

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA APLICADA  
Y TECNOLOGÍA AVANZADA

ÁREA DE ALIMENTOS

**EVALUACIÓN DE EXTRACTOS  
DE LAS HOJAS DE *Gliricidia sepium* (jacq.) EN LA INHIBICIÓN  
DE *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN

TECNOLOGÍA AVANZADA

PRESENTA:

Alumna: Georgina Cobián Portillo.

Director de tesis: Dr. Eduardo San Martín Martínez

MEXICO, D. F. Diciembre de 2007.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F. el día 20 del mes Noviembre del año 2007, el (la) que suscribe Ing. Georgina Cobián Portillo alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro A050180, adscrito a CICATA LEGARIA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Eduardo San Martín Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación de extractos de las hojas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) en la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*., al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección gecobian@ipn.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Ing. Georgina Cobián Portillo

Nombre y firma



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México siendo las 11:00 horas del día 23 del mes de Octubre del 2007 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis de titulada:

**Evaluación de extractos de las hojas de *Gliricidia sepium* (Jacq.) en la inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.**

Presentada por el alumno:

Cobián Portillo Georgina  
Apellido paterno materno nombre(s)  
Con registro: 

A	0	5	0	1	8	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: Maestro en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director de tesis

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dr. José Luis Fernández Muñoz

M. en C. Alejandra Torres Ariño

Dr. Teodoro Rivera Montalvo

Dr. Ramón Arana Errasquín

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA  
APLICADA Y TECNOLOGIA AVANZADA  
Dr. José Antonio I. Díaz

## ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 1 ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
1.1. <i>Gliricidia sepium</i> .....	4
1.1.1. Generalidades.....	4
1.1.2. Composición.....	6
1.1.3. Usos de la planta.....	7
1.2. Microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales.....	8
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
1.2.2. <i>Candida albicans</i> .....	13
<b>CAPITULO 2 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>CAPITULO 3 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPITULO 4 MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>18</b>
4.1. Materiales.....	18
4.1.1. Materias primas.....	18
4.1.2. Cepas.....	20
4.1.3. Equipo.....	20
4.1.4. Medios de cultivo.....	20
4.1.5. Antibióticos.....	21
4.2. Métodos.....	21
4.2.1. Análisis proximal.....	21
4.2.2. Obtención de extractos Orgánicos Totales.....	21
4.2.3. Primera extracción.....	21
4.2.4. Segunda extracción.....	22
4.2.5. Ensayo antimicrobiano por turbidez.....	26
4.2.6. Cinética de crecimiento.....	26
4.2.7. Elección del control positivo.....	26
4.2.8. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria.....	28
<b>CAPITULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	
5.1. Análisis proximal.....	29
5.2. Extracción.....	30
5.3. Cinéticas.....	
5.4. Elección del control positivo.....	35
5.5. Concentración mínima inhibitoria.....	35
<b>CAPITULO 6 CONCLUSIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1.	Árboles de <i>Gliricidia sepium</i> .....	12
Figura 2.	Flores y frutos de <i>Gliricidia sepium</i> .....	12
Figura 3.	Distribución Natural de <i>Gliricidia sepium</i> en América.....	13
Figura 4.	Microfotografía de SEM de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
Figura 5.	<i>Candida albicans</i> .....	21
Figura 6.	Desarrollo de <i>Candida albicans</i> en un tejido.....	21
Figura 7.	Recolección de hojas de <i>Gliricidia sepium</i> .....	26
Figura 8.	Secado de las hojas de <i>Gliricidia sepium</i> .....	26
Figura 9.	Extracción, de la parte lipídica de las hojas de <i>Gliricidia sepium</i> empleando el método de Soxhlet.....	29
Figura 10.	Diagrama de obtención de extractos de las hojas de <i>Gliricidia sepium</i> .....	30
Figura 11.	Diagrama de flujo de la cinética de crecimiento.....	34
Figura 13.	Espectros de UV-Vis de extractos de <i>Gliricidia sepium</i> cuando extraído inicialmente con Hexano.....	38
Figura 14.	Espectro de UV-Vis Extracto con cloruro de metileno.....	39
Figura 15.	Espectro de UV Extracto acetonolico 70:30.....	40
Figura 16.	Cinética de crecimiento de <i>Candida albicans</i> a 30°C.....	41
Figura 17.	Concentración de cepas de <i>Candida albicans</i> (UFC/ml) formadas en función del tiempo (h).....	41
Figura 18.	Relación de la concentración de cepas de <i>Candida albicans</i> (UFC/ml) con la absorbancia (u.a.).....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1.	Porcentaje de cepas resistentes de microorganismos aisladas de hospitales.....	18
Tabla 2	Descripción de las cepas empleadas.....	27
Tabla 3.	Concentraciones de extractos a probar junto con los controles positivos y negativos.....	35
Tabla 4.	Diluciones de los extractos de <i>Gliricidia sepium</i> para determinar el valor de CIM.....	36
Tabla 5.	Composición proximal de hojas de <i>gliricidia sepium</i> .....	37
Tabla 6	Rendimientos de las extracciones.....	38
Tabla 7.	Elección del antibiótico empleado como control positivo para <i>Candida albicans</i> .....	43
Tabla 8.	Concentración mínima inhibitoria del extracto 1 .....	45
Tabla 9.-	Concentración mínima inhibitoria del extracto 2.....	45
Tabla 10.	Concentración mínima inhibitoria del extracto 3.....	46
Tabla 11.	Concentración mínima inhibitoria del extracto 4.....	47
Tabla 12	Concentración mínima inhibitoria del extracto 5.....	47

## Resumen

Muchas plantas o sus componentes son usados en medicina tradicional en muchas partes del mundo para curar enfermedades infecciosas, en áreas tropicales existe una mayor diversidad de especies vegetales a las cuales se les atribuye características o propiedades que fueron valoradas por la medicina tradicional y que se están aplicando en enfermedades como la diabetes, hipertensión hipotensión, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades infecciosas.

En la actualidad existen un sin números de microorganismos que se han vuelto resistentes esto representa un grave problema de salud, el cual consiste en que las bacterias crean mecanismos de defensa, frente a los antibióticos, con la consiguiente perdida de acción de estos medicamentos. El uso y el abuso indiscriminado de antibióticos, es lo que ha facilitado para que las bacterias produzcan estos mecanismos de resistencia.

Como materia prima de esta investigación, se utilizó las hojas del árbol ***Gliricidia sepium* (Jacq,) Kunt ex Walp. (1842)** de la familia Botánica de las Fabaceae. La cual después de seca a la sombra fue molida para realizar las extracciones con solventes que varían su polaridad hexano, cloruro de metileno, etanol-agua, y metanol. Los resultados de composición proximal indican que las hojas de *Gliricidia Sepium* presenta un alto contenido de proteínas y el resultado esta de acuerdo a lo reportado por otros autores. Los espectros de UV Vis de los extractos identificaron adecuadamente las separaciones de los compuestos obtenidos por los diferentes solventes.

Los análisis de inhibición en el desarrollo de *Candida albicans* con los diferentes extractos indican que ningún extracto de *Gliricidia sepium* tienen efecto sobre su desarrollo. Las fracciones extraídas con cloruro de metileno y etanol-agua cuando separadas la fracción de clorofila a través de la disolución con hexano, presentan una mayor inhibición en el desarrollo de *Staphylococcus aureus*. La concentración mínima inhibitoria de la fracción extraída a través de metanol y luego separada la clorofila con hexano, que afecto el desarrollo de *Staphylococcus aureus* fue de 80mg/ml, otros estudios indicaron valores muy proximos (64mg/ml).

## **Abstract**

Many plants or their components are used in traditional medicine in many parts of the world to cure infectious diseases in tropical areas there is a greater diversity of plant species to which they are attached characteristics or properties that were valued by traditional medicine and being implemented in diseases like diabetes, hypertension, hypotension, cardiovascular diseases and other infectious diseases.

There are currently without a number of microorganisms that have become resistant this represents a serious health problem, which is that the bacteria create defense mechanisms, as opposed to antibiotics, with the consequent loss of action of these drugs. The indiscriminate use and abuse of antibiotics, is what has facilitated so that the bacteria produce these mechanisms of resistance.

As raw material of this research, we used the leaves of the tree *Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunt former Walp. (1842) of the family Fabaceae of Botany. The leaves after dry in the shade was ground to make extractions with solvents varying polarity as hexane, methylene chloride, etanol-agua and methanol. The results indicate that proximate composition of the leaves of *Gliricidia sepium* has high protein content and the result of this agreement as reported by other authors. The UV-Vis spectra of the extracts properly identified separations of compounds obtained by the different solvents.

The analysis of inhibition in the development of *Candida albicans* with different extracts suggests that any extract *Gliricidia sepium* have an effect on their development. The fractions extracted with methylene chloride and etanol-agua when separated fraction of the chlorophyll through the breakup with hexane have an increased inhibition in the development of *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory concentration of the fraction extracted via methanol and then separated chlorophyll with hexane, which affect the development of *Staphylococcus aureus* was 80mg/ml, other studies indicated values very next (64mg/ml).

## INTRODUCCIÓN

---

En el trópico los árboles leguminosos han jugado un papel importante al proveer sombra a las plantaciones de café, como barreras vivas para la protección de los cultivos y algunas veces para delimitar las propiedades agrícolas, como combustible y mas recientemente ha sido usado en la nutrición animal, debido a que en estas plantas recircula a través de su metabolismo cantidades elevadas de nitrógeno, que luego son sintetizados en proteínas.

Muchas plantas o sus componentes son usados en medicina tradicional en muchas partes del mundo para curar enfermedades infecciosas, en áreas tropicales existe una mayor diversidad de especies vegetales a las cuales se les atribuye características o propiedades que fueron valoradas por la medicina tradicional y que se están aplicando en enfermedades como la diabetes, hipertensión hipotensión, enfermedades cardiovasculares y otras enfermedades infecciosas internas como externas generadas por microorganismos patógenos, como infecciones en el trato urinario, bronquitis ,diarrea, abscesos cutáneos, y enfermedades provocadas por parásitos.

Por otro lado los antibióticos tienen dramáticamente reducido la incidencia de muchas enfermedades infecciosas. No obstante muchos problemas se mantienen sin resolver debido a serios efectos colaterales ocasionales y el surgimiento de bacterias mutadas resistentes a antibióticos, por ejemplo el *Stafilococos aureus* resistente a metilina (SARM) es una de las principales especies de bacteria que causa infecciones nosocomiales en hospitales en todo el mundo (Yasunaka y kono, 1999; Takeda et al, 2000). En recientes años la emergencia de SARM a iniciado una serie de problemas debido a su resistencia contra numerosos antibióticos. Sin embargo muchos estudios en actividad antimicrobiana con plantas medicinales han sido realizados durante los últimos 30 años (Khan et al, 1980; Samy et al 1998; Essawi and Srour, 2000). Un gran numero de plantas todavía no han sido estudiadas y se tienen algunas investigaciones científicas que buscan confirmar y evidenciar las propiedades medicinales y antimicrobianas de algunas plantas. Este estudio a través de pruebas *in vitro* se evalúa las propiedades antimicrobianas de la

*Gliricidia sepium* contra dos microorganismos patógenos que causan enfermedades infecciosas mas comunes como el *Stafilococcus aureus* y *Candida alvicans*.

## CAPITULO I ANTECEDENTES

---

Las plantas son laboratorios naturales en donde se biosintetizan una gran cantidad de sustancias químicas y de hecho se les considera como la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Las plantas presentan dentro de su proceso de síntesis dos rutas metabólicas, una donde sintetizan los metabolitos primarios que son los necesarios para el desarrollo de la propia planta como ser proteínas, lípidos, carbohidratos y algunos micro nutrientes es decir de presencia universal en todas las especies vegetales; en la segunda ruta metabólica sintetizan en específico un metabolito secundario que en función de su genética sintetiza específicamente este metabolito en mayor proporción que los demás componentes. Entre estos metabolitos secundarios son comunes aquellos que presentan alguna actividad biológica, tales como, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, glucosinolatos, quinonas, taninos, alcaloides y terpenoides. Existe gran variación en cuanto a la concentración de metabolitos secundarios en las diferentes partes de las plantas, no teniendo un patrón de máxima producción, ni órganos especiales de almacenaje, sin embargo lo común es que las mayores concentraciones de este tipo de compuestos se encuentren en flores y semillas (Arguayo, 2002).

