se utilizó directamente después de filtrar, tomándose 10 μL /disco.
- b) **Extracto etanólico:** el contenido de algunos tubos eppendorff (árnica, gordolobo, pasiflora, romero y ruda, respectivamente) se redisolvió cada uno en 900 μL de etanol (dilución 1:10); el contenido de otros tubos (árnica, gordolobo, pasiflora y ruda) se redisolvió en 900 μL de agua estéril (dilución 1:10), con el extracto de romero no se logró la suspensión deseada. Obteniéndose discos de extracto etanólico en etanol (10 μL /disco) y discos de extracto etanólico en agua (10 μL /disco).
- c) **Extracto hexánico:** el contenido de algunos tubos eppendorff (árnica, gordolobo, pasiflora, romero y ruda, respectivamente) se redisolvieron en 900 μL de hexano (dilución 1:10), se tomaron 10 μL /disco.

Además se prepararon los siguientes discos:

- d) **Discos control.** Se impregnaron discos conteniendo cada uno:
 - 10 μL de Solución salina
 - 10 μL de etanol (filtrado en acrodisco de 45 μm de diámetro de poro).
 - 10 μL de hexano (filtrado en acrodisco de 45 μm de diámetro de poro).

- 10 μL de la mezcla de todos los solventes (sol. salina + etanol + hexano).

e) **Mezcla de extractos en diferentes solventes:** Se preparó una mezcla tomando 25 μL de extracto acuoso + 25 μL de extracto etanólico en etanol + 25 μL de extracto etanólico en agua + 25 μL de extracto hexánico, todos de la misma planta. Se tomaron 10 μL /disco.

f) **Mezcla de extractos etanólicos entre plantas.** Se prepararon mezclas en relación 50%-50%, 20%-80% y 80%-20% de las diluciones de los extractos etanólicos:

Árnica- Gordolobo	Árnica- Romero	Árnica-Ruda
Gordolobo-Romero	Gordolobo-Ruda	Romero-Ruda

Se tomaron 10 μL /disco. La mitad de los discos preparados, se esperó a que se secan y fueron esterilizados en autoclave para observar el comportamiento de los compuestos contenidos en los diferentes extractos, probándolos sobre *P. fluorescens* 61(30), *E. coli* y *S. aureus*.

g) **Mezcla de extractos hexánicos entre plantas.** Se prepararon mezclas en relación 50%-50%, 20%-80% y 80%-20% de diluciones de los extractos etanólicos:

Árnica- Gordolobo	Árnica- Romero	Árnica-Ruda
Gordolobo-Romero	Gordolobo-Ruda	Romero-Ruda

Se tomaron 10 μL /disco. La mitad de los discos preparados, se esperó a que se secan y fueron esterilizados en autoclave para observar el comportamiento

de los compuestos contenidos en los diferentes extractos, probándolos sobre *P. fluorescens* 61(30), *E. coli* y *S. aureus*.

Todos los discos se secaron a temperatura ambiente.

6.2.3.2 INOCULACIÓN DE PLACAS

La inoculación se hizo mediante una modificación al método de Bauer-Kirby (Koneman *et al*, 1985). Se sembraron las cepas en medio de aislamiento primario que en este caso fue agar de McConkey y Sal y Manitol (BIOXON, preparado de acuerdo a las especificaciones del fabricante), posteriormente se tomó un inóculo de cada una de estas cepas y se colocaron en tubos con rosca que contenían 1 ml de solución salina 0.85% estéril.

Cuando se alcanzó una turbidez equivalente al estándar No. 0.5 del Nefelómetro de MacFarland se sumergió un hisopo (estéril y seco) en la suspensión bacteriana (antes de retirarlo se eliminó el exceso del líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo) con este se inoculó en las placas de agar Mueller-Hinton, estriándola en al menos 3 direcciones, dando vuelta la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría, procurando cubrir la superficie total del agar (Koneman *et al*, 1985). Pasados 30 minutos de la siembra se colocaron los discos impregnados y secos; se incubaron en estufa a 37 °C por 24 horas. Posteriormente se observó si existe actividad antimicrobiana y se midieron las zonas de inhibición.

6.2.4 ELABORACIÓN DE LA FORMA FARMACÉUTICA

En la elaboración de la forma farmacéutica se utilizó en primera instancia una formulación de una crema hidratante (Simmons, 2000) y se variaron las cantidades de los ingredientes originales para obtener las características deseadas de una loción que se describirá en resultados

La loción y la mezcla de extracto en aceite mineral se probó sobre *Pseudomonas fluorescens* 61(30), *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, por difusión en disco y en pozo.