

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES Y
SUBFRACCIONES ACTIVAS, OBTENIDAS A PARTIR DE HOJAS DE *Elaeagia utilis*
SOBRE *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y
Staphylococcus aureus.

LADY JOHANA SAAVEDRA RAMÍREZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar por el título de

MICROBIÓLOGA INDUSTRIAL

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

2010

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES Y
SUBFRACCIONES ACTIVAS, OBTENIDAS A PARTIR DE HOJAS DE *Elaeagia utilis*
SOBRE *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y
Staphylococcus aureus.

LADY JOHANA SAAVEDRA RAMÍREZ

INGRID SCHULER Ph. D.

Decana Académica

Facultad de Ciencias

Janeth Arias Palacios M.Sc .Ed

Directora Carrera de Microbiología Industrial

Facultad de Ciencias

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE FRACCIONES Y
SUBFRACCIONES ACTIVAS, OBTENIDAS A PARTIR DE HOJAS DE *Elaeagia utilis*
SOBRE *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y
Staphylococcus aureus.

LADY JOHANA SAAVEDRA RAMIREZ

APROBADO

FREDY GAMBOA Ph. D.

DIRECTOR

ALBA NOHEMI TELLEZ Dr. Sc.

CO-DIRECTORA

ELIZABETH GIL ARCHILA M. Sc.

PAR ACADEMICO

Doctora

Janeth Arias Palacios

Directora Carrera de Microbiología Industrial

Facultad de Ciencias

Respetada Doctora:

Con la presente comunicación, hacemos constar que el trabajo de grado titulado: Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones y subfracciones activas, obtenidas a partir de hojas de *Elaeagia utilis* sobre *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Realizado por la estudiante Lady Johana Saavedra Ramírez ha sido revisado y corregido de acuerdo con las observaciones sugeridas por los jurados en la sustentación.

En constancia se firma, a los 13 días del mes de Junio del año 2011.

Cordialmente,

NOMBRE Fredy Gamboa

FIRMA Fredy Gamboa J.

DIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Alba Fabiani Celis J.

FIRMA Alba Fabiani Celis J.

CODIRECTOR TRABAJO DE GRADO

NOMBRE Elizabeth Gila

FIRMA Elizabeth Gila

JURADO TRABAJO DE GRADO

FIRMA _____

JANETH ARIAS PALACIOS M.Sc M.Ed

DIRECTORA CARRERAS DE MICROBIOLOGÍA

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia “.

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación de este proyecto.

Al Centro de Investigaciones Odontológicas y al Grupo de Investigación en Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana (GIFUJ) por facilitar instalaciones y equipo para la realización de este proyecto.

Al Doctor Fredy Gamboa y a la Doctora Nohemí Téllez por haberme brindado toda su atención, colaboración y apoyo durante la ejecución de este trabajo de grado.

A Jennifer Aldana y a la profesora Elizabeth Gil por su entera colaboración.

A mi familia y a Juan Camilo García por el interés y apoyo incondicional que me brindaron durante este tiempo.

A mis amigos por su constante acompañamiento.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	2
2. JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 CARIES DENTAL Y TRATAMIENTO SINTÉTICO.....	4
3.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL.....	5
3.3 PRODUCTOS NATURALES.....	5
4. OBJETIVOS.....	6
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	6
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
5. METODOLOGÍA.....	7
5.1 DISEÑO.....	7
5.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	7
5.3 VARIABLES	7
5.4 PROCEDIMIENTO	7
5.4.1 Obtención de fracciones	7
- Material vegetal	7
- Obtención de extractos y fracciones	8
5.4.2 Subfraccionamiento del floculo etanólico	8
- Decoloración con carbono activado.....	8
- Obtención de subfracciones	8
- Cromatografías	8

5.4.3	Evaluaciones de la actividad antimicrobiana de las fracciones.....	9
-	Cepas a evaluar.....	9
-	Evaluación de la actividad antimicrobiana	9
-	Evaluación microbiológica de las fracciones negativas y positivas con menor volumen por pozo.....	9
-	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	10
-	Estudio químico preliminar.....	10
5.5	ESTRATEGIA DE ANÁLISIS.....	10
6.	RESULTADOS.....	10
6.1	OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES Y SUBFRACCIONES	10
6.2	EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DE FRACCIONES Y SUBFRACCIONES OBTENIDAS.....	11
6.2.1	Evaluación microbiológica de fracciones obtenidas por fraccionamiento líquido/ líquido del extracto etanólico.....	11
6.2.2	Evaluación microbiológica de subfracciones obtenidas por fraccionamiento por columna del floculo etanólico.....	11
6.3	EVALUACIÓN DE FRACCIONES QUE PRESENTARON Y NO PRESENTARON ACTIVIDAD ANTMICROBIANA EN LA EVALUACIÓN INICIAL.....	11
6.3.1	Evaluación microbiológica de fracciones por método fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por fraccionamiento por columna del floculo etanólico, que presentaron actividad antimicrobiana.....	12
6.3.2	Evaluación microbiológica de fracciones por método fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por fraccionamiento por columna del floculo etanólico, que no presentaron actividad antimicrobiana.....	12

6.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	13
6.5 PRUEBAS QUÍMICAS PRELIMINARES.....	14
7. DISCUSIÓN.....	15
8. CONCLUSIONES.....	17
9. RECOMENDACIONES.....	18
10. BIBLIOGRAFÍA.....	19

ANEXOS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variables cualitativas y cuantitativas evaluadas en el estudio.....	7
Tabla 2. Halos de susceptibilidad en mm (promedio de réplicas) producidos contra <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> , al ser enfrentados a las fracciones obtenidas por método de fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y las subfracciones obtenidas del floculo etanólico.....	11
Tabla 3. Halos de susceptibilidad en mm (promedio de réplicas) producidos contra <i>S. mutans</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> , al ser enfrentados a las fracciones obtenidas por método de fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y obtenidas del fraccionamiento por columna del floculo etanólico, con actividad antimicrobiana positiva y negativa en la primera evaluación.....	12
Tabla 4. Datos de Concentración Mínima Inhibitoria arrojados luego de la evaluación de cada una de las concentraciones de fracciones del extracto etanólico y subfracciones del flóculo etanólico frente a cada uno de los microorganismos.....	13
Tabla 5. Pruebas Químicas Preliminares de cada una de las fracciones del extracto etanólico y subfracciones del flóculo etanólico.....	14

INDICE DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
BuOH	Butanol
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetil Sulfoxido
EtOH	Etanol
Hex: AcOEt	Hexano: Acetato de Etilo
Hex	Hexano
MTT	Sal de Tetrazolium
Tol	Tolueno

RESUMEN

Este estudio se encuentra incluido dentro del proyecto realizado por el Grupo de Investigación de Fitoquímica (GIFUJ) y el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO), el cual se titula "Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones obtenidos de dos especies de la familia Rubiaceae: *Iserfia laevis* y *Elaeagia utilis*", se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de hojas de *Elaeagia utilis*, colectadas en Albán (Cundinamarca), estos extractos fueron fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por fraccionamiento por columna del floculo etanólico y la evaluación fue sobre microorganismos causales de la caries y enfermedades periodontales. Se encontraron varias fracciones y subfracciones activas frente a *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* CIO 428, *S. aureus* CIO 322 y *E.coli* CIO 325, dentro de las cuales la fracción CH₂Cl₂ fue la que presento mayor actividad inhibitoria sobre los microorganismos. Se evaluaron diferentes concentraciones para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de cada una de las fracciones y subfracciones contra cada microorganismo, para la fracción CH₂Cl₂ se establecieron valores de 0.5 mg/pozo, 0.25 mg/pozo, 0.1 mg/pozo y 2 mg/pozo como CMI de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E.coli*, respectivamente. Por otra parte, se realizaron pruebas químicas preliminares para establecer posibles compuestos que sean responsables de la presencia de actividad antimicrobiana de cada una de las fracciones y subfracciones evaluadas, dentro los cuales hubo gran presencia de terpenos y flavonoides.