En la actualidad existe un enorme interés en el estudio de plantas medicinales, ya sea empleándolas como materia prima para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras. Estas sustancias o extractos purificados son importantes ya que permiten ser caracterizados analíticamente, para verificar que cumplan de manera eficaz los requisitos de calidad, efectividad y seguridad, exigidos a cualquier medicamento moderno, sea de origen natural o sintético (Machado et al, 2000).

Las plantas superiores producen cientos de diversos metabolitos secundarios, con diferentes actividades biológicas e importancia ecológica. Pueden ser aplicados a las plantas contra insectos, animales superiores y

microorganismos; los compuestos antimicrobianos producidos por las plantas pueden ser activos contra microorganismos patógenos. Existen varios reportes publicados sobre actividad antimicrobiana de extractos crudos de plantas y de ensayos biodirigidos para obtener los principios activos; se estima que existen alrededor de 2.5 millones de especies de plantas superiores y que la mayoría no ha sido analizada para determinar su posible actividad farmacológica (Darah et al., 2006).

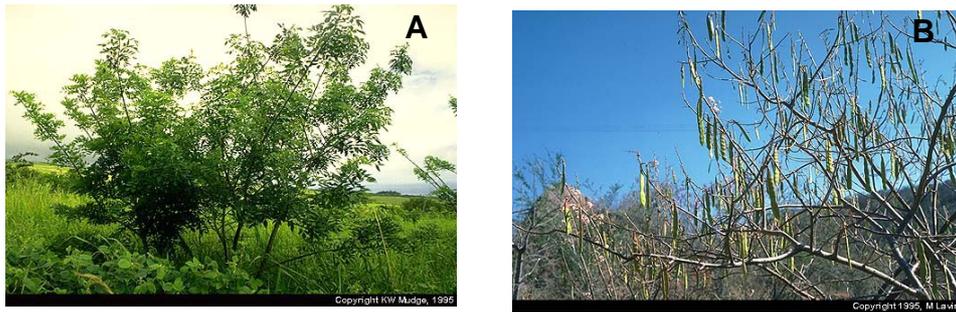
Existen un gran número de familias dentro del reino vegetal, una de las más extensas es la familia de las *Leguminosae*. Guetterenridge y Shehelton (1994), señalaron esta, como el tercer grupo de plantas con flor, con más de 18,000 especies en 650 géneros, además estas plantas tienen una amplia versatilidad.

Las leguminosas tropicales son consideradas de gran importancia, debido a su amplia composición química, principalmente por contener un alto porcentaje de proteína, haciéndolas atractivas como fuente de alimento suplementario para rumiantes, en áreas tropicales (Palma, 1993; Chongo y Galindo, 1995; Febles et al, 1996). Entre las diferentes especies de leguminosa, *Gliricidia sepium* es considerada como la segunda especie multipropósitos mas importante en el trópico, después de *Leucaena leucocephala* (Reveron et al, 1986; Simosns y Stewart, 1994)

## **1.1. *Gliricidia sepium***

### **1.1.1. Generalidades**

La especie vegetal ***Gliricidia sepium* (Jacq.) Kunth ex Walp** (1842) es un árbol caducifolio (Figura 1A) con una altura de hasta 12 m, tiene copas irregulares con una amplia cobertura de follaje (Figura 1B). Estos árboles pierden sus hojas en la época de floración que ocurre entre los meses de febrero y marzo (Batis et al, 1999; Pennington et al, 1998).



**Fig. 1 Árboles de *Gliricidia sepium* A) con follaje B) sin follaje.**

Las flores son pediculadas, de color rosa púrpura, se agrupan en racimos densos tienen una longitud aproximada de 10 a 20 cm, se sitúan en las axilas de las hojas caídas (Figura 2B). Los frutos (Figura 2A) que presenta son vainas lineales dehiscentes de color verde claro cuando están en desarrollo y de color pardo oscuros cuando maduran (Chandhokar, 1982).



**Fig. 2 Los árboles de *Gliricidia sepium* florecen y producen frutos una vez al año  
A) Frutos B) Flores**

Esta especie vegetal pertenece a la familia de las leguminosas, nativa de Meso América, Centroamérica y del norte de Sudamérica (Batis *et al*, 1999). Se encuentra ampliamente distribuida en México y muchas partes del mundo como se ilustra en la Figura 3. La podemos encontrar en Tamaulipas, San Luís Potosí, norte de Puebla, Veracruz, Quintana Roo, Campeche, en la península de Yucatán, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Oaxaca, Chiapas, en la vertiente del Pacífico ((Batis *et al*, 1999; Niembro, A., 1986). Esta planta se ha propagado en distintas partes del mundo, entre ellas África occidental, las Antillas, el sur de Asia (Barrett, 1956; Blohm, 1962; Little y Wadsworth, 1964), y tiene una gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones agroecológicas (Araqué *et al*, 2006; Escobar *et al*, 1995).

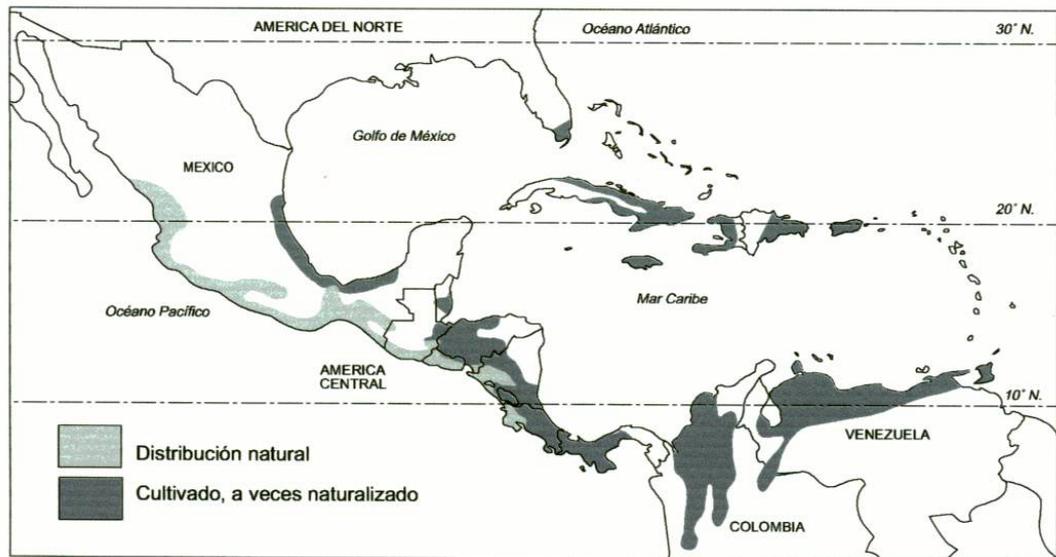


Figura 2.—Distribución natural e introducida del madre de cacao, *Gliricidia sepium*, en la América tropical.

**Figura 3 Distribución natural e introducida de *Gliricidia sepium*, en América tropical-**

Esta planta es muy popular en México algunos de los nombres comunes como se identifica la *Gliricidia sepium* son: Cacahuanano– Republica mexicana; Cocuite, Chante, Mata ratón, Yaité– Chiapas; Cocomuite, Cocuitle, Muitle-Veracruz; Cuchunuc (lengua zoque)-Veracruz; Frijolillo-México; Gueniiza, Yaga-le (legua zapoteca –Oaxaca; Muitle, mata rata-Guerrero; Flor de San José, Palo de corral –San Luis Potosí (Batis *et al*, 1999).

### 2.1.2 Composición

Diversos investigadores (Smith y Van Houtert, 1987; Kass, 1992; Clavero *et al*, 1997) le han atribuido al follaje de *G. sepium* ser una fuente importante de nitrógeno (Topps, 1992), con un alto contenido de nitrógeno proteico (Luca *et al*, 1999; Whetton *et al*, 1997), aunque la concentración de este disminuye en función de la edad de la planta (Araque *et al*, 2006). Esta planta contiene un alto porcentaje de fibra fácilmente degradable en ensayos realizados in vivo con rumiantes (Abdulrazak *et al*, 1996)

Las hojas son de fácil digestión comparadas con otras plantas leguminosas tropicales (Glover, 1989). Dentro de su composición encontramos compuestos químicos como pinitol (Calle *et al*, 1987), también estudios previos han

identificado familias de compuestos como; cumarinas, hidrocarburos y flavonoides glucosídicos (Herat et al., 1986).

### **2.1.3. Usos de la planta**

Es una especie considerada como multipropósitos por la variedad de usos que posee, entre los que se encuentran cercas vivas, protectores de suelo, leña además de proporcionar sombra a los cultivos de café, te, cacao y muchos otros cultivos.

Se ha reportado como una planta empleada para restaurar la fertilidad de suelos debido a la producción de materia orgánica, además de tener la capacidad de captar nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis y trasformarlo en nitrógeno mineral (Mercadet y Ptron 1992). Mejora el drenaje, disminuye la erosión ya que conserva la humedad en climas secos, se emplea como abono verde proveniente de la hojarasca, lo que aumenta al humus, proporciona mejor aireación al subsuelo-(Salazar, 1991)

En las costas de México y regiones tropicales de Sudamérica y Asia se utiliza como forraje en la alimentación animal debido a que las hojas tienen un alto contenido de proteínas (Bennison y Paterson, 1993). Estudios anteriores, realizaron una evaluación fitoquímica de tres árboles forrajeros en donde las hojas de *Gliricidia sepium* resultaron ser el mejor forraje en dietas tropicales, por que presenta los compuestos nutricionales mas altos, una buena tasa de degradabilidad y los principios tóxicos mas bajos comparado con las otras especies estudiada (Walter *et al.*, 1989). También contiene un alto contenido de proteínas y carbohidratos degradables por lo que se usa como alimento o suplemento alimenticio para animales (Glover, 1989; Whetton et al, 1997).

*La Gliricidia sepium* no solo es empleada como una buena opción en la suplemento alimenticio del ganado por su alto valor nutricional, muchas plantas producen ciertos metabolitos secundarios, entre ellos los polifenoles, que ejercen un efecto en las paredes celulares de los protozoarios, produciendo lisis celular, disminuyendo la población, esto es mantienen el equilibrio

adecuado entre los protozoarios y los microorganismos celulolíticos (Flint, 1997).

Se ha reportado diferentes usos de esta planta por algunas propiedades medicinales que esta tiene. Las hojas se utilizan como emplastos y como remedio para erupciones y erisipelas (Niembro, 1986). Se ha reportado también actividad insecticida de esta planta, tienen la capacidad de proteger plantaciones de te en Sri Lanka contra la peste del te. Las propiedades de la *G. sepium* son atribuidas también al corazón del tronco y algunos extractos orgánicos, exhibiendo atracción olfativa y alta toxicidad hacia la termita *Glyptotermes dilatatus* la cual es la responsable del mayor daño en las plantaciones del te. Si embargo la mayoría de las investigaciones químicas previas en *G. sepium* se ah dirigido al aislamiento del potencial alelofatico y componentes tóxicos del corazón del tronco. Estas investigaciones han obtenido el aislamiento de flavonas, isoflavonas y pterocarpanos (Jurd and Manner, 1977; Manner and Jurd, 1979 y Herat et al, 1998).

Las saponinas triterpenoides están dispersados en plantas leguminosas (Miyan et al 1996), muy pocos trabajos fueron realizados en el contenido de tripoertenoides en *G. sepium*.

En la medicina tradicional los extractos de *G. sepium* son usados para reducir la fiebre en niños y adultos, empleados en el tratamiento de infecciones producidas por diversos microorganismos *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Neisseria gonorrhoeae* (Gupta, 1995).

Existen algunas investigaciones de extractos de *Gliricidia sepium* donde se evalúa capacidad inhibitoria en el desarrollo microbiano y para combatir al *Tripanosoma cruzi* (Berger et al, 1998). También se han realizado investigaciones para comprobar la actividad antifúngica (Caceres et al, 1991).

