

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES
ANTIMICROBIANAS Y ANTIMICÓTICAS IN VITRO DE
LA SENNA RETICULATA (SARAGUNDI) ANTE EL
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y CANDIDA ALBICANS**

ALEJANDRA MORALES ALFARO

SAN JOSÉ, COSTA RICA.

II CUATRIMESTRE 2018

Tabla de contenido

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN	1
Planteamiento del problema	1
Hipótesis	2
Objetivo general	3
Objetivos específicos	3
Justificación.....	4
Antecedentes	6
Internacionales.....	7
Nacionales	10
Proyecciones.....	13
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	14
Generalidades de las bacterias.....	14
Estafilococcus	15
Cultivo y características de crecimiento	15
Principales infecciones producidas por Staphylococcus	16
Pruebas diagnósticas de laboratorio por infecciones por S.aureus	18
Antibioticoterapia para el tratamiento por infecciones con S.aureus	19
Generalidades de los hongos	19
Proliferación y aislamiento de hongos.....	21
Clasificación de las micosis.....	21
Candidosis	21
Pruebas diagnósticas de laboratorio.....	22
Principales enfermedades producidas por hongos.....	23
Pruebas de sensibilidad a los antibióticos (PSA) y concentración mínima inhibitoria (CMI).....	24
Plantas medicinales	26

Garantía de la calidad de las plantas medicinales para uso en productos farmacéuticos	27
Generalidades de la <i>Senna reticulata</i>	28
Clasificación taxonómica.....	29
Descripción Botánica.....	29
Etnofarmacología de la planta	30
Fitoquímica de la planta.....	31
Técnicas de Extracción para plantas medicinales	33
Generalidades del proceso de extracción.....	34
Técnicas de extracción convencionales	36
Cromatografía.....	38
Generalidades.....	38
Cromatografía de capa fina.....	39
Descripción de la técnica	40
Pruebas de identificación realizadas por cromatografía.	41
Cromatografía de gases con detector de masas.....	42
Cromatografía acoplada a un detector de masas.....	44
Pruebas de identificación cualitativas	45
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	47
Enfoque	47
Método de la investigación.....	47
Fuentes de información	48
Variables.....	49
Instrumentos y técnicas	51
Proceso de recolección de la muestra de <i>Senna reticulata</i> (willd).....	51

Materiales y equipo para la obtención del extracto de <i>Senna reticulata</i> por el método de reflujo cerrado (Soxhlet) y maceración	52
Los materiales que se utilizaron para la obtención del extracto de <i>Senna reticulata</i> por los métodos de reflujo cerrado (soxhlet) y maceración se describen a continuación:	52
Procedimiento de recolección y análisis de los datos	54
Medición del porcentaje de humedad de la planta seca y fresca.	54
Homogenización de la muestra vegetal para material fresco y seco de <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi)	55
Método de extracción para material fresco de <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi) por reflujo cerrado (Soxhlet)	56
Método de extracción para material seco de <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi) por reflujo cerrado (Soxhlet)	56
Método de maceración, para hojas secas y hojas verdes de <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi).	58
Concentración del extracto hidroalcohólico obtenido por el método de maceración y de reflujo cerrado (soxhlet)	59
Identificación de los componentes del extracto hidroalcohólico de <i>Senna Reticulata</i>	60
Prueba cualitativa para la identificación de alcaloides por medio el ensayo con el reactivo Dragendorff	60
Prueba cualitativa para la identificación de terpenos-terpenoides: prueba de Libermann-Burchard	60
Prueba cualitativa para la identificación de flavonoides: prueba de Shinoda	61
Prueba cualitativa para la identificación de Antraquinonas.	61
Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana y antimicótica del extracto de <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi).	61
Materiales y equipos para el desarrollo de la prueba microbiológica.	62
Preparación de los discos de sensibilidad.....	63
Preparación del medio de cultivo.	64

Inoculación de las placas.....	64
Pruebas de cromatografía de capa fina para la evaluación de los componentes del extracto de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).....	68
Análisis para la detección de flavonoides.....	69
Análisis para la detección de Hidroxiantraquinonas	70
Análisis cualitativo por cromatografía de gases acoplado a un detector e masas (CG/MS) del extracto de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).....	72
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS	73
Comparación de los procesos de obtención del extracto de la planta <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi) por el método de reflujo cerrado (soxhlet) y maceración tanto en la planta seca como en la fresca.	73
Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de la planta <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi) en el crecimiento in vitro de <i>S.aureus</i> y <i>C.albicans</i> , mediante la medición de halos de inhibición.	82
Identificación de los metabolitos activos presentes en extracto de la planta <i>Senna Reticulata</i> (Saragundi).....	92
Análisis de las pruebas de identificación cualitativas para los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) planta fresca y seca, obtenidos mediante la técnica de extracción maceración y reflujo cerrado soxhlet.	92
Análisis de cromatografía de capa fina para los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) planta fresca y seca.	98
Análisis del cromatograma y espectro de masas obtenido para el extracto de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas	104
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	108
REFERENCIAS	110
ANEXOS.....	117

Tablas

Tabla 1. Variables del estudio	49
Tabla 2. Tratamientos para la Cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.....	64
Tabla 3. Tratamientos para la Cepa <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	65
Tabla 4. Resultados de las determinaciones de porcentaje de humedad para el material seco y fresco de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).	73
Tabla 5. Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) para planta fresca y seca obtenido por los métodos de maceración y reflujo cerrado (soxhlet).....	76
Tabla 6. Porcentajes de humedad de los extractos obtenidos por los métodos de maceración y soxhlet para la planta de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi), en estado fresco y seco.	80
Tabla 7. Masas para la homologación de humedad de los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) obtenidos por el método de maceración y soxhlet.	81
Tabla 8. Resultados de la formación de halos de inhibición formados contra la bacteria <i>S.aureus</i> por los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).	85
Tabla 9. Porcentaje de inhibición de los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) obtenido contra <i>S.aureus</i>	86
Tabla 10. Resultados de la formación de halos de inhibición de los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) formados contra el hongo <i>C.albicans</i>	90
Tabla 11. Porcentaje de inhibición obtenido de los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) contra <i>C.albicans</i>	91
Tabla 12. Resultados obtenidos durante la caracterización o tamizaje fitoquímico del extracto de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.....	93

Figuras

Figura 1. Colonias de <i>S.aureus</i> incubadas en placas de agar sangre.....	16
Figura 2. Prueba de difusión de disco para el aislamiento de <i>Escherichia coli</i> de un cultivo de orina.....	26
Figura 3. Arbusto de <i>Senna Reticulata</i> Willd (Saragundí).....	30
Figura 4. Antraquinonas identificadas en la elucidación de la planta <i>Senna reticulata</i> (willd).	32
Figura 5. Esquema de extracción Soxhlet.	37
Figura 6. Ejemplos de cámaras reveladoras para cromatografía de capa fina.	41
Figura 7. Diagrama de un cromatógrafo de gases y su equipamiento.....	42
Figura 8. Ilustración de la fuente de iones por impacto de electrones.	44
Figura 9. Planta verde y seca para la elaboración del extracto.	52
Figura 10. Balanza de Humedad utilizada para las mediciones.....	54
Figura 11. Proceso de homogenización del material vegetal fresco y seco.	55
Figura 12. Método de extracción de la <i>Senna reticulata</i> por el método de reflujo cerrado (soxhlet)	57
Figura 13. Método de extracción de la <i>Senna reticulata</i> por el método de maceración.	58
Figura 14. Equipo de rotavapor utilizado en las pruebas de concentración de los extractos de <i>Senna Reticulata</i> (Saragundí).....	59
Figura 15. Elaboración de discos de sensibilidad para pruebas de inhibición.	63
Figura 16. Preparación de medios de cultivo Agar Mueller Hinton.	64
Figura 17. Replicación de las cepas microbiológicas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	66
Figura 18. Proceso de siembra de las muestras del extracto de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).	67
Figura 19. Productos utilizados como control positivo para las pruebas contra <i>S. aureus</i> y <i>C.albicans</i>	68
Figura 20. Equipo utilizado para la detección de componentes para cromatografía de capa fina.	71
Figura 21. Extractos concentrados de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) obtenidos por el método de maceración y soxhlet.....	75

Figura 22. Extracto de planta seca de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) obtenido por el método de maceración (izquierda) y soxhlet (derecha).	76
Figura 24. Aceite remanente obtenido del proceso de extracción del material seco de la planta de Saragundi por el método soxhlet.	78
Figura 25. Análisis de porcentaje de humedad para los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) obtenidos por los métodos de maceración y soxhlet.	80
Figura 26. Muestras finales diluidas para pruebas de evaluación antimicrobiana del extracto de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).	81
Figura 27. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria <i>S.aureus</i>	83
Figura 28. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria <i>S.aureus</i> por el Neotrol ® NF y control negativo del medio.	84
Figura 29. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria <i>C.albicans</i>	88
Figura 30. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra el hongo <i>C.albicans</i> por el Nitrato de miconazol al 2 % (muestra 7) y control negativo del medio (muestra 8).	89
Figura 31. Ensayo de identificación alcaloides: reactivo Dragendorff con los extractos de <i>Senna reticulata</i> , realizado en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.	94
Figura 32. Ensayo de identificación terpenos: prueba Libermann-Buchard con los extractos de <i>Senna reticulata</i> , realizado en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.	95
Figura 33. Ensayo de identificación para flavonoides, prueba de Shinoda los extractos de <i>Senna reticulata</i> , prueba realizada en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.	96
Figura 34. Extractos de <i>Senna reticulata</i> utilizados para la prueba cualitativa de detección de antraquinonas.	97
Figura 35. Ensayo de identificación para antraquinonas, para los extractos de <i>Senna reticulata</i> , prueba realizada en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.	97

Figura 36. Placa de gel de sílice demarcadas con los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) para prueba de detección de flavonoides por cromatografía de capa fina.	99
Figura 37. Proceso de separación de los compuestos en placa de gel de sílice utilizando una cámara cerrada de revelado de vidrio para los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).....	99
Figura 38. Proceso de revelado de flavonoides para los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) utilizando el reactivo de vainillina.	100
Figura 39. Identificación de flavonoides para los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) utilizando el reactivo de vainillina.	101
Figura 40. Imágenes de los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) analizados a través de la cabina de análisis fluorescente a 254 nm.	102
Figura 41. Proceso de revelado de hidroxiantraquinonas para los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi).	103
Figura 42. Imágenes de los extractos de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) analizados a través de la cabina de análisis fluorescente a 254 nm.	103
Figura 43. Cromatograma obtenido mediante el análisis por cromatografía gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), para la planta fresca macerada de <i>Senna reticulata</i> (Saragundi) realizado por el CIPRONA de la Universidad de Costa Rica.	105

Agradecimientos

A Dios, por permitirme cumplir otra meta más, por regalarme vida para disfrutarla y tiempo para vivirla.

A mi familia, mis padres, hermanos, sobrinos, amigos ya mi suegra, cada uno de ellos participó con su apoyo, tiempo y comprensión en el cumplimiento de este sueño.

A mi esposo por su paciencia, consejos, ánimo y amor demostrado cada día en el largo tiempo de este proceso.

A Laboratorios ZEPOL, S. A por su gran apoyo durante toda la carrera, principalmente, durante la realización de esta investigación.

A mis compañeros de trabajo, gracias por su confianza, su apoyo, sus conocimientos, su tiempo, sin ustedes no habría sido posible terminar este proyecto.

A todos mis profesores a lo largo de la carrera, en especial a la Dra. Yajaira Quesada por aceptar el reto de esta investigación y brindarme su asesoría y guía para concluirla.

Dedicatoria

A Dios porque sin Él presente en mi vida nada sería posible.

A mis papás, Jorge y Míriam por enseñarme que la mejor herencia que puede recibir un hijo en la vida es el estudio y apoyarme a siempre seguir mis sueños.

A mi esposo, Víctor por apoyarme en todos las etapas de esta aventura, sacrificar nuestro tiempo, por ser mi asesor académico personal y sobre todo enseñarme que las metas, los triunfos y las derrotas siempre serán de los dos.

Resumen

El siguiente trabajo de investigación, consiste en realizar un estudio de las propiedades antimicrobianas y antimicóticas *in vitro* de la *Senna reticulata* (Saragundi) ante el *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, ya que ambos se presentan como patógenos de gran interés en las enfermedades tópicas desarrolladas a nivel mundial.

Senna reticulata es un arbusto de unos 3 a 8 m de altura, presenta hojas con el pecíolo de 3,5 a 13 cm lo cual lo diferencia de la otra especie reportada para la planta de Saragundi; *Senna alata* el cual no presenta pecíolo, florece entre los meses de enero a marzo y crece en el bosque húmedo, muy húmedo, pluvial y charrales.

El objetivo principal de esta investigación es evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Senna reticulata* (Saragundi) en cepas de *Staphylococcus aureus*, así como la actividad antimicótica en cepas de *Candida albicans*. Los objetivos específicos serán de tipo experimental dado que consiste en la obtención de extractos con distintos métodos de análisis disponibles, la identificación de las sustancias activas obtenidas de la planta *Senna reticulata*, así como pruebas *in vitro* para determinar la actividad antibacteriana del extracto. La investigación presenta un enfoque cuantitativo ya que se utilizó la recolección de datos para probar la hipótesis planteada.

Esta evaluación se realizó comparando dos métodos de extracción como lo son el reflujo cerrado (Soxhlet) y la extracción por maceración. Además, se evaluaron las diferencias obtenidas utilizando el material vegetal fresco y el material vegetal seco en ambos métodos de extracción.

Para el desarrollo de la investigación, se realizaron pruebas de inhibición microbiológica desarrolladas en el laboratorio de microbiología de la empresa Laboratorios ZEPOL S.A así como la contratación de los servicios del Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica para la detección de los principales compuestos activos y los análisis cualitativos de identificación de grupos funcionales se realizaron en la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

Se comprueba que el extracto de *Senna reticulata* extraído de la planta fresca por el método de maceración es el único que presenta un efecto inhibitorio moderado frente a cepas de

Staphylococcus aureus, sin embargo; los resultados obtenidos no demuestran inhibición de las cepas de *Candida albicans*.

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Las bacterias más importantes como flora transitoria de la piel, y, por lo tanto, implicadas en infecciones cutáneas, son *S. aureus* y *S. pyogenes*. Entre un 20% y 40% de los adultos sanos presentan algún tipo de colonización; por ejemplo, la colonización nasal por *S. aureus* representa hasta un 20%, aunque sólo contaminan de forma transitoria el resto de las zonas del organismo. Por el contrario, en pacientes con dermatitis atópica, la recuperación de *S. aureus* de la piel alcanza un 70 % a 90% de los casos. (Savendra y Santos et al, sf. p160).

Staphylococcus aureus es un patógeno importante en el ser humano. Casi todas las personas presentarán algún tipo de infección por *S. aureus* durante su vida, la cual oscila en gravedad desde una intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas leves hasta infecciones graves que ponen en riesgo la vida. Los estafilococos coagulasa negativos son microflora humana normal y a veces causan infecciones, a menudo éstas están relacionadas con dispositivos implantados en el organismo, como prótesis articulares, derivaciones y catéteres intravasculares, sobre todo en los niños muy pequeños y en los pacientes inmunodeprimidos. (Jewets et al, 2010, p.185).

Las levaduras del género *Candida* causan enfermedades en los humanos que abarcan desde infecciones superficiales no graves, hasta sistémicas y potencialmente mortales. La candidiasis o candidosis, es el origen común de enfermedad vaginal y aunque es una infección no considerada como incapacitante, suele causar síntomas molestos que alteran la conducta del paciente. *Candida albicans* sigue prevaleciendo como el principal agente colonizador. Las diferencias encontradas entre países desarrollados con respecto de los latinoamericanos consisten, básicamente, en los métodos diagnósticos y el tipo de tratamiento. (Pineda, 2017, p 40).

En la actualidad, a pesar del avance alcanzado por la síntesis química, la medicina herbaria pone a disposición de la población un arsenal de sustancias biológicamente activas. Se

estima que hasta el 80 % de la población mundial, principalmente, en los países en desarrollo, depende de los medicamentos a base de plantas como una fuente primaria de atención médica. El consumo mundial de medicinas herbarias es una práctica ampliamente extendida, por lo que es esencial identificar los riesgos asociados a su uso por la población. (Rosalía, et al, 2017, p.2).

Una gran cantidad de plantas o extractos naturales poseen propiedades especiales que facilitan y favorecen que sean utilizados como componentes activos para la elaboración de formas farmacéuticas, las cuales brindan una opción para el tratamiento de enfermedades de la piel producidas por patógenos como *S. aureus* y *C.albicans*. Los medicamentos a base de plantas medicinales presentan grandes ventajas en comparación con los tratamientos químicos. Para el control y prevención de enfermedades por bacterias que denotan patogenicidad, es de gran importancia lograr disminuir la carga bacteriana a nivel tópico para la prevención de complicaciones.

La planta de Saragundi presenta diversas partes que reportan propiedades terapéuticas como antibacterial, antifúngico, antimicrobiano y analgésico. Esta planta ha sido utilizada para el tratamiento de afecciones de la piel en humanos y animales. Existen dos especies reportadas actualmente en el país, *Senna alata* y *Senna Reticulata*, sin embargo, de la especie *Senna reticulata* es la que se ha reportado mayor presencia en varias zonas del país, por lo tanto, será el sujeto de estudio de esta investigación

Según lo expresado, en la presente investigación, se presenta como principal interrogante sí; ¿Tiene el extracto de *Sennareticulata* (Saragundi) efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de cepas de *Staphylococcus.aureus* y efecto antimicótico sobre cepas *Candida albicans*?

Hipótesis

El extracto de *Sennareticulata* (Saragundi) posee efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus* y efecto antimicótico sobre cepas de *Candida albicans*.

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Sennareticulata* (Saragundi) en cepas de *Staphylococcus aureus*, así como la actividad antimicótica en cepas de *Candida albicans*.

Objetivos específicos

Realizar la extracción de los componentes activos de las hojas de la *Senna reticulata* por medio de reflujo cerrado (Soxhlet) y maceración.

Determinar la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de las hojas de *Senna reticulata* en condición fresca y seca.

Identificar la presencia de los metabolitos activos en el extracto de *Sennareticulata* (Saragundi)

Justificación

La fitoterapia es la ciencia que se encarga de aprovechar las propiedades medicinales de las plantas para prevenir o tratar las diferentes enfermedades y dolencias. Es una ciencia que data desde miles de años atrás y que el ser humano ha utilizado como aliado en el tratamiento de enfermedades; las hierbas se siguen utilizando como remedio prácticamente, en todas las culturas e incluso en algunos pueblos son la única opción, la Organización Mundial de Salud (OMS), (2016) reconoce el valor con el que esta terapia contribuye al sistema sanitario mundial

El creciente desarrollo de la resistencia a los medicamentos en los patógenos humanos, así como los efectos secundarios no deseados de algunos agentes antimicrobianos de uso común impulsaron la búsqueda de nuevos agentes con eficacia y seguridad, la *Senna reticulata* se utiliza como antiinflamatorio, cardiovascular, para uso dermatológico en infecciones, en problemas gastrointestinales para combatir la artritis y el reumatismo. (Moreira, Arnáez, Murillo, Quesada, Castro, Zamora, Cordero, Loaiza y Navarro, 2014, p70). Actualmente, la sociedad ha ido aumentando el uso de medicamentos naturales como tratamiento alternativo a la medicina convencional. Por tal motivo, evaluar si es factible utilizar la *Senna reticulata* como activo para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas generará un aporte a la terapéutica nacional.

El informe de la OMS (2016), indica que, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo, como es el caso de Costa Rica ha ido en aumento el uso de plantas medicinales o sus derivados. La terapia con plantas medicinales representa cerca del 25% del arsenal de prescripciones de los países industrializados y un 80% en países en desarrollo. Además, para 1989, se reconoce la importancia de los medicamentos herbarios en la salud de los individuos y de las comunidades, y de esta forma se establece que los países necesitan de información actualizada y autorizada sobre las propiedades beneficiosas y posibles efectos de medicamentos herbarios.

La implicación práctica de esta investigación es utilizar la información documentada que se tiene en relación con la *Senna Reticulata* para sus aplicaciones médicas en terapias antibacteriales, antifúngicas y analgésicas, siendo los extractos de sus hojas efectivos en el tratamiento de las afecciones de la piel. Extractos etanólicos, metanólicos e hidroalcohólicos de la

planta entera de *Senna reticulata* mostraron actividad significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Candida albicans* y *Microsporium canis*. (Ruiz y Roque, 2009, p 42)

“La búsqueda continua y el interés en los productos vegetales naturales para su uso como medicamentos han actuado como catalizadores para explorar las metodologías involucradas en la obtención de los materiales vegetales requeridos y a partir de ahí revisar sus componentes”. (Igoli y Ogali, 2005, p.135).

Makinde, Igoli, Tama, Shaibu y Garba (2007) encontraron que hay un efecto diferenciador entre las respuestas inhibitorias de diferentes microorganismos al utilizar diferentes fracciones de los extractos de las hojas, de forma similar este trabajo pretende estudiar algún efecto diferenciador al utilizar las hojas secas o en estado fresco.

Antecedentes

El uso de plantas medicinales data de muchos años atrás, los descubrimientos de los efectos terapéuticos de algunas plantas se encontraron por casualidad, respondiendo a la necesidad de nuestros antepasados de buscar nuevos alimentos, algunas de estas pruebas y errores, sirvieron para diferenciar plantas comestibles, con efectos negativos y otras que les producían sensaciones de alivio a sus padecimientos. Muchos pueblos que se desarrollaron como cazadores y recolectores por miles de años cambiaron su forma de vida al adoptar la siembra de plantas comestibles y medicinales como parte importante de su subsistencia. (Rosalía, et al, 2017).

Según Watson (1991) en muchos países las plantas de los géneros Cassia y Senna son muy empleadas en la Medicina Popular, reportándose en la literatura diversas acciones farmacológicas que son atribuidas a los componentes fenólicos, antraquinónicos y terpenoides que están presentes en ellas.

“*Senna reticulata* se utiliza en la amazonia como medicina tradicional se emplea como antirreumática, contra enfermedades tóxicas, diurético, laxante, hipertensión y estreñimiento. Cabe destacar su uso como insecticida y repelente. Por lo general, dependiendo de las indicaciones las partes utilizadas son las hojas, las semillas y raíces”. (Villanueva y Zevallos 2017, p 5).

Por todo lo investigado a través del tiempo en relación con las plantas medicinales y sus efectos positivos en la salud de la humanidad, es de interés fundamentar el análisis de la especie *Senna reticulata* y su efecto anti antimicrobiano y antimicótico basándose en los antecedentes que se describen a continuación.

Internacionales

En la elaboración del presente apartado, se procedió a realizar investigación en bases de datos disponibles: OPAC, EBSCO, SCIELO, COCHRANE, MEDLINE, PUBMED, PUBCHEM en los cuales se encontraron los siguientes de interés para la investigación.

Villanueva y Zevallos (2017) realizaron un estudio de “Cuantificación de polifenoles totales de la flor de *Senna reticulata*” en la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Perú. En este estudio se realizó un extracto hidroalcohólico por maceración durante 15 días, luego se rotavaporeó a 50°C a 3,5 rpm y se extrajeron los compuestos fenólicos con metanol. Por la técnica de espectrofotometría, se midió una curva de calibración con un coeficiente de determinación de 0,99mg ácido gálico/ g de flor seca. Los resultados obtenidos demuestran que la flor contiene 8,69+/- 1,27/ g de flor seca lo que se considera como cantidad poco significativa de polifenoles totales.

En el trabajo realizado por Hoffman y DelasAlas (2004) “Screening of Antibacterial and Antifungal Activities of Ten Medicinal Plants from Ghana” (Detección de actividades antibacterianas y antifúngicas de diez plantas medicinales de Ghana) realizado en la Universidad de Houston, USA, se encontró en dicho estudio el reporte de diez plantas medicinales de las cuales se probaron extractos de cinco de ellas: *Phyllanthus niruri*, *Ageratum conyzoides*, *Acanthospermum hispidum*, *Cassia alata* y *Sida*, estos extractos tuvieron actividad contra los microorganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus* incluyendo los resistentes a la meticilina. Se estandarizó la extracción utilizando el equipo Soxhlet agregando 1000mL de metanol y realizando el proceso durante 24 horas. En los resultados obtenidos se encontró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, sin embargo, contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* los resultados no fueron satisfactorios.

Matulevich, Castrillón, Chitiva, y Flores (2017) en su “Caracterización química del aceite esencial de hojas de la especie vegetal *Senna reticulata* (Fabaceae)” realizado en la Universidad Distrital Francisco José de Caldas de Colombia realizaron un estudio a partir de las hojas frescas de la especie vegetal *Senna reticulata* (Fabaceae) se obtuvo la identificación y

composición química del aceite esencial, mediante la técnica de extracción por arrastre de vapor; acoplada a espectrofotometría de masas (CG-EM) comparando los índices de refracción (IR) con los datos reportados en la literatura. Utilizando un software estadístico InfoStat con un análisis multivariado donde se establecieron los coeficientes de correlación de variables, determinación de mínimos cuadrados y regresión lineal. Se obtuvo un rendimiento de 0,10% en peso de aceite esencial identificando 20 compuestos correspondientes al 80,39% de la composición química total del aceite esencial, identificando un ácido carboxílico, un hidrocarburo alifático, dos ésteres, catorce sesquiterpenos y dos aldehídos.

Así mismo, Barría y Sánchez (2013), en su tesis para optar por el título profesional de químico farmacéutico en la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana estudiaron la “Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Senna reticulata* (Willd) “retama” sobre microorganismos patógenos” el estudio consistió en probar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico e hidroalcohólico de la vaina de la planta sobre el *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los extractos hidroalcohólicos se realizaron en una mezcla de etanol/agua en una proporción 70/30, respectivamente, el cual fue macerado por 7 días, Se realizó un tamizaje fitoquímico para identificar alcaloides, quinonas, flavonoides, fenoles, taninos, saponinas, aminos y aminoácidos, además se realizaron pruebas de evaluación de eficacia antimicrobiana mediante la observación directa y registro de los halos de inhibición observados sobre cada microorganismo. En los resultados obtenidos se observó que el extracto etanólico de la hoja presentaron una moderada actividad antimicrobiana significativa frente a *e.coli* y el extracto hidroalcohólico frente a *s.aureus*.

En Perú, Ruiz (2013) en su tesis para optar para el grado académico de Magíster en Microbiología investigó la “Actividad Antifúngica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ochoplantas medicinales. La investigación consistió en determinar la actividad antifúngica in vitro de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de *Hypericum laricifolium*(partes aéreas), *Ilex guayusa*Loes (hojas), *Juglans neotropica* Diels (corteza), *Piper lineatum*(hojas), *Piper spp.* (hojas), *Psidium guajava*(hojas), *Cassia reticulata*Willd (planta entera) y *Terminalia catappa* (hojas). La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en agar frente a *Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Microsporum canis*cepa clínica determinando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Como

resultado importante se obtuvo que todos los extractos presentaron actividad antifúngica importante frente a *C.albicans* y *M.canis*, pero ninguno frente a *A.niger*.