Palabras claves: Actividad antimicrobiana, caries dental, enfermedades periodontales, extractos vegetales, *Elaeagia utilis*.

1. INTRODUCCIÓN

La caries dental y las patologías periodontales son las enfermedades infecciosas más comunes que afectan la humanidad. La prevalencia de enfermedad de los dientes y los tejidos de sostén en Colombia representan la primera causa de morbilidad entre niños de 5 a 14 años y se encuentra en las diez primeras causas de consulta en las instituciones de salud de la población en general [1] y la periodontitis severa compromete a 8 - 10 % de la población adulta [2].

Los agentes causales de estas enfermedades son microorganismos presentes en la cavidad bucal que van formando placa bacteriana o biofilm acumulándose así en la superficie de los dientes, lo que provoca el desarrollo de dichas patologías y puede resultar en la pérdida de los dientes si no se somete a tratamiento [3].

En la actualidad, se cuenta con varios productos, sustancias o medicamentos que actúan directamente sobre los efectos que produce la caries dental, como lo son el flúor, flúor sistémico, clorhexidina, xilitol entre otros [4]. Por parte de enfermedades periodontales se cuenta con antisépticos bisguanide, antisépticos de amonio cuaternario, antisépticos fenólicos y otro tipo de tratamientos como agentes oxigenantes e iones metálicos [5], pero existe algo en común con estos tratamientos químicos y es que suelen tener efectos secundarios como lo son tinción de los dientes, variedades en el sabor de alimentos, sensación de ardor en la punta de la lengua, alteración de la flora bacteriana intestinal y la flora bucal benéfica, generación de resistencia por parte de los microorganismos [6], es por esto que para contrarrestar estos efectos negativos en los pacientes, se ha impulsado la búsqueda de nuevos compuestos provenientes de las plantas que sustituyan los métodos sintéticos para así garantizarle al paciente un tratamiento sin efectos secundarios. Los estudios biodirigidos, son una fuente útil de reconocimiento de fracciones activas en las cuales se reconocen metabolitos secundarios con actividad biológica; en estos, el uso de fracciones o extractos obtenidos del material vegetal (obtenidos a través del tratamiento o contacto con solventes orgánicos de diferentes polaridades), permiten el fraccionamiento de compuestos de acuerdo a la polaridad del solvente, para la posterior evaluación biológica y la identificación de metabolitos secundarios de interés [7]. Nuestro país posee una rica tradición en el uso de las plantas medicinales y una diversidad muy alta, se estima 51.200 especies de plantas vasculares [8], pero poca investigación se ha realizado en el contexto de fitoquímicos con uso terapéutico, dada esta circunstancia, este trabajo pretende identificar fracciones activas

de la planta *Elaeagia utilis*, las cuales presenten actividad antimicrobiana contra cuatro microorganismos de la cavidad bucal y de tal forma realizar un estudio químico preliminar de las mismas para llegar a establecer posibles metabolitos secundarios presentes en dichas fracciones.

Este trabajo hace parte del proyecto de investigación titulado “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos y fracciones obtenidos de dos especies de la familia Rubiaceae: *Isertia laevis* y *Elaeagia utilis*”, fue financiado por la Pontificia Universidad Javeriana y realizado gracias al esfuerzo conjunto de GIFUJ y el CIO.

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades periodontales y la caries dental se consideran como unas de las enfermedades públicas más comunes a nivel mundial [9]. Las dos enfermedades tienen varios factores importantes que influyen en su desarrollo, tales como condiciones socio-económicas y regionales [10], condición inmunológica del huésped [11], conductuales y microorganismos como agentes causales [12], entre otros. Este último, tiene un papel trascendental en el desarrollo de la enfermedad, se conocen varias especies de microorganismos específicos en cada una de ellas, para esta investigación se trabajaran, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Aunque químicamente se han sintetizado sustancias altamente efectivas para eliminar este tipo de microorganismos, su uso excesivo puede llegar a alterar la flora intestinal, inducir resistencia bacteriana, entre otros [13]. Teniendo en cuenta los efectos negativos del tratamiento de las caries con productos sintéticos, se ha intensificado en gran medida la necesidad de buscar nuevas alternativas provenientes de fuentes alternas como compuesto naturales, que presenten la misma efectividad de los tratamientos químicos actuales. El estudio realizado por Alvarado A, *et al*; 2008, estableció la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana en algunas especies de la familia Rubiaceae contra microorganismos relacionados con la caries [13]. El género *Elaeagia* perteneciente a la familia Rubiaceae, está ampliamente distribuido en nuestro país y es de fácil acceso para las comunidades quienes lo reconocen por la generación de resinas que son utilizados en actividades artesanales [14], pero este no ha sido evaluado ni identificado por medio de estudios fitoquímicos, para así determinar la presencia o no de principios

activos contra microorganismos de importancia patológica. Por esto se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿Posee *Eleaegia utilis* sustancias o compuestos químicos que le confieran actividad biológica contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

3. MARCO TEÓRICO

3.1 CARIES DENTAL Y TRATAMIENTO SINTÉTICO

La caries dental se considerada como uno de los mayores problemas de salud buco-dental en la mayoría de países industrializados, llegando a afectar entre 60% y 90% de la población escolar y adulta, respectivamente [15]. Por su parte en Colombia, la caries dental es la enfermedad oral de mayor prevalencia en la población adolescente donde sus efectos aumentan con la edad. La caries dental es un proceso o enfermedad dinámica crónica, que ocurre en la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos y debido al desequilibrio entre la sustancia dental y el fluido de placa circundante, dando como resultado una pérdida de mineral de la superficie dental, cuyo signo es la destrucción localizada de tejidos duros. Se clasifica como una enfermedad transmitible e irreversible [16] [1], por ser un proceso dinámico se considera resultado de la intervención de cuatro factores principales: el agente (microbiota), el sustrato (dieta), el huésped (diente) y el medio ambiente (saliva) [17]. Los principales microorganismos asociados a la producción de caries son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* spp y *Actinomyces* spp. [18], los cuales colonizan el diente y son capaces de producir daño. Existen múltiples grupos de sustancias químicas utilizadas en el control de la placa bacteriana, a través de la detección o retraso de la proliferación bacteriana con antimicrobianos; entre ellos los más utilizados son los antibióticos (penicilina, vancomicina, espiramicina, etc.), compuestos de amonio cuaternario (cloruro de cetilpiridinio), el triclosan, los fluoruros, la hexetidina, la clorhexidina, los compuestos fluorados y los fenoles y aceites esenciales [19].

3.2 ENFERMEDAD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal constituye una de las alteraciones más frecuentes de la cavidad bucal y afecta a la población en diversas formas si se tiene en cuenta las condiciones económicas, sociales y culturales de los individuos llegando a ser una de las principales causas de pérdidas de los dientes. El tercer estudio nacional de salud bucal

(ENSAB III) informa que en 1998 el 92,4 % presentaba por lo menos un parámetro de esta enfermedad [20]. El termino enfermedad periodontal, se refiere a un conjunto de enfermedades inflamatorias que afectan los tejidos de soporte del diente, encía, hueso y ligamento periodontal. Se considera el resultado del desequilibrio entre la interacción inmunológica del huésped y la flora de la placa dental marginal que coloniza el surco gingival [11].

La microbiología bucal de la periodontitis se ha asociado con bacterias como *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Enterococcus* sp. y hongos, básicamente *Candida*, tanto *albicans* como no *albicans*. El tratamiento de estos microorganismos se debe realizar con procedimientos odontológicos específicos, además de la utilización de antimicrobianos sistémicos usados tradicionalmente para el tratamiento de las periodontitis. Sin embargo, últimamente se ha presentado poca sensibilidad de estos microorganismos con los antibióticos comúnmente usados, lo que lleva, a que el proceso infeccioso no sea inhibido efectivamente, sino que por el contrario se esté perpetuando y concluya con la pérdida del diente o lesiones óseas, además de la morbilidad bucal asociada [21].