### **2.2. 1. Microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales**

La propagación de cepas patógenas resistentes a fármacos, es uno de los más serios problemas a resolver para el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos. Durante varias décadas los extractos de plantas han sido de

gran interés debido a que son una gran fuente de metabolitos que poseen actividades aun desconocidas, por lo cual se han realizado análisis para conocer sus potenciales usos como remedios alternativos o para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas (Prabuseenivasan et al., 2006). El uso de los antibióticos se considera el factor más importante en la promoción de la resistencia de los microorganismos. Es decir que el camino para prevenir la resistencia a antibióticos de especies patogénicas es usando nuevos compuestos que no están basados en agentes antimicrobianos sintéticos existentes (Shah, 2005). Los curanderos que usan plantas tradicionales indican que algunas plantas medicinales tales como la *bixa spp.* y *biden spp* son mas eficientes para tratar enfermedades infecciosas que los antibióticos sintéticos, por lo que es necesario evaluar con base científica el potencial uso de la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por patógenos comunes. Las plantas medicinales pueden representar un tratamiento alternativo en casos no severos de enfermedades infecciosas. Ellas también pueden ser una fuente posible para nuevos antibióticos potentes a líneas de microorganismos patógenos no resistentes a antibióticos (Rojas et al 2006)

Actualmente en nuestro país se han observado que existe una resistencia bacteriana de algunos microorganismos a ciertos antibióticos El problema es grave, porque infecciones, que antes eran sensibles o susceptibles a ciertos antibióticos, en la actualidad son producidas por microorganismos resistentes, las cuales mediante mecanismos genéticos transmiten genes de resistencia de una bacteria a otra, frente a los antibióticos, lo que lo imposibilita a realizar su efecto bactericida.

El Consorcio Internacional de Control de Infecciones nosocomiales (INICC), entre los cuales se encuentra México miden la incidencia de infecciones hospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) y se comparan con tasas de INICC. El estudio prospectivo realizado en 2004 sobre la vigilancia de infecciones hospitalarias durante nueve meses en cuatro UCI de México. Utilizando 1184 pacientes, 6707 días de cama, 6950 días de catéter vascular central, 2692 días de respirador mecánico, y 3593 días de catéter urinario. La tasa total de infección hospitalaria

fue de 30.82% y 54.42 por 1000 días del paciente. El lugar de infección más común fue la neumonía asociada a respirador (46.57%), e infección del torrente sanguíneo (ITS) asociada con catéter vascular central (CVC) (39.45%), seguida por infección del tracto urinario asociada con sonda vesical (SV) (13.97%). La tasa de neumonía asociada a respirador mecánico (RM) fue de 29.34 por 1000 días de RM. La tasa de infección del torrente sanguíneo asociada a catéter vascular central fue de 20.71 por 1000 días de CVC. La tasa de infección del tracto urinario sintomática asociada con sonda vesical fue de 7.79 por 1000 días de SV. En resumen cuando se compara con tasas de INICC encontramos nuestra tasa de neumonía 3 veces por sobre la tasa de INICC, la tasa de ITS 5 veces por sobre la tasa de INICC, y nuestra tasa de infección del tracto urinario 2 veces por sobre la tasa de INICC. Los resultados indican que es necesario intervenir en los UCI de México para reducir las infecciones hospitalarias, especialmente la ITS asociada con CVC (Castañon et al. 2004).

En la tabla 1 se presenta un estudio sobre los microorganismos que están afectando mas y adquiriendo resistencia a antibióticos, entre ellos destacamos el *Stafilococcus aureus* que tiene resistencia a determinados antibióticos encontrados tanto en los nosocomios como en la comunidad cuando se aplica un cierto antibiótico, quedando solo la Norfloxacin como único antibiótico donde no sobrevive ninguna cepa. Para la E. Coli se tiene todavía varios antibióticos que pueden matar las cepas teniendo solo algunos donde sobreviven como la Amikacina, Cefotaxima y Norfloxacin. Así otros microorganismos también han desarrollado cierta resistencia a antibióticos como indicado en la Tabla 1 (RHOVE, 1998-2003).

**Tabla 1. Porcentaje de resistencia cepas de microorganismos aisladas de hospitales**

GERMEN	TOTAL	Amikacina			Dicloxacilina			Gentamicina			Cefotaxima			Imipenem			Vancomicina			Norfloxacin		
		T	N	C	T	N	C	T	N	C	T	N	C	T	N	C	T	N	C	T	N	C
SCN	206	55	50	5	42	53	7	6	4	2	2	1	1				2	2	0			
<i>K. pneumone</i>	115	48	47	1	1	1	0	1	1	0	10	7	3							1	1	0
<b>S. aureus</b>	<b>75</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>			
<i>E. coli</i>	46	4	4	0							4	4	0							6	5	1
<i>E. cloacae</i>	42	4	4	0							5	5	0									
<i>Klebs oxll</i>	40	14	11	3				4	4	0			0							2	2	0
<i>Pseudom</i>	34	12	12	0	10	9	1				1	1		2	2	0				5	5	0
<i>E. auregen</i>	18	2	2	0							4	4	0									
<i>S. malthop</i>	9	5	5	0							1	1	0							5	5	0
<i>E. pneum</i>	16	2	1	1				1	1	0			0									
<i>St homynl</i>	15	2	2	0	2	2	0															
<i>S. hemolitic</i>	5	2	2	0	1	1	0															
Total		155	148	7	58	49	9	15	12	3	28	24	4	3	3	0	3	3	0	19	18	1
Proporción %		19.3	18.5	.8	7.2	6.1	1.1	.02	1.5	.03	3.5	3	.5	.3	.3	0	.3	.3	0	2.3	2.2	.1

T: Total por grupo    N: Nosocomial    C: Comunitario

### ***Staphylococcus aureus***

Es una bacteria que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas, que causa gran variedad de infecciones, desde infecciones menores de la piel (forúnculos, ampollas, vejigas) y abscesos cutáneos hasta enfermedades que pueden poner en peligro la vida como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock toxico (SST) y sepsis.

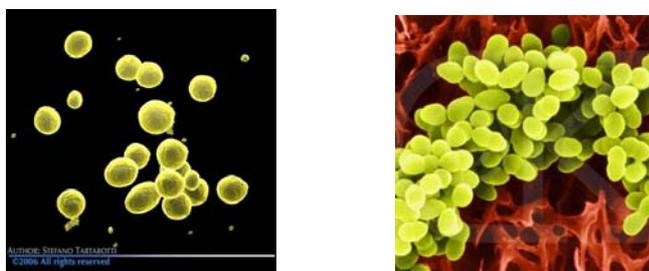


Figura 4. Microfotografía de SEM de Staphylococcus Aureos

Es un coco que crece agrupado en racimos como se muestra en la figura 4 (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera

con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10% en sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar. Produce la fermentación láctica. Es catalasa positivo y coagulasa positivo.

**Patogénesis.** El *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. Ocasionando infección de piel y partes blandas. Neumonía. Sepsis con o sin metástasis (osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados). Enfermedades por toxinas (síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis).

Para tratar las infecciones provocadas por *S. aureus*, se emplea Penicilina 4<sup>a</sup> Generación (Meticilina), siempre que este microorganismo no sea resistente al antibiótico (SARM *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina). Los microorganismos resistentes a Meticilina son muy peligrosos ya que provocan multitud de infecciones nosocomiales (contraídas en el hospital) y son multiresistentes a gran cantidad de antibióticos (además del indicado); se ha visto que estos microorganismos pueden ser ahora sensibles a la penicilina G. Han provocado un gran problema en los países desarrollados, siendo estos patógenos portada de periódicos en Reino Unido o Estados Unidos.

Para no tener problemas con este microorganismo es necesario evitar la contaminación cruzada en la elaboración de alimentos, almacenarlos a altas o bajas temperaturas para evitar o restringir su crecimiento y cocinar los alimentos. *S. aureus*: es un agente corriente de las infecciones patógenas y de las toxiinfecciones alimentarias. Los estafilococos se diseminan por las actividades domésticas y comunitarias tales como hacer cama, vestirse o desvestirse.

Estudios realizados por Rojas et al, (2006) con extractos con plantas medicinales observo que el extracto acuoso de *P. Pulchrum* mostró actividad contra *S. Aureus*. Pero los extractos acuoetanolicos de plantas medicinales tienen un mayor grado de actividad antimicrobiana cuando comparado con los

extractos en agua y hexano. La presencia de esteroides y antocianinas de *Bixia orellana* (semilla) puede ser responsable de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. cereus* y *E. Coli*. Similarmente la presencia de esteroides y aminoácidos en *C. peltata* puede corresponder a su alta actividad antimicrobianas mostrada contra *E. coli*, *B. Pilosa* pero presenta menor actividad contra *S. aureus* y *B. Cereus*. Aunque algunos estudios establecieron que los extractos metanolicos de esta planta tienen alta actividad contra *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. Subtilis* (Rabe y Van, 1997).

### ***Candida albicans***

*Candida albicans* es un hongo dimórfico que existe en los organismos de sangre caliente, incluyendo el hombre. Este organismo coloniza las superficies mucosas de las cavidades mucosas oral, vaginal y el tracto digestivo y es causante de una gran variedad de infecciones dependiendo de la naturaleza del organismo huésped. La candiditis es la infección mas común la cual se divide en superficial y profunda (miocarditis, septicemia) siendo considerada como un problema clínico grave; en los últimos años este microorganismo se ha vuelto inmune a los fármacos que la inhibían, por lo que las infecciones generadas han incrementado dramáticamente en las últimas dos décadas (Molero, 1998).

Existen ciertos hongos que no son patógenos para personas sanas, pero pueden serlo en personas que están afectadas de diferentes enfermedades (linfomas malignos, diabetes grave) y a las que han sido intensamente tratadas con medicamentos antibacterianos de amplio espectro o sometidas a tratamientos inmunosupresores; en este grupo se encuentran la mayor parte de las especies de *Candida*

Dentro de las micosis, las producidas por levaduras del género *Candida* son las de más frecuente presentación contando con un gran número de formas clínicas dividiéndose en sistémicas y superficiales (Rueda, 2002).

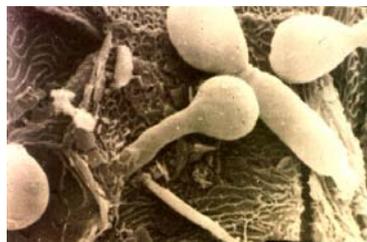
Con el término candidiasis se nombran numerosas infecciones provocadas por levaduras del género *Candida*. Dentro de este, *C. albicans* es el agente etiológico de mayor importancia en este tipo de patologías.



**Figura 5.- Candida albicans A) en forma de levadura, B) en su fase miclear**

Al microscopio se observa como células redondeadas, ovas (3-7  $\mu\text{m}$  de diámetro) o gemantes las cuales quedan unidas para formar pseudomicelios o se alargan para formar micelio (Macola, 2001). La especie *Candida albicans*, dentro del género, produce tubos germinativos. En agar Sabouraud crecen formando colonias blancas, blandas, cremosas, lisas (Macola, 2001).

**Patogénesis.** *C. albicans* se hallan con frecuencia en las mucosas normales de la boca, vagina y tubo digestivo. Cuando se hacen invasoras pueden producir diferentes tipos de lesiones agudas o crónicas.



**Figura 6.- Desarrollo de candida albicans en un tejido**

Los tres efectos patogénicos de los hongos que le dan importancia médica son: micotoxicosis, enfermedades de hipersensibilidad y la colonización de los tejidos, como observado en la figura 6. Murray *et al*, (2002) refieren esta última

como la forma principal por la cual las levaduras del género *Candida* provocan su acción patógena en el hombre y los animales.

La adherencia de *C. albicans* es el primer paso en la colonización e invasión de los tejidos mucocutáneos, la cual es probablemente mediada por la interacción de las glucoproteínas de superficie de la levadura con la célula epitelial del hospedero. Luego se produce la aparición de tubos germinativos, micelio o pseudomicelio (según la especie), los cuales penetran directamente en la célula epitelial. La adherencia continúa con la producción de enzimas hidrofílicas como proteinasas, fosfatasas, y fosfolipasas. Una vez dentro de la célula epitelial los hongos proliferan. Generalmente las especies de *Candida* que no se adhieren son no patógenas (McGinnis & Tilton, 1994).

Estudios realizados por Rojas et al, (2006) con extractos de plantas ha demostrado que los extractos acuoetanolicos de *J. Secunda*, *P. Pulchrum* y *P. paniculata* fueron los mas activos contra *C. albicans*. *J. secunda* y *P. pulchrum* presento similar concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *C. albicans* (0.5 y 0.6 ug /ml respectivamente) comparado con la nistatina (0.6 ug/ml). Sin embargo estas dos plantas presentan una menor CMI contra *E. coli* (0.6 ug/ml) que sulfato de gentamicina (0.9 ug/ml).