También, Nunes do Santos y Goretti (2008) en su artículo “Constituyentes químicos aislados del tallo de *Senna reticulata* Willd, (Leguminosae) exponen que la especie *Senna* la cual, también, es conocida como *Cassia reticulata* presenta diversas propiedades farmacológicas por las cuales se ha utilizado ampliamente en la medicina popular de América Latina. Utilizada en Brasil para el tratamiento de obstrucciones del hígado y reumatismo. El estudio consistió en utilizar el material molido y seco y extraerlo con etanol en frío, además de realizar otras extracciones con n-hexano y a través de técnicas cromatográficas. En los resultados obtenidos se encontraron las sustancias 1,8-diidroxí-3-metilantarquinona (crisofanol) y el 1,8-diidroxí-3-metil-6-metoxiantraquinona (fisciona). Este estudio demuestra que existen otras especies, además de *Cassia alata* que presentan efectos farmacológicos.

Por otra parte, es importante conocer algunas de las investigaciones realizadas a las especies *Senna alata* conocida, también, como *Cassia alata* ya que es, comúnmente, llamada Saragundí autores como Makinde y Igoli (2007) realizaron el estudio de la actividad antimicrobiana de la *Cassia alata*, éste se realizó en Nigeria. Para la realización del estudio, se utilizó el equipo Soxhlet efectuando la extracción con una mezcla de metanol y agua (4:1) la evaluación fitoquímica de los extractos de hojas dio pruebas positivas para alcaloides, fenólicos, terpenoides, grasas, aceites y ceras. Los resultados obtenidos para los extractos mostraron actividad contra bacterias y hongos probados.

En el estudio realizado por Binti (2008) en Malasia sobre “Evaluation of antimicrobial activity from *Cassia alata* leaves towards Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)” (Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Cassia alata* hacia el *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (MRSA) realizado para optar por su grado de Máster en Ciencias de la Facultad de Farmacia, detalla la extracción de las hojas secas de la planta utilizando etanol y metanol. El extracto metanólico fue separado utilizando solventes cuya polaridad fuera incrementando, tales como butanol, hexano y cloroformo. Los resultados obtenidos de los

extractos de butanol y cloroformo exhibieron inhibición contra *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina.

Por otro lado, Villaseñor y Sánchez(2009) en su estudio sobre “Cassiaindoline, a New Analgesic and Anti-Infl ammatory Alkaloid from *Cassia alata*” (Cassiaindoline, un nuevo alcaloide analgésico y antiinflamatorio de *Cassia alata*) realizado en la Universidad de Philipinas en el cual se aisló un nuevo dimérico indol llamado Cassiaindoline. El extracto de las hojas del indol se elucidó a través de análisis de espectroscopía. En el análisis se obtuvieron dosis analgésicas de 125,0 mg /kg en ratones en el compuesto aislado.

Así mismo, en la investigación realizada por Somchit (2013) “In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*” (Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de *Cassia Alata* en etanol y agua) realizado en la Universidad de Malasia, el estudio consistió en probar in vitro el extracto elaborado en agua y en etanol de la *Cassia alata* y su efecto contra hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Microsporum canis*) levadura (*Candida albicans*) y bacterias (*Staphylococcus aereus* y *Escherichia coli*). Se realizó la extracción mediante el aparato Soxhlet, utilizando etanol 95% v/v y agua destilada, la extracción se llevó a cabo durante 12 horas. En los resultados obtenidos se muestra que la *C.albicans* mostró susceptibilidad dependiente de la concentración hacia los extractos de etanol y agua de las cortezas, sin embargo, fue resistente hacia el extracto de hojas. El grado de susceptibilidad varió, el extracto de agua de las cortezas mostró una zona de inhibición mayor que el etanol.

Nacionales

En esta sección de la investigación, se procedió a realizar búsqueda de información en bases de datos disponibles de portales virtuales de las Universidades Estatales: Universidad de Costa Rica (SIBDI), Universidad Nacional (SIDUNA), Instituto Tecnológico de Costa Rica (SIBITEC), Universidades Privadas: Universidad de Iberoamérica UNIBE, Universidad Latina de Costa Rica ULATINA, Universidad de Ciencias Médicas UCIMED y en la Universidad Internacional de las Américas UIA para un total de tres trabajos nacionales, que, a continuación, se describen.

En la Universidad de Costa Rica, se encontró una tesis, ésta fue elaborada por Watson, (1991) para optar por el posgrado en Química. La investigación consistió en la Evaluación fitoquímica de las hojas de *Senna alata* y *Cassia fruticosa*. En dicha investigación se emplearon técnicas cromatográficas para llevar a cabo la separación de los compuestos detectados y técnicas espectroscópicas para determinar su posible identidad. Se utilizó el método Bolhman el cual es un método eficiente para la extracción de una gama alta de compuestos. Se obtuvieron resultados positivos de los extractos metanólicos y acuosos por lo que se probó con larvas de *Artemia salina* para determinar si había compuestos bioactivos en las fracciones polares.

Por otro lado, Pérez (2004) en su informe especial para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología investigó sobre la “Determinación in vitro de la eficacia de extractos de Saragundi (*Senna reticulada*) contra hongos dermatófilos (*Trichophyton rubrum* y *Microsporum gypseum*) este estudio fue realizado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. La metodología utilizada fue efectuar extractos por maceración empleando como disolventes alcohol y cloroformo, estos extractos se probaron en cuatro concentraciones distintas sobre cultivos *in vitro* de dos hongos dermatófilos (*Trichophyton rubrum* y *Microsporum gypseum*), para lo cual se utilizaron discos de papel absorbente impregnados con cada una de las diluciones. Los resultados de las pruebas de actividad antifúngica con los extractos electos se analizaron estadísticamente dando como resultado un efecto inhibitorio superior en los extractos alcohólicos y una mayor susceptibilidad a los extractos por parte de *Trichophyton rubrum*.

Así mismo, en el trabajo final de graduación para optar por el grado académico de Licenciatura en Farmacia y al grado profesional de Doctor en Farmacia elaborado por Arias, (2007) en la Universidad de Costa Rica, se estudió la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales obtenidos de plantas de la flora costarricense. En el estudio, se probaron los efectos antimicrobianos contra *Microccus luteus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeuriginosa*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* de las hojas de extractos, tanto acuosas como etanólicos y aceite esencial de las hojas de *Siparuna grandiflora*, *Siparuna pauciflora*, *Piper naranjoana*, *Hedyosmun bonplandianum* y *Piper friedrichsthalii*. Se utilizó la prueba de Mitscher como prueba de tamizaje, los extractos que presentaron actividad fueron los extractos acuosos y etanólicos de *Piper friedrichsthalii* y *Hedyosmun bonplandianum* contra *Microccus leteus*, *Staphylococcus*

epidermidis, *Staphylococcus aureus*. También, se determinó la concentración mínima inhibitoria utilizando un medio líquido, en este caso los resultados demostraron que, en todas las muestras, la actividad antibacteriana del aceite esencial fue mayor que la de los extractos acuosos y etanólicos.

Moreira et al (2016) en su investigación realizada en Costa Rica sobre “Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica” se enfocaron en la revisión fitoquímica de las plantas *Phyllanthus niruri* (chanca piedra), *Senna reticulata* (Saragundi), *Pettiveria alliaceae* (ajillo) y *Phyllanthus acuminatus* (chilillo), de manera que se vinculó a su actividad biológica potencial mediante técnicas que permiten establecer protocolos de buen uso, así como introducir buenas prácticas de cultivo a las comunidades de las regiones de Huetar Norte y Huetar Atlántica para que se pueda hacer uso sostenible de las plantas. Se utilizaron las técnicas de análisis UPLC-DAD/TQ-ESI MS y de RMN, además se determinó la actividad antioxidante a través de dos metodologías, DPPH y ORAC.

Los resultados obtenidos en la planta de interés *Senna reticulata* se encontró que esta planta junto con el chilillo puede presentar problemas de domesticación de las especies si no se les brinda condiciones óptimas. También, se determinó que la especie requiere de 6 a 8 meses de sembrada para iniciar su periodo reproductivo. En cuanto a los componentes fitoquímicos se elucidaron estructuras con potencial bioactivo como lignanos, tetraterpenos, fitosteroles, polifenoles monoméricos glicosilados, agliconas y flava-3-oles.

Por último, Jiménez (2002) en su trabajo de graduación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniera Agrónoma con el grado de licenciatura en la Universidad EARTH realizó la caracterización de 10 Genotipos de Saragundi (*Senna reticulata* (Willd) H.S Irwin & Barneby), propagación vegetativa por estacas y desarrollo de productos en Pocora, Costa Rica” básicamente, el estudio consistió en realizar un diseño de siembra por estacas las cuales se mantuvieron por un periodo de 6 semanas luego se trasladaron al campo para ser sembradas y monitorear altura, diámetro, número de hojas, entre otros.

También, se elaboraron productos cosméticos cremas y champús con extracto de Saragundi. El extracto se realizó en agua hirviendo las hojas por 5 minutos luego se filtró y se dejó enfriar para ser utilizado en los cosméticos. Los resultados obtenidos para las mediciones de

las plantas la variable que mayor desarrollo obtuvo fue altura, también al elaborar los productos cosméticos se comprobó que los productos presentan una buena aceptación visual.

La información emanada de los estudios realizados a la *Sennareticulada* demuestran que existe evidencia científica en la actividad inhibitoria frente al, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, por lo cual resulta una base importante para desarrollar la presente investigación.

Proyecciones

Dentro de las consideraciones de proyección del presente trabajo de investigación se encuentran:

Elaborar una alternativa natural que esté a disposición a nivel nacional para la creación de una nueva forma farmacéutica.

Realizar una publicación en revistas científica de circulación nacional en el área de etnofarmacología médica.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

Generalidades de las bacterias

“Las células bacterianas poseen un tamaño entre 0,3 y 0,5 μm , estas bacterias pueden tener, básicamente, tres formas: cocos o esféricos, alargadas o bacilos y curvados o espirales. Las bacterias pertenecen al reino procariota y son capaces de reproducirse mediante fisión binaria” (Jewets et al, 2010, p.185).

Según lo establece Flores (2014), las bacterias son divididas en dos tipos, las primeras son las arqueobacterias, que carecen de peptidoglicano, ésta es la cualidad que les permite vivir en medios ácidos y salinos, las otras son las eubacterias las cuales, sí poseen peptidoglicano, éstas son las que viven en organismos vivos. El método de reproducción de las bacterias es mediante reproducción binaria y, básicamente, éstas se presentan en formas básicas, esféricas o cocos, las alargadas o bacilos, y las bacterias curvadas o espirilos.

Mollinedo y González, (2014) realizan la diferenciación de los dos tipos de bacterias, las Gram positivas y las Gram negativas, éstas tienen una reacción a la tinción de Gram, establecida por el bacteriólogo danés Hans Christian Joachim Gramen en 1844, el doctor Gramen desarrolló una técnica de coloración diferencial cuya reacción es diferente, según el microorganismo que se identifica, pues las bacterias Gram positivas se tiñen de color violeta y las bacterias Gram negativas de color rosado. La diferencia entre ambas bacterias está en la estructura de la pared celular ya que las Gram negativas presentan una pared celular delgada unida mediante lipoproteínas a otra membrana mientras que las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglicano.

Mollinedo y González, (2014) clasifican a las bacterias, además de su forma antes mencionadas, en bacterias, según su óptimo de temperatura entre ellas las termófilas, mesófilas y psicrófilas, también, según su pH en el cual se desarrollan: acidófilas, neutrófilas y basófilas y para fines prácticos, según la necesidad de oxígeno: bacterias aerobias estrictas donde se tiene a la *Helicobacter pylori*, bacterias anaerobias estrictas y las bacterias anaerobias facultativas, aquí se tienen especies como *E. coli*, *salmonelas* y *Estafilococos*.

Estafilococcus

Jewets et al, 2010 define los estafilococcus como células esféricas grampositivas, por lo general, dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tiene actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso. Algunos son miembros de la microflora normal de la piel y las mucosas del ser humano; otros producen supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas suelen producir septicemia normal. (p.185).

Es importante resaltar que casi todas las personas presentan algún tipo de infección por *S. aureus* durante su vida, puede ser desde una intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas leves hasta infecciones graves que ponen en peligro la vida. Alrededor del 75% estas infecciones que son causadas por estafilococcus coagulasa-negativos se deben a *S.epidermis*(p.185).

Cultivo y características de crecimiento

Según Jewets et al, 2010 y Bustos, Handman y Gutiérrez (2006), los estafilococcus crecen rápidamente en casi todos los medios bacteriológicos, se desarrollan con más rapidez a una temperatura de 37°C, pero forman pigmento mejor a una temperatura ambiente (20 a 25°C). *S.aureus* suelen formar colonias de color gris a amarillo dorado profundo. El género *Staphylococcus* contiene dos especies *S. saccharolyticus* y *S. aureus* subespecie *anaerobius*, que al principio se desarrollan sólo bajo condiciones anaerobias, pero que se vuelven más aerotolerantes en los subcultivos. (p.185).

“Los estafilococcus producen catalasa, lo cual los distingue de los estreptococos, además fermentan lentamente muchos carbohidratos y producen ácido láctico, pero no gas, son relativamente resistentes a la desecación, al calor (resisten una temperatura de 50°C durante 30 minutos)”(Jewets et al, 2010).

En la

Figura 1, se observa el crecimiento de las colonias de *S.aureus* en una placa de agar sangre, después de la incubación durante 24 horas.

Figura 1. Colonias de *S.aureus* incubadas en placas de agar sangre.



Fuente: Jewets et al, 2010.

Bustos et al (2006), establecen que *S.aureus* forma parte de la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre (p.288).

Generalmente, una lesión estafilocócica presenta un furúnculo u otro absceso circunscrito. Grupos de *S. aureus* establecidos en un folículo piloso producen necrosis del tejido (factor dermonecrótico), se produce coagulasa y coagula la fibrina alrededor de la lesión lo que da con la formación de tejido fibroso al final del proceso. En el centro de la lesión, ocurre la licuefacción del tejido necrótico, la cavidad se llena lentamente con tejido de granulación y después hay cicatrización. (Jewets et al, 2010).

Principales infecciones producidas por *Staphylococcus*

“*S. aureus* posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales de la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis.

Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Provoca intoxicación alimentaria al liberar sus enterotoxinas en los alimentos y produce el síndrome del shock tóxico al liberar super antígenos en el torrente sanguíneo. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres” (Bustos et al, 2006, p.287).

Según Cervantes, García y Salazar (2014), la evolución natural de las infecciones por *S. aureus* se puede resumir como sigue: en neonatos, la mayoría de los niños y los adultos serán colonizados en forma intermitente por *S. aureus*, albergarán el microorganismo en forma preferente en la nasofaringe, ocasionalmente en la piel y más raramente en la vagina. Sin duda, esta bacteria puede contaminar cualquier sitio de la piel, mucosas o incluso trasladarse a otras personas por transferencia interpersonal, a través de aerosoles o por contacto directo.

La liberación de toxinas en la piel y otros órganos puede causar diversos tipos de exantemas cutáneos y síntomas generales como lo es la enfermedad diarreica aguda. Las bacterias pueden sobrepasar los mecanismos fagocíticos locales y acceder a los canales linfáticos y al torrente sanguíneo, dando origen a una bacteriemia estafilocócica, ésta es una complicación grave que puede conducir a una infección metastásica el cual conlleva a un pronóstico no muy alentador para el paciente. (Cervantes et al, 2014).

“Desde cualquier punto, los microorganismos pueden diseminarse a través de los linfáticos y la circulación sanguínea a otras partes del organismo. La supuración dentro de las venas, asociada a la trombosis, es una característica frecuente de tal diseminación. En la osteomielitis, el centro primario del crecimiento de *S. aureus* suele ser un vaso sanguíneo terminal de la metafisis de un hueso largo, lo que desencadena necrosis del hueso y supuración crónica. *S. aureus* puede ser causa de neumonía, meningitis, empiema, endocarditis o septicemia con formación de pus en cualquier órgano.

Los estafilococos de baja invasividad intervienen en muchas infecciones cutáneas (p. ej., acné, piodermia o impétigo). Los cocos anaerobios (*Peptostreptococcus*) participan en las infecciones anaerobias mixtas. Los estafilococos también causan enfermedad mediante la elaboración de toxinas, sin una infección invasiva manifiesta. La exfoliación ampollosa, el síndrome de epidermólisis estafilocócica

aguda, es causada por la producción de toxinas exfoliativas” (Jewets et al, 2010, p 189).

Castañón (2012), establece que *S.aureus* una de las principales causas de infecciones adquiridas en la comunidad y a nivel hospitalario, esta bacteria puede comportarse, tanto como un organismo comensal y como un agente patógeno, siendo la mucosa nasal el principal sitio de colonización de los seres vivos, estimándose que aproximadamente el 20% al 30% de la población general es portadora de la bacteria.

Pruebas diagnósticas de laboratorio por infecciones por S.aureus

Jewets et al (2010), establecen los siguientes cuatro tipos de pruebas de diagnóstico utilizadas en la clínica para identificar o aislar la bacteria *S.aureus*, los cuales se enumeran a continuación:

Muestras: las muestras apropiadas son las relacionadas con fluidos corporales como lo son: sangre, aspirado traqueal o líquido cefalorraquídeo o pus de la superficie (p. 189).

Frotis: característicamente los estafilococos aparecen como cocos grampositivos en racimos en frotis de pus o de esputo al teñirse con la técnica de Gram (p.189).

Cultivo: al sembrar las muestras en agar sangre se originan colonias características en un término de 18h a una temperatura de 37°C, pero los pigmentos se pueden producir hasta varios días después a temperatura ambiente. El *S.aureus* fermenta al medio de cultivo manitol, pero no así otros estafilococos (p.189).

Prueba de la catalasa: es una prueba utilizada para detectar la presencia de la enzima citocromo oxidasa, consiste en colocar una gota de la solución de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos y aplicar una cantidad del crecimiento bacteriano a la solución. Si se presenta burbujas, es decir, si se da la liberación de oxígeno es indicación de una prueba positiva (p.189).

Prueba de la coagulasa: esta prueba consiste en mezclar el plasma de conejo (o humano) citratado, diluido 1:5 se mezcla con un volumen igual de caldo de cultivo o del cultivo de colonias crecidas en agar y se incuba a una temperatura de 37°C, si se forman coágulos en un lapso de 1 a 4 horas la prueba es positiva (p.189).

Antibioticoterapia para el tratamiento por infecciones con *S.aureus*

La mayoría de las personas infectadas con *S.aureus* se alberga la bacteria ya sea en la nariz, en la piel o en la faringe, puesto que los microorganismos patógenos pueden diseminarse rápidamente de una lesión a otra zona de la piel ya sea por contacto con los dedos y por la ropa que se utiliza. Muchos fármacos antimicrobianos tienen algún efecto contra los estafilococos *in vitro*, sin embargo, en personas infectadas por patógenos es difícil erradicarlos ya que los microorganismos rápidamente desarrollan resistencia, impidiendo así que el fármaco ejerza su acción en la porción necrótica central de una lesión supurativa. (Jewets et al, 2010, p 190)

Suárez y Gudiol (2008), mencionan que Alexander Fleming en 1928 observó que el crecimiento de *S.aureus* se inhibía ante la presencia del hongo *Penicillium notatum*. Sin embargo, no fue sino hasta 1940 cuando se empieza a utilizar el tratamiento parenteral con penicilina, aún al pasar del tiempo los betalactámicos son los antimicrobianos más prescritos en atención primaria y hospitalaria. (p 116)

La producción de antibióticos como la penicilina a través del tiempo ha crecido de la mano del desarrollo industrial, se ha desarrollado antibióticos resistentes a la penicilinas, otros útiles para las micobacterias (*M. tuberculosis*), para Gram negativos (G-), para hongos, y así hasta los novedosos antiretrovirales. (Ponce de León, Arredondo y López, 2015, p 682.)

Jewets et al (2010), establecen que las cepas de *S.aureus* resistentes a la penicilina G siempre producen penicilinas, a menudo son susceptibles a penicilinas resistentes a la lactamasa B, cefalosporinas o vancomicina. (p 191)

Generalidades de los hongos

“Los hongos son microorganismos eucariotas que se ubican en la naturaleza. Este reino comprende cerca de 50000 diferentes especies donde solo alrededor de 200 de las miles de especies han sido identificados como patógenos en los humanos, y de éstas solo una docena de ellas son las responsables del 90% de todas las infecciones producidas”.(Kayser, Bienz,Eckert y Zinkernagel, 2005)

Jewets et al (2010), establecen que los hongos son organismos eucariotas con al menos un núcleo y una membrana nuclear, un retículo endoplasmático, mitocondrias y un aparato secretor. Son quimiótrofos, secretores de enzimas que degradan una amplia variedad de sustratos

orgánicos en nutrientes solubles que luego son absorbidos pasivamente o integrados a la célula por transporte activo. (p 628)

El elemento morfológico básico de los hongos es la hifa, una red de hifas entrelazadas se conoce como un micelio. La forma básica de un hongo unicelular es llamada levadura, por lo general, los hongos asumen la forma de levadura en la etapa parasitaria y la forma de micelio en la etapa saprófita. Las paredes celulares de los hongos consisten en casi un 90% de carbohidratos, así como glucoproteínas y lípidos, tales como quitina, glucanos y mananos. Los hongos filamentosos se reproducen asexualmente (mitosis), por crecimiento de hifas y extensión de la punta, o con la ayuda de esporas asexuales. (Kayser et al,2005)

“La fase de levadura suele formarse en los tejidos del huésped, su cultivo es a 37 °C, mientras que la fase miceliar se encuentra en cultivo a temperaturas de 25 °C. Entre los hongos dimorfos patógenos se encuentran algunas especies agentes de micosis profundas, como *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides immitis*. Algunas especies de interés médico, causantes de micosis básicamente superficiales, como *Candida albicans* y *Malassezia globosa*.” (Crespo,2008, p388).

Jewets et al (2010), indican que los hongos se clasificación en cuatro filos: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*. El filo más numeroso es el *Ascomycota* (o ascomicetos) que incluye más del 60% de los hongos conocidos, y en promedio cerca del 85% de los patógenos para los humanos. (p 629)

“Entre las micosis más comunes que afectan al ser humano se distinguen, las infecciones exógenas, en las que la entrada del hongo en el huésped puede producirse directamente en la piel sana, por implantación a través de heridas o traumas superficiales, por inhalación o por diseminación desde un foco previo de infección profunda. Ejemplos de cada una de ellas son las dermatofitosis, las micosis subcutáneas, las aspergilosis y la histoplasmosis. Por otro lado, hongos comensales, como las especies de *Malassezia* en la piel o las de *Candida* en el tracto digestivo, pueden devenir patógenas aprovechando ciertas alteraciones del huésped que permiten que los microorganismos se multipliquen e invadan los tejidos: son infecciones endógenas.” (Crespo, 2008, p389)

Proliferación y aislamiento de hongos.

Muchos hongos viven en la naturaleza y crecen fácilmente solo con una fuente de nitrógeno y carbohidratos, el medio utilizado tradicionalmente en micología, el agar Sabouraud, contiene glucosa y peptona modificada a un pH de 7,0 este medio se ha usado porque no permite la proliferación de las bacterias. (Jewets et al, 2010, p 630)

Clasificación de las micosis

Según lo establece Crespo (2008), no existe un consenso definitivo de la clasificación de la micosis, sin embargo, los define en su monografía de la siguiente manera:

Micosis superficiales o saprofitas: en este tipo el hongo, está limitado al estrato córneo, por lo que causa una mínima reacción en el huésped, en ésta están incluidas las pitiriasis versicolor, las piedras y la tinea nigra (p390).

Micosis cutáneas: éstas, también, están limitadas al estrato córneo, pero inducen en mayor medida una reacción de inflamación. Aquí, se incluyen las dermatofitosis o tiñas y las candidiasis de piel, mucosa y uñas (p390).

Micosis subcutáneas: aquí están comprendidas las micetomas, la esporotricosis, la cromoblastomicosis, la lobomicosis y la rinosporidiosis (p390).

Micosis sistémica: en este último apartado se agruparían la blastomicosis, la histoplasmosis, la criptococcosis, la coccidiomicosis, la paracoccidioidomicosis, las cigomicosis, las aspergilosis, las hialohifomicosis y las candidiasis sistémicas.

Candidosis

Existen algunas especies del género *Candida* que pueden causar candidosis, éstas por lo general, son miembros de la flora normal de la piel, mucosas y de las vías gastrointestinales. La candidosis es la micosis sistémica más común y los agentes que con mayor frecuencia las producen son *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. dubliniensis*. ((Jewets et al, 2010, p 647)

Kayser et al (2005), mencionan que al menos el 70% de todas las infecciones causadas por Candidosis son causadas por *C.albicans*. Las tinciones de Gram revelan que *C.albicans* es una levadura ovalada Gram-positiva, esta especie puede cultivarse en los medios de cultivo habituales en los cuales después de 48 horas de incubación presenta unas colonias blanquecinas, éstas se diferencian de otras levaduras por características morfológicas y bioquímicas. (p. 363)

Existen dos técnicas sencillas descritas por Jewets et al (2010), para diferenciar *C.albicans* que es el patógeno más frecuente de otras especies de Cándida, la primera consiste en que después de la incubación en suero durante unos 90 minutos a 37°C, las levaduras de *C.albicans* comienzan a formar hifas verdaderas o tubos germinativos y en medios con deficiencia de nutrientes *C.albicans* produce grandes clamidosporas esféricas. En la segunda técnica se puede utilizar la fermentación en azúcar. (p.647)

Pruebas diagnósticas de laboratorio

Jewets et al (2010) enumeran una serie de pruebas que se utilizan, generalmente, para poder identificar si se trata de *C.albicans* o alguna otra especie de Candida. Entre las principales por tener en cuenta se tienen:

Muestra: se obtienen muestras con aplicadores y raspaduras de lesiones superficiales, sangre, líquido cefalorraquídeo, tejidos para biopsia, orina, exudados, entre otros. (p.648)

Examen microscópico: todas las muestras obtenidas se examinan en extensiones teñidas por la técnica de Gram en busca de pseudohifas y células gemantes. (p.648)

Cultivo: todas las muestras son cultivadas en medios para hongos o bacterias a temperatura ambiente o 37°C. *C.albicans* se identifica por la producción de tubos germinativos o clamidosporas, otras especies de Candida se identifican por un conjunto de reacciones bioquímicas. (p.649)

Serología: en general, los métodos serológicos tienen sensibilidad o especificidad escasa, en el caso de la Candidosis sistémica puede haber incremento de los títulos de anticuerpos a diversos antígenos de Candida. (p.649)

Principales enfermedades producidas por hongos.

Además de las alergias fúngicas que son frecuentes encontrar Kayser et al (2005) establecen que las enfermedades por hongos son muy frecuentes y se pueden clasificar clínicamente de la siguiente manera: micosis primaria (coccidioidomicosis, histoplasmosis, blastomicosis), micosis oportunistas (micosis superficiales y de levadura profunda, aspergilosis, mucormicosis, feohifomicosis, hialofitomicosis, criptococosis; peniciliosis, neumocistosis), micosis subcutáneas (esporotricosis, cromoblastomicosis, micetoma, micosis cutáneas (pitiriasis versicolor, dermatomicosis). La micosis se desarrolla, principalmente, en pacientes con deficiencias inmunológicas. (p.352)

Jewets et al (2010) establecen las siguientes manifestaciones clínicas que se presenta en la candidosis:

Candidosis cutánea y de mucosas: ésta presenta factores de riesgo para que se presente, tales como SIDA, embarazo, diabetes, lactantes, ancianos, uso de anticonceptivos, traumatismos en la piel. Se presenta un algodoncillo en la lengua, los labios, encías, o el paladar. Se puede presentar invasión en la vagina originada por levaduras, ésta se caracteriza por irritación, prurito y secreción vaginal. Otra manifestación incluye la invasión a la piel, principalmente, cuando el órgano se encuentra debilitado por algún traumatismo. (p.647)

Candidosis sistémica: ésta puede ser causada por catéteres, sondas, operaciones, uso de drogas intravenosas, broncoaspiración, daño en la piel o a las vías gastrointestinales. En pacientes con deficiencia innata de fagocitos los cuales no poseen células de defensa, pueden surgir infecciones en cualquier sitio en particular como en riñones, piel, ojos, corazón y meninges. Otro factor es por el uso a largo plazo de corticosteroides y otros inmunosupresores. (p.648)

Candidosis mucocutánea crónica: es una enfermedad rara que inicia en la niñez y se acompañan a inmunodeficiencias de índole celular y endocrinopatías, éstas originan infecciones graves que producen desfiguración en cualquier parte de la piel o de las mucosas. (p.648)

Para el tratamiento de la candidosis como el conocido algodoncillo y otras formas mucocutáneas producidas por *C.albicans*, se suelen tratar con nistatina tópica, cetoconazol o fluconazol principalmente por vía oral. La forma sistémica o generalizada se trata con anfotericina B en conjunto con flucitosina o fluconazol, las lesiones cutáneas desaparecen con

mayor rapidez si se eliminan factores contribuyentes como la humedad excesiva o el consumo de antibacterianos.