3.3 PRODUCTOS NATURALES

Solo una pequeña parte de la diversidad entre los hongos, la fauna y la flora han sido explorada. La investigación actual sobre las moléculas y productos naturales se centra principalmente en las plantas, ya que pueden obtenerse con mayor facilidad y ser seleccionadas sobre la base de la etno-medicina [22]. A través del tiempo se han establecido que los aceites esenciales de las plantas son los responsables del efecto positivo en el tratamiento de enfermedades infecciosas, patologías en el sistema respiratorio, el tracto urinario, gastrointestinal y piel [23].

Actualmente ha aumentado el interés de investigación por parte de la comunidad científica dedicada a la investigación de las propiedades medicinales de las plantas. En los mismos estudios se encuentran distintos criterios a evaluar muchos se centran en determinar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas que se encuentran en la medicina popular [24], aceites esenciales [25] o compuestos aislados, como los alcaloides [26], flavonoides [27], lactonas sesquiterpénicas [28], diterpenos [29], triterpenos [30] o naftoquinonas [31], entre otros. Algunos de estos compuestos se aíslan o se obtienen por

el aislamiento biodirigido y posteriormente se realiza la detección de actividad antimicrobiana por parte de la planta [23].

En Colombia se han realizado algunos estudios sobre la actividad antimicrobiana de compuestos activos provenientes de plantas sobre microorganismo en la cavidad bucal; Perdomo M. *et al*; 2009, reporta las fracciones metanol y diclorometano activas de hojas de *Iseritia laevis* contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* [32] y por otro lado Aldana J; 2010, reporta también la fracción diclorometano como fracción activa a partir de hojas de *Elaeagia utilis* contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus* [14].

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de fracciones y subfracciones a partir de hojas de *Elaeagia utilis* sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, los cuales se encuentran asociadas a la caries dental y enfermedades periodontales.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto antimicrobiano sobre *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli* de fracciones obtenidas a partir de hojas de *Elaeagia utili*, así mismo como determinar si existe reproducibilidad de dichos resultados con relación al estudio realizado por Aldana J, (2010).
2. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de la fracción(es) activa(s), contra *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli*.
3. Realizar un estudio químico preliminar a la fracción o fracciones que resulten activas contra *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli*

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño: El presente estudio es una investigación básica- descriptiva- transversal –prospectivo.

5.2 Población y Muestra: La muestra y el muestreo será por conveniencia.

5.3 Variables

Tabla 1. Variables cualitativas y cuantitativas evaluadas en este estudio.

VARIABLES	UNIDAD DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
Cepas	-----	Variable independiente Cualitativa – Nominal.
Actividad antimicrobiana	Ausencia (<1 mm)	Variable dependiente Cuantitativa – Razón.
	Presencia (\geq 1 mm)	
Extractos vegetales	mg / pozo	Variable independiente cualitativa – Nominal.
Componentes antimicrobianos de la(s) fracción(es) activa(s).	Positiva	Variable cualitativa – independiente – Razón.

5.4 Procedimiento

5.4.1 Obtención de fracciones

1. **Material vegetal:** Se colectaron en campo muestras de hojas de la especie *Elaeagia utilis*; aproximadamente 2,3 K, en el departamento de Cundinamarca, municipio de Albán, vereda Java, en la Fundación Granjas Infantiles del Padre Luna. La determinación taxonómica para este ejemplar fue realizada por H. Bernal del Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana como *Elaeagia utilis*, encontrándose un ejemplar depositado en el Herbario de esta institución. El material de hojas fue secado a temperatura ambiente, y posteriormente molido y pulverizado con la ayuda de un molino de cuchillas.

2. **Obtención de fracciones:** Los extractos y fracciones a partir de las hojas de *Elaeagia utilis* se obtuvieron en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Básicas de la Pontificia Universidad Javeriana, de acuerdo al siguiente protocolo:

- **Obtención de Extracto Etanólico:** Del material vegetal seco y molido se extrajo una fracción inicial Etanólica, la cual se obtuvo del tratamiento en frío del material con etanol durante 72 horas. El extracto etanólico se concentro en un rotaevaporador a presión reducida para posteriormente llevar a sequedad.
- **Floculación:** Se puso en contacto el extracto etanólico con etanol-agua y se dejo 24 horas, posteriormente se filtró y se concentró en rotaevaporador hasta sequedad.
- **Obtención de las fracciones:** Se tomo el extracto etanólico luego de la floculación y se le realizó una extracción líquido-líquido, en un embudo de decantación, usando

cuatro solventes de diferentes polaridades, para finalmente conseguir las fracciones Hexano, Tolueno, Diclorometano y Butanol.

5.4.2 Subfraccionamiento del flóculo etanólico

- **Decoloración con carbón activado:** A partir del floculo etanólico, obtenido por Aldana J; 2010, se tomaron 10 g los cuales fueron disueltos en etanol, posteriormente se adiciono carbono activado, se calentó a 125 °C aproximadamente y se agitó hasta ebullición. Finalmente, se filtró y se concentró en rotaevaporador a presión reducida hasta sequedad.
- **Obtención de las subfracciones:** A partir del floculo etanólico decolorado se tomo 2 g de la muestra la cual se mezcló con silica gel. La muestra, ya preparada, se paso por columna de cromatografía al vacío con fase estacionaria silica gel, adicionando solventes de diferentes polaridades Hex (100 mL), Hex: AcOEt (8:2) (100 mL), Hex:AcOEt (7:3) (100 mL), Hex: AcOEt (6:4) (100 mL), Hex: AcOEt (1:1) (100 mL),Hex: AcOEt (3:7) (100 mL), AcOEt (100 mL) y EtOH (100 mL).
- **Cromatografías:** Se montaron placas cromatográficas para lograr establecer similitudes entre las fracciones obtenidas y así determinar si se podían o no mezclar para posteriormente realizar la evaluación antimicrobiana (Anexo 4).

5.4.3 Evaluaciones de la actividad antimicrobiana de las fracciones

1. Cepas a evaluar: Cuatro cepas de cavidad oral (*Streptococcus sobrinus* (CIO 428), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus* (CIO 322) y *Escherichia coli* (CIO 325)), asociadas a caries dental y a enfermedades periodontales, suministradas por el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la Pontificia Universidad Javeriana fueron evaluadas.

2. Evaluación de la actividad antimicrobiana:

Método de difusión en pozo: La actividad antimicrobiana de los extractos, fracciones y subfracciones frente a las bacterias se realizó, de acuerdo al método de difusión en pozo descrito por Dobner M. *et al*; 2003 [33], en el cual a partir de un cultivo puro de cada una de las bacterias a evaluar, se realizó una suspensión ajustada por turbimetría a la escala 0,5 de Mac Farland. De esta suspensión se tomaron 100 µl que se agregaron a 20 ml de agar Mueller Hinton (antes de que se solidificara), se mezcló y se sirvió en caja de petri.

Luego de solidificar, se hicieron pozos de 0,5 cm de diámetro sobre el agar usando pipetas Pasteur invertidas previamente esterilizadas. En cada pozo en forma independiente se aplicaron 30 µl de la fracción o subfracción disuelta en dimetilsulfoxido (DMSO) con una concentración de 0,5 mg/pozo, utilizando como control positivo 150 µl de vancomicina o 125 µl de trimetoprima-sulfametoxazol y como control negativo 30 µl DMSO. Posteriormente, las cajas se incubaron a 37 °C durante 72 horas en anaerobiosis (sobre de anaerogen, Oxoid 5 L). La lectura de la prueba se realizó usando como indicador de viabilidad bacteriana Sal de Tretazolium (MTT) [34] para así determinar la presencia o no de zonas de inhibición y el tamaño de las mismas. Cada ensayo se realizó por duplicado.

3. Evaluación microbiológica de las fracciones negativas y positivas con menor volumen por pozo: Posteriormente de obtener los primeros resultados de actividad antimicrobiana, se optó por realizar dos ensayos los cuales incluían evaluar las fracciones negativas con el doble de la concentración (1 mg/pozo) que el ensayo inicial (0,5 mg /pozo) y por otra parte se evaluaron las fracciones y subfracciones activas con menor volumen, siendo en este caso 20 µl. Esta evaluación se ejecuto bajo los mismos parámetros de la evaluación microbiológica inicial.