### CAPITULO III JUSTIFICACIÓN

---

En la actualidad existen un sin números de microorganismos que se han vuelto resistentes esto representa un grave problema de salud, el cual consiste en que las bacterias crean mecanismos de defensa, frente a los antibióticos, con la consiguiente perdida de acción de estos medicamentos. El uso y el abuso indiscriminado de antibióticos, es lo que ha facilitado para que las bacterias produzcan estos mecanismos de resistencia.

Dentro los principales microorganismos asociados con los índices de morbilidad y mortalidad en infecciones nosocomiales, se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (RHOVE 1998-2003).

Las plantas medicinales podrían representar un tratamiento alternativo en caso de enfermedades contagiosas. Ellas pueden ser también una fuente para nuevos antibióticos a los cuales los microorganismos no sean resistentes. Los extractos de plantas medicinales por lo general no presentan efectos colaterales por lo que su uso es mas tolerado, esto debido a que la concentración de compuesto activo no esta en los niveles de los medicamentos alópatas.

Existe la necesidad de realizar investigaciones para buscar alternativas de nuevos antibióticos y antimicóticos que nos permitan solucionar este problema, por lo que el estudio de extractos de plantas medicinales como la *Gliricidia sepium* podría ser útil alguno de los extractos dependiendo del solvente usado en la extracción.

La aplicación de los extractos de *Gliricidia sepium* según la polaridad del extracto, tendría que ser estudiado en cuanto a su concentración y dosis a ser administrada por lo que se justifica el estudio de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

## CAPITULO IV OBJETIVOS

---

### **Objetivo general:**

Evaluar extractos de hojas de *gliricidia sepium* en la inhibición del desarrollo de *S. aureus* y *Candida albicans*

### **Objetivos específicos:**

Realizar el análisis proximal de la planta (cenizas, lípidos, nitrógeno total)

Realizar extracciones con disolventes de diferente polaridad (cloruro de metileno, agua:etanol 70:30, metanol y hexano).

Determinar la actividad biológica de los extractos orgánicos de *Gliricidia sepium* en la inhibición de *S. aureus* y *Candida albicans*

Caracterizar por espectroscopia y cromatografía de columna el extracto biológicamente activo.

## CAPITULO V MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 5.1. MATERIALES

#### 5.1.1 Materia prima

Como materia prima de esta investigación, se utilizó las hojas del árbol ***Glicicidia sepium* (Jacq.) Kunt ex Walp. (1842)** de la familia Botánica de las Fabaceae. La identificación taxonómica fue realizada por el Ing. Gabriel Ruvalcaba Gómez, Jefe del jardín botánico de la Universidad del Mar. Unidad Puerto Angel.

**Área de Estudio.** Desde los límites con el Estado de Guerrero, hasta Salina Cruz la costa oaxaqueña pertenece a la provincia fisiográfica conocida como Zona Montañosa de la Costa del Suroeste (Álvarez, 1962).

En el área de estudio el clima es tropical lluvioso con lluvias en verano. La temperatura en todos los meses es superior a 18°C y la precipitación anual media fluctúa entre 1000 y 2000 mm.

**Descripción del Sitio de Colecta.** Las hojas objeto de estudio del presente trabajo, se encontraron en las Costas del estado de Oaxaca. El sitio de colecta se encuentra ubicado entre las localidades de Zipolite y Puerto Ángel pertenecientes al Municipio de San Pedro Pochutla.

**Colección del material vegetal.** Las hojas del árbol de *Glicicidia sepium*, se colectó el 2 de marzo del 2006. Las coordenadas del lugar fueron 16° 47' de latitud norte y 96° 28' de longitud oeste a una altura de 150 m.

La recolección se realizo manualmente, se cortaron hojas de diferentes alturas de los árboles seleccionados.

Las hojas se guardaron en bolsas de polietileno e inmediatamente se almacenaron en cajas térmicas y se transportaron al Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Instituto de Industrias de la Universidad del Mar, unidad Puerto Ángel.



**Figura. 7** Recolección de hojas de *Gliricidia sepium*

**Almacenamiento del material vegetal.** Las hojas recolectadas se limpiaron de todo material extraño con agua destilada y se colocaron en bandejas de malla para su secado a temperatura ambiente, bajo la sombra como se muestra en la figura 5a y 5b. Las hojas ya secas se guardaron en bolsas de polietileno. Una vez que se etiquetaron las muestras se procedió a transportarlas al Laboratorio de Investigación de Apoyo Analítico del CICATA-IPN para proceder a su análisis.

Una muestra de las hojas se preservó en una bolsa con ventilación para su identificación y referencia.



**Figura 8.** Secado de las hojas de *Gliricidia sepium*

### 5.1.2. Cepas bacterianas, de mohos y levaduras.

Para llevar a cabo la valoración antimicrobiana en este trabajo, se emplearon las cepas patógenas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* fueron donadas por laboratorio de microalgas de la Universidad de Mar Unid Puerto Ángel y por el cepario del laboratorio de microbiología de Escuela de Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (Tabla 2).

Microorganismo	Fecha	Procedencia	Observaciones
<i>Staphylococcus aureus</i>	25/08/2007	ENCB-IPN	ATCC25923
<i>Candida albicans</i>	19/09/2007	UMAR	Aislada de pacientes Vulva

### 5.1.3. Equipo

Balanza Analítica. Marca OHAUS. Explorer, Precisión  $\pm 0.1$ mg USA

Ultrasonido. Marca Elma. Modelo Transsonic T1-H-S

Rotavapor. Marca Yamato. Modelo RESO

Tamizador. Equipo RO-Tap. Ws. Tyler Co., Y USA

Molino. Licuadora Marca Osterizer

Digestor y destilador de microkjeldahl. Marca labconco USA

Estufa. Marca Thermolyne. Modelo Oven serie 9000, USA.

Autoclave- Marca All American. Modelo No. 25X

Agitador orbital. Marca lab-line. Modelo Orbit shaker, USA.

Mufla Marca Lindberg.

Espectrofotómetro de UV-Vis Varian. Modelo Cary 50, USA

Cromatografía de HPLC: Marca Varian

Espectrofotómetro de UV-Vis Varian. Modelo Cary 50, USA

**5.1.4. Medios de cultivo.** Los medios de cultivo que se emplearon fueron:

Caldo de Muller Hinton. Marca Bioxon.

Triptona: Marca Difco.

Agar nutritivo- Marca Bioxon.

Extracto de levadura

Agar de dextrosa Saborud

Caldo de dextrosa saburoud  
Agar-agar  
Suero istonico

#### **5.1.6. Antibióticos**

Gentamicicina  
Cloranfenicol  
Nistatina

### **5.2. METODOS**

**5.2.1. Análisis proximal.** Fue realizado por los métodos oficiales AOAC (1997) Humedad (925.10), ceniza (923.03), extracto etéreo (920.85), fibra cruda (920.86) y proteína (979.09).

#### **5.2.2. Obtención de Extractos Orgánicos Totales**

Las hojas secas de *Gliricidia sepium* se molieron en licuadora y luego se tamizaron hasta que tengan un tamaño de partícula de 960 micrones. Las extracciones con los diversos disolventes se llevaron acabo por dos métodos, en la primera se elimino la fracción lipidica, ya que esta no necesariamente presenta actividad biológica, la segunda extracción se realizo de forma directa con solventes de diferentes polaridades.

**Extracción 1.** Para eliminar la parte lipidica, se dejo reflujar hexano, por 6h, empleando el método de soxhlet (Figura 5.3), se elimino los restos de disolvente a temperatura ambiente, para proceder a la extracción con los solventes de polaridad diferente. En esta parte se emplearon dos disolventes, una mezcla polar agua: etanol 70:30 v/v y un disolvente medianamente polar; cloruro de metileno (99.8%).



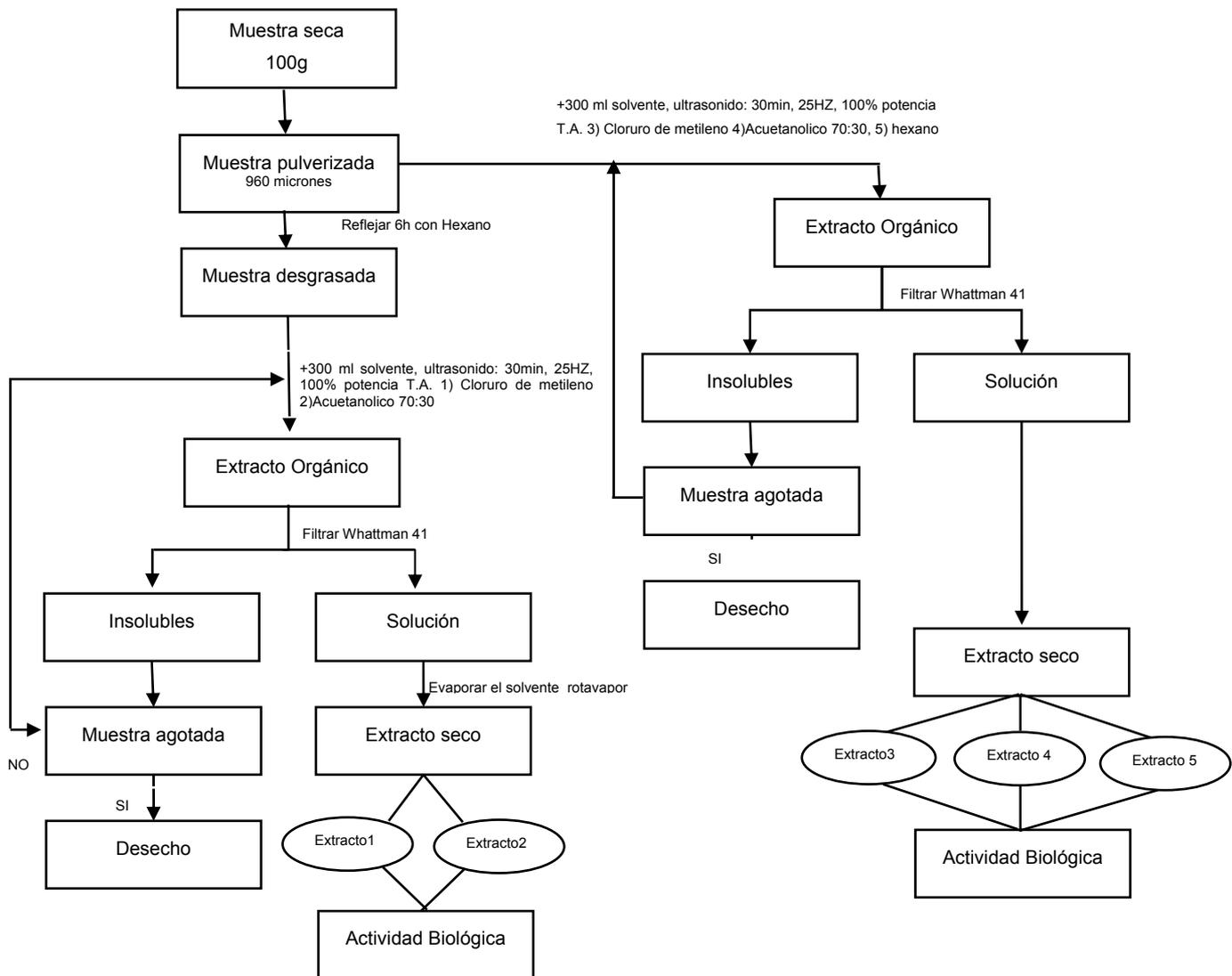
**Figura 9. Extracción de la parte lipídica de las hojas de *Gliricidia sepium* empleando el método de Soxhlet**

Una vez obtenida la muestra a la cual se le retiró la fracción lipídica, se procedió a la extracción con los disolventes orgánicos, utilizando una proporción 1:3 (muestra: disolvente). La extracción se llevó a cabo por ultrasonido (30min, 25Hz, 100% potencia). Después los extractos fueron filtrados a vacío (Whatman 42), el material vegetal que no logró ser filtrado se le siguió realizando extracciones consecutivas, hasta lograr extraer la mayor proporción de los compuestos presentes en la planta, para verificar esto se realizó un espectro de Ultravioleta Visible (UV-VIS) de cada extracto y se compararon, observando como disminuían las bandas de absorbancia. Se juntaron los extractos y luego se procedió a concentrar a baja presión en el rotavapor a una temperatura no mayor de 40° C. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos ámbar a 4° C.