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos (PSA) y concentración mínima inhibitoria (CMI)

La realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana que se realizan en los laboratorios de microbiología clínica es de gran importancia para confirmar la susceptibilidad a los agentes antimicrobianos o para detectar resistencia a los distintos aislamientos bacterianos, principalmente, aplicados para bacterias patógenas que presentan mecanismos de resistencia. Algunas de las pruebas son, la susceptibilidad a la penicilina presentada por *Streptococcus pyogenes*, pruebas de susceptibilidad de aislamientos individuales con algunas especies importantes que pueden poseer mecanismos de resistencia adquiridos, por ejemplo, Enterobacteriaceae, especies de *Pseudomonas*, especies de *Staphylococcus*, especies de *Enterococcus* y *Streptococcus pneumoniae*. (Jorgensen y Ferraro, 2009, p1749)

En los reportes emitidos por Clinical Laboratory Standards Institute CLSI (2017), se establece que una bacteria es sensible cuando ha generado un halo de inhibición de entre 30mm y 35mm de diámetro, una cepa es resistente cuando genera halos de inhibición menores a 15mm. Mediante la aplicación de este ensayo es posible establecer cuáles sustancias antibacterianas son efectivas y permite determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

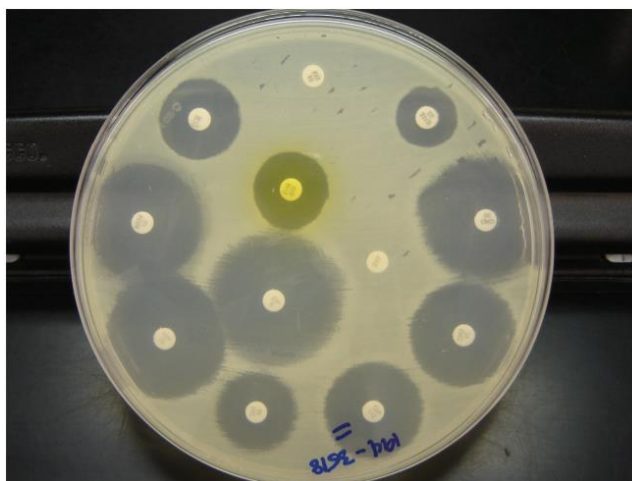
Jorgensen y Ferraro, (2009) establecen distintas pruebas o métodos de análisis de susceptibilidad que se desarrollan a continuación:

Ensayos de caldo de dilución: este procedimiento consiste en la preparación de diluciones de los antibióticos en concentraciones conocidas como 1, 2, 4, 8 y 16 mg/mL en el medio líquido dispensado en tubos de ensayo, estos han sido previamente inoculados con bacterias en suspensión estandarizada de $1 \text{ a } 5 \times 10^5 \text{ CFU /mL}$. Después de una noche de incubación a 35°C los tubos que presentan turbidez son los que presentaron crecimiento, la menor concentración de antibiótico que impida el crecimiento representa la concentración mínima inhibitoria (CMI).(p1749)

Método de gradiente antimicrobiano: en este método se utiliza el principio de establecer un gradiente de concentración antimicrobiana en un medio de agar especial para determinar susceptibilidad, por lo general, se emplean tiras plásticas que están impregnadas en la parte inferior con una concentración de antibiótico y están marcadas en la superficie con una escala de concentración, después de una noche de incubación las pruebas se leen viendo las rayas de la parte superior del plato, la CMI se determina por la intersección de la parte inferior del área de inhibición con la tira reactiva. (p 1750)

Métodos de discos de difusión: este método es bastante práctico, la prueba se realiza aplicando una bacteria de aproximadamente 1 CFU/mL a la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton, luego se colocan discos de papel impregnados con las concentraciones preparadas del antibiótico sobre la superficie del agar inoculado. Las placas se inoculan de 16 a 24 horas a 35°C. Las zonas de inhibición del crecimiento alrededor de cada uno de los discos de antibiótico se miden al milímetro más cercano. El diámetro de la zona está relacionado con la susceptibilidad del aislado y a la velocidad de difusión del medicamento a través del medio agar. Los resultados obtenidos se traducen utilizando las categorías de susceptibilidad ya sean susceptibles, intermedios o resistentes dadas por Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). En la Figura 2, se observa el resultado obtenido al realizar la prueba de difusión de disco para el aislamiento de *Escherichia coli* en un cultivo de orina.

Figura 2. Prueba de difusión de disco para el aislamiento de *Escherichia coli* de un cultivo de orina.



Fuente: Tomado de Jorgensen y Ferraro, 2009.

Plantas medicinales

Las plantas constituyen una fuente importante para el aislamiento de productos naturales como drogas, tintes, saborizantes y fragancias, muchos de estos químicos son metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento de las plantas y se acumulan en tejidos especializados. (Barroto et al, 2005).

El hombre desde la antigüedad ha experimentado con distintos tipos de hierbas para el desarrollo y tratamientos de ciertas enfermedades, las plantas medicinales por definición son aquellas que disponen de principios activos o metabolitos los cuales pueden utilizarse en el tratamiento y curación de enfermedades, el objetivo de estudiarlas es buscar sintetizar compuestos de estructuras conocidas para producir nuevas formas farmacéuticas con mayor eficacia y menos toxicidad que los medicamentos sintetizados. (Mendoza 2008).

En Costa Rica, se estima un aprovechamiento total de 406 especies que corresponden a 104 géneros: la familia Asteraceae reúne el mayor número de especies, asimismo, 37% del total está representado por 11 familias. (Quesada, 2016, p 43).

El uso tradicional de plantas silvestres es motivo de estudio ya que se involucra el conocimiento científico con el adquirido a través de la transmisión oral adquirido de generación en generación como sucede en ciertas regiones de Costa Rica. (Moreira et al, 2014, p70).

Sharapin (2000), establece que los productos de origen natural puros se definen por su estructura química y son identificados por los distintos análisis químicos. Los productos fitoterapéuticos tienen composición química variable, por lo cual son definidos por los procesos de extracción. Por lo tanto, dos de los factores de mayor importancia en el proceso de industrialización de este tipo de producto son la calidad de la materia prima utilizada y el solvente utilizado para su extracción.

Garantía de la calidad de las plantas medicinales para uso en productos farmacéuticos

Quesada (2016) en su publicación en relación con la guía de plantas útiles de la región de Diquis del Museo Nacional de Costa Rica, establece ciertos aspectos que se deben considerar para utilizar el material vegetal como parte de la formulación en un medicamento, es muy importante que el producto sea de la más alta calidad, se ha establecido una serie de exámenes entre los que se recomiendan análisis botánicos como el análisis de identidad, análisis de pureza como lo son las pruebas físico-organolépticos y microbiológicos y los análisis de actividad o composición y garantía de calidad del producto terminado, los cuales se describen a continuación:

Exámenes de identidad: en este análisis, se pretende determinar plenamente la especie en cuestión y la parte usada medicinalmente. Todo laboratorio de productos farmacéuticos debe tener un herbario para referencia y así asegurar la identidad de la especie que se va a utilizar. (p 50).

Exámenes de pureza: son exámenes de laboratorio que pretenden garantizar que la materia prima proveniente de los campos de cultivo ha sido procesada adecuadamente y almacenada en condiciones óptimas, se realizan al menos dos tipos de análisis:

Físico-organoléptico: se refiere al análisis macroscópico y estereoscópico del secado, tamaño de partículas, búsqueda de contaminación por larvas e insectos, características de color, olor y sabor, condiciones de aspecto general de una muestra representativa del lote proveído por el productor. Se analiza, también, el porcentaje de humedad por métodos gravimétricos o

químicos. De importancia son también los ensayos para la determinación de cenizas (totales, insolubles en ácido, y solubles en agua) pesticidas y metales pesados. (p 50).

Exámenes de actividad y composición: los análisis de actividad se realizan, generalmente, con bioensayos, ya sean *in vitro* o *in vivo*, los cuales pretenden evaluar la actividad biológica o farmacológica de una materia prima, extracto o producto terminado. Las principales pruebas pueden contribuir, tanto a la validación del uso popular como a la verificación de la bioactividad de la planta, por lo general, son ensayos para medir la actividad antibacteriana, antifúngica, citotóxica, antiinflamatoria, hipoglucemante, diurética, espasmolítica e inmunomoduladora. (p 50).

Análisis de actividad o composición: se pueden realizar en tres niveles dependiendo de la instrumentación disponible. En primer lugar, mediante el tamizaje fitoquímico por pruebas convencionales (macrométrico), luego por el análisis de fracciones purificadas y finalmente, mediante la valoración de un principio activo específico. El principio activo se puede evaluar utilizando cromatografía de capa fina, espectrofotometría, reflectometría, cromatografía de gases o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). (p 50).

Generalidades de la *Senna reticulata*

La especie *Senna reticulata* perteneciente a la familia Fabaceae y subfamilia *Caesalpinioideae*, es un arbusto leñoso de flores amarillas, los tallos crecen rápidamente, produce flores todo el año, crece en sitios abiertos y es una planta que resiste la sequía. (Matulevich et al, 2017).

Parolin (2005), describe que la especie de *Senna reticulata Willdes* un árbol pionero que coloniza zonas abiertas del Amazonas, sus raíces y tallos poseen una alta tolerancia a la inundación y presenta una alta asimilación fotosintética. (p41).

“Se ubica en Costa Rica en el bosque húmedo, muy húmedo y pluvial así como en charrales y tacotales. Se cultiva de 0 a 500 (-1800) m de altura. Principalmente se puede encontrar en vertiente del Caribe, Cordillera de Talamanca, Llanuras de los Guatusos, de Tortuguero, Santa Clara, Baja Talamanca, cuenca del Río Tempisque, Valle Central, en el

Parque Nacional Carara, región de Puriscal (la Cangreja), Parque Nacional de Manuel Antonio, vecindad de Palmar Norte, región de Golfo Dulce, Isla del Coco”. (Hammel, Grayum, Herrera y Zamora 2010, p 710).

El cultivo se realiza por semilla, se debe tener cuidado con el fruto ya que se quiebra con facilidad y la semilla es muy pequeña, no se deben almacenar por mucho tiempo y éstas germinan a los tres o cuatro días de sembradas. Después de tres o cuatro meses las plantas germinadas se trasladan al sitio definitivo de siembra, la primera cosecha se realiza a los cinco meses de establecida la plantación. (Quesada, 2008, p 24).

Clasificación taxonómica

De acuerdo con Barría y Sánchez (2013), la planta se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Rosales*

Familia: *Fabaceae*

Género: *Senna*

Especie: *Senna reticulata Will*

Nombre común: *retama*

Sinonimia: *Cassia reticulata Will. V*

Descripción Botánica

Según lo establece Hammel et al (2010), *Senna* (Willd) H.S Irwin & Barneby nombre común Saragundi, Saragundín, Sorocontil, es un arbusto o arbolito de 3 a 8m, presenta las ramitas de

color pardo rojizo, cortamente pubescentes, presenta hojas con el pecíolo de 3,5 a 13 cm, sin nectarios glandulares; raquis 13 a 45cm, sin nectarios glandulares, que termina en un apéndice de 1,5 a 5 mm y presenta folíolos 7 a 13 pares, florece entre los meses de enero a marzo. (p710). En la Figura 3, se observa un arbusto pequeño de la planta Saragundi tomado de la zona de San Vito de Coto Brus, de la provincia de Puntarenas, Costa Rica donde se recolectó el material vegetal de la investigación.

Figura 3. Arbusto de *Senna Reticulata* Willd (Saragundi).



Fuente: Tomada por la señora María Rosa Rodríguez Rodríguez el 14 de febrero de 2018 en la zona San Vito de Coto Brus, de la provincia de Puntarenas, Costa Rica.

Es importante resaltar como lo estipula Hammel et al (2010), que para diferenciar la especie *Senna reticulata* de la *Senna alata*, se debe ir al análisis minucioso de la descripción botánica de cada especie, donde la diferencia principal está en sus pecíolos. La especie *Senna alata* se reconoce por sus pecíolos muy cortos (1,3 a 5cm) a veces son casi nulos o recubiertos por los folíolos proximales. La especie *Senna reticulata* presenta pecíolos más grandes (3,5 a 13cm) es común que se tiendan a confundir ambas especies, y por ende, se puede dar un uso indebido de la planta para fines medicinales.

Etnofarmacología de la planta

Quesada (2008), establece los siguientes usos por parte de la población, que se le han asignado a la planta de Saragundi, presentándose, además, los siguientes efectos terapéuticos, por

ejemplo, al realizar una infusión se puede utilizar para bajar la fiebre, como laxante, para combatir el reumatismo, también ayuda a los malestares del hígado. Se usa en fricciones contra enfermedades venéreas y de la piel, además regula la menstruación y en maceración con alcohol, se utiliza para combatir la artritis y el reumatismo.

Por otra parte, Sosa (2014), define que para la preparación por infusión: se vierte una taza de agua hirviendo sobre una cucharada de hojas, se deja reposar durante 10 minutos, luego se toman de dos a tres tazas tres veces al día. La maceración en alcohol consiste en remojar dos a tres hojas picadas en media taza de alcohol y se usa tópicamente. La fricción se realiza al machacar las hojas frescas y se friccionan sobre la piel afectada.

Así mismo, Moreira et al, (2014) definen que la planta se utiliza como antiinflamatorio, para uso cardiovascular, de uso en dermatología para infecciones, también en problemas gastrointestinales combatiendo la artritis y el reumatismo. Además del uso conocido de sus hojas como laxante y reductor de peso. (p 24)

Fitoquímica de la planta

Se han reportado la presencia de ciertas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en las hojas, tallos, flores y frutos, donde se destaca la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos, antraquinonas, saponinos y glicósidos. (Matulevich et al, 2017).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados heterociclos, a este grupo pertenecen sustancias como la morfina, heroína y cocaína, su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante la interacción con el ADN eucariota, lo cual explica, también, su actividad antiviral. (Barría y Sánchez, 2013).

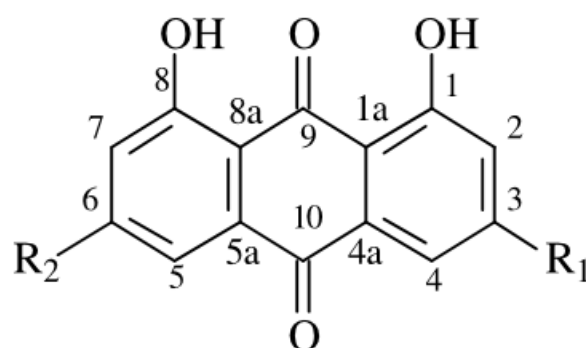
Nunes do Santos y Goratti (2008), reportan la identificación de compuestos como lo son seis antraquinonas, dos esteroides el B-sitosterol y el estigmasterol, dos triterpenos el alfa y beta amirina, el flavonoide campferol y la biantrona crisofanol. Se registran dos sustancias de gran interés como los son 1, 6, 8-trihidroxi-3-metoxiantraquinona y el 1,3,8-trihidroxiantraquinona.

Según Barría y Sánchez (2013), las quinonas son anillos aromáticos, se encuentran en muchos compuestos en la naturaleza y son las causantes del color marrón que se produce en las frutas dañadas. Presentan un alto potencial antimicrobiano ya que poseen una gran reactividad al

formar complejos con los aminoácidos hidrófilos de las proteínas, por lo general, inactivan la proteína y anulan su función.

En la Figura 4, se observan las antraquinonas identificadas en la planta *Senna reticulata*. Los valores La2-A y La2-B corresponde a las sustancias 1,6,8- trihidroxi-3-metoxiantraquinona y 1,3,8-trihidroxiantraquinona, respectivamente.

Figura 4. Antraquinonas identificadas en la elucidación de la planta *Senna reticulata*(willd).



	R ₁	R ₂
Crisofanol	CH ₃	H
Fisciona	CH ₃	OCH ₃
Emodina	CH ₃	OH
La2-A	H	OH
La2-B	OCH ₃	OH

Fuente: Tomado de Nunes do Santos y Goratti (2008).

Las antraquinonas son un grupo importante de compuestos secundarios encontrados en bacterias, hongos, líquenes y plantas superiores. Se encuentran en un gran número de familias que incluyen *Rubiaceae*, *Rhamnaceae*, *Poligonaceae*, y *Leguminosaceae*. (Barroto et al, 2005).

Las antraquinonas poseen grupos fenólicos en C-1 y C-8 y grupos Ceto en C-9 y C-10, adicional a esto un grupo metil, oxymetil o carboxilo puede estar presente en C-3, y un grupo hidroxilo o metoxi en C-3, esto se evidencia en la Figura 4. (Wagner y Bladt, 2000, p 54).

“La mayoría de las antraquinonas están hidroxiladas en C-1 y C-2 y con frecuencia están en forma de glicósidos que son los que se hidrolizan durante el aislamiento, la mayoría se pueden extraer con disolventes no polares pero cuando están como glicósidos se extraen con agua, etanol o mezclas de ambos.” (Domínguez, 1985, p 163).

En la industria farmacéutica las antraquinonas se utilizan para el tratamiento de gingivitis, estomatitis, úlceras bucales, inflamación de las mucosas y condiciones periodontal. Otro miembro del grupo de las antraquinonas la *Senna* se utiliza en la preparación de laxantes para el estreñimiento. (Barroto et al, 2005).

Barría y Sánchez (2013) así como Mihai y Holban (2017) mencionan que el otro grupo presente en el extracto de *Senna reticulata*, los flavonoides son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo, cuya actividad frente a los microorganismos se debe a la formación de complejos con las proteínas solubles y extracelulares con las células de la pared bacteriana. Los flavonoides tienen una gran importancia en las plantas por sus efectos antimicrobianos, antioxidantes.

Los flavonoides se encuentran distribuidos en las plantas, tanto como glicósidos libres, de hecho son estos los que contribuyen a darle color a flores, frutos y hojas de las plantas. Los flavonoides presentan distintos tipos de solubilidad, hay algunos totalmente solubles en agua así como otros insolubles en ella, pero solubles en éter etílico, algunos son solubles en etanol, pero todas son insolubles en éter de petróleo (Domínguez, 1985, p81).

Además, Villanueva y Zevallos (2017), mencionan que en la planta de *Senna reticulata* se encuentran presentes gran cantidad de polifenoles, estos compuestos poseen una gran cantidad de beneficios para la salud, como sus características antioxidantes (p, 175).

Técnicas de Extracción para plantas medicinales

En este apartado, Sharapin (2000), desarrolla ampliamente la metodología por seguir para realizar extractos de productos fitoterapéuticos, es, por esta razón, que se utilizará dicho autor como referencia mayoritaria para este apartado.

Generalidades del proceso de extracción

Para iniciar un proceso de extracción ya sea en una escala piloto o industrial, se debe definir la selectividad del solvente por ser usado como uno de los parámetros de mayor importancia, éste va a depender del propósito que se desee tener, se puede obtener un extracto cuya composición química contiene la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta, o un extracto que contenga una característica determinada de interés. Entonces, para lograr la mayor cantidad de componentes químicos de la planta, se suelen utilizar solventes con alta polaridad como el alcohol etílico o metanol, en cambio para obtener un constituyente específico de interés, se usan solventes selectivos de menor polaridad como lo es el hexano, que sólo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares. (Sharapin, 2000, p18).

Otro factor importante, es el tipo de material vegetal con el que se realizará el extracto. La industria farmacéutica utiliza preferiblemente como materia prima, el material seco, una vez que éste ha sido sometido a procesos de procesamiento y estabilización. El utilizar material seco es beneficioso ya que de esta forma se interrumpen los procesos enzimáticos en las células vegetales y se impide el crecimiento de microorganismos, facilitando el almacenamiento y transporte del material sin riesgos del deterioro, sin embargo, como este proceso involucra calor pueden presentarse pérdidas de aceites esenciales y de sustancias volátiles, por lo cual la mayoría de las plantas medicinales pueden ser secadas a temperaturas entre 30°C y 60°C. (Sharapin, 2000, p25).

Mihai y Holban (2017) así como Sharapin, (2000) mencionan que pocas son las plantas que son procesadas frescas, son solo aquellas donde los procesos de secado dan como resultado un producto final con contenidos inferiores de principios activos. El contenido de humedad de las plantas frescas varía de 60% a un 80%, el proceso de secado en las hojas reduce este contenido de un 20% a 75%. Así mismo, el proceso de secado puede llevarse a cabo al sol o a la sombra, sin embargo, los mejores resultados se obtienen cuando se utilizan secadores solares o secadores que operan con aire caliente.

El proceso de extracción da inicio cuando la droga entra en contacto con el solvente, en el caso de utilizarse material seco, se produce un proceso opuesto al del secado, donde se tiende a reconstituir el estado original de la célula. El proceso de extracción, inicia, tanto para el material seco, como para el material fresco, cuando el solvente penetra en la célula vegetal y expulsa el aire

contenido en el citoplasma. Esta penetración del solvente en la célula, induce a un momento dipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos, permitiendo así que las sustancias extraídas se adhieran a las moléculas del solvente. Técnicamente, la eficiencia del proceso de extracción será mayor cuanto menor sea el tamaño de la partícula, ya que así se obtiene una mayor área de contacto con el solvente. (Sharapin, 2000, p28).

La capacidad de asociación de las partículas de la planta y el solvente, puede expresarse en términos de la constante dieléctrica, cuanto más polar sea un solvente mayor será su constante dieléctrica, así los compuestos ionizables o altamente polares se disuelven en solventes de elevada constante dieléctrica como lo es el etanol cuya constante dieléctrica es de 24 al igual que los compuestos apolares se disuelven en compuestos de baja constante dieléctrica como es el caso del hexano el cual presenta una constante de 2. (Sharapin, 2000, p 35).

Para escoger un solvente, es necesario considerar aspectos relacionados con la selectividad, la facilidad de manipulación, el precio, seguridad y los riesgos en cuanto a la posible contaminación ambiental; sin embargo, el más importante por a considerar es el grado de toxicidad del solvente. (Sharapin, 2000, p 37).

El agua, que es el solvente universal a utilizar en los procesos extractivos, no necesariamente debe ser desmineralizada o destilada, es suficiente con que haya pasado por pruebas que demuestren que es apta para el consumo humano, cumpliendo con dureza dentro de los límites y pruebas de microbiológicas dentro de los límites aceptables. (Sharapin, 2000).

Sharapin (2000) así como Mihai y Holban (2017), también definen cinco variables fundamentales que influyen en el proceso de extracción:

Agitación: ésta hace que nuevas cantidades de solvente entren en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación sea alcanzado.

Temperatura: la disolución de sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de temperatura, ya que ésta contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Es importante recordar que muchos principios activos son termolábiles y pueden ser destruidos total o parcialmente a temperaturas elevadas, se podrían perder sustancias volátiles, como por ejemplo, componentes de aceites esenciales. (p39).

pH: éste influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales, por ejemplo, en la extracción de alcaloides con solventes orgánicos de baja polaridad se requiere realizar un pretratamiento con soluciones alcalinas, buscando así liberar los alcaloides de sus sales y así volverlos solubles en el solvente orgánico. (p39).

Naturaleza del solvente: depende de lo que se busque extraer, el solvente que se utilice extrae selectivamente o no cierta clase de compuestos. Los alcoholes alifáticos de tres carbonos o mezclas de estos con agua son los solventes más utilizados, estos logran extraer la mayoría de sustancias de interés como alcaloides, flavonoides, glicósidos cardiotónicos y terpenos. El alcohol etílico y sus mezclas con agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos y tinturas. Se recomienda utilizar las proporciones 7:3 ó 8:3 cuando no existen estudios específicos y se requiere realizar la extracción de partes como tallo, raíces y semillas. La proporción 1:1 se recomienda para extraer hojas y partes áreas verdes, ya que a esta concentración se evita la extracción de clorofila y de sustancias polimerizadas o resinoides que pueden complicar las siguientes etapas de purificación por presentar precipitados viscosos. (p40).

Tiempo de extracción: se determina experimentalmente en función del solvente y el equipo seleccionado, este tiempo debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés. (p 41)

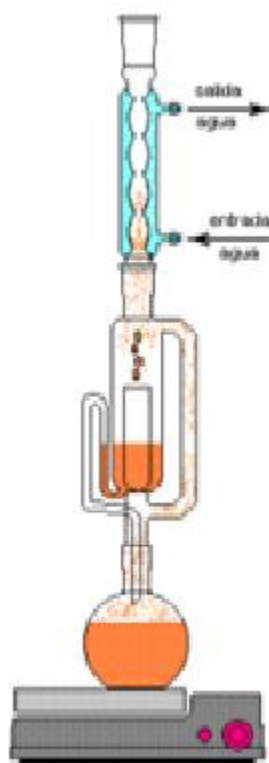
Técnicas de extracción convencionales

Existen distintas técnicas para la extracción de los compuestos bioactivos, la técnica clásica incluye distintos tipos de solventes o una mezcla de ellos junto con la aplicación de calor. Mihai y Holban (2017), definen tres métodos convencionales utilizados como técnicas tradicionales para la extracción de los compuestos activos, los cuales son:

Extracción por reflujo cerrado utilizando el equipo Soxhlet: es una técnica propuesta por el químico Alemán Franz Ritter von Soxhlet en 1879. Inicialmente, diseñado para la extracción de lípidos, consiste en colocar una cantidad de la muestra, por lo general, seca, en un dedal, éste es contenido en un balón de destilación que contiene el solvente, después de alcanzar cierto nivel de desbordamiento, la solución en el dedal es succionada por un sifón hacia el balón de destilación, la solución tiene solutos los cuales han sido extraídos dentro del líquido. Los solutos quedan en el balón de destilación y el solvente pasa hacia el lecho del material sólido.

El proceso se repite varias veces hasta completar la extracción, la cual puede realizarse por varios ciclos. (p276). En la Figura 5, se observa un esquema básico del sistema de extracción Soxhlet.

Figura 5. Esquema de extracción Soxhlet.



Fuente: Tomado de <http://cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>, 2018.

Tanto Sharapin (2000) como Mihai y Holban (2017), definen el segundo método la extracción por maceración, ésta consiste en dejar en contacto la droga vegetal con el solvente, dicho contacto puede ser por horas e incluso días. El rendimiento obtenido en este proceso, depende de factores como el tamaño de partícula, contenido de humedad de la planta o el solvente utilizado. La agitación casual o el incremento de temperatura pueden facilitar el proceso

de extracción. También, es importante mantener el material vegetal y el solvente en un recipiente cerrado durante el proceso de extracción. Una vez realizado el proceso de extracción, el líquido es filtrado.