4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria: La(s) fracción(es) activa(s), fueron evaluadas microbiológicamente con el método de difusión en pozo, a un rango de concentración decreciente, para reconocer cual es la mínima concentración de la fracción que inhibe el crecimiento visible de los microorganismos (*Streptococcus sobrinus* (CIO 428), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Staphylococcus aureus* (CIO 322) y *Escherichia coli* (CIO 325)).

5. Estudio químico preliminar: Para la realización de las pruebas químicas se sometieron a las fracciones activas a las pruebas de preliminares con los reactivos de Lieberman- Burchard (esteroides y esteroles), Salkowski (terpenos), Baljet (Terpenos-esteroles), Hidroxamato (Sesquiterpenos), Shinoda (Flavonoides), Cloruro férrico (flavonoides y fenoles), Antrona (glicosidos de flavonoides y terpenos), Dragendroff (alcaloides), así como se realizó la prueba de Espuma (saponinas) (Anexo 6).

5.5. ESTRATEGIA DE ANÁLISIS: El análisis de los datos se llevo a cabo con estadística descriptiva, mediante la obtención de media, desviación estándar y varianza de los datos de los halos de inhibición.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de las fracciones y subfracciones: A partir del extracto etanólico inicialmente elaborado, se obtuvieron fracciones de Hex, Tol, CH₂Cl₂ y BuOH. Además se realizó fraccionamiento del flóculo etanólico, de este se obtuvieron ocho subfracciones, las cuales fueron Hex: AcOEt (8:2), Hex:AcOEt (7:3), Hex: AcOEt (6:4), Hex: AcOEt (1:1), Hex: AcOEt (3:7), AcOEt, EtOH y EtOH (extracción discontinua). Posteriormente, se realizaron placas cromatográficas a cada una de las fracciones y subfracciones, para así de este modo identificar diferencias y similitudes entre ellas, por medio de este método se logró identificar que las fracciones Hex:AcOEt (7:3) y Hex: AcOEt (6:4), eran iguales, por lo que se procedió a realizar los estudios microbiológicos y químicos uniendo las dos fracciones (Anexo 4).

6.2 Evaluación microbiológica de fracciones y subfracciones obtenidas

6.2.1 Evaluación microbiológica de fracciones obtenidas por fraccionamiento líquido/ líquido del extracto etanólico: La evaluación microbiológica de estas fracciones se realizó a una concentración de 0,5 mg/pozo, encontrando una mayor inhibición con la fracción CH₂Cl₂ para tres de los microorganismos evaluados (*S. mutans*, *S. sobrinus* y *S.aureus*), para *E. coli* la única fracción que inhibió su crecimiento fue EtOH (Tabla 1. Anexo 5, figura 5).

6.2.2 Evaluación microbiológica de subfracciones obtenidas por fraccionamiento por columna del floculo etanólico: La evaluación microbiológica de estas subfracciones se realizó a una concentración de 0,5 mg/pozo. Se obtuvieron varias subfracciones activas para cada microorganismo, para *S.mutans* y *S.sobrinus*, la subfracción con mayor actividad fue Hex:AcOEt(1:1), para *S.aureus* se obtuvo Hex:AcOEt (7:3-6:4) como subfracción con mayor actividad y para *E.coli* la única subfracción activa fue EtOH. (Tabla 1. Anexo 5, figura 5).

Tabla 2. Halos de susceptibilidad en mm (promedio de replicas) producidos contra *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli*, al ser enfrentados a las fracciones obtenidas por método de fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y las subfracciones obtenidas del floculo etanólico.

Fracción	Microorganismos			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Hexano	0 mm	0 mm	14,5 mm	0 mm
Tolueno	0 mm	0 mm	16 mm	0 mm
CH ₂ Cl ₂	15 mm	16 mm	18,5 mm	0 mm
BuOH	0 mm	0 mm	8,5 mm	0 mm
Hex: AcOEt (8:2)	13,5 mm	11 mm	16 mm	0 mm
Hex:AcOEt (7:3 – 6:4)	10 mm	7 mm	18,5 mm	0 mm
Hex: AcOEt (1:1)	14,5 mm	12,5 mm	16,5 mm	0 mm
Hex: AcOEt (3:7)	0 mm	0 mm	17,5 mm	0 mm
AcOEt	0 mm	0 mm	16 mm	0 mm
EtOH	11 mm	0 mm	0 mm	11,5 mm
EtOH directo	0 mm	0 mm	13 mm	0 mm
Control positivo, Vancomicina	20 mm	23 mm	27,50 mm	0 mm
Control positivo, Trimetoprima-sulfametoxazol	17 mm	24,5 mm	20 mm	48,5 mm
Control negativo	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Fracciones que presentan mayor actividad.

6.3. Evaluación de fracciones que presentaron y no presentaron actividad antimicrobiana en la evaluación inicial

6.3.1 Evaluación microbiológica de fracciones por método fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por fraccionamiento por columna del floculo etanólico, que presentaron actividad antimicrobiana: Luego de realizar las primeras evaluaciones se establecieron las fracciones activas para cada microorganismo, la evaluación microbiológica se realizó a una concentración de 0,5 mg/pozo, teniendo una variación en la cantidad de cada pozo de 20 µl. Los resultados obtenidos mostraron que la fracción Hex:AcOEt (7:3-6:4) tuvo mayor actividad antimicrobiana para *S. mutans*, la fracción CH₂Cl₂ tuvo mayor actividad para *S. sobrinus*, con respecto a *S. aureus* la fracción con mayor actividad fue la AcOEt y para *E.coli* la única fracción evaluada no dio actividad (Tabla 2. Anexo 5, figura 6).

6.3.2 Evaluación microbiológica de fracciones por método fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por fraccionamiento por columna del floculo etanólico, que no presentaron actividad antimicrobiana: Luego de realizar las primeras evaluaciones se establecieron las fracciones que no

presentaron actividad para cada microorganismo, la evaluación microbiológica se realizó a una concentración de 1 mg/pozo. Los resultados mostraron como fracciones que se les duplico la concentración inicial llegaron a presentar inhibición bacteriana, siendo de esta forma la fracción con mayor actividad para *S. mutans* Hex:AcOEt (3:7), para *S. sobrinus* la fracción tolueno fue la que presentó mayor actividad, para *S. aureus* solo se midió la fracción EtOH, la cual fue la única que no presentó actividad en el ensayo de 0,5 mg/pozo, en este caso duplicando la concentración si ejerció inhibición frente a la bacteria y por su parte ninguna de las fracciones y subfracciones evaluadas dio actividad positiva para inhibición de *E.coli* (Tabla 2. Anexo 5, figura 6).

Tabla 3. Halos de susceptibilidad en mm (promedio de replicas) producidos contra *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli*, al ser enfrentados a las fracciones obtenidas por método de fraccionamiento líquido/líquido del extracto etanólico y obtenidas del fraccionamiento por columna del floculo etanólico, con actividad antimicrobiana positiva y negativa en la primera evaluación.

Fracción	Microorganismos			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Hexano	12,5 mm	12,5 mm	12,5 mm	0 mm
Tolueno	13 mm	14 mm	13,5 mm	0 mm
CH ₂ CL ₂	13,5 mm	17 mm	15 mm	0 mm
BuOH	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
Hex: AcOEt (8:2)	13 mm	11 mm	15 mm	0 mm
Hex:AcOEt (7:3– 6:4)	16 mm	13 mm	14 mm	0 mm
Hex: AcOEt (1:1)	12 mm	13,5 mm	13 mm	0 mm
Hex: AcOEt (3:7)	14 mm	9,5 mm	12 mm	0 mm
AcOEt	11,5 mm	13 mm	17 mm	0 mm
EtOH	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
EtOH directo	0 mm	0 mm	11 mm	0 mm
Control positivo, Vancomicina	24 mm	25 mm	15 mm	0 mm
Control positivo, Trimetoprima-sulfametoxazol	23 mm	21 mm	16 mm	30 mm
Control negativo	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

 Datos arrojados de las fracciones y subfracciones que NO presentaron actividad antimicrobiana en la primera evaluación.