**Extracción 2.** La segunda extracción se realizó de forma directa con cada disolvente empleando una proporción 1:3 (muestra: disolvente), se emplearon tres disolventes una solución polar de agua: etanol 70:30 (v/v), cloruro de metileno (99.8%) y hexano (99.9%) la extracción por ultrasonido (30 min, 25Hz, 100% potencia), Después la muestra fue filtrada a vacío (Whatman 42), el material vegetal que no logró ser filtrado se le siguió realizando extracciones consecutivas, hasta lograr extraer la mayor parte de los compuestos presentes en la planta, para verificar esto se realizó un espectro de Ultravioleta Visible

(UV-VIS) de cada extracto y se compararon, observando como disminuían las bandas de absorbancia. y se procedió a concentrar a baja presión los disolventes con el rotavapor a una temperatura no mayor de 40°C. Los extractos obtenidos se almacenaron en frascos de tapa roscada a 4°C.

De esta extracción se obtuvieron tres extractos que referiremos a ellos como extracto 3 (Acuetanólico) 4 (Cloruro de metileno) y 5 (Hexano).



**Fig. 10.- Diagrama de obtención de extractos obtenidos de las hojas de *Gliricidia sepium***

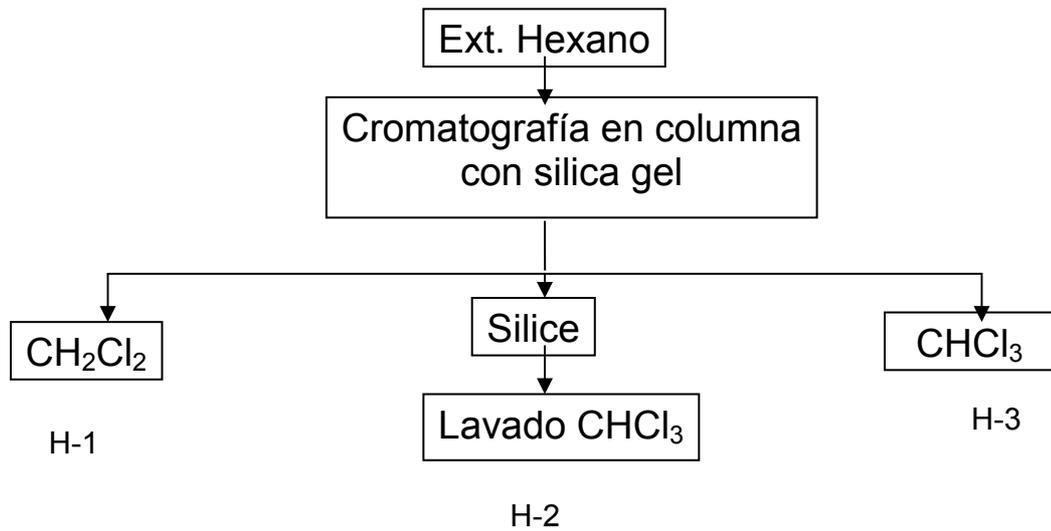
### Segunda etapa

#### Separación y Caracterización

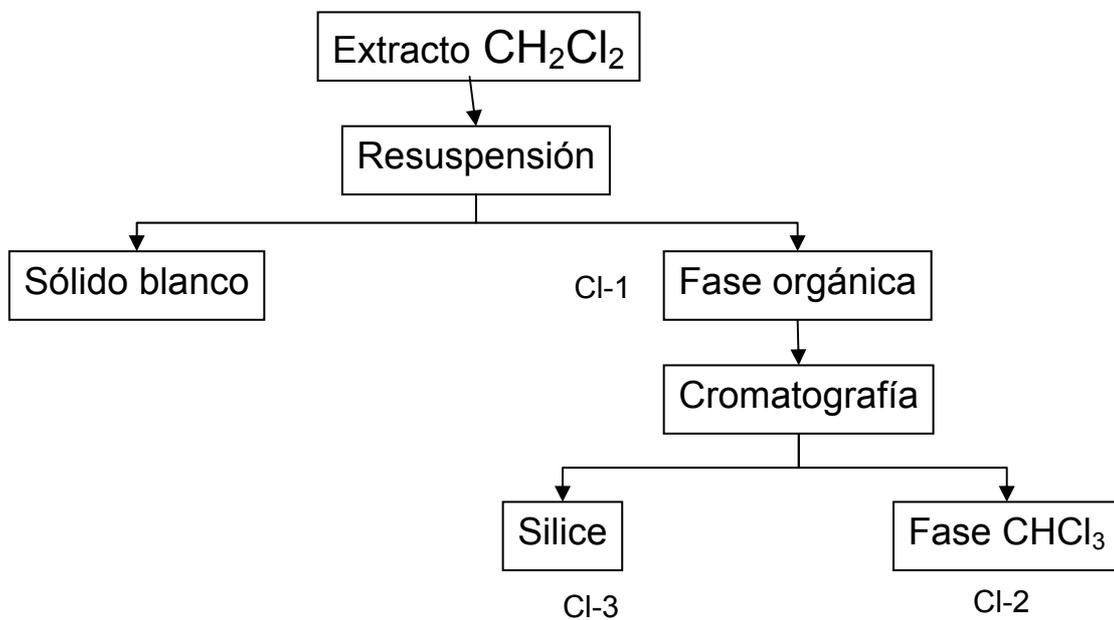
- ◆ Cromatografía en columna: Celita, 20cm
- ◆ TLC : Eluyente tolueno Acetato de etilo 1:1

- ◆ UV Vis :Scan de 190-900
- ◆ Masas: PE5 perkin Elmer, largo de 30m. Diámetro interno 0.32 y espesor de fil 0.25  
50°C, 5min; 1.5 °C/min; 200°C, 15 min

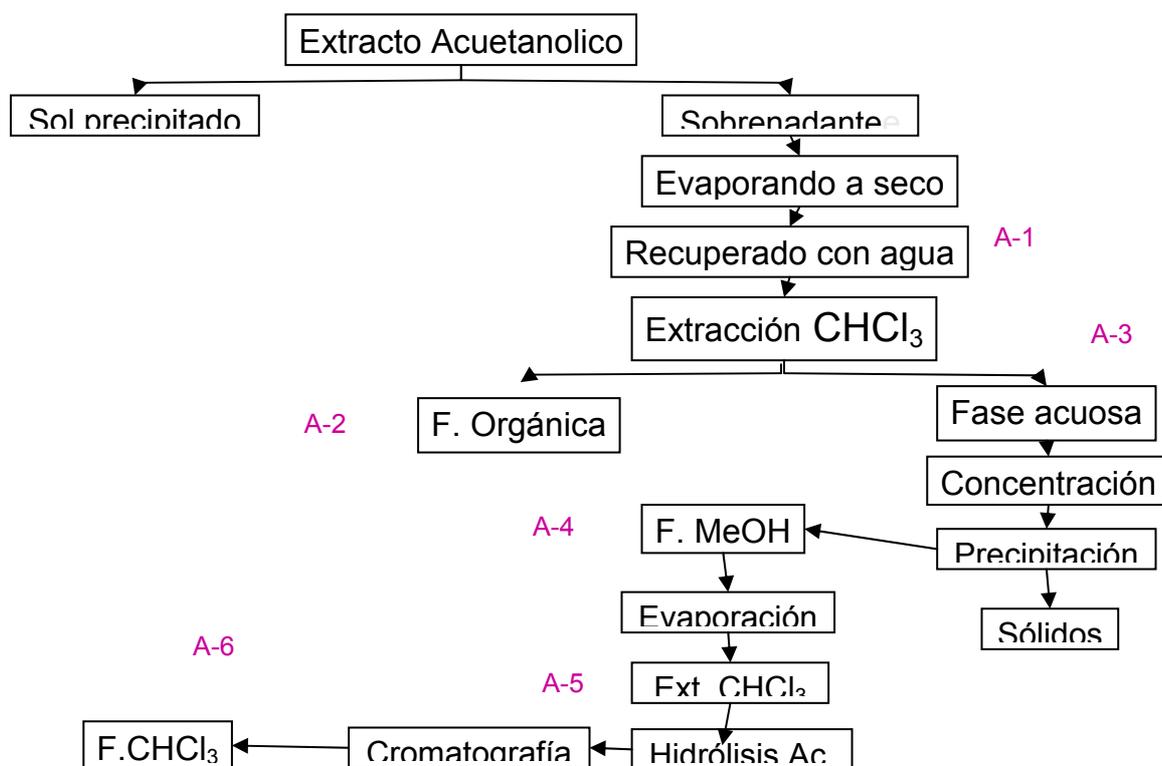
### EXTRACCIÓN CON HEXANO



### Extracto con cloruro de metileno



## Extracto Acuetanólico 70:30



### 5.2.3. Ensayo antimicrobiano por turbidez.

La prueba de actividad antimicrobiana se evaluó por el método de turbidez a través de UV-Vis. Esta prueba se fundamenta en que durante una cinética de crecimiento, la población de los microorganismos van aumentando, por tal motivo la turbidez producida es directamente proporcional al número de microorganismos presentes, si le aplicamos un extracto o un antibiótico que inhiba o retrase el desarrollo del microorganismos, no se presentara el fenómeno de turbidez y los valores de absorbancia serán menores o nulos. Los ensayos realizados se hicieron por triplicado empleando como control positivo el antibiótico que presentara mayor inhibición de los microorganismos y como control negativo el solvente empleado para cada una de las extracciones.

Existen longitudes de onda a las cuales se puede medir los máximos de absorbancia para cada microorganismo, para *Staphylococcus aureus* se empleo 650nm (Torres, 2001) y para *Candida albicans* una de 600nm (Torres,

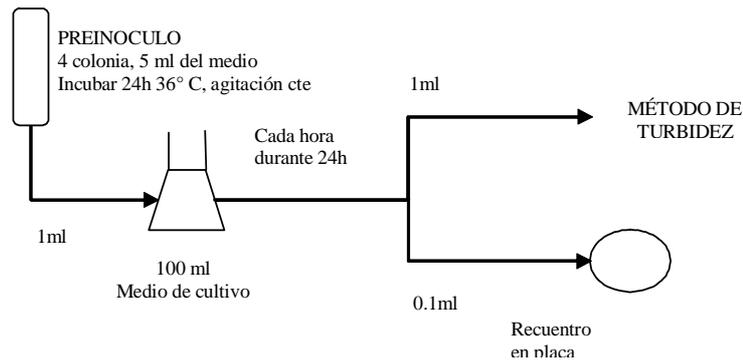
2001), que son microorganismos que se estudian en el presente trabajo.

### **5.2.3.1 Cinética de crecimiento**

Con el fin de verificar la viabilidad de cada uno de los microorganismos se realizó una cinética de crecimiento.

**Preparación del preinoculo.** Para llevar a cabo la activación de las cepas se emplearon los caldos de cultivo apropiados (Dextrosa Sabouraud para *Candida albicans* y Muller Hinton para *Staphylococcus aureus*). Los medios se prepararon de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se repartieron en tres tubos con 5ml cada uno y se esterilizaron. A partir del cultivo bacteriano puro se tomaron 4 colonias morfológicamente similares con un asa estéril y se inocularon en cada uno de los tubos. Posteriormente se incubaron a 30°C y 36°C respectivamente, con agitación de 110 rpm constante durante 24 horas.

**Inoculación.** Se preparó 300 ml de caldo de cultivo específicos para cada microorganismo y se depositaron 100 ml en 3 matraces de 500 ml cada uno, el material se esterilizó (15 min, 15 lb). Se tomó 1 ml del preinoculo y se depositó en cada uno de los matraces, se resuspendió. Los matraces permanecieron en agitación constante y las temperaturas óptimas (30°C y 36°C respectivamente) de desarrollo, cada hora se tomaron alícuotas de 1ml, se depositó en una celda del espectrofotómetro (de plástico con capacidad 4ml) que contenía 3 ml de solución isotónica de cloruro de sodio (0.9%) y se midió la absorbancia (600nm para *Candida albicans* y 650nm para *Staphylococcus aureus*), al mismo tiempo se tomó 0.1ml y se sembró en placas de agar con dextrosa sabourau y Muller Hinton respectivamente, hasta observar que la curva de crecimiento microbiano se encontró en la fase estacionaria.