Por último, se encuentra el método de hidrodestilación, éste es tradicionalmente utilizado para la extracción de los aceites esenciales. El proceso consiste en introducir el material vegetal dentro del matraz de destilación junto con agua, la cual es llevada hasta el punto de destilación, el calor permite que los componentes del material vegetal que se encuentran en el vapor sean liberados, este vapor es enfriado y recolectado a partir de la separación de los compuestos por su densidad. (p 276)

Cromatografía

Generalidades

La cromatografía fue originalmente desarrollada por el botánico Ruso M.S Tswett en los años comprendidos entre 1872 y 1919, inicialmente, creada como una técnica de separación basada en los pigmentos que presentan coloración en las plantas, con el tiempo evolucionó a ser un método utilizado para la separación de los componentes de una mezcla, los cuales se encuentran distribuidos en dos fases, una estacionaria y la otra móvil. (Robards, Haddad y Jackson, 2004, p 2)

Tal y como lo describen Waksmundzka, Sherma y kowalska (2008), la cromatografía es un conjunto de técnicas analíticas que permite realizar la separación molecular de los componentes en una mezcla compleja. La separación es posible debido al movimiento migratorio de las moléculas causado por la afinidad existente entre dos fases inmiscibles.

La separación de la mezcla en cada uno de sus componentes se lleva a cabo en un tiempo característico de paso en el sistema que se designa como tiempo de retención. Las variaciones en el tiempo de retención de los distintos compuestos es la característica que hace posible su separación. (Waksmundzka et al, 2008, p5)

Las técnicas de cromatografía agrupan un conjunto importante de métodos los cuales permiten separar componentes que están estrechamente relacionados en mezclas complejas, en

casi todas las separaciones cromatográficas la muestra se disuelve en una fase móvil, ésta se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible que se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Los métodos cromatográficos se pueden clasificar en clases generales: cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos. (Skoog y Leary, 1994, p 675),

Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina (CCF o TLC por sus siglas en inglés), es un tipo de cromatografía cuyo principio de separación se basa en la diferencia de solubilidad del compuesto químico, la fase móvil y la fase estacionaria. Es además, una cromatografía de adsorción, es decir, la fase estacionaria está compuesta por un sólido finamente subdividido conocido como adsorbente. (Fried y Sherma, 1996, p 1)

Esta técnica es una forma de cromatografía que consiste en un adsorbente sólido (fase estacionaria), distribuido uniformemente sobre una superficie plana, que generalmente, puede ser hojas de aluminio o vidrio. Este adsorbente presenta cierta capilaridad dada por las partículas finamente divididas y que permite que la fase móvil pase entre las partículas del adsorbente. La separación ocurre cuando uno de los componentes de la mezcla es retenido en mayor grado por la fase estacionaria que los otros componentes. La fase estacionaria puede modificarse de acuerdo con las necesidades de separación, aunque el factor más importante para que ésta se lleve en forma adecuada es la fase móvil elegida. (Secretaría de Salud, 2013, p 112).

En cromatografía de capa fina, particularmente, el adsorbente, que puede ser sílica o alúmina, se encuentra extendido sobre un soporte rígido de vidrio o aluminio como una capa homogénea y con grosor de 0,25mm. La fase móvil en CCF está formada por uno o más solventes orgánicos, a esta fase también se le denomina como eluyente. (Fried y Sherma, 1996, p 3)

Tan importante como la selección de la fase para cromatografía de capa fina, es la selección de los reveladores, químicos que reaccionan con los compuestos de la placa y permiten su visualización empleando luz ultravioleta. El revelador es necesario cuando se trabaja con compuestos volátiles que pueden variar su estructura al final de la revelación o porque presenta una sensibilidad de detección mayor con el revelador” (Secretaría de Salud, 2013, p 113).

Los reveladores mayormente empleados en cromatografía son: vapor de yodo o ácido sulfúrico ya que interactúan con casi la totalidad de compuestos orgánicos. Otros reveladores

actúan facilitando la visualización de marcadores de grupos funcionales específicos, así por ejemplo, los alcaloides se visualizan con el reactivo de Dragendorff, para compuestos con aminas y aminoácidos está la ninhydrina o el 2-difenilborinato de etilamina con polietilenglicol para polifenoles y el reactivo de vainillina para flavonoides (Wagner y Bladt, 2001).

A continuación, según lo descrito por Fried y Sherma, (1996), se muestran algunos adsorbentes en orden creciente de fuerza de polaridad:

Octadecyl sílica < Ciano sílica < amino sílica < Gel de sílica. El gel de sílice o sílica gel ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$), es de los adsorbentes más utilizados para CCF. Es un gel sólido, cristalino, poroso, de baja solubilidad y, por lo tanto, muy estable. (p 2).

Al igual que con el adsorbente, el eluyente debe mostrar una buena selectividad para separar los componentes de la sustancia analizada. Al seleccionar la fase móvil deben considerarse características como la habilidad del solvente para ser adsorbido por el eluato. Si la atracción entre ambos es muy fuerte puede ocurrir que la sustancia avance a través de la placa sin separarse, pero si por el contrario fuera un eluyente muy débil, no sería capaz de desplazar la sustancia (Fried y Sherma, 1996, p 5).

Fried y Sherma (1996), también, mencionan que los solventes orgánicos más utilizados según su fuerza eluyente (partiendo de menor fuerza hacia el de mayor fuerza) son: metanol, etanol, ácido acético, acetona, acetato de etilo, éter dietílico, diclorometano, tolueno y hexano.

Descripción de la técnica

Fried y Sherma (1996) así como Sasidharan, Chen, Saravana Sundram y Yoga, (2011) afirman que la separación por capa fina inicia con la preparación de la cámara de desarrollo, para esto se debe agregar el sistema de solventes y adherir papel filtro humedecido con los solventes a las paredes internas de la cámara con el fin de saturar la cámara con los compuestos orgánicos.

La solución muestra se aplica en banda utilizando un capilar o micropipeta sobre el punto definido como origen en la cromatoplaqueta, ubicado 1,5 – 2cm del extremo inferior de la placa, el mismo procedimiento se repite con la solución de referencia (Sasidharan et al 2011).

Sasidharan et al (2011), resaltan que al introducir la placa con la muestra en la cámara de revelado, se coloca en posición vertical asegurando que el solvente no alcance el punto de origen,

pues de lo contrario el compuesto se solubilizaría en la fase móvil y no sería posible observar una separación completa sobre la placa. La fase móvil se deja ascender hasta alcanzar el 90% de la longitud de la placa, es decir, 1 a 2 cm por debajo del borde superior, conocido, también, como el frente de la fase móvil.

Las cámaras de revelado que se utilizan para el desarrollo de esta técnica son generalmente de vidrio y pueden encontrarse en distintas formas, como se muestra en la Figura 6. Es conveniente verter la fase móvil en la cámara y dejar que se sature por al menos 1 hora, pues se obtiene mejor repetibilidad de los valores de retención que cuando se realiza la corrida sin saturación (Sharapin, 2000).

Figura 6. Ejemplos de cámaras reveladoras para cromatografía de capa fina.



Fuente: Tomado de <https://www.fishersci.es/shop/products/fungilab-fungicrom-separating-chambers-tlc-8/p-4696774>, junio 2018

Pruebas de identificación realizadas por cromatografía.

En la cromatografía de capa delgada, se han localizado flavonoides usando gel de sílice como absorbente, policaprolactama y pulpa de papel. Se ha usado acetato de etilo -ácido fórmico-agua metanol (10:2:2:1) como fase móvil para sílice, principalmente. Los agentes cromogénicos que se utilizan, son el reactivo de vainillina (antes de usarse se mezclan dos volúmenes de vainillina al 10% en etanol con un volumen de ácido clorhídrico concentrado) para visualizar los

analitos, el papel se inmerge brevemente en la mezcla y se saca, se anota el tiempo de aparición de las manchas, el reactivo de vainillina se colorea rosa con los derivados de resorcinol y floroglucinol (Domínguez, 1985, p 85).

Domínguez, (1985), define que para la detección de hidroxiantraquinonas se utiliza el disolvente éter de petróleo (p.eb 45 °C -70°C) saturado con metanol al 97% como fase móvil. Para hacerlas visibles se usa una solución metanólica al 0,5% de acetato de magnesio, calentándose el papel a 90°C durante 5 min. Para poder identificar la localización de los hidroxilos se sabe que cuando los hidroxilos están en posición meta la coloración es anaranjada, en la posición para, es púrpura y si se encuentran en posición orto la coloración es violeta(p.166).

Cromatografía de gases con detector de masas.

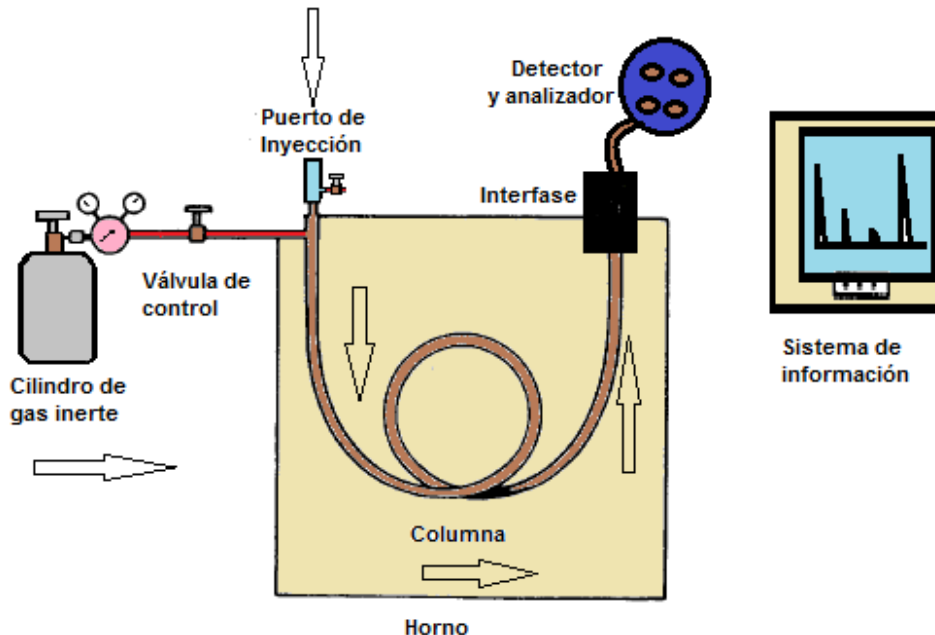
La farmacopea de los Estados Unidos de América define la espectrometría de masas como una técnica analítica basada en la medición de la relación entre la masa y la carga de especies iónicas que están relacionadas con el analito. Esta técnica se puede utilizar para determinar la masa molecular y la composición elemental de un analito, así como la elucidación de la estructura (USP40, p 665).

La muestra se vaporiza al ingresar al equipo y es transportada por el gas portador a través de la columna. Las sustancias de la muestra, llamados solutos, se separan en un proceso conocido como elución que está en función de la presión de vapor relativa de cada compuesto y su afinidad con la fase estacionaria(Skoog y Leary, 1994).

Es una técnica sensible y altamente específica para la identificación de compuestos. La identificación o verificación de estructuras mediante Espectrometría de masas es particularmente potente cuando se usa junto con la técnica de separación tal como cromatografía de gases (GC) o cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se puede obtener mayor especificidad en el análisis usando espectrometría de masas (MS/MS) o espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) la cual permite cumplir con requerimientos más estrictos en cuanto a la exactitud de la masa determinada (USP40,p 666).

En la Figura 7 muestra un diagrama básico de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, por el gas portador, el sistema de inyección, la columna y el detector de masas.

Figura 7. Diagrama de un cromatógrafo de gases y su equipamiento.



Fuente: Tomado de McNair y Miller (1998).

Los autores Skoog y Leary (1994), definen componentes principales y fundamentales con los que debe contar un equipo de cromatografía de gases, estos son:

Gas portador, el cual es un gas inerte que cruza desde el inyector, pasa por la columna y llega al detector, su función es transportar la muestra sin producirle cambios químicos, por lo general, se utiliza helio, nitrógeno, argón, metano, dióxido de carbono e hidrógeno. (p706)

Sistema de inyección: aquí influyen dos variables fundamentales asociadas a la técnica de cromatografía de gases, las cuales son el tamaño de la muestra y la velocidad de inyección. El tipo de inyección depende de la técnica y del tipo de columna que se utilice, por ejemplo, para las columnas capilares se tienen dos tipos de inyectores, los sistemas con divisor y sin divisor de flujo. (p707)

Columna: se utilizan dos tipos de columnas las empacadas y las capilares. Las columnas deben soportar diferentes rangos de temperatura es importante la resistencia térmica para evitar el sangrado, que es crítico en los detectores sensibles como el detector de ionización de llama, el detector de captura electrónica y el detector de masas utilizados en los análisis de trazas. (p 708)

McNair y Miller, (1998) mencionan que en la técnica de cromatografía la programación de temperatura (PT) es un método muy efectivo para optimizar la separación de los analitos. La temperatura es una variable muy importante en cromatografía de gases, debido a que los tiempos de retención se ven muy afectados con cambios pequeños en la energía aplicada en el horno.

Cromatografía acoplada a un detector de masas.

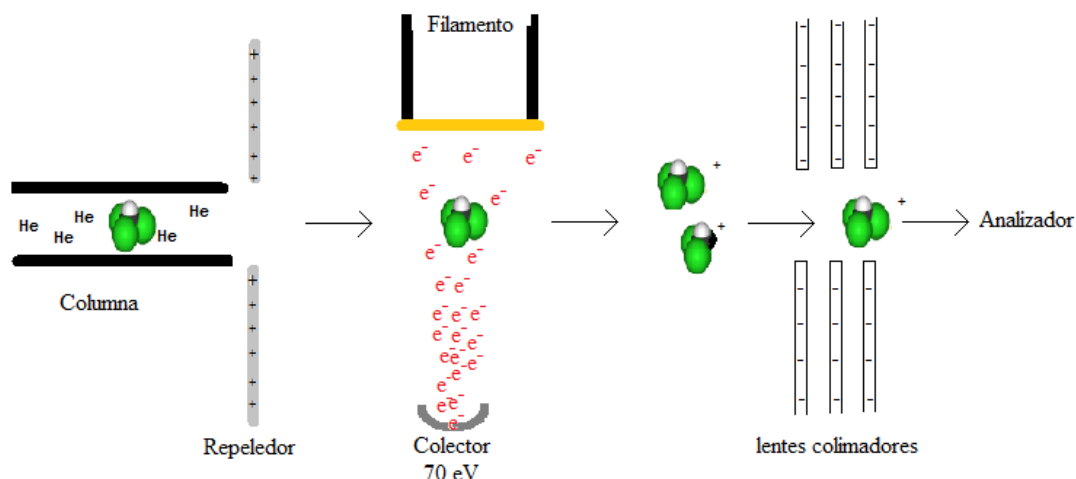
Un cromatógrafo acoplado a un detector de masas, es un equipo que tiene la capacidad de detectar la aparición de los solutos eluidos y, también, proporcionar información sobre su identidad al generar el espectro de masas asociado. Después de la separación de la muestra, la molécula de analito eluida, es conducida a la fuente de ionización, donde se fragmenta y es dirigida al detector de masas para generar el cromatograma y el espectro de masas (Skoog y Leary, 1994, p723).

Existen muchas formas de ionización, pero la más extendida es la de impacto de electrones (IE). El eluente ingresa a la cámara de ionización que está caliente y en alto vacío. La fragmentación de la molécula ocurre por la exposición de la muestra vaporizada a un rayo de electrones de alta energía (Kitson, Larsen y MacEwen, 1996).

Arias (2011), define que un filamento de tungsteno es la fuente de electrones cuya energía está definida por el voltaje aplicado al filamento. Los electrones de alta energía chocan con las moléculas neutras de analito causando la ionización y la fragmentación. En la

Figura 8 se ilustra el funcionamiento de la fuente de iones al ser impactada por electrones.

Figura 8. Ilustración de la fuente de iones por impacto de electrones.



Fuente: Tomado de Arias, V. (2011).

Después de la ionización, las partículas cargadas son desviadas o alineadas debido a los cambios de potencial de los lentes cargados y son dirigidos hacia el analizador. Las especies se separan dependiendo de la razón masa carga (m/z) por un campo eléctrico aplicado (Arias, 201, p 43).

Arias (2011) especifica que el detector se puede configurar para permitir la lectura de los iones producidos durante la ionización o se puede restringir a relaciones masa/carga específica. Si se seleccionan todos los iones comprendidos en un rango m/z que ingresan al detector, se ha configurado el equipo en el modo SCAN. Los cromatogramas obtenidos en este modo, tienen mucha información y se pueden utilizar para determinar la identidad de una molécula. Tiene la desventaja de ofrecer baja sensibilidad.(p45)

Pruebas de identificación cualitativas

Domínguez (1985) menciona que, en muchas ocasiones, al buscar plantas con principios activos el recolector puede que conozca la especie que va a recoger de antemano o puede que no, o tal vez, deba decidir en cuál de los principios activos está interesado en encontrar. Es para este tipo de situaciones que resultan útiles las pruebas químicas, sencillas, sensibles, específicas, rápidos que equipo mínimo, económico y fácil de transportar. (p 39).

Barría y Sánchez (2013) así como Domínguez (1985) establecen una serie de ensayos utilizados en el tamizaje fotoquímico y que son de gran valor para identificar compuestos de interés como lo son alcaloides, antraquinonas, terpenos y flavonoides. Entre las pruebas que se mencionan se tiene:

Ensayo de Mayer y Ensayo de Wagner: éste permite identificar alcaloides, se utiliza el reactivo de Dragendorff, a la solución ácida. Si al agregar 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner al extracto de la planta se observa opalescencia, turbidez, precipitado, se considera, entonces, positiva la presencia del metabolito. (p 16)

Ensayo de Borntrager: este ensayo se emplea para la identificación de quinonas, en este caso si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo. (p 16)

Ensayo de Shinoda: permite conocer la presencia de flavonoides, aquí el ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea amarillo, naranja o rojo intenso. (p 17)

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En el siguiente capítulo se describe la metodología por seguir para la realización de esta investigación, definiendo el enfoque que presentará ésta, el método utilizado, los objetos de estudio, las variables, así como los instrumentos y técnicas utilizados para la recolección de datos.

Enfoque

El enfoque utilizado, en la presente investigación, se describe como cuantitativo, ya que tal y como lo define Hernández, Fernández y Baptista(2014,p.4) “el enfoque cuantitativo utiliza la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, con el fin de establecer pautas de comportamiento y probar teorías”, en la investigación se realizarán procedimientos que prueben la eficacia antimicrobiana de los productos obtenidos y de esta manera cumplir con los objetivos de la investigación.

Método de la investigación

Un experimento, según lo definen Hernández et al, (2014, p129), “se refiere a un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes, para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador”. Para esta investigación, los objetivos y proyecciones planteadas serán de tipo experimental dado que consiste en la obtención de extractos con distintos métodos químicos disponibles, la identificación de las sustancias activas obtenidas de la planta *Senna reticulata*, así como pruebas *in vitro* para determinar la actividad antibacteriana del extracto.

Fuentes de información

Para el presente estudio experimental, se utilizarán los siguientes objetos de estudio:

- Hojas de Saragundi seco.
- Hojas de Saragundi frescas
- Cepas certificadas de *Staphylococcus aureus*
- Cepas Certificadas de *Candida albicans*
- Equipo Soxlet
- Medios de cultivo
- Cromatógrafo de gases acoplado a masas
- Equipo de cromatografía de capa fina
- Artículos científicos de referencia
- Libros académicos relacionados con el tema

Las actividades de investigación se realizarán en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas, así como en el Laboratorio de Control de Calidad de Laboratorios Zepol S.A

Variables

Una variable es una propiedad que puede ser cambiante y cuya variación es capaz de medirse u observarse. (Hernández, et al.2014, p105). Las variables de estudio se definen en la Tabla 1.

Tabla 1. Variables del estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Definición instrumental
Técnica de extracción	“Se refieren a las técnicas de preparación de la muestra, es el paso inicial en el estudio de cualquier planta medicinal”. (Grumezescu, 2017, p65)	Extracción sólido-líquido Maceración	Equipo Soxhlet Maceración
Actividad antimicrobiana	“La actividad antimicrobiana se mide in vitro para establecer: 1) la potencia de un antimicrobiano en solución; 2) su concentración en los líquidos corporales y tejidos, y 3) la sensibilidad de determinado microorganismo a una	Medición de los halos de inhibición para los patógenos <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>	Pruebas para microorganismo específicos en medios de cultivo con comparación con un control positivo

	concentración conocida del fármaco”. (Jawetz, Melnick y Adelberg. 2010. p346)		
Metabolito activo	Los principios activos, metabolito activo o sustancias activas, son los que definen y sirven para clasificar a estas plantas y el principal criterio para su selección y mejora, el control del rendimiento y calidad del cultivo, conjuntamente, del procesado industrial, así como los que dotan a la planta de sus propiedades y sus usos terapéuticos y farmacológicos”. (Muñoz, 2002, p 16).	Identificar los principales metabolitos activos presentes en el extracto de <i>Senna Reticulata</i>	Cromatografo de gases acoplado a masas. Cromatografía de capa fina. Pruebas cualitativas de identificación de grupos funcionales

Instrumentos y técnicas

En el siguiente apartado, se describen los métodos, las técnicas e instrumentos requeridos para la ejecución del proyecto de investigación. Estos se desarrollaron en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas y en las instalaciones de Laboratorios Zepol, S.A.

Proceso de recolección de la muestra de *Senna reticulata* (willd).

El material vegetal, para este proyecto, se obtuvo de la finca de la señora María Rosa Rodríguez Rodríguez ubicada en la zona de San Vito de Coto Brus, de la provincia de Puntarenas, Costa Rica, en el mes de febrero de 2018. La muestra se dividió en dos submuestras, denominadas material fresco y material seco. El material fresco fue recolectado el 31 de marzo del 2018 a las 2:00pm. Desde el muestreo, el material fresco de las hojas se almacenó en refrigeración a una temperatura inferior a 10 ° C conservadas en bolsas plásticas cerradas hasta el momento de la extracción. El material seco, se preparó a partir del material fresco secado al aire y bajo el sol por un periodo de seis días hasta el momento de la extracción.

Una vez recibida la planta, se llevó al Herbario Nacional para que fuera identificada por el Botánico Armando Estrada Chavarría quién identificó la especie por utilizar como *Senna reticulata*. En la Figura 9, se observan las muestras del material por tratar.

Figura 9. Planta verde y seca para la elaboración del extracto.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Materiales y equipo para la obtención del extracto de *Senna reticulata* por el método de reflujo cerrado (Soxhlet) y maceración

Los materiales que se utilizaron para la obtención del extracto de *Senna reticulata* por los métodos de reflujo cerrado (soxhlet) y maceración se describen a continuación:

Balanza de Humedad OHAUS modelo MB35

Cámara de Bioseguridad

Equipo de Reflujo cerrado (Soxhlet)

Procesador de alimentos

Balanza analítica y granataria

Balón de fondo redondo de 1000 ml

Balón de fondo redondo de 500 ml

Termómetro

Beaker 250 ml, 600 ml

Probeta 100 ml

Manguera de goma para conexiones hidráulicas

Agitador-calentador

Embudo

Prensas

Soporte universal

Perlas de ebullición

Piseta

Pescador

Cronómetro

Papel de filtro Whatman #113

Probeta 200 ml

Etiquetas

Erlenmeyer de 3 L

Reactivos

Agua Purificada

Etanol 95%

Saragundí (*Senna reticulata*) = 100 g

Procedimiento de recolección y análisis de los datos

Medición del porcentaje de humedad de la planta seca y fresca.

1. Se colocó una cantidad aproximada de 1,500 g de planta seca en la balanza de humedad marca OHAUS modelo MB35.
2. Se midió la humedad durante 10 minutos a una temperatura de 110°C.
3. Para la planta fresca, se colocó una cantidad aproximada de 0.600g en la balanza de humedad marca OHAUS modelo MB35. La Figura 10 muestra la balanza de humedad utilizada.

Figura 10. Balanza de Humedad utilizada para las mediciones.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Homogenización de la muestra vegetal para material fresco y seco de *Senna Reticulata* (Saragundi)

Tanto a la planta verde como la seca, se les realizó una división para facilitar la extracción y disminuir el volumen del material que se colocaría en los equipos, así como para homogenizar las partes de la planta recibidas. Para esto, se procedió a utilizar un procesador de alimentos marca Proctor Silex modelo 72588RY. Se siguieron las siguientes actividades:

1. Se colocó la cantidad de 100g dividido en pequeñas cantidades en el procesador de alimentos hasta obtener un tamaño del material adecuado para ingresar al equipo soxhlet como al erlenmeyer de maceración.
2. Se colocó en un beaker de 1 L cada porción procesada hasta completarlo.
3. Se pesó en balanza granataria la cantidad de 100g requerida para realizar las extracciones.
4. El procedimiento anterior se realizó, tanto para la planta fresca, como para las secas. En la Figura 11, se observa el proceso efectuado para obtener la homogenización de la muestra vegetal.

Figura 11. Proceso de homogenización del material vegetal fresco y seco.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Método de extracción para material fresco de *Senna Reticulata* (Saragundí) por reflujo cerrado (Soxhlet)

1. Se colocó 100 g de hojas de material fresco dentro de un filtro de papel Whatman, y se ingresó en el Soxhlet.
2. Se adicionó 2.5 L de disolución hidroalcohólica (70/30) al balón de 5000 mL y las perlas de ebullición. Utilizando una manta de calentamiento se calentó por un periodo 4 ciclos de extracción.
3. Se aseguró el equipo al soporte universal y se conectó las mangueras de goma a la toma de agua refrigerante.
4. Se encendió la plantilla de calentamiento y se programó a una temperatura aproximada de 78 °C.
5. Se realizó el reflujo por 12 horas.
6. Se trasladó el líquido remanente del Soxhlet a una botella ámbar de 5 L una vez finalizado el proceso.
7. Se permitió el enfriamiento del extracto y se almacenó en refrigeración entre 2 a 8°C para conservar el extracto para las pruebas posteriores. Este fue evaporado posteriormente, según lo que se indica en el apartado de concentración del extracto.
8. Se separaron 50 mL para ser utilizados en pruebas posteriores de identificación de componentes.

Método de extracción para material seco de *Senna Reticulata* (Saragundí) por reflujo cerrado (Soxhlet)

1. Se colocó 100 g de hojas de material seco dentro de un papel filtro, y se ingresó en el Soxhlet.
2. Se adicionó 2.5 L de disolución hidroalcohólica (70/30) al balón de 5000 mL y las perlas de ebullición.
3. Se aseguró el equipo al soporte universal y se conectó las mangueras de goma a las tomas de agua refrigerante.

4. Se encendió la plantilla de calentamiento y se programó a una temperatura de 78 °C.
5. Se realizó el reflujo por 6 horas, hasta obtener 4 ciclos de extracción, tal y como se muestra en la Figura 12.
6. Se trasladó el líquido remanente del soxhlet a una botella ambar de 5 L una vez finalizado el proceso.
7. Se permitió el enfriamiento del extracto y se almacenó en refrigeración entre 2 a 8°C para conservar el extracto para las pruebas posteriores. Este fue evaporado posteriormente, según lo que se indica en el apartado de concentración del extracto.
8. Se separaron 50 mL para ser utilizados en pruebas posteriores de identificación de componentes.