 Fracciones que presentaron mayor actividad.

6.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Teniendo en cuenta los resultados obtenidos luego de las evaluaciones realizadas de las fracciones del extracto etanólico y subfracciones del floculo etanólico, se llevo a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria para cada una de estas. Se evaluaron concentraciones de 0.1 mg/pozo, 0.25 mg/pozo, 0.75 mg/pozo, 2 mg/pozo y 5 mg/pozo, los resultados se

muestran en la Tabla 3, los datos completos se encuentran en el anexo 3. (Anexo 5, figura 7)

Tabla 4. Datos de Concentración Mínima Inhibitoria arrojados luego de la evaluación de cada una de las concentraciones de fracciones del extracto etanólico y subfracciones del flóculo etanólico frente a cada uno de los microorganismos.

Fracciones	Microorganismos y sus respectivas CMI (mg/pozo)			
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Hexano	0,75	0,75	0,1	2
Tolueno	0,25	0,5	0,1	2
CH ₂ Cl ₂	0,5	0,25	0,1	2
BuOH	2	2	0,1	2
Hex:AcOEt (8:2)	0,1	0,1	0,1	2
Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	0,25	0,1	0,1	2
Hex:AcOEt (1:1)	0,1	0,1	0,1	
Hex:AcOEt (3:7)	0,75	0,75	0,1	
AcOEt	0,75	0,5	0,1	
EtOH directo	2		0,5	
EtOH	0,5		0,1	0,5

 Subfracciones que NO presentaron actividad antimicrobiana contra los microorganismos respectivos.

6.5. Pruebas químicas preliminares: Se tomo cada una de las fracciones del extracto etanólico y las subfracciones del flóculo etanólico y se realizaron las nueve pruebas químicas preliminares, siendo negativa la prueba Lieberman-Burchard para todas las fracciones y subfracciones, Salkowski negativa para fracciones Hex y Tol y positiva para las demás de fracciones, Baljet positiva para todas las fracciones y subfracciones, prueba de Hidroxilamina negativa solo para dos subfracciones Hex:AcOEt (8:2) y para EtOH directo, Shinoda todas las fracciones y subfracciones presentaron formación de gas la fracción CH₂Cl₂ fue la única que presentó el color característico, prueba de cloruro férrico resultado negativa para las fracciones Hex y Tol y para la subfracción Hex:AcOEt (8:2), la prueba Antrona resultado positiva solo para las fracciones (Hex, Tol, CH₂CL₂ y BuOH), Dragendrof resultado positiva solo para las fracciones Tol y CH₂Cl₂ y para la subfraccion AcOEt y por último la prueba de espuma resultado positiva solo para las fracciones CH₂CL₂ y BuOH y para las subfracciones Hex:AcOEt (8:2) y EtOH (Tabla 4. Anexo 5, figura 7).

Tabla 5. Pruebas Químicas Preliminares de cada una de las fracciones del extracto etanólico y subfracciones del flóculo etanólico

Fracciones y Subfracciones	Pruebas Químicas Preliminares								
	Lieberman-Burchard (Esteroides y Esteroles)	Salkowski (Terpenos)	Baljet (Terpenos-esteroles)	Hidroxilamina (Sesquiterpenos)	Shinoda (Flavonoides)	Cloruro férrico (Flavonoides y fenoles)	Antrona (Glicosidos de flavonoides y terpenos)	Dragendrof (Alcaloides)	Espuma (Saponinas)
Hex	-	-	+	+	-*	-	+	-	-
Tol	-	-	+	+	-*	-	+	+	-
CH ₂ CL ₂	-	+	+	+	+	+	+	+	+
BuOH	-	+	+	+	-*	+	+	-	+
Hex:AcOEt (8:2)	-	+	+	-	-*	-	-	-	+
Hex:AcOEt (7:3)	-	+	+	+	-*	+	-	-	-
Hex:AcOEt (1:1)	-	+	+	+	-*	+	-	-	-
Hex:AcOEt (3:7)	-	+	+	+	-*	+	-	-	-
AcOEt	-	+	+	+	-*	+	-	+	-
EtOH	-	+	+	+	-*	+	-	-	+
EtOH dir.	-	+	+	-	-*	+	-	-	-

*: Presencia de gas pero no formación de color. Prueba Negativa: -, Prueba Positiva: +

7. DISCUSIÓN

Han sido muchos los estudios realizados a través del tiempo los cuales han permitido establecer que extractos de diferentes especies vegetales muestran actividad antimicrobiana frente a microorganismos de cavidad bucal, es el caso de las familias Fabáceas [35][36], Asteracea [37], Vitaceae [38], Rosaceae [39], Moraceae [40], Myristicaceae [41], Rubiaceae [42] [43]; entre otras, de la familia Rubiaceae se ha estudiado la especie *Iserfia laevis*, la cual ha demostrado tener actividad antimicrobiana contra dichos microorganismos [13] [32], y la especie *Elaeagia utilis*, la cual también fue estudiada y demostrada su actividad antimicrobiana por Aldana J. (2010) [14].

En este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de hojas de *Elaeagia utilis* frente a *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli*, los cuales son agentes causales de caries dental y enfermedades periodontales. Teniendo en cuenta los resultados encontrados, en la evaluación microbiológica se pudo observar de manera general que aunque fueron muchas las fracciones y subfracciones que presentaron actividad, la fracción CH₂CL₂ fue la que presentó mayor actividad antimicrobiana frente a *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli* teniendo como CMI 0,5 mg/pozo, 0,25 mg/pozo, 0,1 mg/pozo y 2 mg/pozo respectivamente. Los resultados de *S. mutans* y *S. sobrinus* concuerdan con lo reportado por Aldana J.; 2010 [14], ya que su estudio incluía estos dos microorganismos, donde la fracción CH₂CL₂ también presentó mayor actividad encontrando halos de inhibición de 15

mm y 17 mm. En cuanto a *S.aureus* y *E. coli* no se tiene registro de estudios de actividad antimicrobiana con la especie *Elaeagia utilis* por lo que no hay parámetros directos de comparación en cuanto a resultados, pero este estudio logro aportar que esta especie vegetal tiene actividad antimicrobiana contra dichos microorganismos.

Según More G. *et al*; 2008 [6] quienes realizaron un estudio con extractos etanólicos de ocho plantas tradicionalmente usadas en el tratamiento de enfermedades bucodentales en el sur de África, las bacterias Gram negativas resultan más resistentes a los extractos de ciertas plantas esto también lo comprobó Zohri A. *et al* (1998) [44], quien determinó que las bacterias Gram positivas presentaban mayor actividad de inhibición a partir de extractos vegetales, mientras que las Gram negativas no, esto debido a la gran cantidad de mecanismos de resistencia con los que cuentan [45], es así como en los estudios muestran halos de inhibición muy pequeños [44]. Esto explica porque las bacterias Gram positivas (*S. mutans*, *S. sobrinus* y *S. aureus*) evaluadas en este estudio arrojaron mayores datos de inhibición con menores concentraciones que la bacteria Gram negativa (*E.coli*), ya que, aunque esta presentó mayor inhibición por parte de la fracción CH₂CL₂, dicha fracción tuvo que ser aumentada más del doble para que evidenciara actividad antimicrobiana (15 mm) (Anexo 3), cabe resaltar que la fracción EtOH también dio actividad positiva pero esta con menor concentración (0,5 mg/pozo) sin embargo, no fue mayor la inhibición que la presentada por la fracción CH₂CL₂.