**Figura 11. Diagrama de flujo de la cinética de la crecimiento**

**Elección del control positivo.** Se verifico la respuesta que presentan los microorganismos del presente trabajo frente a ciertos antibióticos: Cloranfenicol y Gentamicina con *Staphylococcus aureus* (Torres, 2001), Gentamicina y Nistatina frente a *Candida albicans* (Torres, 2001). Tomamos con una asa estéril una colonia y se inoculo en 10 ml de caldo estéril, se incubaron en una estufa con agitación orbital constante (110 rpm) a 36°C y 30°C según el microorganismo, hasta el momento en que el cultivo alcanza una absorbancia entre 0.5 y 0.8 a 650 nm para *Staphylococcus aureus* y 600nm para *Candida albicans*. Se coloco 1ml del medio de cultivo estéril en un tubo de ensayo y se le adiciono 0.5ml de Sulfato de Gentamicina (1 mg/ml) y 0.5ml de Nistatina (1000UI/ml), se observo la respuesta de los microorganismos frente a los antibióticos y por medio del espectro visible a la longitud de onda preestablecida se determina el antibiótico que produce el control positivo.

#### **VII.6.4. Evaluación y concentración mínima inhibitoria de los extractos de *G. sepium*.**

Tomamos con una asa estéril una colonia y se inoculo en 10 ml de caldo estéril, se incubo en un agitador orbital a la temperatura optima de crecimiento (30°C para *Candida albicans* y 36°C para *Staphylococcus aureus*), hasta el momento en que el cultivo alcanzo una absorbancia entre 0.5 y 0.8 medida a sus máximos de absorbancia. Se Diluyo el cultivo bacteriano a 1:100. En se llenaron 96 microtubos, con 2 ml del cultivo diluido cada uno, se adicionaron 0.50 ml del extracto a probar (extracto 1, 2, 3, 4 y 5) y el estándar (10 mg / ml

gentamicina, nistatina y cloranfenicol) como control positivo y el disolvente empleado en la disolución de los extractos (DMSO y agua) como control negativo y se formo una primera fila primera. Con una micropipeta, se tomaron 0.5 ml de la primera fila y adiconarlos a la siguiente fila y mezclar 5 veces, se repitió el mismo procedimiento con las filas inferiores hasta descartar los últimos 0.5ml ml de la última fila. Se Incubaron a 30°C y a 36°C a agitación constante y se midió la absorbancia a la longitud se onda adecuada. Se emplearon tres concentraciones de los extractos obtenidos (25, 50 y 100 mg/ml) quedando el diseño como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de extractos a probar junto con los controles positivos y negativos

Dilución	EXTRACTO A PROBAR						C -	C +	medio
	25 mg / ml	blanco	50 mg / ml	blanco	100 mg / ml	blanco	DMSO	Antibiótico	
A									
B									
C									
D									
E									
F									
G									
H									

Se calculo el valor de la CIM a la cual se observo efecto antimicrobiano como indicado en la Tabla 4.

Tabla 4. Diluciones de los extractos de *Gliricidia sepium* para determinar el valor de CIM.

mg / ml		10 mg/ml
Fila	Disolución	Muestras/ estándar
A	1/5	2000
µg/ ml		
B	1/25	400
µg/ ml		
C	1/125	80
µg/ ml		
D	1/625	16
µg/ ml		
E	1/3125	3.2
µg/ ml		
F	1/15625	0.64
µg/ ml		
G	1/78125	0.128
µg/ ml		
H	1/390625	0.026
µg/ ml		

## CAPITULO VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Análisis proximal

Como se puede observar en la tabla 5, la concentración de proteína total que presentan las hojas de *Gliricidia sepium* es alto un valor de 19.79% de su composición lo que concuerda con todas las referencias (Galindo et al 1989; Topps, 1992, Whetton et al, 1997; Luca et al., 1999) en donde la planta es catalogada como una fuente excelente follaje por su alto contenido de nitrógeno proteico.

Tabla 5. Composición proximal de hojas de *gliricidia sepium*

Análisis	Porcentaje
Humedad	71.08
Cenizas	8.9
Proteína (Nitrógeno x 6.25)	19.79 ± 0.53
Carbohidratos, fibras (Diferencia )	

### 6.2 Extracciones

De acuerdo al proceso establecido en el diagrama de la Figura 10 se ha obtenido dos extractos que durante el desarrollo referirán como extracto 3 (Cloruro de metileno) y extracto 4 (Acuaetanolico).

Los extractos orgánicos extraídos por cada solvente tienen características físicas diferentes.



Los extractos 1 y 3 (extracto empleado agua: etanol, 70:30). En el momento de ser concentrados precipitado que podemos observar en las Figura 12 para llevar acabo las evaluaciones de actividad biológica, se trabajo con el sobrenadante que fue separado y concentrado hasta eliminar todo el solvente empleado.



Como podemos observar la mayor parte de compuestos presentes en las hojas de *Gliricidia sepium*, son los que tiene carácter polar, tanto en el primer extracto como el segundo

Extracto	Solvente empleado	Cantidad extraída por 100g de muestra
1	Agua: etanol (70:30)	19.07g
2	Cloruro de metileno	
3	Agua: etanol (70:30)	21.14g
4	Cloruro de metileno	8.7g
5	Hexano	2.0g

El proceso de extracción realizado inicialmente con hexano y después el producto resultante libre de compuestos solubles en solventes apolares es retirada para continuar la extracción con solventes como el cloruro de metileno, cloroformo y cloroformo con separación en una columna de silica gel, se obtienen los extractos que cuando evaluados por UV-Vis proporcionan espectros indicados en la Figura 13. La muestra H<sub>3</sub> que fue extraído solo con cloroformo tiene un pico característico correspondiente al compuesto de clorofila por la posición de longitud de onda que presenta (650 a 700nm), no teniendo otros picos de absorbancia en este extracto. Cuando se realiza la extracción con Cloruro de Metileno se tiene un pico con dos hombros a los

lados, compuesto característico de un compuesto que podría tener dos anillos en los extremos unidos por una cadena alifática con probables dobles enlaces en la cadena lo que le proporciona la absorción por la excitación de los fotones de la luz visible en esa longitudes de onda, este tipo de compuestos es característico de carotenoides. Por ultimo el espectro del extracto con cloroformo donde separa en columna con fase estacionaria de silica gel se obtiene un espectro donde no se observa las clorofilas y compuestos parecidos a los carotenoides, solo compuestos que posiblemente sean los flavonoides, compuestos fenolicos, saponinas y terpenoides, debido a que la columna de separación retuvo los compuestos semejantes a carotenoides dejando libre a los polifenoles.

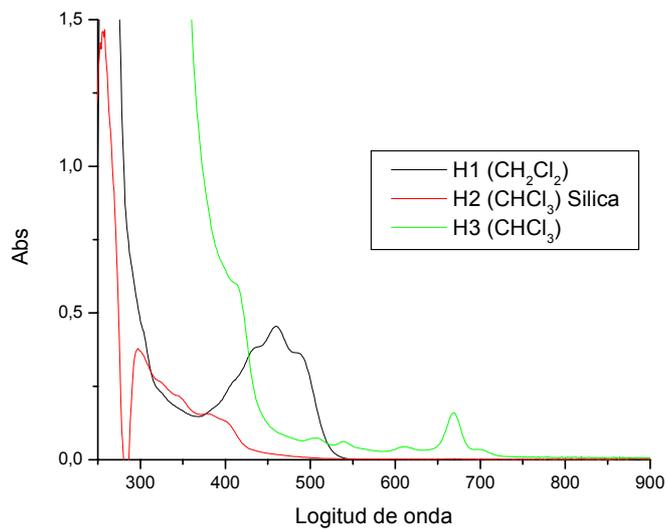
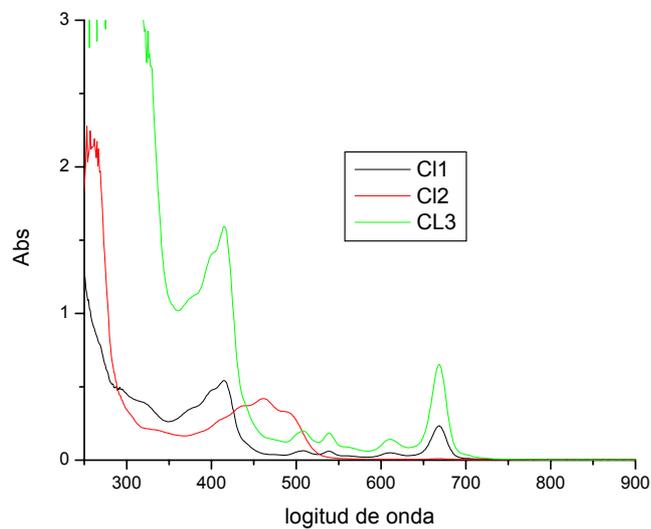


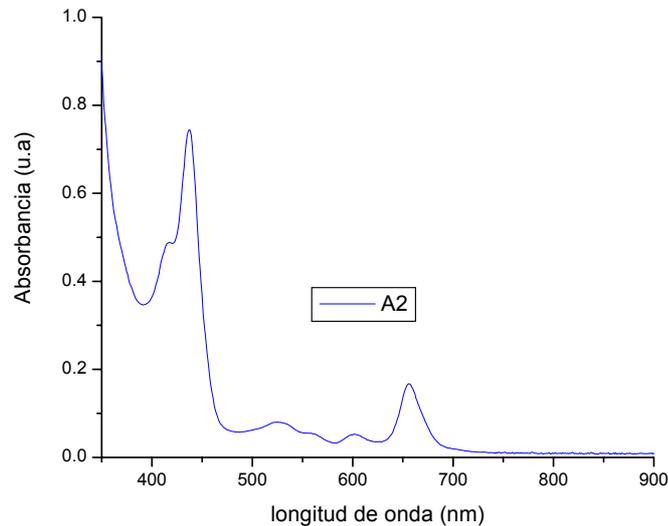
Figura 13. Espectros de UV-Vis de extractos de *Gliricidia sepium* cuando extraído inicialmente con Hexano.

En la Figura 14 se presentan los espectros de muestras que fueron extraídas con cloruro de metileno donde se observa que las fracciones CL1 y CL3 por el espectro y las posiciones de longitud de onda de los picos, se puede identificar que estas dos muestra tienen compuestos de clorofila y los grupos de polifenoles, no se observa con mucha intensidad la presencia de carotenoides. La muestra CL2 no tiene compuestos de clorofila pero si se puede distinguir con mayor intensidad la presencia de compuestos semejantes a los carotenoides. Estos resultados se deben a que en el proceso de extracción la fracción de clorofila sea separada por el solvente de cloroformo quedando de forma residual los compuestos semejantes a carotenoides y compuestos fenolitos.



**Figura 14. Espectro de UV-Vis Extracto con cloruro de metileno**

En la Figura 15 se observa el espectro del extracto obtenido con solvente acuoetanolico, de forma similar a los espectros obtenidos para los extractos con cloruro de metileno se puede indicar que los compuestos que se encuentran en el extracto son clorofilas, fracciones menores de compuestos semejantes a carotenoides y en mayor proporción los compuestos fenólicos.