Figura 12. Método de extracción de la *Senna reticulata* por el método de reflujo cerrado (soxhlet)



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Método de maceración, para hojas secas y hojas verdesde *Senna Reticulata* (Saragundí).

1. Se colocó 100g del material seco en un erlenmeyer de 3000mL
2. Se adicionó 3 L de disolución hidroalcohólica (70/30) al erlenmeyer
3. Se agitó manualmente de manera circular.
4. Se mantuvo el material en remojo durante 14 días agitando una vez al día.
5. Se filtró el material extraído utilizando papel filtro marca Whatman #113 de 50,0cm
6. Se colocó el extracto en un recipiente oscuro y se almacenó en refrigeración con una temperatura de 2 a 8 °C. Este fue evaporado posteriormente, según lo que se indica en el apartado de concentración del extracto. La Figura 13 muestra el proceso realizado para el método de extracción por maceración.
7. Se separaron 50mL para ser utilizados en pruebas posteriores de identificación de componentes.

Figura 13. Método de extracción de la *Senna reticulata* por el método de maceración.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Concentración del extracto hidroalcohólico obtenido por el método de maceración y de reflujo cerrado (soxhlet) de *Senna Reticulata* (Saragundi)

Para realizar la concentración de los extractos, se procedió a utilizar el método de rota vaporización de las muestras utilizando un rotavapor marca BUCHI modelo V-700, tal como se muestra en la Figura 14.

1. Se colocó pequeñas porciones del extracto en un balón de fondo redondo de 1L
2. Se abrió el sistema de recirculación de agua.
3. Se encendió la bomba de vacío.
4. Se concentró el extracto hasta obtener una solución pastosa.

Figura 14. Equipo de rotavapor utilizado en las pruebas de concentración de los extractos de *Senna Reticulata* (Saragundi)



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Identificación de los componentes del extracto hidroalcohólico de *Senna Reticulata*

Para la identificación de los componentes, se practicó a los extractos de las muestras frescas y secas análisis cualitativo por medio de pruebas de laboratorio de los grupos funcionales de los compuestos presentes. Para ello, se fundamentó en los grupos más reconocidos como alcaloides, flavonoides, terpenos-terpenoides y Antraquinonas.

Prueba cualitativa para la identificación de alcaloides por medio el ensayo con el reactivo Dragendorff

1. Se colocó tres gotas del extracto fresco y seco en sendos tubos de ensayo limpios.
2. Se adicionó 1mL de HCl al 1%.
3. Se agregó dos gotas del reactivo de Dragendorff.
4. Se preparó una prueba blanco sin agregar extracto.
5. Se anotó los cambios de coloración, la precipitación y turbidez como comparación con la prueba blanco.

Prueba cualitativa para la identificación de terpenos-terpenoides: prueba de Libermann-Burchard

1. Se colocó tres gotas del extracto fresco y seco en sendos tubos de ensayo limpios.
2. Se adicionó 1 mL de Cloroformo y suavemente se agitó.
3. Se adicionó y se mezcló bien 1mL de anhídrido acético.
4. Se agregó y sin agitación hasta tres gotas de ácido sulfúrico concentrado.
Se preparó una prueba blanco sin agregar extracto.
5. Se anotó los cambios de coloración, la precipitación y turbidez como comparación con la prueba blanco.

Prueba cualitativa para la identificación de flavonoides: prueba de Shinoda

1. Se colocó tres gotas del extracto fresco y seco en sendos tubos de ensayo limpios.
2. Se agregó unas virutas de magnesio metálico.
3. Se adicionó 0,5 mL de ácido clorhídrico y se agitó suavemente.
4. Se preparó una prueba blanco sin agregar extracto.
5. Se anotó los cambios de coloración, la precipitación y turbidez como comparación con la prueba blanco.

Prueba cualitativa para la identificación de Antraquinonas.

1. Se colocó 50mg de extracto fresco y seco en sendos tubos de ensayo limpios.
2. Se agregó 1mL de una solución de Cloruro de hierro III al 10%.
3. Se adicionó a la solución 1mL de ácido clorhídrico concentrado.
4. Se dejó enfriar el extracto.
5. Se extrajo las antraquinonas liberadas con 2mL de cloroformo.
6. Se preparó una prueba blanco sin agregar extracto.
7. Se observó la coloración rojo-rosa en la solución al agitarlo.

Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana y antimicótica del extracto de *Senna Reticulata* (Saragundi).

En esta etapa, se evaluó la efectividad antibacteriana y antimicótica del extracto de *Senna Reticulata* (Saragundi) extraído de diferentes maneras, sobre el rayado de medio de cultivo Mueller -Hinton de una cepa de *S.aureus* y de la cepa de *C.albicans*. Se evaluaron los extractos de la planta seca por el método de maceración y soxhlet, además de los extractos de la planta fresca obtenidos por maceración y por el método soxhlet, Las pruebas se realizaron en el laboratorio de microbiología de Laboratorios ZEPOL S.A supervisadas por la Ingeniera en Biotecnología Laura Ulloa Acuña.

Materiales y equipos para el desarrollo de la prueba microbiológica.

Los materiales y equipos que se utilizaron para el desarrollo de la prueba microbiológica, se describen a continuación:

Goteros

Asas para inoculación para la esterilización

Mechero Bunsen

Portaobjeto

Hisopos estériles

Discos de antimicrobianos de 6mm Whatman N°2

Regla con escala métrica.

Perforador de papel

Cámara de bioseguridad

Autoclave

Incubadora de 30-35°C

Plantilla eléctrica

Placas estándar estériles

Refrigeradora 2-8°C

Guantes estériles

Puntas estériles

Micropipeta de 100-1000 microlitros.

Pinzas estériles

Vernier calibrado

Reactivos.

Extractos de saragundi

Cepas de microorganismos, marca Microbiologics: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231.

Antibiótico suspensión oftálmica Neotrol ® NF, Fabricante Lansier

Crema de Miconazol Nitrato al 2%, Fabricante Stantech

Medio de cultivo Agar Mueller Hinton, marca Becton Dickinson.

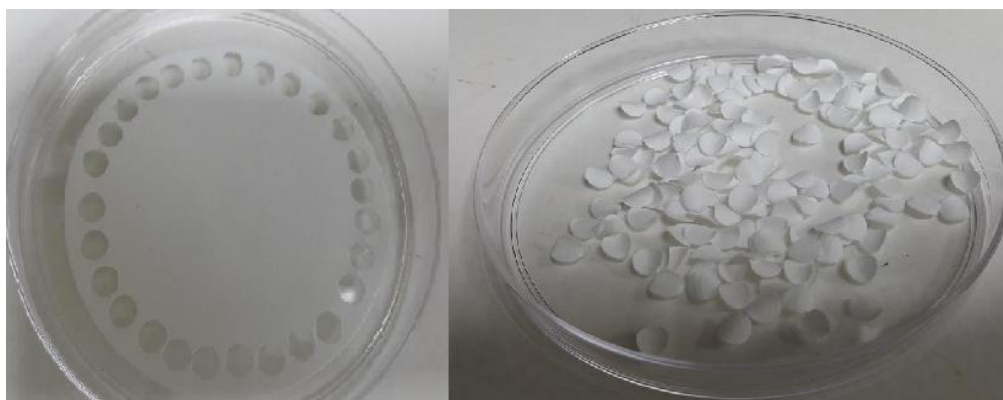
Medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya, marca Becton Dickinson

Buffer de fostato

Preparación de los discos de sensibilidad.

Los discos de sensibilidad, se prepararon utilizando papel Wattman N°2 empleando un perforador convencional. Estos discos fueron esterilizados en la autoclave a 121°C x 15 libras de presión x 15 minutos. La obtención de los discos se muestra en la Figura 15.

Figura 15. Elaboración de discos de sensibilidad para pruebas de inhibición.

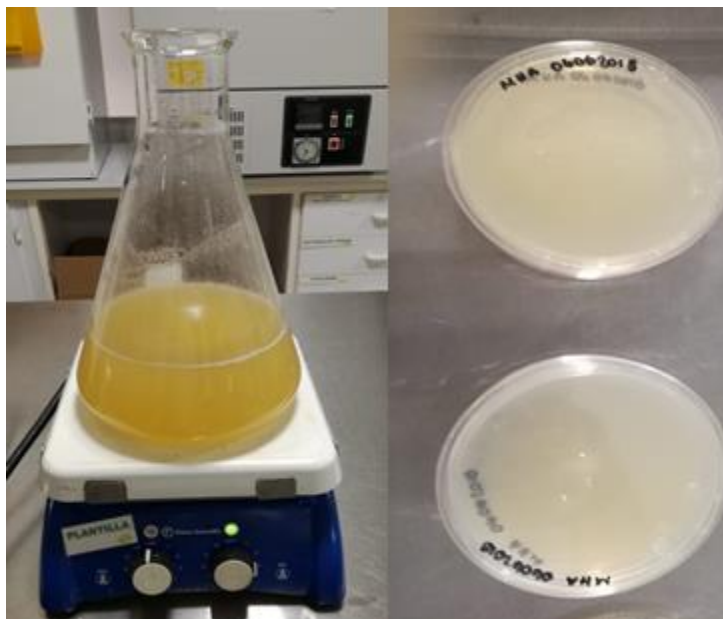


Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Preparación del medio de cultivo.

Se realizó la preparación del medio de cultivo Agar Mueller Hinton, marca Becton Dickinson BD acorde con las instrucciones del proveedor. Una vez esterilizado, este medio se dispensó en placas estándar estériles y éstas se almacenaron de 2 a 8° C hasta ser utilizadas, tal y como se muestra en la Figura 16.

Figura 16. Preparación de medios de cultivo Agar Mueller Hinton.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Inoculación de las placas.

1. Se procedió a identificar los distintos extractos por analizar, según lo establecido en la Tabla 2 y en la Tabla 3 de la siguiente manera:

Tabla 2. Tratamientos para la Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Numero Muestras	Especificación
1	Material Vegetal Fresco soxhlet+ <i>Staphylococcus aureus</i>
2	Material Vegetal Fresco Macerado+ <i>Staphylococcus aureus</i>
3	Alcohol al 70%+ <i>Staphylococcus aureus</i>

4	Material Vegetal Seco Concentrado soxhlet+ <i>Staphylococcus aureus</i>
5	Material Vegetal Seco Concentrado Macerado+ <i>Staphylococcus aureus</i>
6	Material Vegetal Seco soxhlet Aceite-Grasa+ <i>Staphylococcus aureus</i>
7	Neotrol+ <i>Staphylococcus aureus</i>
8	Control negativo del medio de cultivo

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Tabla 3. Tratamientos para la Cepa *Candida albicans* ATCC 10231.

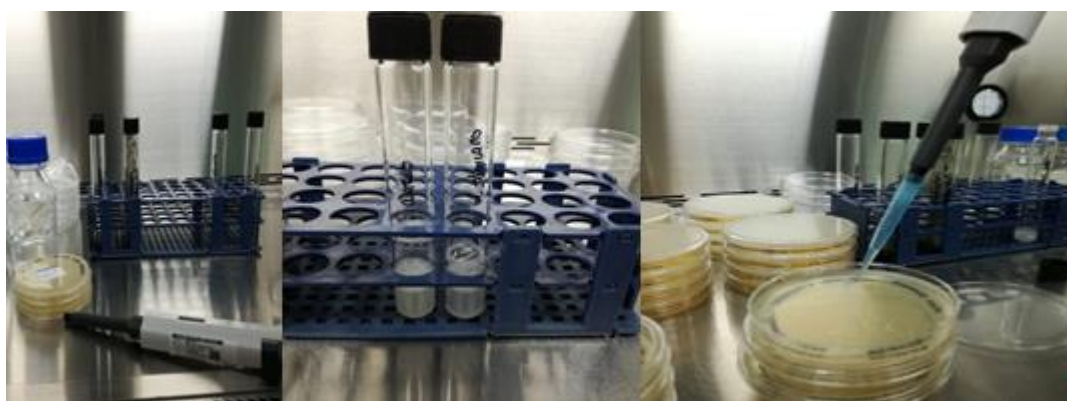
Numero Muestra	Especificación
1	Material Vegetal Fresco soxhlet+ <i>Candida albicans</i>
2	Material Vegetal Fresco Macerado+ <i>Candida albicans</i>
3	Alcohol al 70%+ <i>Candida albicans</i>
4	Material Vegetal Seco Concentrado soxhlet+ <i>Candida albicans</i>
5	Material Vegetal Seco Concentrado Macerado+ <i>Candida albicans</i>
6	Material Vegetal Seco soxhletAceite-Grasa+ <i>Candida albicans</i>
7	Miconazol+ <i>Candida albicans</i>
8	Control negativo del medio de cultivo

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

2. Dentro de la cámara de bioseguridad se ingresaron todos los materiales necesarios para ejecutar el análisis, utilizando en todo momento una buena técnica aséptica.
3. Una vez dentro de la cámara de bioseguridad se preparó una solución madre que contenía la cepa de microorganismo por evaluar, ésta consistía en 5mL de buffer fosfato junto con una asada de la cepa la cual comercialmente viene a dos pasajes de la cepa original.

4. De la cepa se tomaron 100 microlitros y se añadieron a cada una de las placas por evaluar.
5. Con un hisopo estéril se dispersó la alícuota que contenía el microorganismo a través de toda la placa de manera que no quedara ninguna sección del medio de cultivo sin crecimiento. En la Figura 17, se visualiza el proceso de replicación de las cepas microbiológicas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231

Figura 17. Replicación de las cepas microbiológicas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231



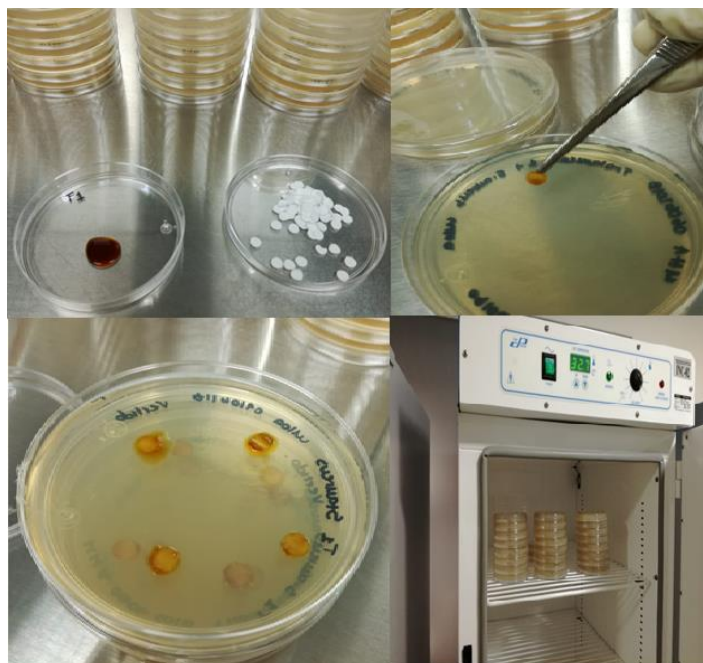
Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

6. En una placa vacía se colocó una alícuota de las muestras por evaluar, según lo descrito en las tablas 1 y 2 así como los discos estériles.
7. Se tomó un disco con las pinzas estériles, se impregnó con el extracto evaluado y se colocó en la placa de Agar Mueller Hinton correspondiente. Por cada placa se colocaron 4 discos.
8. Una vez finalizados todas las muestras de extractos, las placas se colocaron en incubación a 30 a 35° C por 3 días.
9. Se evaluó si se dio la formación de halos de inhibición que demuestren actividad antimicrobiana del extracto de *Senna Reticulata* para cada una de las aplicaciones realizadas por placa. En la Figura 18, se observa el proceso de siembra de las muestras de extracto de Saragundi.
10. Se observó, comparó y midió los halos de inhibición en los casos que se formaron.

Se analizó un control positivo del solvente utilizado para la extracción de la planta, así como la utilización de un antibiótico y un antimicótico de uso común. En la

Figura 19, se muestran los productos utilizados como control positivo para las pruebas contra *S. aureus* y *C. albicans*.

Figura 18. Proceso de siembra de las muestras del extracto de *Senna reticulata* (Saragundi).



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Figura 19. Productos utilizados como control positivo para las pruebas contra *S. aureus* y *C.albicans*.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Pruebas de cromatografía de capa fina para la evaluación de los componentes del extracto de *Senna reticulata* (Saragundi).

Para determinar la presencia de compuestos fitoquímicos en el extracto de *Senna Reticulata*, se utilizó la técnica de cromatografía de capa fina para poder visualizar la presencia de los compuestos mayoritarios reportados en la literatura. Las pruebas se realizaron utilizando los equipos del laboratorio de análisis fisicoquímico de Laboratorios Zepol S.A

Materiales y equipo

Placas de celulosa Merck Millipore®

Cabina de análisis fluorescente Spectroline CX-20

Cámara reveladora

Micropipeta Boeco

Porbeta de 100mL

Beaker de 250mL

Cámara de flujo laminar

Reactivos

Ácido fórmico anhidro

Acetato de Magnesio

Éter de petróleo

Reactivo de vainillina

Etanol 95%

Metanol

Ácido Clorhídrico concentrado

Análisis para la detección de flavonoides.

A continuación, se detalla el procedimiento por seguir para la detección de flavonoides por el método de cromatografía de capa fina:

1. Se mezcló en un beaker de 250mL los siguientes reactivos acetato de etilo, ácido fórmico, agua y metanol en la siguiente proporción (10:2:2:1).
2. Se agitó suavemente la solución con la ayuda de un agitador de vidrio.
3. En las placas de gel de sílice se demarcó el origen a 2,0cm del borde inferior de la placa y el frente de la placa a 2,0cm del borde superior.
4. En cada placa se aplicó con la ayuda de un capilar despuntado o una pipeta pasteur una pequeña gota de la muestra sobre la placa esperando que seque la placa se utilizó la siguiente simbología para su identificación.
PSMC: Planta seca macerado concentrado.
PSMS: Planta seca macerado sin concentrar.
PSSC: Plana seca soxhlet concentrado.
PSSS: Plana seca soxhlet sin concentrar.
PFMC: Planta fresca macerado concentrada.
PFMS: Planta fresca macerado sin concentrar.
PFSC: Planta fresca soxhlet concentrado.
PFSS: Planta fresca soxhlet sin concentrar.
5. Se introdujo la placa en la cámara de reveladora que contiene el solvente o fase móvil y se dejó correr el solvente.
6. La cromatoplaca se desarrolló hasta que el eluyente recorriera el 90% de la longitud de la placa (16cm) y, posteriormente, se secó bajo corriente de aire.
7. Una vez que la placa se secóse roció con el reactivo de vainillina hasta la aparición de manchas con la ayuda de una bomba de vacío, dentro de la capilla, se esperó de 2 a 5 minutos para el completo secado.
8. Finalmente, se procedió a examinar las placas bajo luz ultravioleta a 254nm, y bajo luz blanca.

Análisis para la detección de Hidroxiantraquinonas

A continuación, se detalla el procedimiento por seguir para la detección de hidroxiantraquinonas por el método de cromatografía de capa fina:

1. Se mezcló en un beaker de 250mL los siguientes reactivos éter/metanol en una proporción 5:3
2. Se agitó suavemente la solución con la ayuda de un agitador de vidrio.
3. En las placas de gel de sílice se demarcó el origen a 2,0cm del borde inferior de la placa y el frente de la placa a 2,0cm del borde superior.
4. En cada placa se aplicó con la ayuda de un capilar despuntado o una pipeta pasteur una pequeña gota de la muestra sobre la placa esperando que seque la placa se utilizó la siguiente simbología para su identificación.
PSMC: Planta seca macerado concentrado.
PSMS: Planta seca macerado sin concentrar.
PSSC: Plana seca soxhlet concentrado.
PSSS: Plana seca soxhlet sin concentrar.
PFMC: Planta fresca macerado concentrada.
PFMS: Planta fresca macerado sin concentrar.
PFSC: Planta fresca soxhlet concentrado.
PFSS: Planta fresca soxhlet sin concentrar
5. Se introdujo la placa en la cámara de reveladora que contiene el solvente o fase móvil y se dejó correr el solvente.
6. La cromatoplaca se desarrolló hasta que el eluyente recorriera el 90% de la longitud de la placa (16cm) y posteriormente se secó bajo corriente de aire.
7. Se calentó el papel a 90°C durante 5 minutos.
8. Cuando los hidroxilos están en posición meta la coloración es naranja, cuando la posición es para es púrpura y en posición orto son de color violeta.
9. Finalmente se procedió a examinar las placas bajo luz ultravioleta a 254nm, y bajo luz blanca. En la Figura 20, se visualiza el equipo utilizado para la detección de componentes con el método de cromatografía de capa fina.

Figura 20. Equipo utilizado para la detección de componentes para cromatografía de capa fina.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Análisis cualitativo por cromatografía de gases acoplado a un detector e masas (CG/MS) del extracto de *Senna reticulata* (Saragundi).

Para realizar este análisis, se contrató los servicios del Centro de Investigación en Productos Naturales CIPRONA de la Universidad de Costa Rica. Por lo que se les entregó la muestra del extracto de *Senna reticulata* realizado a la planta fresca por el método de maceración, ésta fue la muestra seleccionada para determinar los distintos componentes presentes en el extracto.

El análisis se realizó durante el mes de junio 2018, mediante el análisis de barrido de los distintos componentes orgánicos. Se entregó la cantidad de 0.5g de muestra para la realización del análisis el cual se analizó con la técnica partición líquido-líquido por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La información y los resultados que se proporcionan en este capítulo son los relacionados con el desarrollo de la investigación planteada de cada variable del estudio las cuales están basadas en los objetivos específicos estipulados en el trabajo de investigación.

Comparación de los procesos de obtención del extracto de la planta *Senna Reticulata* (Saragundi) por el método de reflujo cerrado (soxhlet) y maceración tanto en la planta seca como en la fresca.

Para la elaboración de esta investigación, se procedió a realizar las extracciones de la planta *Senna reticulata* (Saragundi) utilizando la planta en su estado fresco, así como después de secarse al sol durante seis días.

Un aspecto importante que se desarrolló antes de preparar los extractos, fue el de homogenizar la muestra, ya que ambas, tanto el material fresco como el seco, se encontraban con la hoja entera y con vainas de tamaño normal, por lo cual se procedió a realizar una disminución del tamaño de partícula hasta alcanzar una mayor superficie de contacto con el solvente.

Como un análisis inicial, se procedió a determinar el porcentaje de humedad de ambos materiales, tanto el material fresco como el seco. Para ello, haciendo uso de la balanza de humedad se tomó una pequeña porción de la muestra con el tamaño de partícula homogenizada y se estableció el porcentaje de humedad inicial con que se realizaron los procesos de extracción. Se muestran los resultados de los porcentajes de humedad en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las determinaciones de porcentaje de humedad para el material seco y fresco de *Senna reticulata* (Saragundi).

Muestra	Masa pesada (g)	Porcentaje de Humedad (%)
Material seco	1,520	9,06
Material fresco	1,510	66,5

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Como se observa en la Tabla 4 el material seco presentó un 9,06 % de humedad mientras que el material fresco un 66,5 %. Tal y como lo define Mihai y Holban (2017) y Sharapin, (2000), el contenido de humedad de las plantas frescas puede variar de 60% a un 80%, el proceso de secado en las hojas reduce este contenido de un 20% a 75%. Con base en estos resultados se observa, que el proceso de secado redujo en un 86,37 % el contenido de agua, partiendo de una base 100 % en la hoja fresca. Dicho porcentaje puede ser determinante en las pruebas siguientes ya que procesos de secado excesivos pueden acabar con algunos compuestos activos presentes en las muestras vegetales.

La comparación de los métodos de extracción, así como la utilización de los distintos tipos de material, se realizó para determinar si existían diferencias entre la planta fresca y la seca, así como los métodos de extracción con que se realizan los extractos.

Una vez determinada la humedad presente en los materiales vegetales, se procedió a realizar los extractos por maceración, ya que estos son los que requirieron mayor tiempo de extracción, para ello, se utilizaron 100g de material fresco y seco, respectivamente y se agregó 3 L del solvente seleccionado, en este caso Alcohol/Agua en una proporción 70/30. Esta proporción de solvente se utilizó siguiendo lo recomendado por Sharapin (2000), ya que el alcohol etílico y sus mezclas con agua son el solvente por excelencia para utilizar en extractos y tinturas.

La proporción 7:3, se utiliza para la extracción total de los componentes, principalmente, cuando no existen muchos estudios específicos en relación con los compuestos por extraer; además, otro factor que influyó en su escogencia es que la mayor parte de la bibliografía consultada utilizaba esta proporción para la extracción de los activos y en los que los resultados obtenidos fueron favorables en la inhibición de microorganismos.

Los extractos se almacenaron por un periodo de 14 días protegidos de la luz y tapados para evitar pérdidas por evaporación, y se agitaron una vez al día de forma manual. Concluido el tiempo de contacto para la extracción, se procedió a filtrar para eliminar todo el residuo de la planta y proceder con la concentración del extracto por medio del rotavapor, pasando de un volumen de 3 L a un volumen aproximado de 20 mL. Antes de realizar el proceso de concentración por medio del rotavapor, se separaron 50 mL para realizar pruebas de identificación cualitativa de activos en los extractos directos de maceración y de Soxhlet.

Aunque el agua que se requiere en los procesos de extracción, no necesariamente debe ser destilada o desmineralizada, en este proceso sí se trabajó con agua purificada para eliminar cualquier posible contaminación o interferencia que se pudiera presentar en el proceso de extracción o en la posible contaminación de los extractos.

Para realizar el proceso con el método de extracción de reflujo cerrado utilizando el soxhlet, se pesó 100g del material y se colocó en el aparato, en este caso se utilizó solo 2,5 L del solvente debido a la menor capacidad del balón de calentamiento. El proceso de extracción se mantuvo durante 12 horas continuas, lo cual dio como resultado 4 ciclos de extracción, esto se realizó, tanto para el material fresco como en el seco.

Una vez concluida la extracción, se procedió a rotavaporar hasta obtener un volumen aproximado de extracto de 20 mL. Antes de realizar el proceso de concentración por medio del rotavapor, se separaron 50 mL para realizar pruebas de identificación cualitativa de activos, los extractos finales obtenidos se muestran en la Figura 21.

Figura 21. Extractos concentrados de *Senna reticulata* (Saragundi) obtenidos por el método de maceración y soxhlet.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Las características físicas encontradas en los extractos, tanto para la planta fresca como la seca a partir de los dos métodos de extracción se muestran en la Tabla 5. Tal y como se observa, los extractos realizados para la planta seca por el método de maceración, así como por la extracción por soxhlet presentaron características muy similares, principalmente, distinguiéndose del extracto fresco por su consistencia viscosa y color café muy fuerte. Esta característica

dificultó más el proceso de concentración ya que provocó la separación del material oleoso que no se pudo retirar del balón de calentamiento.

Tabla 5. Características organolépticas del extracto hidroalcohólico de *Senna reticulata* (Saragundi) para planta fresca y seca obtenido por los métodos de maceración y reflujo cerrado (soxhlet).

Tipo de extracto	Pruebas físicas		
	Olor	Color	Apariencia
Planta fresca macerada	Dulce	Café claro	Fluida presenta sedimentos
Planta fresca soxhlet	Dulce	Café claro	Filuda presenta sedimentos
Planta seca macerada	Dulce	Café oscuro	Viscoso
Planta seca soxhlet	Dulce	Café oscuro	Viscoso

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

La diferencia principal entre el extracto fresco y seco realizado por ambas técnicas radicó en su consistencia; tal y como se aprecia en la Figura 22 y en la Figura 23, el extracto de planta seca presenta una apariencia muy viscosa casi como de un aceite, sin presentar sólidos visibles, mientras que el extracto de la planta fresca presenta una apariencia fluida y con gran cantidad de sólidos presentes.