De acuerdo con estudios realizados [43], existen varios géneros de la familia Rubiaceae con actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli* específicamente algunos de ellos son *Benkara malabárica*, *Anthium dicocum*, *Haldina cordifolia*, entre otras. Realizado este estudio se puede establecer que la especie *Elaeagia utilis* también tiene actividad antimicrobiana contra esta bacteria generada por la acción de la fracción CH₂CL₂ (2mg/pozo) obtenida a partir del extracto etanólico, la cual genero la formación de un halo de 15 mm (Tabla 1). Para *S. aureus* también se habían realizado estudios con especies de la familia Rubiaceae, [42], más específicamente la especie *Hamelia patens*, la cual fue comprobada su actividad contra dicho microorganismo, en este caso este estudio permite establecer que la especie *Elaeagia utilis* perteneciente a la familia Rubiaceae también presenta actividad antimicrobiana frente a este microorganismo, siendo el más sensible en el estudio debido a que la mayoría los extractos lo inhibieron. En cuanto *S. mutans* y *S. sobrinus*, con este estudio se reafirma la actividad antimicrobiana de extractos vegetales a partir de las hojas de *Elaeagia utilis* por parte de la fracción CH₂CL₂, así como en el

estudio de Aldana J.; 2010 [14], lo que conlleva así mismo a establecer reproducibilidad de dichos resultado.

S. mutans, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E.coli* son anaerobios facultativos [46] [47], por lo que se incubaron en condiciones de anaerobiosis. Debido a que los extractos vegetales están constituidos por sustancias de diversas características, no es posible comparar su potencia con respecto al control positivo, solo se puede determinar para cada microorganismo el grado de actividad del extracto en relación con el control positivo, es decir a la presencia y tamaño de las zonas de inhibición [42]. Los controles positivos utilizados fueron la vancomicina el cual es un antibiótico glicopéptido de espectro reducido que actúa con gran eficacia frente a bacterias Gram positivas inhibidor de la síntesis de peptidoglicano [48] y Trimetoprima-sulfametoxazol, perteneciente a las sulfamidas de amplio espectro, el cual actúa bloqueando la ruta de síntesis del ácido fólico con igual efectividad en bacterias Gram negativas y Gram positivas [48]

Los metabolitos secundarios, son productos naturales que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida del organismo y tienen funciones particulares, a las que se les asocia con actividad antimicrobiana en algunos casos, es por ello que se realizaron las pruebas químicas preliminares para así establecer que compuestos pertenecían a cada una de las fracciones y subfracciones, según los resultados obtenidos (Tabla 4) se puede ver que se encontró presencia de fenoles, a los cuales se les ha asociado su actividad antimicrobiana con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, se evidenció la presencia de flavonoides los cuales están relacionadas con la formación de complejos con las proteínas solubles y con la pared bacteriana lo que causa inactivación de la misma, alcaloides los cuales al parecer tienen como mecanismo de acción la intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo [49]. Teniendo en cuenta la fracción que presentó la mayor actividad antimicrobiana (CH_2Cl_2) se puede decir que esta contiene bastantes metabolitos secundarios los cuales posiblemente podrían ser los responsables de la inhibición de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E.coli*. En cuanto a *E.coli*, la cual demostró cierta resistencia ante los extractos se ha establecido que las saponinas poseen la capacidad de inhibir su crecimiento [49], esto explicaría el porqué las fracciones que presentaron inhibición ante esta bacteria Gram negativa ejercieron dicha actividad antimicrobiana. Por otro lado se tienen registros que en la familia Rubiaceae las especies que tienen actividad antimicrobiana presentan triterpenos como componente mayoritario [50], dichos componentes efectivamente se

encuentran presentes en muchas de las fracciones y subfracciones que presentaron actividad frente a los microorganismos.

8. CONCLUSIONES

1. Las fracciones y subfracciones aisladas de hojas de *Elaeagia utilis* evidenciaron actividad antimicrobiana contra las cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, lo que hace de esta especie una importante fuente de compuestos con actividad antimicrobiana frente a microorganismos causales de caries dental y enfermedades periodontales.
2. Se estableció que la fracción CH₂CL₂, fue la que tuvo mayor actividad antimicrobiana para *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. aureus* y *E. coli*.
3. Se logró establecer para cada una de las fracciones y subfracciones la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a cada uno de los microorganismos.
4. Se determinó para cada una de las fracciones y subfracciones los componentes químicos relevantes, los cuales podrían ser los causales de la actividad antimicrobiana.
5. A partir del estudio realizado se puede concluir que este tipo de evaluación es reproducible debido a que los resultados obtenidos fueron iguales a los obtenidos por Aldana, J. (2010), en cuanto a la evaluación de la actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*.

9. RECOMENDACIONES

A partir de los datos recolectados se recomienda purificar los componentes activos de las fracciones que resultaron activas para así establecer los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

Realizar estudios in vivo para de esta forma evaluar la actividad antimicrobiana contra los microorganismos causales de la caries dental y enfermedades periodontales.

Evaluar y establecer posibles efectos secundarios que causen dichos extractos o componentes activos sobre los pacientes.

Usar las fracciones activas encontradas en este estudio para evaluar otros microorganismos causales de patologías a nivel de cavidad bucal.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gamboa L. Epidemiología de la caries. *Univers Odont.* 2000; **20** (1): 13-17.
- [2] Lim J, Perez P, Guarda E, Fajuri A, Marchant E, Martínez A, Lazen R, Valle F, Hernández D, Casanegra A, Cereceda M, Villalobos A, Boncompte M, Acevedo F. Enfermedad periodontal en pacientes con síndrome coronario agudo. *Rev Méd Chile* 2005; **133**: 183-189.
- [3] Albiano W, Alviano D, Diniz C, Antonioli A, Alviano C, Farias L, Carvalho M, Souza M, Bolognese A. In vitro antioxidant potencial of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology.* 2008; **53**: 545-552.
- [4] Duque J, Hidalgo-Gato I, Pérez José. Técnicas actuales utilizadas en el tratamiento de la caries dental. *Rev Cubana Estomatol.* 2006; **43** (2).
- [5] Tuzun B, Firatli S, Tuzun Y, Firatli E, Wolf R. Oral Therapeutics and Oral Cosmetics. *Clinics in Dermatology.* 2001; **19**: 449-451.
- [6] More G, Tshikalange T, Lall N, Botha F, Meyer J. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of Ethnopharmacology.* 2008; **119**: 473-477.
- [7] Cos P., Vlietinck A., Vanden D. & Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro “ proof-of-concept”. Review. *Journal of Ethnopharmacology.* 2006; **106**: 290-302.
- [8] Lopez A, Hudson J, Towers G. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology.* 2001; **77**: 189-196.
- [9] Toscón J, Cabrera G. Algunas creencias sobre susceptibilidad y severidad de la caries en adolescentes del Valle del Cauca, Colombia. *Colombia médica.* 2005; **36** (3): 1 – 6.
- [10] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/index.html>. Organización Mundial de La Salud. Fecha de Consulta: 01 de Noviembre de 2010.

- [11] Fonseca M, Vivas-Reyes R, Díaz A. La enfermedad periodontal como riesgo de enfermedades sistémicas. Archivos de La Salud. Universidad de Cartagena. 2008; **45**: 1-9.
- [12] Figueroa G, Alonso G, Acevedo A. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. Acta Odontológica Venezolana. 2009; **1**: 1-13.
- [13] Alvarado A, Téllez N, Gamboa F. Evaluación de la actividad inhibitoria de extractos, fracciones y subfracciones obtenidas de la planta *Iseria laevis* sobre bacterias de importancia en caries dental. Revista de la Federación Odontológica Colombiana. 2008; **71**: 8-15.
- [14] Aldana J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones y subfracciones obtenidas a partir de hojas de *Elaeagia utilis* sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 2010. 12-14.
- [15] <http://www.who.int/en/>. Holck S, Lawes C, Priest P. World Health Organization. 2002. Fecha de consulta: 01 Noviembre de 2010.
- [16] Nuñez D., Bacallao L. Bioquímica de la caries dental. Instituto de Ciencias Básicas y preclínicas Victoria de Girón, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. 2010; **9** (2): 156 – 166.
- [17] Rodríguez A & González O. Fisiopatología de la caries dental. Univers Odont, May 2000; **20** (1): 21-27.
- [18] Aricapa D. Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 2009; 20–26.
- [19] Bascontes A. & Motrante S. Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. Av. Periodont Implantol. 2006; **18** (1): 31 – 59.