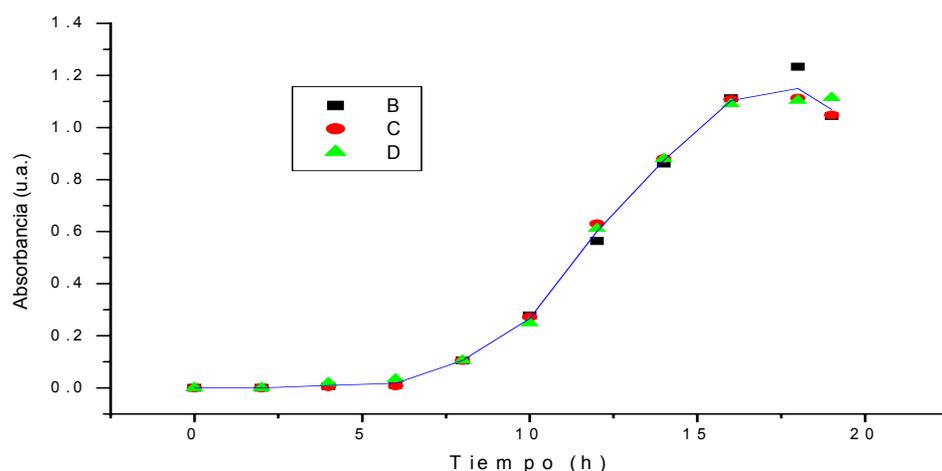


**Figura 15. Espectro de UV Extracto acuoetanolico 70:30**

### **6.3. Evaluaciones microbiológicas**

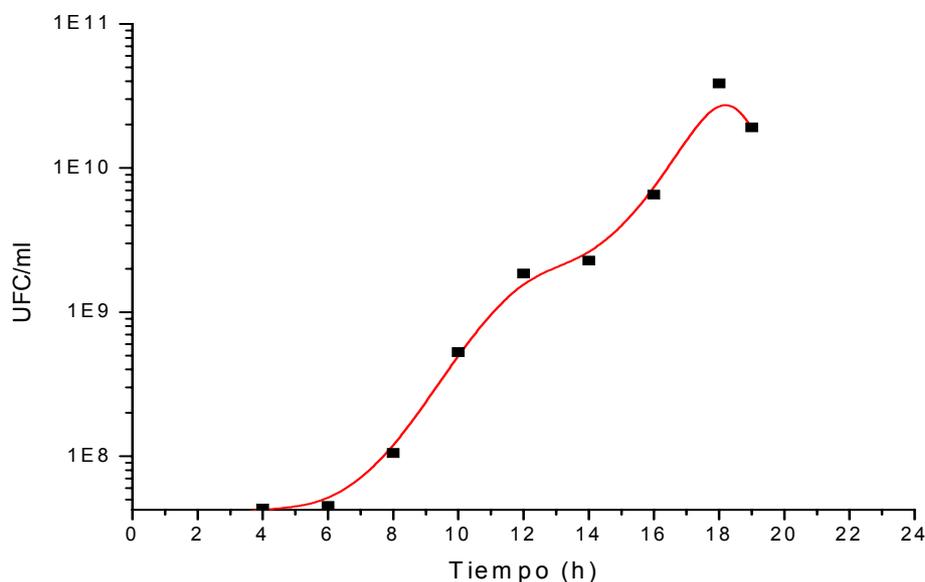
#### **6.3.1. Cinéticas**

Para evaluar el efecto de los extractos en los microorganismos. Se estudio el comportamiento de *Candida albicans* en los substratos de crecimiento y observar la viabilidad de la cepa efectuando su cinética de crecimiento. El estudio indica que la cepa de *Candida albicans* alcanzo su desarrollo máximo a las 16 horas a una temperatura de 30°C y en el substrato seleccionado. El microorganismo tiene un comportamiento normal, disponiendo de un tiempo (6h) para adaptarse al medio, después comienza a desarrollarse muy rápidamente hasta alcanzar las 16h y posteriormente alcanza la estabilidad determinado talvez por la disponibilidad del substrato.



**Figura 16.** Cinética de crecimiento de *Candida albicans* a 30°C

Durante la evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa de *Candida albicans*, también se contabilizó las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) obteniendo el máximo crecimiento a las 19h de  $2 \times 10^{10}$  UFC/ml, como observado en la Figura 17.



**Figura 17.** Concentración de cepas de *Candida albicans* (UFC/ml) formadas en función del tiempo (h).

Cuando se relaciona las unidades formadoras de colonias con la absorbancia, se está obteniendo el efecto de la concentración en la absorbancia, obteniendo el mayor valor de absorbancia de 1.1 (u.a.) para una concentración de  $2 \times 10^{10}$  UFC/ml de *Candida albicans*, como indicado en la Figura 18.

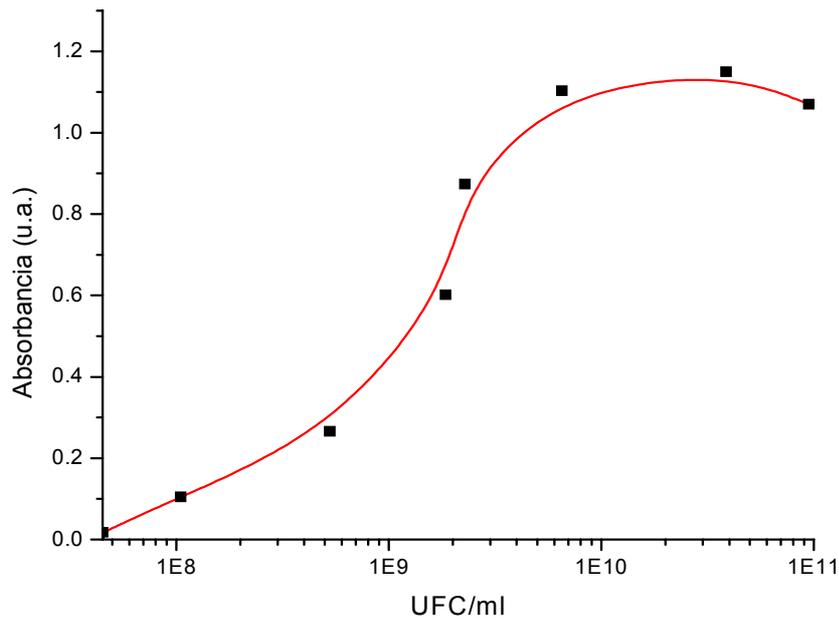


Figura 18. Relación de la concentración de cepas de *Candida albicans* (UFC/ml) con la absorbancia (u.a.)

### Elección del control positivo

Se probaron dos antibióticos contra *Candida albicans*, reportes anteriores observaron que la gentamicina y la nistatina son los antibióticos que inhiben el desarrollo de *Candida albicans* para comprobar esto empleamos dos concentraciones de los antibióticos para gentamicina 80 mg/ml y 10 mg/ml y para nistatina 1000 UI/ml y 100 UI/ml. Como podemos observar en la tabla 1 los dos antibióticos presentan un efecto de inhibición.

Tabla 7.- Elección del antibiótico empleado como control positivo para *Candida albicans*

Dilución	GENTAMICINA						NISTATINA						Control Negativo
	[80 mg/ ml]		[10 mg/ml]		[1000 UI/ml]		[100 UI/ml]						
A	0.022	0.02	0.25	0.082	0.11	0.121	0.099	0.086	0.084	0.019	0.006	0.01	1.426
B	0.019	0.02	0.036	0.102	0.101	1.72	0.009	0.013	0.007	0.109	0.125	0.351	1.52
C	0.029	0.022	0.058	1.252	1.278	1.248	0.004	0	0.1	1.042	1.252	1.31	1.495
D	1.219	0.051	1.224	1.451	1.59	1.408	0.754	0.861	0.676	1.253	1.303	1.314	1.435
E	1.382	1.232	1.349	1.473	1.19	1.324	1.344	1.138	1.326	0.904	1.33	1.353	1.483
F	1.459	1.368	1.36	1.366	1.382	1.408	1.31	1.32	1.29	0.661	0.357	1.308	1.521
G	1.434	1.481	1.179	1.327	1.263	1.389	1.422	1.326	1.348	0.991	1.388	1.261	1.427
H	1.461	1.701	1.622	1.465	1.403	1.42	1.466	1.396	1.401	1.32	1.4	1.399	1.492

Con la concentración de 80 mg/ml la gentamicina presenta un efecto de inhibición a una concentración de 0.64 mg/ml (correspondiente a la fila **C**) pero como se puede observar claramente la nistatina presenta un mejor efecto de inhibición dándonos casi un crecimiento nulo comparado con el control positivo donde los extractos nos daban una absorbancia de 1.495.

La nistatina nos presento este efecto a una concentración de 8 UI/ml y por lo cual en el presente trabajo se empleara como control positivo para las pruebas del calculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la nistatina ya que esta es la que inhibe el desarrollo de *Candida albicans*

### **Concentración mínima inhibitoria (MIC)**

El preinoculo empleado en esta prueba tenía una absorbancia de 0.575 esta fue medida a 600 nm, tomando de este una alícuota de 2 ml y disolviéndola en 200 ml (1:100) y partiendo de este medio de cultivo inoculado para llevar cabo el análisis.

Para llevar a cabo la prueba de la concentración mínima inhibitoria se tomo un gramo de cada uno de los extractos obtenidos y se diluyeron en diez mililitros de DMSO la disolución se hizo parcialmente en vidrios de reloj observando que las muestras obtenidas con cloruro de metileno fueron las que no se disolvieron en su totalidad estas presentaron un punto de saturación de disolución con este solvente.

Como podemos observar en las tablas de resultados 8, 9, 10, 11 y 12 el DMSO presenta un efecto inhibitorio para el crecimiento y desarrollo de *Candida albicans*, dándonos un valor de absorbancia de 0.074 comparado con el desarrollo del medio de cultivo testigo que fue de 1.423 se puede observar claramente el efecto.

En todas las pruebas en donde el disolvente empleado fue el DMSO se observa una tendencia de inhibición en la primera fila de disolución (fila A) de las placas de 96 tubos, pero los extractos 2 y 4 este efecto continua presente

en la fila B y si comparamos los valores de absorbancia que presentan los extractos y el efecto que produciría la disolución de DMSO donde su absorbancia fue de 1.376 y la de los extractos 2 y 4 son menores. El efecto de inhibición es producto de la interacción de los componentes de los extractos con el desarrollo del microorganismo estudiado.

Por tal motivo se decidió hacer la disolución de los extractos 1, 2 y 4 en agua y verificar que el efecto de inhibición lo provoca los componentes de los extractos obtenidos a través de cloruro de metileno y el extracto acuetanólico para verificar su efectividad.

**Tabla 8.- Concentración mínima inhibitoria del extracto 1**

Dilución	EXTRACTO 1						C -		C +		medio	
	25 mg / ml		blanco	50 mg / ml		blanco	DMSO	Nistatina				
A	0.011	0	0	0.013	0.032	0	0.024	0.015	0	0.074	0.028	1.423
B	1.481	1.505	0	1.305	1.322	0	1.406	1.496	0	1.376	0.029	1.423
C	1.489	1.513	0	1.377	1.47	0	1.525	1.48	0	1.439	0.096	1.423
D	1.442	1.468	0	1.523	1.423	0	1.346	1.376	0	1.403	0.535	1.423
E	1.401	1.602	0	1.229	1.448	0	1.381	1.418	0	1.42	1.29	1.423
F	1.339	1.415	0	1.428	1.517	0	1.463	1.287	0	1.454	0.633	1.423
G	1.236	1.334	0	1.308	1.463	0	1.303	1.391	0	1.396	1.524	1.423
	1.451	1.571	0	1.501	1.633	0	1.516	1.539	0	1.383	1.303	1.423

**Tabla 9.- concentración mínima inhibitoria del extracto 2**

Dilución	EXTRACTO 2						C -		C +		medio	
	25 mg / ml		blanco	50 mg / ml		blanco	DMSO	Nistatina				
A	0.006	0.051	0	0.018	0.036	0	0.034	0.046	0	0.074	0.028	1.423
B	0.577	0.857	0	0.47	0.27	0	0.63	0.583	0	1.376	0.029	1.423
C	1.371	1.373	0	1.313	1.36	0	1.136	1.003	0	1.439	0.096	1.423
D	1.304	1.398	0	1.338	1.335	0	1.305	1.357	0	1.403	0.535	1.423
E	1.402	1.36	0	1.488	1.326	0	1.36	1.363	0	1.42	1.29	1.423
F	1.625	1.303	0	1.546	1.392	0	1.525	1.41	0	1.454	0.633	1.423
G	1.58	1.456	0	1.316	1.323	0	1.482	1.479	0	1.396	1.524	1.423
	1.9	1.303	0	1.376	1.189	0	1.428	1.218	0	1.383	1.303	1.423

**Tabla 10.- concentración mínima inhibitoria del extracto 3**

Dilución	EXTRACTO 3								C -		C +	
	25 mg / ml		blanco	50 mg / ml		blanco	100 mg/ ml		blanco	DMSO	Nistatina	medio
A	0.007	0	0	0.023	0.019	0	0.006	0.008	0	0.074	0.028	1.423
B	1.463	1.501	0	1.561	1.581	0	1.523	1.682	0	1.376	0.029	1.423
C	1.510	1.581	0	1.484	1.546	0	1.463	1.495	0	1.439	0.096	1.423
D	1.384	1.452	0	1.431	1.490	0	1.494	1.414	0	1.403	0.535	1.423
E	1.403	1.397	0	1.301	1.365	0	1.369	1.415	0	1.42	1.29	1.423
F	1.384	1.401	0	1.482	1.397	0	1.310	1.223	0	1.454	0.633	1.423
G	1.452	1.500	0	1.426	1.374	0	1.232	1.398	0	1.396	1.524	1.423
	1.408	1.442	0	1509	1.413	0	1.472	1.417	0	1.383	1.303	1.423