Figura 22. Extracto de planta seca de *Senna reticulata* (Saragundi) obtenido por el método de maceración(izquierda) y soxhlet (derecha).



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Figura 23. Extracto de planta fresca de *Senna reticulata* (Saragundi) obtenido por el método de maceración(izquierda) y soxhlet(derecha).



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Los resultados obtenidos sobre las características físicas en los extractos de las plantas frescas y secas demuestran que a pesar de aplicar distintos métodos de extracción las propiedades

de los extractos finales no parecen variar, ya que presentan similitudes en olor, color y apariencia. Para los extractos de planta seca, obtenidos por los métodos de maceración y por medio de soxhlet, las muestras presentaron la misma consistencia y las mismas características físicas.

Los extractos de la planta seca por el método soxhlet, presentaron problemas en el proceso de concentración, ya que una parte del aceite fue imposible de recuperar; sin embargo, se le realizaron lavados al balón de recuperación, donde se logró extraer el material remanente, esto para poder realizarle pruebas microbiológicas y descartar que esta porción presentara actividad antimicrobiana. La Figura 24 muestra el aceite obtenido de la extracción del material seco.

Figura 24. Aceite remanente obtenido del proceso de extracción del material seco de la planta de Saragundi por el método soxhlet.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Una variable importante por discutir, es el tiempo de extracción, puesto que al adquirir el material fresco éste se utilizó inmediatamente para evitar problemas de deterioro del material, contrario al material seco, que pudo ser almacenado sin refrigeración, sin sufrir daño alguno mientras se efectuaban las distintas etapas del proceso de extracción.

Sin embargo, es necesario recordar que el proceso de extracción por maceración requirió de 14 días de extracción, con agitación manual una vez al día, lo cual es el tiempo del operario a cargo del proceso. La extracción con el equipo soxhlet, se realizó en 12 horas y no demandó de tiempo adicional de filtrado, este proceso sí requiere de una mayor inversión al ser equipo más especializado y el subsecuente consumo energético y de agua.

A pesar de que la industria farmacéutica utiliza preferiblemente como materia prima el material seco, según lo establece Sharapin, (2000), por sus ventajas como la disminución de volumen de almacenaje, la interrupción de procesos enzimáticos de las células vegetales, el impedimento del crecimiento de microorganismos, el transporte del material sin riesgos de deterioro, en esta investigación se presentaron mayores complicaciones en el proceso de concentración de la muestra y en las posteriores pruebas de inhibición microbiana.

Como las muestras obtenidas de los extractos secos por ambos métodos de extracción presentaron una consistencia muy viscosa difícil de manipular para las pruebas de microbiología, se realizó un pretratamiento de normalización del porcentaje de humedad, ya que, al utilizar la técnica de rotavapor, para concentrar las muestras, se presentan ciertas limitaciones para determinar la cantidad de sólidos, por lo que el proceso de concentración se detuvo desde un criterio subjetivo.

En la Tabla 6, se muestran los resultados de las mediciones de humedad para los extractos obtenidos por los métodos de maceración y soxhlet, tanto para la planta seca como para la planta fresca.

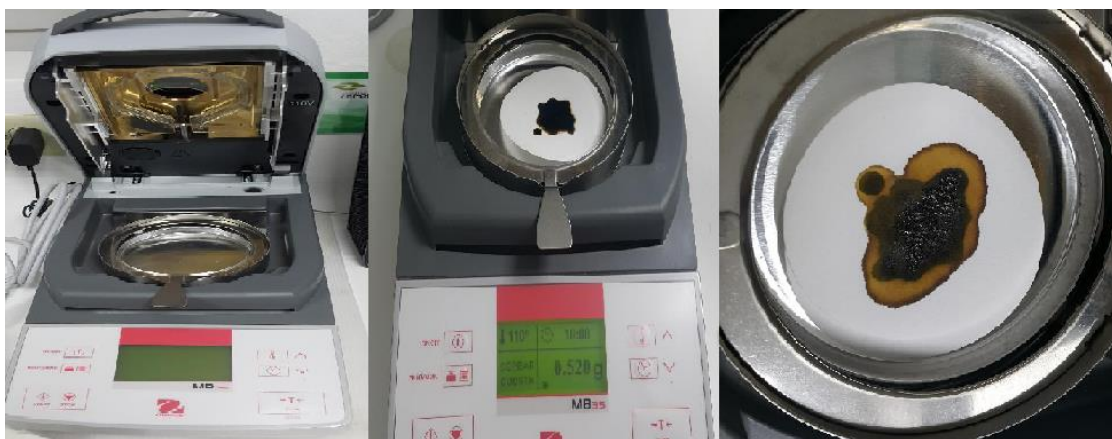
Tabla 6. Porcentajes de humedad de los extractos obtenidos por los métodos de maceración y soxhlet para la planta de *Senna reticulata* (Saragundi), en estado fresco y seco.

Tipo de extracto	Porcentaje de humedad experimental (%)
Planta fresca, macerada	81,02
Planta fresca, soxhlet	85,32
Planta seca, macerada	17,44
Planta seca, soxhlet	16,36
Aceite- grasa planta seca soxhlet	83,52

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la Figura 25, se ilustra el proceso de determinación de humedad para los extractos obtenidos de Saragundi por los métodos de maceración y soxhlet.

Figura 25. Análisis de porcentaje de humedad para los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) obtenidos por los métodos de maceración y soxhlet.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Una vez realizados los cálculos para las pruebas microbiológicas de evaluación de actividad antimicrobiana, es necesario partir de una base en la que tuvieran el mismo contenido de sólidos, por lo que se realizó una normalización al contenido de humedad, utilizando como referencia el extracto que presentara mayor contenido de humedad, en este caso el de la planta fresca obtenida por el método soxhlet que presentó un 85,32% de humedad.

Se realizaron diluciones con agua purificada de las muestras, hasta homologarse con el extracto de la planta fresca obtenida por el método soxhlet, los resultados de estos cálculos se observan en la Tabla 7.

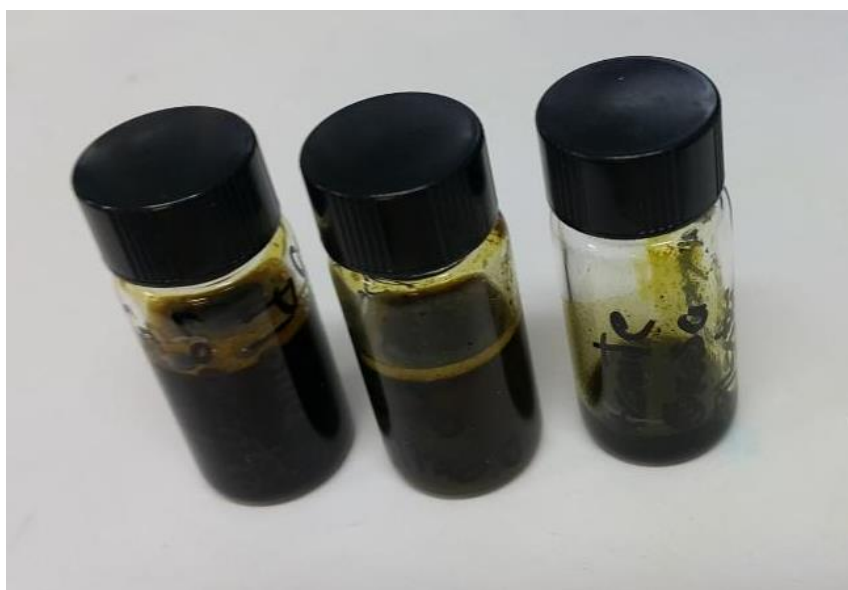
Tabla 7. Masas para la homologación de humedad de los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) obtenidos por el método de maceración y soxhlet.

Tipo de extracto	Masa del extracto (g)	Masa de agua a adicionar (g)
Planta fresca, macerada	0,5104	0,1436
Planta seca, macerada	0,7422	3,1270
Planta seca, soxhlet	0,7980	3,7486
Aceite- grasa planta seca soxhlet	0,5222	0,0640

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Así mismo, en la Figura 26 se observan las muestras finales una vez diluidas para utilizarse en los análisis de evaluación antimicrobiana.

Figura 26. Muestras finales diluidas para pruebas de evaluación antimicrobiana del extracto de *Senna reticulata* (Saragundi).



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de la planta *Senna Reticulata* (Saragundi) en el crecimiento in vitro de *S.aureus* y *C.albicans*, mediante la medición de halos de inhibición.

Para el desarrollo de estas pruebas, se utilizaron todas las medidas de bioseguridad, así como las técnicas de asepsia, siendo de vital importancia el uso de equipo estéril y de la cámara de bioseguridad para salvaguardar la seguridad del analista que realizó el procedimiento.

Se procedió a trabajar con una cepa certificada de *Staphylococcus aureus* que no tuviera más de 24 horas de replicada, de igual manera se realizó con la cepa certificada de *Candida albicans*. Ambas réplicas se realizaron en el laboratorio de microbiología de Laboratorios ZEPOL S.A supervisadas por la encargada del laboratorio.

La cepa de *Staphylococcus aureus* trazable a ATCC® 6538 y la cepa de *Candida albicans* trazable a ATCC® 10231. En el anexo 1 se muestran los certificados correspondientes a cada cepa.

Para iniciar con las pruebas, se analizaron las muestras obtenidas de los extractos clasificados anteriormente y, según la técnica de extracción utilizada, así como el estado de la planta. La asignación de las muestras por analizar, se estableció, según lo mencionado en las tablas 1 y 2 para las pruebas con *S.aureus* y *C.albicans*, respectivamente.

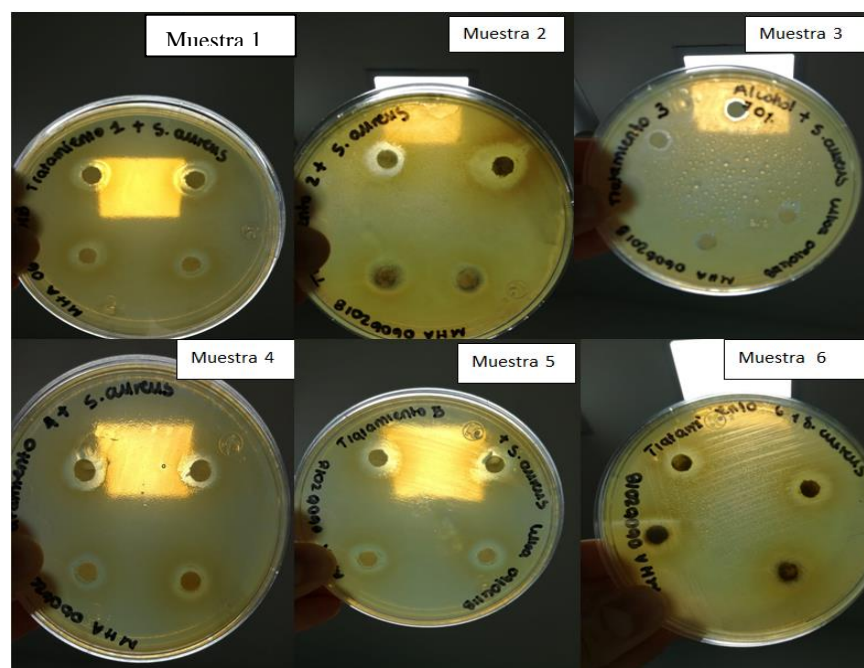
Para ambas pruebas, tanto para la inhibición de la bacteria *S.aureus* y del hongo *C.albicans* se realizaron con la técnica de métodos de discos de difusión utilizando el medio Mueller-Hinton, por medio del hisopado se dispersó el microorganismo inoculando toda la placa de manera que no quedara ninguna sección del medio de cultivo sin crecimiento bacteriano.

Una vez realizada la siembra de la cepa se procedió a colocar los discos impregnados con los extractos con la ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar, todas las pruebas se efectuaron por duplicado.

Se colocaron un máximo de 4 discos por placa, según lo establece Barría y Sánchez (2013), no deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150mm, ni más de 6 en una placa de 100mm, en esta prueba se utilizaron placas de 90 mm x 15mm.

Luego de transcurrido el tiempo de inoculación a 35°C, se midió la formación de halos de inhibición utilizando un vernier calibrado. Cabe destacar que se realizó un análisis al solvente utilizado para la extracción, de manera que se pudiera descartar algún tipo de inhibición por sí sola de los microorganismos, así como controles al medio utilizado, además se realizaron pruebas con dos productos farmacéuticos que sirvieron como control positivo para la prueba, tanto para las cepas de *S.aureus* así como *C.albicans*. En la Figura 27, se observa la formación de los halos de inhibición contra la bacteria *S.aureus*.

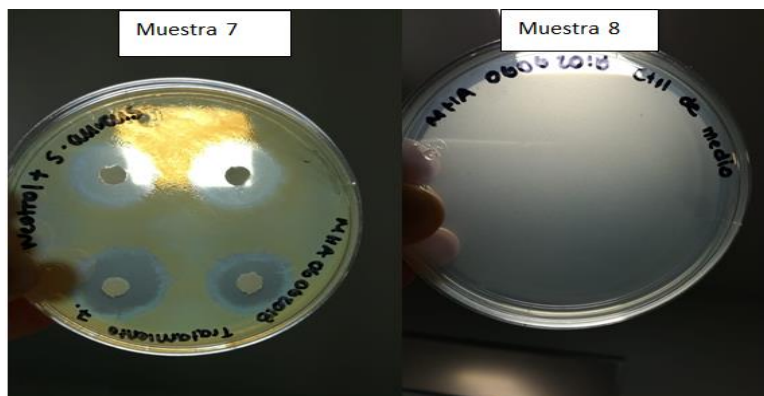
Figura 27. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria *S.aureus*.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la Figura 28, se observan los halos de inhibición presentados para el control positivo en antibiótico de amplio espectro Neotrol ® NF (muestra 7) así como el control del medio utilizado (muestra 8).

Figura 28. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria *S.aureus* por el Neotrol ® NF y control negativo del medio.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Según Barría y Sánchez (2013), para calcular el porcentaje de inhibición de cada muestra se debe dividir el diámetro de los halos de la muestra entre el diámetro de los halos obtenidos por el control y el resultado se multiplica por 100. Además, establecen que se puede clasificar la actividad antimicrobiana tomando como referencia los siguientes parámetros:

- Inactivo con un porcentaje de inhibición menor a 55%
- Poco activo con un porcentaje de inhibición entre 55 % -65%
- Moderadamente activo con un porcentaje de inhibición entre 66 % - 80%
- Buena actividad con un porcentaje de inhibición mayor al 80%

En la Tabla 8, se observan los valores obtenidos en las mediciones de los halos de inhibición de cada muestra. Basados en la información suministrada por Barría y Sánchez (2013) y analizando los valores obtenidos se observa en la Tabla 9 de los cálculos del porcentaje promedio de inhibición de actividad presentada contra *S.aureus*.

Tabla 8. Resultados de la formación de halos de inhibición formados contra la bacteria *S.aureus* por los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi).

Muestra	Placa 1 (mm)				Promedio	Placa 2 (mm)				Promedio
	Disc 1	Disc 2	Disc 3	Disc 4	x	Disc 1	Disc 2	Disc 3	Disc 4	x
1	11,30	10,76	10,56	9,74	10,59	10,11	10,88	11,32	10,56	10,72
2	10,82	13,55	12,37	11,49	12,06	14,44	14,05	14,63	12,72	13,96
3	6,48	6,11	6,98	7,40	6,74	7,12	6,79	7,45	7,16	7,13
4	10,21	9,30	9,41	9,33	9,56	9,04	8,51	10,07	8,24	8,97
5	10,58	11,18	8,91	9,60	10,07	9,39	8,94	7,60	8,02	8,49
6	9,03	11,03	9,76	10,73	10,14	10,06	9,69	8,56	8,93	9,31
7	17,67	16,92	16,09	16,85	16,88	17,20	19,72	20,43	19,97	19,33
8	Ausencia de crecimiento					Ausencia de crecimiento				

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Según los datos obtenidos en la Tabla 9 la muestra 2 correspondiente al extracto de la planta fresca obtenido por el método de maceración, es la única que obtuvo un porcentaje de inhibición moderadamente activo con un 71,86 %, la muestra 1 correspondiente al extracto de planta fresca obtenido por el método soxhlet, obtuvo un 58,85 % siendo así catalogada como poco activa.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) obtenido contra *S.aureus*.

Muestra	Promedio de inhibición (mm)	Porcentaje de inhibición
1	10,66	58,85
2	13,01	71,86
3	6,94	38,30
4	9,27	51,17
5	9,28	51,26
6	9,73	53,71
7	18,11	100

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Para las muestras 4 y 5 correspondientes al extracto de planta seca, obtenidas por los métodos de soxhlet y maceración, presentaron resultados de inhibición muy similares de 51,17% y 51,26%, respectivamente, siendo éste un porcentaje de inhibición inferior a 55% catalogado como inactivo, según lo descrito por Barría y Sánchez (2013).

La muestra 6, corresponde a material vegetal seco obtenida por el método soxhlet, pero solo a una porción de aceite (Aceite) que quedó en el balón después de realizar la concentración de la muestra, la cual presentaba consistencia distinta, tal y como se comentó en el análisis de la variable 1. Esta muestra presentó un porcentaje de inhibición del 53,71% siendo inactivo, según la clasificación de Barría y Sánchez (2013).

Se empleó de referencia el medicamento Neotrol ® NF cuya combinación de dos ingredientes: Polimixina B y Neomicina ambos son eficaces bactericidas, la mezcla de estos proporciona un espectro de acción amplio contra la gran mayoría de cepas bacterianas, tanto gram-positivas como gram-negativas, siendo efectivo contra *S.aureus*. En los resultados de esta muestra se observa que presentó unos halos inhibición en promedio de 18,11 mm, siendo 5,1mm más que los presentados por el extracto fresco macerado.

Los resultados obtenidos en la muestras 1, demuestran que el extracto de planta fresco macerado fue el único que presentó actividad antimicrobiana activa frente a *S.aureus*. El extracto de la planta fresca obtenido por el método soxhlet, está catalogado como poco activo frente a

S.auerus. Las diferencias obtenidas entre el método macerado y la extracción con soxhlet se pueden presentar por diversas razones como las descritas por Sharapin (2000), al mencionar que la temperatura utilizada en el proceso de soxhlet, la cual se mantuvo en aproximadamente a 68°C mientras que en el extracto macerado la extracción se realizó a temperatura ambiente.

Otro factor importante por considerar en cuanto a la variación de los resultados entre el extracto macerado y el extraído por soxhlet, es el tiempo de extracción, este tiempo debe ser suficiente para permitir la separación de los compuestos de interés, en el caso de la extracción con soxhlet ésta se realizó por un periodo de 12 horas, tiempo suficiente para que se realizaran 4 ciclos de extracción; sin embargo, el extracto macerado se mantuvo durante 14 días, en los cuales se agitó una vez al día, aunque no se tiene estipulado un tiempo estándar para realizar extracciones, es posible que el aumento en el tiempo de contacto del material fresco macerado contra el realizado por la extracción con soxhlet fuera un factor determinante en los resultados obtenidos.

En la industria de fabricación de medicamentos, dos factores importantes por considerar en un proceso de fabricación son los costos y la eficiencia del proceso, por lo cual es de considerar que el prolongar los procesos de extracción estos influyen directamente en los costos, tiempos muertos de espera y mano de obra directa que se involucra en el proceso, desde este punto de vista se podría decir, que un proceso de maceración podría incrementar los costos de producción por el tiempo, desperdicios y el proceso manual que conlleva, al compararlo con una extracción con el sistema de soxhlet.

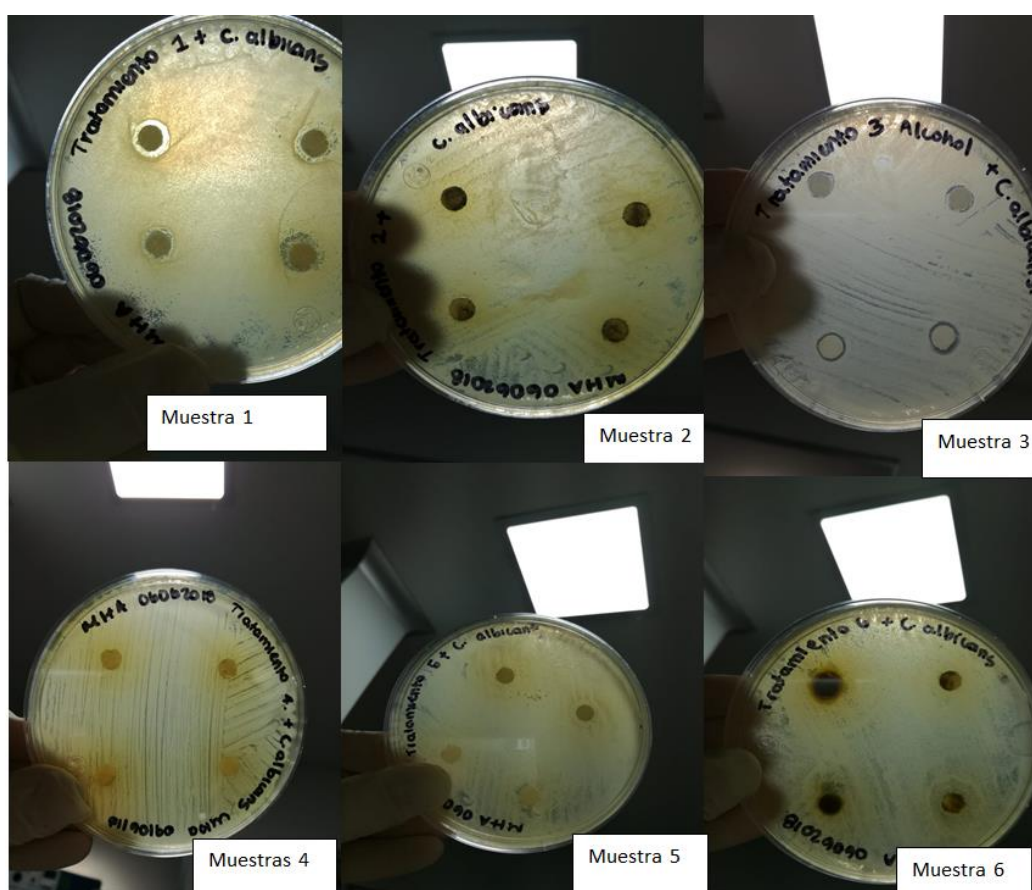
Los procesos de secado, según lo establece Sharapin (2000), al involucrar calor pueden presentar pérdidas de aceites esenciales o sustancias volátiles, las plantas medicinales deben ser secadas con temperaturas entre los 30°C y 60°C incluso el autor establece que las plantas que presentan aceites esenciales, la temperatura debe ser inferior a 40°C. Mihai y Holban (2017), también, mencionan, que en el caso de que se utilicen procesos con baja temperatura es requerido periodos largos de extracción.

En el caso de esta investigación, no se controló la cantidad de calor de secado dado que la fuente de radiación solar no fue una de las variables medidas, lo cual pudo ocasionar que se presentaran pérdidas en los compuestos activos de la planta.

Los resultados obtenidos para el análisis de los extractos hidroalcohólicos de planta fresca son congruentes con los obtenidos por Barría y Sánchez (2013), donde reportaron una actividad moderada de inhibición con un 68,8% de inhibición frente a *S.aureus*.

En relación con los resultados obtenidos de las muestras de los extractos analizados y su efecto contra *C.albicans*, se observa en la Figura 29 los halos de inhibición que se presentaron en las muestras.

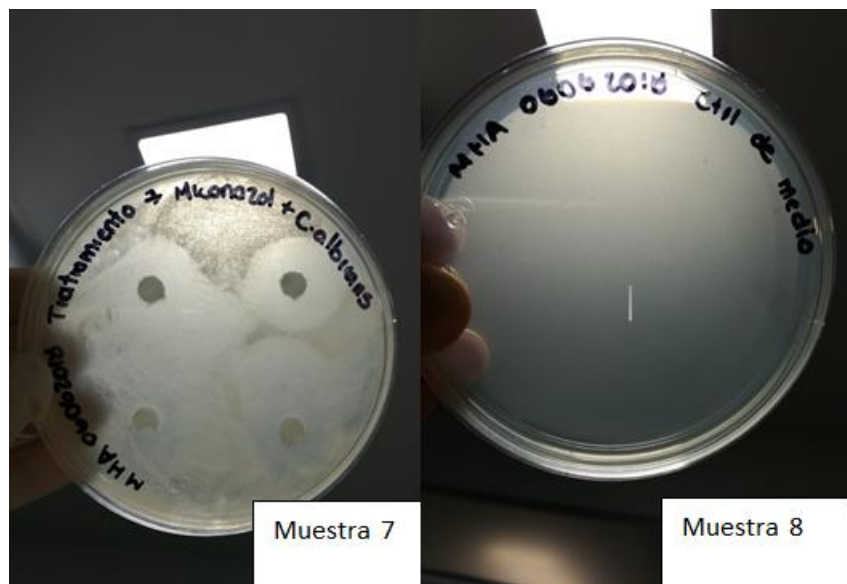
Figura 29 Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra la bacteria *C.albicans*.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la Figura 30 se observan los halos de inhibición presentados para el control positivo por el Nitrato de miconazol al 2% (muestra 7), así como el control del medio utilizado (muestra 8).

Figura 30. Formación de halos de inhibición obtenidos en el medio de cultivo Mueller-Hinton contra el hongo *C.albicans* por el Nitrato de miconazol al 2% (muestra 7) y control negativo del medio (muestra 8).



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Como se observa en las imágenes de la Figura 29, no se demostró inhibición de los extractos analizados en contra de la cepa de *C.albicans*. Solamente se muestra inhibición en la Figura 30 por parte del medicamento nitrato de miconazol cuya concentración es al 2% utilizado como control positivo de la prueba, este medicamento es un antimicótico tópico de amplio espectro, de acción contra dermatofitos, tinea, Cándida, Pitiriasis, algunos bacilos y cocos gram-positivos.

En la Tabla 10 se observan los resultados de las mediciones promedios obtenidos para la formación de halos de inhibición contra *C.albicans*. Como se observa el valor más alto obtenido después del medicamento de Nitrato de miconazol al 2% corresponde al solvente utilizado para la extracción del material vegetal.

Tabla 10. Resultados de la formación de halos de inhibición de los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) formados contra el hongo *C.albicans*.

Muestra	Placa 1 (mm)				Promedio (mm)	Placa 2 (mm)				Promedio (mm)
	Disc 1	Disc 2	Disc 3	Disc 4	X	Disc 1	Disc 2	Disc 3	Disc 4	x
1	5,93	8,42	6,20	6,80	6,84	7,92	7,77	7,44	8,10	7,81
2	6,99	6,26	6,15	6,23	6,41	5,96	6,25	6,07	6,07	6,09
3	6,96	7,92	7,02	7,10	7,25	6,76	6,76	7,14	7,96	7,16
4	6,22	6,03	6,30	6,13	6,17	6,24	6,14	6,14	6,14	6,17
5	6,13	6,44	6,44	6,55	6,39	6,27	6,44	6,48	6,20	6,35
6	6,56	5,59	6,29	6,44	6,22	6,07	6,07	6,49	6,38	6,25
7	18,93	22,37	22,05	23,21	21,64	14,91	18,73	16,78	20,01	17,61
8	Ausencia de crecimiento					Ausencia de crecimiento				

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la Tabla 11 se muestra el porcentaje de inhibición obtenido para los extractos de *Senna reticulata*, según lo establece Barría y Sánchez (2005), se clasifica a todas las muestras analizadas por debajo del 55% ubicándolas así en sustancias inactivas contra la cepa de *C.albicans*.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición obtenido de los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) contra *C.albicans*.