- [20] Tascón J, Londoño D, Jaramillo C, Burbano P, Mesa M, Hernández T. Creencias, prácticas y necesidad de tratamiento periodontal en una población adulta en Cali. Colombia Médica. 2006; **37**: 196-202.
- [21] Pereyra A, Yáñez I, Reyes L. Prevalencia de periodontitis causada por sobreinfecciones en pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana. Revista Mexicana de Periodontología. 2010. **1**: 1.
- [22] Verpoorte R, Choi Y, Kim H. Ethnopharmacology and systems biology: A perfect holistic match. Journal of Ethnopharmacology. 2005; **100**: 53-56.
- [23] Ríos J & Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology. 2005; **100**: 80-84.
- [24] Ngwendson J., Bedir E., Efang S, Okunji C, Iwu M, Schuster B., Khan I. Constituents of *Peucedanum zenkeri* seeds and their antimicrobial effects. Pharmazie. 2003; **58**: 587–589.
- [25] Alma M., Mavi A., Yildirim A., Digrak M., Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2003; **26**: 1725–1729.
- [26] Klausmeyer P., Chmurny G, McCloud T., Tucker K., Shoemaker R. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. Journal of Natural Products. 2004; **67**:1732– 1735.
- [27] Sohn H., Son K., Kwon C., Kwon G., Kang S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoides isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. Phytomedicine. 2004; **11**: 666–672.
- [28] Lin F., Hasegawa M., Kodama O. Purification and identification of antimicrobial sesquiterpene lactones from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 2003; **67**:2154–2159.

- [29] El-Seedi H., Sata N., Torssell K., Nishiyama S. New labdene diterpenes from *Eupatorium glutinosum*. *Journal of Natural Products*. 2002; **65**: 728–729.
- [30] Katerere D, Gray A., Nash R., Waigh R. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae. *Phytochemistry*. 2003; **63**: 81–88.
- [31] Machado T, Pinto A, Pinto M., Leal I., Silva M., Amaral A., Kuster R., Netto-dos Santos K. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring aphananthraquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2003; **21**: 279–284.
- [32] Perdomo M. & Téllez M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la fracción activa de *Isertia laevis* obtenida a partir de dos metodologías de extracción sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Trabajo de grado. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia. 2009; 23-25.
- [33] Dobner M., Schwaiger S., Jenewein I., Stuppner H. Antibacterial activity of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss). *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; **89**:301-303.
- [34] Thorn S, Horobin R, Seidler E, Barer M. Factors affecting the selection and use of tetrazolium salts as cytochemical indicators of microbial viability and activity. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993; **74**: 433- 443.
- [35] Katsura H, Tsukiyama R, Suzuki A, Kobayashi M. In vitro Antimicrobial activities of Bakuchiol against Oral Microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001; **45** (11): 3009-3013.
- [36] Guerra M, Sánchez E, Gálvez M. Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. *Rev Cubana Plant Med*. 2004; **9**(1): 93 – 97.
- [37] Yatsuda R, Raden P, Cury J, Muranta R, Rehder V, Melo L, Koo H. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans Streptococci. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; **97**: (183-189)
- [38] Rivero J, Recí M, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 1988; **23**:127-149.

- [39] Silva J, Martins de Siqueira A. Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. Rev Cubana Plant Med. 2000; **5** (1): 26-29.
- [40] Park K, You J, Lee H, Baek N, Hwang J. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. Journal of Ethnopharmacology. 2003; **84** (2): 181-185.
- [41] Chung J, Choo J, Lee M, Hwang J. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. Phytomedicine. 2006; **13**: 261-266.
- [42] Sanabria A, Mendoza A, Moreno A. Actividad Antimicrobiana *In vitro* de Angiospermas Colombianas. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. 1998; **27**: 47-51.
- [43] Jayasinghe O, Jayasooriya C, Bandara B, Ekanayake S, Herlini L, Assante G. Antimicrobial Activity of Some Sri Lanka *Rubiaceae* and *Melanaceae*. Fitoterapia. 2002; **73**: 424-427.
- [44] Zohri A, Abdel-Gawad K, Saber . Antibacterial, antidermatophytic and antitoxigenic activities of onion (*Allium cepa* L.) oil. Microbiol Res. 1995; **150**(2): 167-172.
- [45] Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Asociación Colombiana de Infectología. 2008; **12**: 217-226.
- [46] <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>. Todar K. Todar's Online Textbook of Bacteriology. 2008. Fecha de consulta: 24 de Noviembre de 2010.
- [47] Chaves M, Gómez S, Martínez M. Microorganismos asociados al desarrollo de la caries. Univers Odont. 2000; **20** (1): 33-42.
- [48] Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. Brock, Biología de los microorganismos. Pearson, Addison Wesley. 2009; 881-883.
- [49] Domingo D, López-Brea M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev Esp Quimioterap. 2003; **16**(4):385-393.
- [50] Kloucek T, Polesny Z, Svobodova B, Vlkova E, Kokoska L. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. Journal Ethnopharmacology. 2005; **2**: 309-316.

ANEXOS

Anexo 1

Análisis Estadístico

Tabla 1. Análisis estadístico de la primera evaluación de actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por el fraccionamiento por columna del floculo etanólico

Microorganismo		Hex	Tol	CH ₂ CL ₂	BuOH	Hex:AcOEt (8:2)	Hex:AcOEt (7:3)	Hex:AcOEt (1:1)	Hex:AcOEt (3:7)	AcOEt	EtOH Direc.	EtOH	Trimet.	Vanc.	DMSO
<i>S. mutans</i>	Replica 1	0,00	0,00	15,00	0,00	12,00	10,00	14,00	0,00	0,00	0,00	12,00	16,00	20,00	0,00
	Replica 2	0,00	0,00	15,00	0,00	15,00	10,00	15,00	0,00	0,00	0,00	10,00	18,00	20,00	0,00
	Media	0,00	0,00	15,00	0,00	13,50	10,00	14,50	0,00	0,00	0,00	11,00	17,00	20,00	0,00
	Des.estandar	0,00	0,00	0,00	0,00	2,12	0,00	0,71	0,00	0,00	0,00	1,41	1,41	0,00	0,00
	Coef. variacion	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00
	% Inhibicion Vanc.	0,00	0,00	75,00	0,00	67,50	50,00	72,50	0,00	0,00	0,00	55,00	100,00	100,00	0,00
	% Inhibicion Trimet.	0,00	0,00	88,24	0,00	79,41	58,82	85,29	0,00	0,00	0,00	64,71	100,00	100,00	0,00
<i>S. sobrinus</i>	Replica 1	0,00	0,00	15,00	0,00	12,00	8,00	12,00	0,00	0,00	0,00	12,00	26,00	24,00	0,00
	Replica 2	0,00	0,00	17,00	0,00	10,00	6,00	13,00	0,00	0,00	0,00	10,00	23,00	22,00	0,00
	Media	0,00	0,00	16,00	0,00	11,00	7,00	12,50	0,00	0,00	0,00	10,00	24,50	23,00	0,00
	Des.estandar	0,00	0,00	1,41	0,00	1,41	1,41	0,71	0,00	0,00	0,00	10,00	2,12	1,41	0,00
	Coef. variacion	0,00	0,00	0,09	0,00	0,13	0,20	0,06	0,00	0,00	0,00	10,00	0,09	0,06	0,00
	% Inhibicion Vanc.	0,00	0,00	69,57	0,00	47,83	30,43	54,35	0,00	0,00	0,00	10,00	100,00	100,00	0,00
	% Inhibicion Trimet.	0,00	0,00	65,31	0,00	44,90	28,57	51,02	0,00	0,00	0,00	10,00	100,00	100,00	0,00