**Tabla 11.- concentración mínima inhibitoria del extracto 4**

Dilución	EXTRACTO 4								C -		C +	
	25 mg / ml		blanco	50 mg / ml		blanco	100 mg/ ml		blanco	DMSO	Nistatina	medio
A	-0.004	-0.033	0	0.081	0.038	0	0.019	0.03	0	0.074	0.028	1.423
B	1.45	1.442	0	0.725	0.561	0	0.394	0.503	0	1.376	0.029	1.423
C	1.495	1.578	0	1.444	1.292	0	1.308	1.338	0	1.439	0.096	1.423
D	1.448	1.4	0	1.26	1.237	0	1.357	1.454	0	1.403	0.535	1.423
E	1.5	1.422	0	1.388	1.408	0	1.42	1.426	0	1.42	1.29	1.423
F	1.431	1.42	0	1.344	1.458	0	1.384	1.357	0	1.454	0.633	1.423
G	1.346	1.362	0	1.247	1.333	0	1.317	1.423	0	1.396	1.524	1.423
	0.915	0.939	0	1.348	1.363	0	1.463	1.44	0	1.383	1.303	1.423

Los extractos obtenidos con hexano no presentan un efecto de inhibición durante el desarrollo de *Candida albicans*, como podemos observar en la tabla 6 solo en la primera dilución (Fila A) no se observa desarrollo microbiano, pero este efecto es observado también en el control negativo (DMSO), los compuestos químicos de carácter apolar que pudieran ser extraído por este solvente son principalmente lípidos, de los cuales se tienen pocos reportes que presenten actividad biológica.

**Tabla 12 concentración mínima inhibitoria del extracto 5**

Dilución	EXTRACTO 5								C -		C +	
	25 mg / ml		blanco	50 mg / ml		blanco	100 mg/ ml		blanco	DMSO	Nistatina	medio
A	0.008	0.038	0	0.27	0.28	0	0.031	0.048	0	0.074	0.028	1.423
B	1.342	1.261	0	1.2	1.248	0	0.979	1.04	0	1.376	0.029	1.423
C	1.494	1.513	0	1.497	1.534	0	1.463	1.382	0	1.439	0.096	1.423
D	1.484	1.418	0	1.479	1.501	0	1.525	1.53	0	1.403	0.535	1.423
E	1.497	1.427	0	1.472	1.467	0	1.48	1.441	0	1.42	1.29	1.423
F	1.369	1.496	0	1.525	1.427	0	1.434	1.44	0	1.454	0.633	1.423
G	1.505	1.344	0	1.546	1.368	0	1.541	1.33	0	1.396	1.524	1.423
	1.482	1.224	0	1.53	1.499	0	1.444	1.429	0	1.383	1.303	1.423

## Staphylococcus aureus

Dilución	Sulfato de Gentamicina						Cloranfenicol						Control
	10 mg/ml			1 mg/ml			10 mg/ml			1 mg/ml			
<b>A</b>	0.019	0.011	0.015	0.011	0.011	0.014	0.068	0.06	0.051	0.02	0.032	0.028	0.254
<b>B</b>	0.028	0.018	0.018	0.019	0.02	0.016	0.034	0.032	0.03	0.022	0.037	0.029	0.254
<b>C</b>	0.018	0.025	0.015	0.02	0.019	0.021	0.023	0.032	0.037	0.103	0.137	0.128	0.254
<b>D</b>	0.024	0.024	0.017	0.025	0.022	0.018	0.08	0.105	0.081	0.161	0.166	0.182	0.254
<b>E</b>	0.019	0.02	0.018	0.105	0.094	0.087	0.116	0.168	0.182	0.182	0.207	0.176	0.254
<b>F</b>	0.018	0.03	0.021	0.194	0.192	0.121	0.107	0.192	0.121	0.196	0.2	0.22	0.254
<b>G</b>	0.189	0.214	0.141	0.22	0.206	0.193	0.169	0.228	0.179	0.201	0.241	0.204	0.254
<b>H</b>	0.326	0.275	0.221	0.199	0.163	0.221	0.178	0.17	0.179	0.213	0.225	0.231	0.254

## Se probaron los posibles disolventes

Dilución	Blanco	Etanol	DMSO	Agua
<b>A</b>	0.254	0.013	0.064	0.212
<b>B</b>	0.254	0.12	0.204	0.212
<b>C</b>	0.254	0.208	0.182	0.212
<b>D</b>	0.254	0.233	0.225	0.212
<b>E</b>	0.254	0.205	0.22	0.212
<b>F</b>	0.254	0.257	0.203	0.212
<b>G</b>	0.254	0.258	0.247	0.212
<b>H</b>	0.254	0.241	0.2	0.212

Los resultados obtenidos de los diferentes extractos indican que la *Gliricidia sepium* presenta efectos de inhibición en el crecimiento de microorganismos especialmente en los referidos a *Estafilococcus aureos* y la fracción con mayor potencial para la inhibición es la referida a la extracción con solventes de cloruro de metileno y metanol después de separar los compuestos de clorofila que interfieren en la lectura de turbidez en el UV Vis. Los compuestos que más afectan el desarrollo de los microorganismos son los fenolicos y sus terpenoides.

## **Conclusiones.**

La *Gliricidia Sepium* presenta un alto contenido de proteínas y el resultado esta de acuerdo a lo reportado por otros autores.

Los espectros de UV Vis de los extractos identificaron adecuadamente las separaciones de los compuestos obtenidos por los diferentes solventes, es así que se pudo establecer el proceso de separación de los componentes y estudiar su efecto inhibitorio de cada fracción en el desarrollo de los dos microorganismos, *Candida albicans* y *Staphilococcus aureos*.

Los análisis de inhibición en el desarrollo de *Candida albicans* con los diferentes extractos indican que ningún extracto de *Gliricidia sepium* tienen efecto sobre su desarrollo.

Las fracciones extraídas con cloruro de metileno y etanol-agua cuando separadas la fracción de clorofila a través de la disolución con hexano, presentan una mayor inhibición en el desarrollo de *Staphylococcus aureus*.

La concentración mínima inhibitoria de la fracción extraída a través de metanol y luego separada la clorofila con hexano, que afecto el desarrollo de *Staphylococcus aureus* fue de 80mg/ml, otros estudios indicaron valores muy proximos (64mg/ml).

## **Recomendaciones.**

Los futuros trabajos que deberían realizarse:

Investigar con los médicos que utilizan plantas medicinales otras plantas que tengan un mayor potencial en enfermedades infecciosas.

Realizar extracciones con otros sistemas físicos o fisicoquímicos como las microondas que puedan liberar los compuestos activos sin dañar su estructura química y sus propiedades bioquímicas de las plantas.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Arguayo, G.S., 2002. Insecticidas Vegetales, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, Internet. Chillán, CHILE
2. Batis, A.I., M.I. Alcocer, M. Gual, C. Sánchez y C. Vázquez-Yanes. 1999. Árboles y Arbustos Nativos Potencialmente Valiosos para la Restauración Ecológica y Reforestación. Instituto de Ecología, UNAM. México, D.F.
3. Bennison, J.J.; Paterson, R. T. Use of trees by livestock 3: *Gliricidia*; Natural Resources Institute: Chatham, U. K., 1993.
4. Berger, I.; Barrientos, AC.; Caceres, A.; Hernández, M.; Rastrelli, L.; Passreiter CM., Kubelka W. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Tripanosoma cruzi*. J. Ethopharmacol 1998, 62 (2): 107-15.
5. Caceres, A. ; Lopez, B.; Juárez, X.; del Aguila, J.; Garcia, S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 2. Evaluation of antifungal activity of seven American plants. J. Ethopharmacol. 1993 Dec; 40 (3): 207-13.
6. Castañon J. Martinez Soto J. Franco G. Rangel-Frausto MS. Higuera F. Tobal N. Ruiz J. Duarte P. Rosenthal VD Estudio Prospectivo Multicéntrico Nacional para Evaluar la Tasa de Infección Hospitalaria asociada a dispositivos invasivos en Unidades de Cuidados Intensivos en México: Comparación con Tasas Americanas de NNIS. 2004. [http://www.inicc.org/esp/trabajo\\_ind.php](http://www.inicc.org/esp/trabajo_ind.php)
7. Calle, J.; Rivera, A.; Joseph-Nathan, P. Pinitol from the leaves of *Gliricidia sepium*. *Planta Medica* **1987**, 25, 303-306.
8. Essawi, T., Srour, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 343–349.
9. Galindo W. F.; Rosales M.; Murgueitio E. y Larra hondo J. E. Sustancias antinutricionales en las hojas de guamo, nacedero y matarraton. *Livestock Research for Rural Development* 1 (1), 1-10 1989.
10. Glover, N. *Gliricidia*: Production and Use; Nitrogen Fixing Tree Association: Honolulu, HI, 1989; 44 pp.

11. Gupta MP. *Gliricidia sepium*. In 270 Plantas Medicinales Iberoamericanas 1st edición, Bogota: Presencia Ltda. 1995: 378-379.
12. Herath, H. M. T. B.; Dassanayake, R. S.; Priyadarshani, A. M. A.; De Silva, S.; Wannigama, G. P.; Jamie, J. Isoflavonoids and Pterocarpan from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 117-119.
13. Jurd, L.; Manners, G. D. Isoflavene, isoflavan, and Flavonoid constituents of *Gliricidia sepium*. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 723-726.
14. Khan, M.R., Ndaalio, G., Nkunya, M.H.H., Wevers, H., Sawhney, A.N., 1980. Studies on African medicinal plants. Part 1: Preliminary screening of medicinal plants for antibacterial activity. *Planta Medica Supplement*, 91–97.
15. Martinez G, Alpuche C, Anaya C, Alcántara D, Gayosso C, Danza et al. Outbreak of nosocomial sepsis and pneumonia in a Newborn Intensive Care Unit by multiresistant extended- $\beta$ -lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae*: High impact on mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; *22*:725-728.
16. Manners, G. D.; Jurd, L. Additional flavonoids from *Gliricidia sepium*. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1037-1042.
17. Miranda G, Castro N, Leaños B, Venezuela A, Garza-Ramos U, Rojas T et al. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended- $\beta$ -lactamase- producing *Klebsiella pneumoniae* in Mexican pediatric Hospital- *J Clin Microbiol* 2004; *42*: 30-35
18. Rabe T.; Van J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purpose. *J. Ethnopharmacol* 1997, *56*: 81-87
19. Rojas J.J.; Ochoa V.J.; Ocampo S. A. and Muñoz J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. Vol, pg1-6, 2006
20. Takeda, S., Yasunaka, K., Kono, K., Arakawa, K., 2000. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated at Fukuoka University Hospital and hospitals and clinics in the Fukuoka city area. *International Journal of Antimicrobial Agents* *14*, 39–43.
21. Samy, R.P., Ignacimuthu, S., Sen, A., 1998. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology* *62*, 173–182.

22. Shibutani, S.; Igarashi, K.; Samejima, M and Saburi, Y. 1999 Antimicrobial Activity of extracts from Conifer Bark. In 10 th International symposium on Wood and pulping Chemistry. Yokohama, Japan. Tomo II, 28-31 pp.
23. Shah PM. The need for new therapeutics agents: what is in the pipeline? *Clinical Microbiology and infections* 2005, 11: 36-42.
24. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza U, Velásquez M, et al. Outbreak of infection with extended- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital- *J Clin Microbiol* 2001;39: 3193-3196
25. Vernon M, Trick W E, Welbel SF, Peterson BJ, Weinstein RA. Adherence with hand hygiene: Does number of sinks matter?. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24:224-225.
26. Yasunaka, K., Kono, K., 1999. Epidemiological study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Fukuoka University Hospital. *Microbial Drug Resistance* 5, 207–213.
27. Whetton, M.; Rossiter, J. T.; Wood, C. D. Nutritive evaluation of nitrogenous fractions in leaves of *Gliricidia sepium* and *Calliandra calothyrsus* in relation to tannin content and protein degradation by rumen microbes *in vitro*. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 3570-3576.