Muestra	Promedio de inhibición (mm)	Porcentaje de inhibición (%)
1	7,31	37,23
2	6,25	31,84
3	7,21	36,71
4	6,17	31,43
5	6,37	32,15
6	6,24	31,78
7	19,63	100

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Ninguna de las muestras de extractos analizados, presentó actividad antimicrobiana contra *C.albicans*, a pesar de estar reportado por distintos autores como Ruiz (2013), la actividad antifúngica de *Cassia (Senna) reticulata* los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los extractos hidroalcohólicos, tanto de la planta fresca como la planta seca, no presentan efecto inhibitorio ante *C.albicans*. Muchos autores, como Nunes do Santos y Goret (2008), así como Quesada (2008), reportan el uso más común de la especie *Senna reticulata* para obstrucciones de hígado y problemas reumáticos y afección de piel, pero por bacterias no por hongos.

La literatura que reflejó más información para esta investigación se refiere a la especie *Senna alata* en relación con los efectos antifúngicos y antibacteriales, sin embargo, en Costa Rica es más común encontrar la especie *Senna reticulata*, por lo cual se pueden dar confusiones de uso del material vegetal.

Identificación de los metabolitos activos presentes en extracto de la planta *Senna Reticulata* (Saragundi)

Para la identificación de metabolitos activos presentes en los distintos extractos evaluados en esta investigación, se realizaron tres métodos distintos mediante los cuales se logró identificar la presencia de los compuestos activos descritos por la literatura. Primero, se realizaron las pruebas de identificación cualitativas de los compuestos reportados en la literatura, luego se realizaron pruebas cualitativas por cromatografía de capa fina para la identificación de flavonoides y antraquinonas por último, se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a detector de masas, para la verificación de los compuestos que más se han reportado en la literatura.

Análisis de las pruebas de identificación cualitativas para los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) planta fresca y seca, obtenidos mediante la técnica de extracción maceración y reflujo cerrado soxhlet.

El primer método aplicado fue la prueba de identificación cualitativa o tamizaje fitoquímico, donde mediante pruebas o ensayos de caracterización de grupos funcionales, se procedió al tamizaje fitoquímico de los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) para el material vegetal fresco y seco, obtenidos por medio de los métodos de maceración y soxhlet.

En el Tabla 12, se resumen los resultados obtenidos durante la realización de los ensayos establecidos.

Tabla 12. Resultados obtenidos durante la caracterización o tamizaje fitoquímico del extracto de *Senna reticulata* (Saragundi) realizado en las Instalaciones del Laboratorio Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Tipo de extracto	Planta fresca macerada	Planta fresca soxhlet	Planta seca soxhlet	Planta seca soxhlet
Prueba de Dragendorff (Detección de alcaloides)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Prueba de Libermann-Buchard (Detección de terpenos)	Coloración verde claro turbidez, (Positivo)	Coloración verde claro turbidez, (Positivo)	Coloración verde oscuro (Positivo)	Coloración verde oscuro (Positivo)
Prueba Shinoda (Detección de flavonoides)	Coloración leve (Positivo)	Coloración leve (Positivo)	Coloración fuerte (Positivo)	Coloración fuerte (Positivo)
Prueba de detección de Antraquinonas	Positivo Coloración leve	Positivo Coloración leve	Positivo Coloración fuerte	Positivo Coloración fuerte

Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

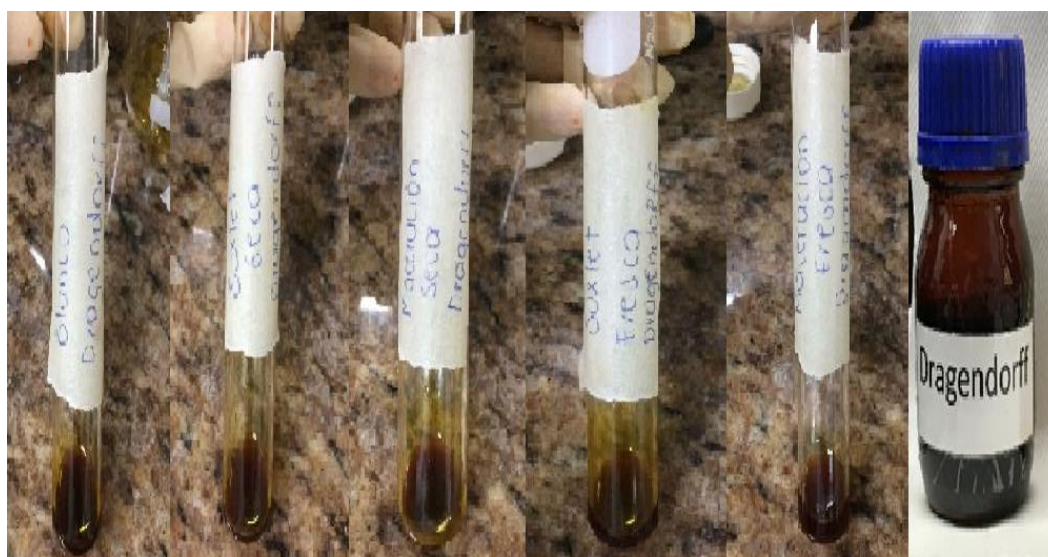
Para determinar la presencia de alcaloides, se aplicó el reactivo Dragendorff, según lo establece Domínguez (1985), el cual está compuesto por tetrayoduro bismuto de potasio (KBiI_4), éste puede indicar la presencia de alcaloides por la formación de un precipitado color naranja rojizo cuando se le adiciona a una muestra del extracto vegetal.

Este ensayo dio un resultado negativo durante la identificación de los metabolitos de alcaloides presentes en los extractos obtenidos; tanto por maceración como por reflujo cerrado (soxhlet), así como para el material fresco y el seco. Este resultado es interesante ya que los alcaloides están reportados como compuestos de acción antimicrobiana, mediante la interacción

con el ADN, por lo cual el no obtener presencia de ellos en las extracciones es evidencia de su poca actividad antimicrobiana demostrada en las pruebas microbiológicas.

Durante la realización del ensayo se corrió paralelamente un blanco negativo, de forma que se pudiese observar por diferencia la presencia del mismo. En la Figura 31, se puede apreciar lo observado durante la realización de la prueba de laboratorio.

Figura 31. Ensayo de identificación alcaloides: reactivo Dragendorff con los extractos de *Senna reticulata*, realizado en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.



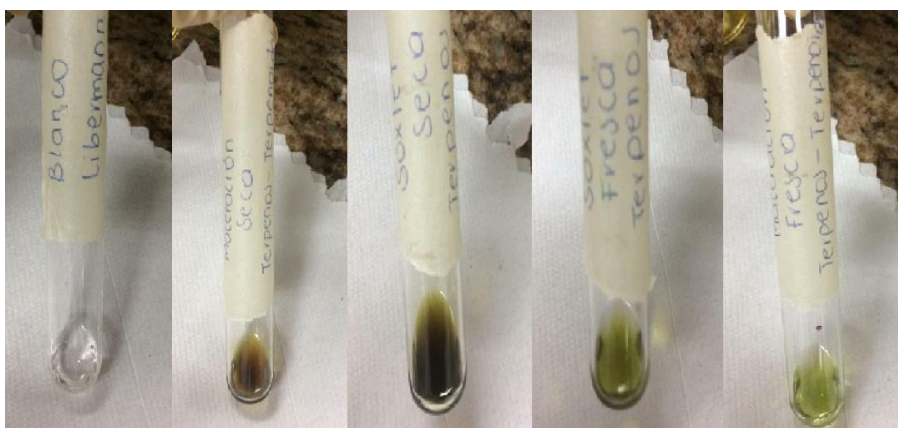
Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

La identificación de terpenos presentes en las muestras de los distintos extractos aplicando el ensayo de Libermann-Buchard descrito por Domínguez (1985), consistió en una reacción de la muestra (previamente agregado ácido acético anhidro) con H_2SO_4 concentrado agregado gota a gota. Si se genera un cambio de coloración azul, verde, rojo o anaranjado la prueba es positiva.

Este ensayo con las distintas muestras, mostraron resultados positivos para los extractos realizados al material vegetal fresco y seco principalmente notable el cambio de color a un verde claro para la muestra extraída por maceración utilizando material vegetal fresco. La muestra analizada del extracto fresco obtenido por el método de reflujo cerrado (soxhlet) presenta un cambio de coloración un poco menos notable. Sin embargo, las muestras de los extractos del material seco presentan un resultado positivo cambiando a un color verde oscuro casi café. En la

Figura 32, se observa los cambios presentados respecto del blanco negativo que se corrió para demostrar la reacción.

Figura 32. Ensayo de identificación terpenos: prueba Libermann-Buchard con los extractos de *Senna reticulata*, realizado en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Nunes do Santos y Goratti (2008), reportan para el extracto de *Senna reticulata* dos triterpenos los cuales son el alfa y beta amirina, las pruebas realizadas cualitativas demuestran la presencia de este tipo de compuestos en los extractos.

Para la identificación de flavonoides en los extractos, se aplicó el ensayo o reacción de Shinoda (Domínguez, 1985), en el cual se describe que los extractos alcohólicos incoloros o ligeramente amarillos al tratarlos con tiras de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico concentrado presentan coloraciones naranjas, amarillos, café, rojas o rojas azulada a violeta. Esta prueba aplicada a los extractos, dio positivo para los extractos obtenidos del material vegetal seco, tanto el extraído por maceración como por reflujo cerrado (soxhlet), dado que se observó una coloración amarilla intensa oscura, sin embargo, en la planta fresca se presenta una coloración leve. En la

Figura 33, se puede apreciar el resultado obtenido de éste.

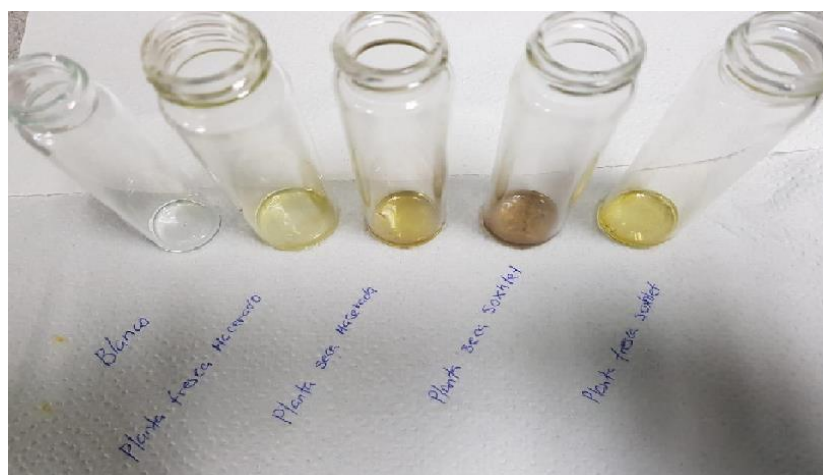
Figura 33. Ensayo de identificación para flavonoides, prueba de Shinoda los extractos de *Senna reticulata*, prueba realizada en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Para la identificación de las antraquinonas en los extractos se aplicó el ensayo descrito por Domínguez (1985), para el cual se agregó 1 mL de cloruro de hierro III al 10% y 1 mL de HCl concentrado a las muestras de extractos, la solución se calentó y al enfriarse se realizó la extracción de las antraquinonas utilizando cloroformo, las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrado o con ácido sulfúrico. En la Figura 34, se observa la apariencia de los extractos antes de iniciar las pruebas. De izquierda a derecha se observan el blanco, los extractos de planta fresca macerada, planta seca macerada, planta seca soxhlet y planta fresca soxhlet.

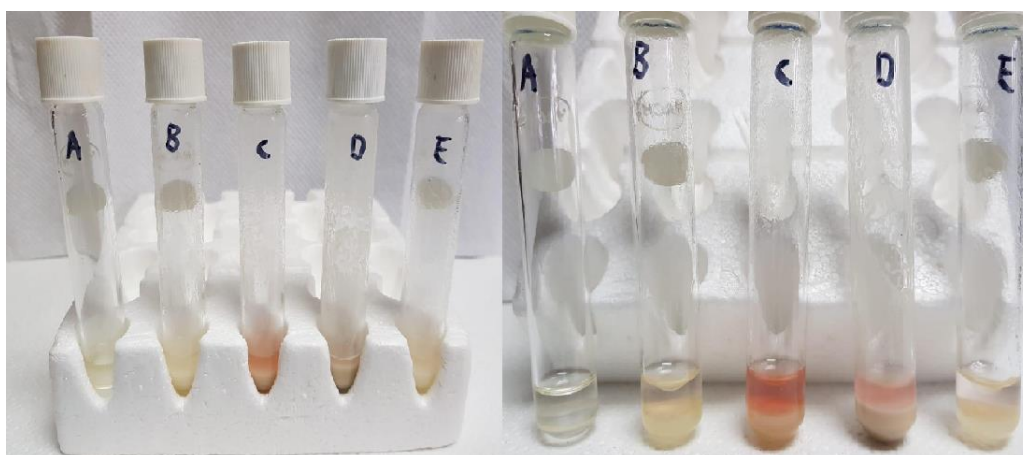
Figura 34. Extractos de *Senna reticulata* utilizados para la prueba cualitativa de detección de antraquinonas.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la Figura 35, se observan los resultados obtenidos para la prueba cualitativa de identificación de antraquinonas. Las muestras presentan resultado positivo con una coloración rosada fuerte para los extractos de planta seca macerada (C) y planta seca soxhlet (D) en comparación con el blanco correspondiente al tubo A. Las muestras de los extractos frescos macerado (B) y soxhlet (E) presentan una coloración tenue.

Figura 35. Ensayo de identificación para antraquinonas, para los extractos de *Senna reticulata*, prueba realizada en las instalaciones del Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Análisis de cromatografía de capa fina para los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) planta fresca y seca.

Para la realización de este análisis, se buscó identificar los dos compuestos mayoritariamente descritos en la bibliografía, los cuales son las antraquinonas y los flavonoides. Al no contar con un estándar de referencia para la *Senna reticulata*, solo se procedió a realizar pruebas de presencia o ausencia de los compuestos y comparar si se observaban diferencias entre los distintos extractos obtenidos en esta investigación. Se realizó la comparación no solo de los extractos concentrados de la planta fresca y seca, ambos obtenidos por el método de maceración y soxhlet, sino también, de los extractos sin concentrar utilizados para las pruebas de identificación cualitativa; de manera que se pudiera comparar alguna diferencia importante en las coloraciones o en la forma como se realizó la separación de los compuestos en las diferentes muestras.

Partiendo de los distintos extractos obtenidos se colocaron las muestras en las placas de celulosa con la ayuda de un capilar, colocando una gota de cada extracto a analizar. Para iniciar con las pruebas se procedió a establecer la siguiente demarcación de las muestras para facilitar la demarcación en las placas:

PSMC: Planta seca macerado concentrado.

PSMS: Planta seca macerado sin concentrar.

PSSC: Plana seca soxhlet concentrado.

PSSS: Plana seca soxhlet sin concentrar.

PFMC: Planta fresca macerado concentrada.

PFMS: Planta fresca macerado sin concentrar.

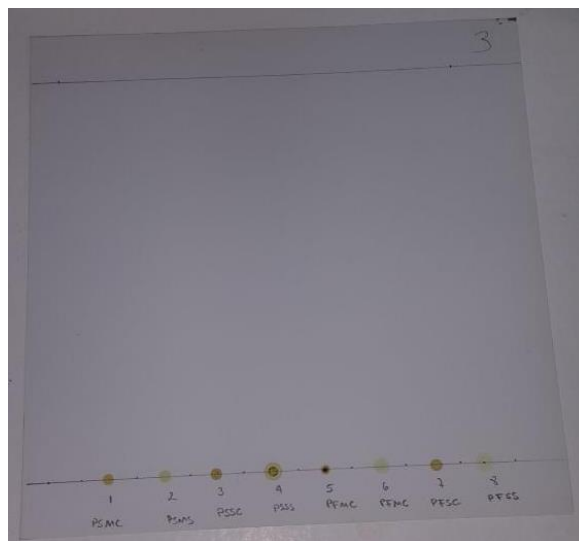
PFSC: Planta fresca soxhlet concentrado.

PFSS: Planta fresca soxhlet sin concentrar.

En la

Figura 36 se observa la demarcación de la placa con los distintos extractos a analizar. Así como en la Figura 37 se observa el proceso de separación de los compuestos.

Figura 36. Placa de gel de sílice demarcadas con los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) para prueba de detección de flavonoides por cromatografía de capa fina.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

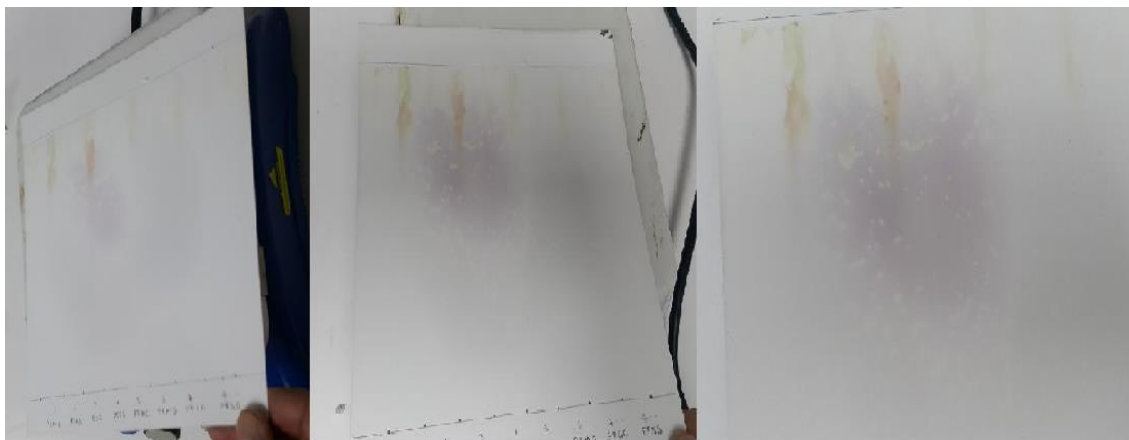
Figura 37. Proceso de separación de los compuestos en placa de gel de sílice utilizando una cámara cerrada de revelado de vidrio para los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi).



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Para la prueba de identificación de flavonoides indicada por Domínguez (1985), se utilizó el reactivo revelador de vainillina, el cual se utiliza una vez finalizado el proceso de separación, se calentó en una plantilla de calentamiento hasta revelar la presencia de flavonoides, tal y como se observa en la Figura 38.

Figura 38. Proceso de revelado de flavonoides para los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) utilizando el reactivo de vainillina.

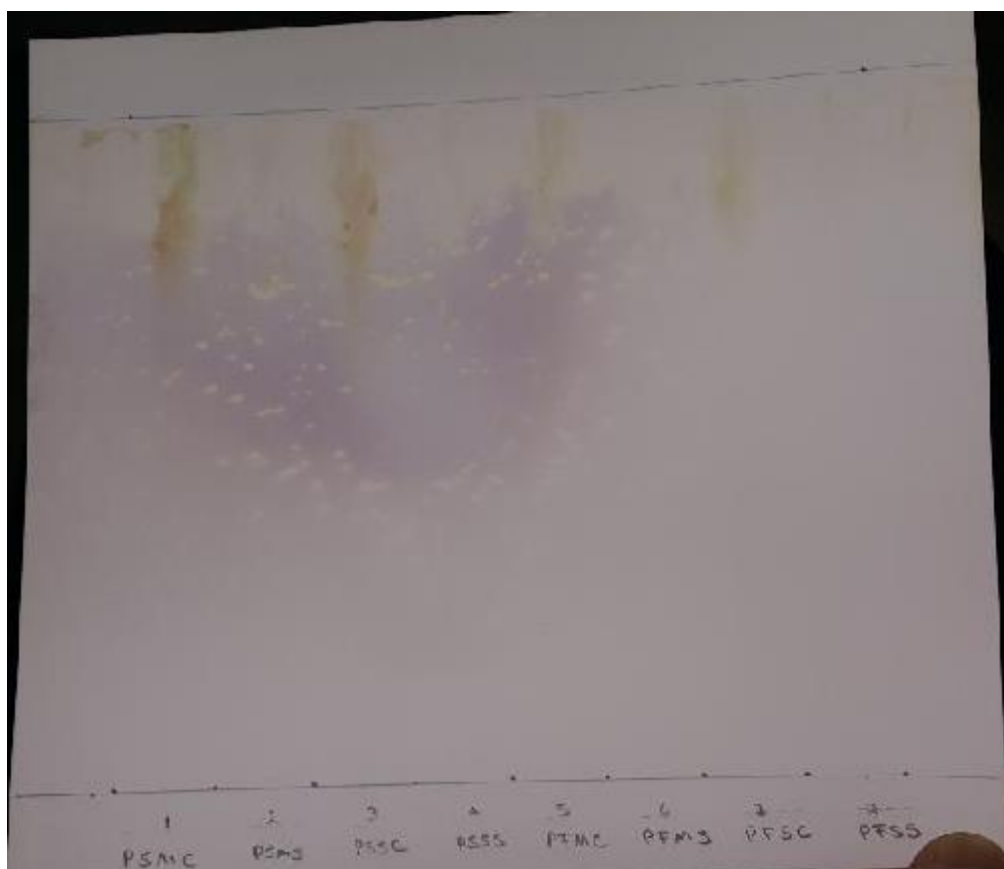


Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la Figura 39, se observa el resultado final de la identificación de flavonoides, éste coincidiendo con la identificación positiva realizada en la prueba de Shinoda, ya que la coloración rosa se presenta en la primera porción de la placa exactamente donde se colocaron los extractos de plantas seca, tanto macerados como extraídos con soxhlet, además no se evidencia diferencia de la utilización de los extractos concentrados y sin concentrar.

Para esta prueba se puede mejorar en relación con la separación de los compuestos, ya que como se observa, todas las manchas subieron con el solvente quedando atrapadas en la parte superior de la placa impidiendo una buena resolución. Se puede intentar cambiar la polaridad de la fase móvil para permitir una mejor separación de las manchas.

Figura 39. Identificación de flavonoides para los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) utilizando el reactivo de vainillina.



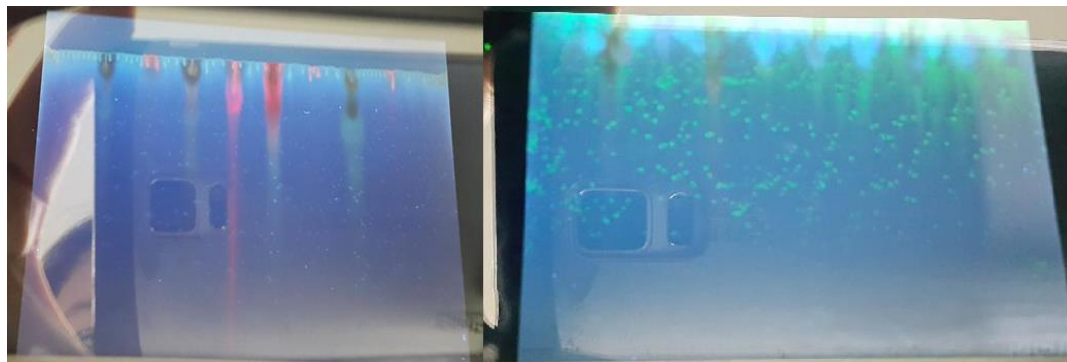
Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la

Figura 40 se puede apreciar los compuestos visualizados a través de la cabina de análisis fluorescente donde se examinó la placa bajo luz ultravioleta a longitud de onda de 254nm. Se observa en la figura de la derecha las manchas correspondientes a la coloración de flavonoides revelados por el reactivo de vainillina.

También, se observa cómo las manchas de los extractos fluyeron junto con los solventes no permitiendo la separación completa de los compuestos de interés.

Figura 40. Imágenes de los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) analizados a través de la cabina de análisis fluorescente a 254nm.

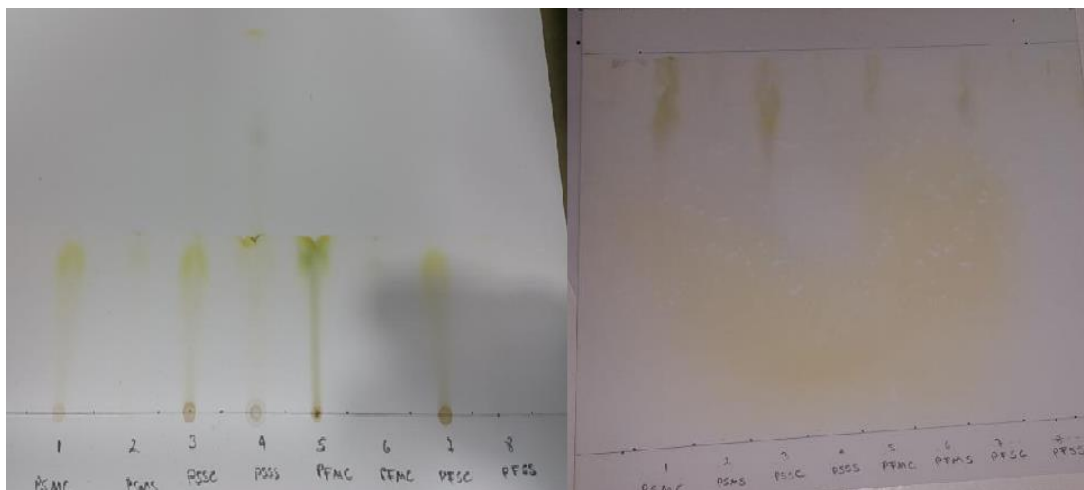


Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Para la identificación de hidroxiantarquinonas, que es uno de los compuestos de interés en el extracto de *Senna reticulata* (Saragundi) ya que, según lo reportado por los autores Nunes do Santos y Goratti (2008) y Barría y Sánchez (2013), la planta presenta cinco hidroxiantraquinonas principales como lo son: crisofanol, fisciona, emodina, 1,6,8-hidroxi-3-metoxiantraquinona y 1,3,8- trihidroxiantraquinona, se buscó, según lo señalado por Domínguez (1985), en relación con la identificación de antraquinonas, realizar las pruebas para confirmar la presencia de estos compuestos en los extractos.

En la Figura 41, se observa la elucidación de los compuestos utilizando una fase móvil de éter/metanol en una proporción de 5:3. Según los resultados obtenidos, no se presenta separación de los compuestos y además, no se presentan diferencias entre los distintos extractos analizados. Sin embargo, se puede notar la presencia de antraquinonas al realizar el revelado con la solución de metanol al 0,5% y acetato de magnesio, luego de calentar durante 5 minutos, se presenta una coloración naranja así tal y como lo indica Domínguez (1985), esto es indicación de que de la variedad de antraquinonas que existen, en los extractos, tienen hidroxilos ubicados en posición meta, lo que es posiblemente producto del complejo de la quinona y el hidróxilo contiguos con el acetato de magnesio.

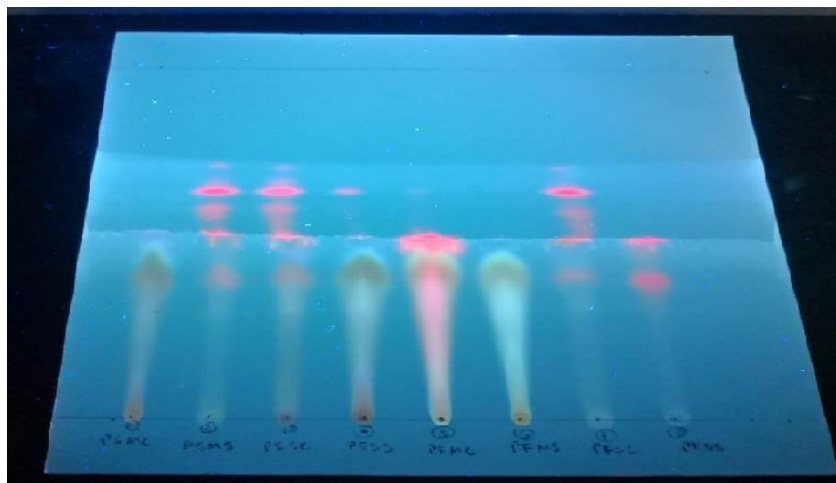
Figura 41. Proceso de revelado de hidroxiantraquinonas para los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi).



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

En la Figura 42, observan se los compuestos visualizados a través de la cabina de análisis fluorescente donde se examinó la placa bajo luz ultravioleta a longitud de onda de 254nm.

Figura 42. Imágenes de los extractos de *Senna reticulata* (Saragundi) analizados a través de la cabina de análisis fluorescente a 254nm.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

Análisis del cromatograma y espectro de masas obtenido para el extracto de *Senna reticulata* (Saragundi) mediante la técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas

Para comprobar la presencia de los componentes presentes en los extractos de *Senna reticulata*, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), para la prueba se seleccionó el extracto de la planta fresca macerada concentrada que fue el que presentó actividad moderada de inhibición frente a *S.aureus*, por lo cual se analizó esta muestra para la identificación cromatográfica, por motivos del alto costo de la prueba no se pudo realizar a todas las muestras del estudio.

La técnica de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), es una técnica confiable y eficaz para identificar y determinar la proporción de componentes con alto grado de veracidad, dado que además, de separar en forma individual, permite mediante espectrometría de masas dilucidar los compuestos orgánicos por análisis de los fragmentos mayoritarios, producto del proceso de la técnica.

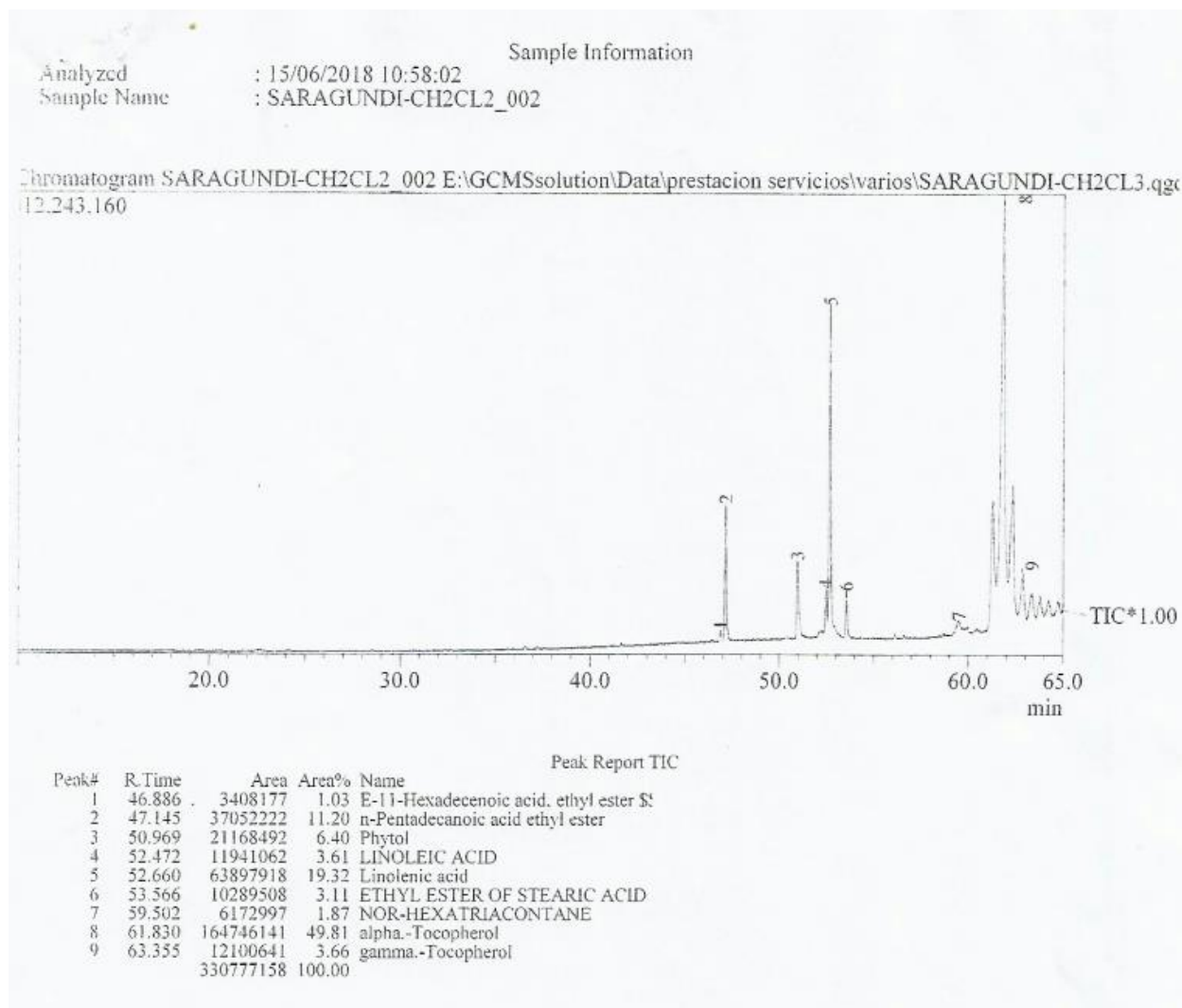
Para la muestra analizada, se realizó primeramente una limpieza para eliminar clorofila utilizando sílica, además se llevó a cabo una extracción utilizando acetato de etilo. Dicho ensayo fue contratado al Centro de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica

(CIPRONA). En el reporte suministrado por el CIPRONA, (ver anexo 2) se detectan compuestos comunes presentes en la mayoría de plantas y reportadas para el Saragundí.

En el cromatograma obtenido en el análisis de la muestra realizado el 15 de junio del 2018 por el CIPRONA (ver anexo3), se logró establecer la presencia de 9 compuestos que se describirán a continuación como porcentajes de las áreas totales de los picos cromatográficos detectados; siendo el compuesto mayoritario con un 49,81 % el alfa-tocopherol, seguido se encuentra el ácido linolenico con un 19,32 %, con un 11,20 % está presente el n-pentadecanoato de etilo, con 6,40% se encuentra el fitol, el gama-tocoferol presenta un 3,66%, con un 3,61% se obtuvo el ácido linoléico y el estearato de etilo con un 3,11%. Con los porcentajes menores se encontró el E-11-hexadecenoato de etilo con un 1,03% y el nor-hexatriacontano.

La Figura 43, es la muestra del cromatograma obtenido para la muestra de extracto fresco obtenido por maceración de la planta *Senna reticulata* (Saragundi).

Figura 43.Cromatograma obtenido mediante el análisis por cromatografía gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), para la planta fresca macerada de *Senna reticulata* (Saragundi) realizado por el CIPRONA de la Universidad de Costa Rica.



Fuente: Elaboración propia. Morales, A. (2018).

El compuesto de mayor proporción encontrado, el alfa-tocoferol, es un compuesto fenólico de gran interés por sus propiedades antioxidantes, este compuesto no es de los principales activos reportados en la literatura para la planta de *Senna reticulata* (Saragundi). Algunas referencias bibliográficas reportan un efecto antioxidante y antiinflamatorio de las especies de Cassia (Senna) como lo menciona Villanueva y Zevallos (2017), principalmente, por la presencia del alto contenido fenólico y de flavonoides.

En una corrida cromatográfica convencional, se aplica una temperatura de inicio relativamente baja, conforme va pasando el tiempo y, según la programación de rampas de

temperatura estipuladas en el método utilizado, se va aumentando la temperatura en la columna. Cuando la temperatura en la columna es baja, los compuestos volátiles son los primeros que llegarán al detector y que saldrán en el cromatograma, presentando tiempos de retención bajos.

Conforme va aumentando la temperatura, los compuestos menos volátiles salen en la corrida. Al observar la Figura 43, se aprecia que en los primeros minutos de la corrida no hay evidencia de moléculas volátiles como terpenos y otros compuestos orgánicos presentes, por lo general, en extractos naturales. Sin embargo, conforme va pasando el tiempo se aprecia el primer pico aproximadamente a los 45 minutos y se corta la corrida a los 65 minutos.

Las moléculas identificadas en las pruebas cualitativas que están presentes en el extracto de *Senna reticulata* como flavonoides y antraquinonas, son moléculas más pesadas y con puntos de ebullición mucho más altos mayores de 180 °C normalmente, por lo que al cortar la corrida cromatográfica no se pudieron detectar algunos de los compuestos de interés, se evidencia que faltó tiempo al análisis, por lo tanto, este análisis no es concluyente para esta investigación ya que solo aportan moléculas que no se detectaron con las pruebas cualitativas.

Los motivos por los cuales, el resultado de esta prueba no genera aporte en la detección de las sustancias reportadas en la bibliografía, puede deberse a los siguientes aspectos:

- a- A pesar de una disminución en la presión del sistema (vacío) y su subsecuente efecto en los puntos de ebullición de las moléculas en general, en el tratamiento aplicado a la muestra analizada en el momento de concentrar con el rotavapor, pudo no ser el adecuado, ya que se pudieron perder sustancias volátiles.
- b- Los compuestos volátiles pudieron no ser afines en cuanto a solubilidad al acetato de etilo, por lo que al realizar su extracción con este disolvente, dichos compuestos no se extrajeron de la muestra analizada pudiendo haber quedado retenidos en la sílica.
- c- Haber analizado solamente un tipo de extracto, dejando de lado los extractos obtenidos de la planta seca, tanto por los métodos de maceración y soxhlet, los cuales presentaron actividad biológica al realizar las pruebas de identificación cualitativa de sustancias activas.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente investigación permiten concluir lo siguiente:

- A pesar de que la industria farmacéutica utiliza preferiblemente como materia prima el material seco por sus ventajas de manipulación, transporte y preservación, el extracto de planta seca generó mayores complicaciones en el proceso de concentración de la muestra y en los pretratamientos para los análisis posteriores de pruebas de inhibición microbiana.
- El proceso de concentrado de las muestras por rota vaporización, pudo haber afectado la respuesta de los indicadores biológicos ante las moléculas presentes en los extractos de la planta seca.
- La diferencia principal observada en las características organolépticas entre el extracto fresco y seco realizado por ambas técnicas, radicó en su consistencia presentando la planta seca apariencia muy viscosa sin presencia sólidos visibles, mientras que el extracto de la planta fresca presenta una apariencia fluida y con gran cantidad de sólidos presentes.
- Las características físicas observadas en los extractos de las plantas frescas y secas demuestran que no hay variaciones en olor, color y apariencia al aplicar el método de maceración y soxhlet, tanto para la planta fresca como para la planta seca.
- El extracto de la planta fresca obtenido por el método de maceración es la única muestra que obtuvo un porcentaje de inhibición moderadamente activo con un 71,86 % ante el *S. aureus*.
- El método de extracción por maceración generó mejores resultados obteniéndose un 71,86 % para el extracto macerado contra un 58,85 %, en las pruebas de inhibición antimicrobiana contra el microorganismo *S.aureus* que el método de reflujo cerrado soxhlet.
- No se presentó actividad inhibitoria por parte de ninguna de las muestras analizadas ante la cepa de *Candida albicans*.
- En la prueba de identificación de alcaloides utilizando el reactivo de Dragendorff para los extractos analizados, no se presentó la presencia de estas sustancias.
- La identificación de metabolitos activos empleando pruebas cualitativas, tales como: Liberman-Buchard y Shinoda dieron positivos para la presencia de terpenos, flavonoides y antraquinonas no así la prueba de Dragendorff para alcaloides presentes en los extractos.
- La identificación de antraquinonas y flavonoides por cromatografía de capa fina fue positiva para los extractos analizados.

- La identificación de los compuestos reportados en la literatura para *Senna reticulata*(Saragundi) no se detectaron en el análisis por cromatografía de gases acoplado a masas realizado por el CIPRONA, sin embargo, se identifican nuevas moléculas que no han sido reportadas en investigaciones anteriores realizadas a la planta; como lo son alfa-tocopherol, el ácido linolénico, n-pentadecanoato de etilo, fitol, gama-tocoferol, ácido linoleico, el estearato de etilo, E-11-hexadecenoato de etilo y el nor-hexatriacontano. .

Recomendaciones

- Se recomienda realizar la identificación de los compuestos activos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a masas, utilizando solventes polares para la purificación de las muestras, que permitan la extracción de compuestos presentes en las muestras para mejorar la capacidad de identificación de moléculas en los extractos.
- Realizar las pruebas microbiológicas y de identificación a los extractos sin concentrar para minimizar pérdidas de los compuestos activos que pudieran presentarse en el momento de calentar y eliminar sustancias activas de interés. Para efectos de ampliar los resultados obtenidos, se recomienda hacer las pruebas de identificación por cromatografía de gases acoplado a masas, tanto al extracto obtenido de la planta fresca como seco con el fin de determinar o desestimar posibles cambios en estados de oxidación de las moléculas durante el proceso de secado.
- Efectuar este tipo de investigación a la especie *Senna alata* la cual reporta gran actividad antimicrobiana y antifúngica, según lo establecen Makinde y Igoli (2007) y Binti (2008).
- En el proceso de secado de la planta, utilizar secadores solares o secadores que operan con aire caliente para controlar la temperatura aplicada al material.
- Asegurar utilizar solamente las hojas de la planta tanto fresco y seco, para realizar los extractos por los métodos de maceración y soxhlet.

REFERENCIAS

- Arias, F. (2007). “Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales obtenidos de plantas de la flora costarricense”. Universidad de Costa Rica. p.1.
- Arias, V. (2011). “Evaluación de la presencia de trihalometanos en aguas de consumo humano, en dos regiones de Costa Rica”. Universidad de Costa Rica. pp 30-45
- Barría, G; Sánchez, A. (2013). “Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de *Senna reticulata* (Wild) “retama” sobre microorganismos patógenos” Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Perú. pp. 1-61. Recuperado de alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNAP_87e0c079940425ad652678b232e904f.
- Barrese Y, Hernández M, García O. (2005). Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata*L. Revista Cubana Plant Med. Cuba. 10. (2). pp 1-8. Recuperado de www.binasss.sa.cr.
- Barroto, J; Blanco, M; Rivas, M; Hernández, M; Concepción, O; Trujillo, R. Meroterpenos (Antraquinonas) en diferentes partes de la planta de *Morinda royoc* L. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 36. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525053>.
- Bustos, J; Hamdan, A; Gutiérrez, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la remergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomed. México. 17.pp 287-305. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2006/bio064f.pdf>.
- Binti H, (2008). Evaluation of antimicrobial activity from *Cassia alata* leaves towards Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Universiti Teknologi Mara Malaysia. p.1. Recuperado de www.binasss.sa.cr.
- Castañón, C. (2012). Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. Revista Evidencia Médica e Investigación en Salud. 5 (3) pp 79-84. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2012/eo123b.pdf>.

- Cervantes, E; García, R; Salazar, P. (2014). Características generales de los *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica. México. 61 (1). pp 28-40. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th Ed, pp56-63.
- Crespo, V. (2008). Generalidades sobre los hongos. Dermatomicosis: saprofitias y dermatofitosis. Elsevier. España. 23 (7) pp 389-396. [doi.org/10.1016/S0213-9251\(08\)72312-8](https://doi.org/10.1016/S0213-9251(08)72312-8)
- Domínguez, J. (1985). Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa, México.
- Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. (2013). Segunda Edición. México.
- Fried, B; Sherma, J. (1996). Practical Thin- layer Chromatography. CRC Press, Inc. USA. pp 1-10.
- Grumezescu, A. y Holban, A. (2017). Ingredients Extraction by Physicochemical methods in food. Academic Press. USA. pp 638.
- Hammel, B; Grayum, M; Herrera, C; Zamora, N. (2010). Manual de Plantas de Costa Rica. Dicotiledóneas (Clusiaceae-Gunneraceae). 5. pp710-720.
- Hoffman BR, H. DelasAlas, K. Blanco, N. Wiederhold, R.E. Lewis and L. Williams. (2004). Screening of Antibacterial and Antifungal Activities of Ten Medicinal Plants from Ghana. Pharmaceutical Biology. 42. (1). pp. 13-17. doi.org/10.1080/13880200490504925
- Igoli, J; Ogali, O; Tor-Anyin, T; Igoli, N. (2005). Research Paper- Traditional Medicine Practice Amongst the Igede People of Nigeria. African Journal of Traditional complementary and alternative medicines. Nigeria. 2. (2). pp.134-152. DOI:10.1300/J044v10n04_01
- Jawetz, Melnick y Adelberg. (2010). Microbiología Médica. China, 25ª Edición, Mc Graw Hill. pp185.
- Jiménez, A. (2002). Caracterización de 10 Genotipos de Saragundí (*Senna reticulata* (Wild) H.S. Irwin & Barneby), propagación vegetativa por estacas y desarrollo de productos en

- Pocora, Costa Rica". Universidad EARTH. Costa Rica. pp 1-43. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/241945381/SARAGUNDI-pdf>.
- Jorgensen, J; Ferraro, M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. Medical Microbiology. USA. 49 (1) pp 1749-1755. Recuperado de <https://watermark.silverchair.com>
- Kaiser, F; Bienz, K; Eckert, J; Zinkernagel, R. (2005). Medical Microbiology. USA. 9^a Edición, Thieme Stuttgart. pp 663.
- Kitson, F; Larsen, B; McEwen, C. (1996). Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Academic Press. Londres. p.15-35.
- Makinde A, Igoli J, Tama L, Shaibu S, Garba A. (2007). Antimicrobial activity of Cassia alata. African Journal of Biotechnology. Nigeria. 6. (13). pp 1509-1510. Recuperado de <http://www.academicjournals.org>.
- Matulevich, J; Castrillón, W; Chitiva, L; Flórez, E. (2017). "Caracterización química del aceite esencial de hojas de la especie vegetal Senna reticulata (Fabaceae)" Revista Facultad de Ciencias Básicas. Colombia. 13 (2). pp 123-127. doi.org/10.18359/rfcb.2749.
- McNair, H; Miller, J. (1998). Basic Gas Chromatography. John Wiley & Sons. Nueva York, EEUU. p. 1-97.
- Mendoza, N. (2008). Farmacología Médica. Editorial Médica Panamericana. Mexico.
- Muñoz, F. (2002). Plantas medicinales y aromáticas estudio, cultivo y procesado. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Mollinedo, P; González, C. (2014) Bacterias Gram Negativas. Revista Boliviana. 49. pp 2609-2613 Recuperado de http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a05.pdf

- Moreira, I; Arnáez, E; Murillo, R; Quesada, S; Castro, V; Zamora, W; Cordero, M; Loaiza, J; Navarro, M. (2014). Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Costa Rica 27 (4). pp 69-77. Recuperado de http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/2087 Nunes dos Santos, R.; Goretti, M.; (2008). Chemical Constituents isolated from the wood of *Senna reticulata* Wild (Leguminosae). *Química Nova*. Brasil. 31(8) p.p 1979-1981. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n8/11.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Resistencia a los antimicrobianos. Dirección url: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Parolin, P. (2005). *Senna reticulata* (Willd) H.S. Irwin & Barneby (Fabaceae) “Mataplasto”, árbol pionero en las planicies inundables Amazónicas. *Ecología Aplicada*. Perú. 4 (1-2) pp 41-46. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=34100206>.
- Pérez, B. (2004). Determinación in vitro de la eficacia de extractos de Saragundí (*Cassia alata*) contra hongos dermatófilos (*Trichophyton rubrum* y *Microsporum gypseum*). Informe de práctica de especialidad para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología con el grado académico de Bachiller Instituto Tecnológico de Costa Rica. p.7
- Pineda, J; (2017) Artículo de Revisión Candidosis vaginal. Revisión de la literatura y situación de México y otros países latinoamericanos. *Revista Médica Risaralda*; 23 (1): 38 – 44
- Ponce de León, S; Arredondo, R; López, Y. (2015) La resistencia a los antibióticos: un grave problema global. *Gaceta médica de México*. México. 151. pp 681-689 Recuperado de www.binasss.sa.cr.
- Quesada, A. (2016). Guía de plantas útiles de la región de Diquis. Museo Nacional de Costa Rica Primera edición. pp 43-58.
- Quesada, A. (2008). Plantas al servicio de la salud, plantas medicinales de Costa Rica y Centroamérica. Herbario Nacional de Costa Rica. Costa Rica. p24. Recuperado de <http://www.museocostarica.go.cr/descargas/PlantasMedicinales.pdf>.
- Robards, K; Haddad, P; Jackson, P. (2004). Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods. Australia. 2ª Edición. Elsevier. pp 1-20.

- Rosalía, M.; Gruszycki, K.; Lilián, A.; Pérez, T.; Baez, M.; Carrizo, D.; Díaz, A.; Gruszycki, A. (2017) Importancia de la farmacovigilancia en medicina herbaria. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Argentina. 22. (1). pp. 1-10. Recuperado de <http://scielo.sld.cu>.
- Ruiz, J; Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor-Oriente Peruano. Ciencia e Investigación, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú. 12 (1). pp 41-47. Recuperado <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3387/4507>.
- Ruiz, J. (2013). Actividad Antifungica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. p.2. Recuperado de <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2590>
- Saavedra, J; Santos, S; González, F; Hernández, T; Sampelayo, M; Navarro, M. (sf). Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. Sección de Enfermedades. pp.159-175. Recuperado de <http://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/piel.pdf>
- Sasidharan, S; Chen, Y; Saravana, D; Sundram, K; Yoga, L. (2011) Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants Extracts. African Journal of traditional, Complementary and Alternative Medicines. África. 8 (1). pp 1-10
- Skoog, D; Leary, D. (1994). Análisis Instrumental. McGraw-Hill. Madrid, España. p. 704-725.
- Secretaría de salud. (2013) Farmacopea herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos. México Segunda Edición. Publicaciones e impresiones de calidad S.A, pp 112-113
- Sharapin, N. (2000) Fundamentos de tecnología Fitoterapéuticos. CYTED. Colombia. pp 17-38. Recuperado de https://books.google.co.cr/books?id=XH2HzSIJPywC&pg=PA41&dq=percolacion+tecnica&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=percolacion%20tecnica&f=false.

- Somchit, M; Reezal, I.; Elysha,N.; I, Mutalib, A. (2003). In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology*. Malasia.84. pp. 1-4. Recuperado de www.elsevier.com/locate/jethpharm.
- Sosa, R. (2014). *El poder medicinal de las plantas*. Inter-American Division Publishing Association. España. 13ª edición. pp 337-338.
- Suarez,C; Gudiol,F. (2009). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Elsevier Doyma. España; 27. (2). pp 116-129. doi:10.1016/j.eimc.2008.12.001
- Timothy,S;Wazis,C;Adati,R;Maspalma,I. (2012).Antifungal activity of aqueous and etanolic leaf extracts of *Cassia alata* linn. *Journal of Applied Pharm*; 2. (7). pp. 182-185. DOI: 10.7324/JAPS.2012.2728.
- Vargas, T. (2014). *Morfología Bacteriana*.Revista de actualización clínica Investiga. Bolivia. 49.pp2594-2598.Recuperado http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v49/v49_a02.pdf.
- Villanueva, J; Zevallos, L(2017). Cuantificación de polifenoles totales en flor de *Senna reticulata*. Universidad Católica los Ángeles Chimbote.Ciencias de la Salud.Perú. 4 (1) pp 174-180. Recuperado de <http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle>.
- Villaseñor I, Sánchez A. (2009). Cassiaindoline, a New Analgesic and Anti-Infl ammatory Alkaloid from *Cassia alata*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen, pp 335-338. Recuperado de <http://www.znaturforsch.com>.
- Wagner,H.; Bladt,S. (2001). *Plant drug analysis*. Alemania. Segunda edición. Springer. pp 1-54.
- Waksmundzka, M; Sherma, J; Kowalska,T. (2008). *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Taylor and Francis Group. USA. Edición 99. pp 896.

Watson, H. (1991) Evaluación Fitoquímica de las hojas de *Senna alata* y *Cassia fruticosa*. Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Química para optar al grado de Magister Scientiae. Universidad de Costa Rica. p. 19.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00		(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69		(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus
 Sample Description: 0485
 Sample ID: 485-564
 Sample Creation Date/Time: 2017-09-14T15:04:20.439 MB
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D9 (+++)(A)	485-564	Staphylococcus aureus	

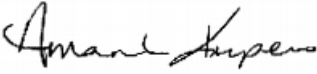
Comments:

N/A



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-564 Reference Number: ATCC® 6538™* Purity: Pure Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2019/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kieshia L Negen Release Date: 2017/9/26
--	--

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative <div style="text-align: center;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



TESTING CERT #2655.01

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00		(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69		(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Candida albicans
 Sample Description: 0443
 Sample ID: 443-806
 Sample Creation Date/Time: 2017-09-19T12:15:09.537 TB
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
H2 (+++)(A)	443-806	Candida albicans	

Comments:

N/A



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Candida albicans Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-806 Reference Number: ATCC® 10231™* Purity: Pure Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2019/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kieshia L. Negen Release Date: 2017/9/26
Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamyospore production: positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small>	
<small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small>	
<small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small>	
<small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small>	
	<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small>
 TESTING CERT #2655.01	<small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small>

Anexo 2. Reporte del CIPRONA para la muestra de *Senna reticulata*(Saragundi)

22 de junio de 2018
CIPRONA-183-2018

Señor
Víctor Arias
Presente

Estimado señor:

A continuación, les informo sobre el resultado del análisis realizado a una muestra de *extracto de Saragundi*, por usted entregada.

Muestra:

Extracto de Saragundi planta fresca macerada, vial transparente, muestra no homogénea.

Técnica de detección utilizada:

- Partición líquido-líquido
- Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

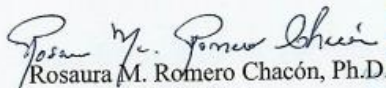
Resultado:

Se detectan los compuestos: *E-11-hexadecenoato de etilo*, *n-pentadecanoato de etilo*, fitol, ácido linolénico, ácido linoleico, estearato de etilo, *nor-hexatriacontano*, alfa y gama tocoferol en los extractos orgánicos obtenidos a partir de la muestra.

Inferencia:

La muestra presenta en las fracciones menos polares, compatibles con GCMS, compuestos comunes presentes en la mayoría de las plantas y reportadas para el Saragundi.

Sin otro particular, se despide,


Rosaura M. Romero Chacón, Ph.D.
DIRECTORA



cc. archivo
Lmq/



Teléfono: 2511-2270 / Página web: <http://www.ciprona.ucr.ac.cr>
Correo electrónico: ciprona@ucr.ac.cr / Dirección: Sede Rodrigo Facio, Ciudad de la Investigación.

Anexo 3. Cromatograma de la muestra de Saragundi.