<i>S. aureus</i>	Replica 1	14,00	16,00	19,00	8,00	16,00	18,00	16,00	17,00	15,00	0,00	13,00	20,00	28,00	0,00	
	Replica 2	15,00	16,00	18,00	9,00	16,00	19,00	17,00	18,00	17,00	0,00	13,00	20,00	27,00	0,00	
	Media	14,50	16,00	18,50	8,50	16,00	18,50	16,50	17,50	16,00	0,00	13,00	20,00	27,50	0,00	
	Des.estandar	0,71	0,00	0,71	0,71	0,00	1	0,71	0,71	0,71	1,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Coef. variacion	0,05	0,00	0,04	0,08	0,00	0,04	0,04	0,04	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	% Inhibicion Vanc.	52,73	58,18	67,27	30,91	58,18	67,27	60,00	63,64	58,18	0,00	47,27	100,00	100,00	0,00	
	% Inhibicion Trimet.	72,50	80,00	92,50	42,50	80,00	92,50	82,50	87,50	80,00	0,00	65,00	100,00	100,00	0,00	
<i>E.coli</i>	Replica 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,00	60,00	0,00	0,00	
	Replica 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,00	37,00	0,00	0,00	
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,50	48,50	0,00	0,00	
	Des.estandar	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,12	16,26	0,00	0,00	
	Coef. variacion	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,34	0,00	0,00	
	% Inhibicion Vanc.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	
	% Inhibicion Trimet.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	23,71	100,00	0,00	0,00	

Des. Estándar: Desviación Estándar; Coef. Variación: Coeficiente de variación; % Inhibición Vanc: % Inhibición de Vancomicina; % Inhibicion Trimet: %Inhibicion Trimetoprima-sulfametoxazol; Trimet: Trimetoprima-sulfametoxazol; Vanc: Vancomicina.

Tabla 2. Análisis estadístico de la segunda evaluación de actividad antimicrobiana de las fracciones obtenidas del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por el fraccionamiento por columna del floculo etanólico, que presentaron y no presentaron actividad antimicrobiana.

Microorganismo		Hex	Tol	CH ₂ CL ₂	BuOH	Hex:AcOEt (8:2)	Hex:AcOEt (7:3)	Hex:AcOEt (1:1)	Hex:AcOEt (3:7)	AcOEt	EtOH Direc.	EtOH	Trimet.	Vanc.	DMSO
<i>S. mutans</i>	Replica 1	12,00	11,00	13,00	0,00	13,00	16,00	12,00	14,00	12,00	0,00	0,00	22,00	25,00	0,00
	Replica 2	13,00	15,00	14,00	0,00	13,00	16,00	12,00	14,00	11,00	0,00	0,00	24,00	23,00	0,00
	Media	12,50	13,00	13,50	0,00	13,00	16,00	12,00	14,00	11,50	0,00	0,00	23,00	24,00	0,00
	Des.estandar	0,71	2,00	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,71	0,00	0,00	1,41	1,41	0,00
	Coef. variacion	0,06	0,15	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	% Inhibicion Vanc.	52,08	54,17	56,25	0,00	54,17	66,67	50,00	58,33	47,92	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00
	% Inhibicion Trimet.	54,35	56,52	58,70	0,00	56,52	69,57	52,17	60,87	50,00	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00
<i>S. sobrinus</i>	Replica 1	12,00	15,00	16,00	0,00	13,00	11,00	12,00	11,00	14,00	0,00	0,00	21,00	24,00	0,00
	Replica 2	13,00	13,00	18,00	0,00	9,00	15,00	15,00	8,00	12,00	0,00	0,00	21,00	26,00	0,00
	Media	12,50	14,00	17,00	0,00	11,00	13,00	13,50	9,50	13,00	0,00	0,00	21,00	25,00	0,00
	Des.estandar	0,50	1,41	1,41	0,00	2,83	2,83	2,12	2,12	1,41	0,00	0,00	0,00	1,41	0,00
	Coef. variacion	0,04	0,10	0,08	0,00	0,26	0,22	0,16	0,22	0,11	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00
	% Inhibicion Vanc.	50,00	56,00	68,00	0,00	44,00	52,00	54,00	38,00	52,00	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00
	% Inhibicion Trimet.	59,52	66,67	80,95	0,00	52,38	61,90	64,29	45,24	61,90	0,00	0,00	100,00	100,00	0,00
<i>S. aureus</i>	Replica 1	14,00	15,00	18,00	0,00	20,00	17,00	16,00	15,00	16,00	11,00	0,00	16,00	14,00	0,00
	Replica 2	11,00	12,00	12,00	0,00	10,00	11,00	10,00	9,00	18,00	11,00	0,00	16,00	16,00	0,00
	Media	12,50	13,50	15,00	0,00	15,00	14,00	13,00	12,00	17,00	11,00	0,00	20,00	27,50	0,00
	Des.estandar	2,12	2,12	4,24	0,00	7,07	4,24	4,24	4,24	1,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Coef. variacion	0,17	0,16	0,28	0,00	0,47	0,30	0,33	0,35	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	% Inhibicion Vanc.	45,45	49,09	54,55	0,00	54,55	50,91	47,27	43,64	61,82	40,00	0,00	100,00	100,00	0,00
	% Inhibicion Trimet.	62,50	67,50	75,00	0,00	75,00	70,00	65,00	60,00	85,00	55,00	0,00	100,00	100,00	0,00
<i>E.coli</i>	Replica 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,00	30,00	0,00	0,00
	Replica 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,00	30,00	0,00	0,00
	Media	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,50	30,00	0,00	0,00
	Des.estandar	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,12	0,00	0,00	0,00
	Coef. variacion	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00

	% Inhibicion Vanc.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00
	% Inhibicion Trimet.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	38,33	100,00	0,00	0,00	



Datos arrojados de las fracciones y subfracciones que NO presentaron actividad antimicrobiana en la primera evaluación; Des. Estándar: Desviación Estándar; Coef. Variación: Coeficiente de variación; % Inhibición Vanc: % Inhibición de Vancomicina; % Inhibicion Trimet: %Inhibicion Trimetoprima-sulfametoxazol; Trimet: Trimetoprima-sulfametoxazol; Vanc: Vancomicina.

Tabla 3. Análisis estadístico de la Concentración Mínima Inhibitoria de las fracciones obtenidas del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por el fraccionamiento por columna del floculo etanólico.

					Parámetros estadísticos			
Microorganismo	Fracción	Concentración (mg/pozo)	Replica 1 (mm)	Replica 2 (mm)	Media	Desv.	Coef.	
<i>S. mutans</i>	Hex	075	12,00	10,00	11,00	1,41	0,13	
	Tol	0,25	9,00	9,00	9,00	0,00	0,00	
	CH ₂ CL ₂	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	BuOH	2	9,00	10,00	9,50	0,71	0,07	
		5	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	
	Hex:AcOEt (8:2)	0,25	15,00	12,00	13,50	2,12	0,16	
		0,1	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	0,25	9,00	9,00	9,00	0,00	0,00	
		0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	Hex:AcOEt (1:1)	0,25	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	
		0,1	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	
	Hex:AcOEt (3:7)	0,75	11,00	13,00	12,00	1,41	0,12	
	AcOEt	0,75	8,00	10,00	9,00	1,41	0,16	
EtOH directo	2	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00		
	5	11,00	13,00	12,00	1,41	0,12		
EtOH	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
<i>S. sobrinus</i>	Hex	0,75	9,00	10,00	9,50	0,71	0,07	
	Tol	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	CH ₂ CL ₂	0,25	15,00	16,00	15,50	0,71	0,00	
		0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	BuOH	2	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	
		5	11,00	11,00	11,00	0,00	0,00	
	Hex:AcOEt (8:2)	0,25	13,00	15,00	14,00	1,41	0,10	
		0,1	11,00	10,00	10,50	0,71	0,07	
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	0,25	11,00	10,00	10,50	0,71	0,07	
		0,1	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	
	Hex:AcOEt (1:1)	0,25	12,00	11,00	11,50	0,71	0,06	
		0,1	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00	
	Hex:AcOEt (3:7)	0,75	11,00	11,00	11,00	0,00	0,00	
	AcOEt	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
EtOH directo	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
EtOH	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	Hex	0,25	15,00	13,00	14,00	1,41	0,10	
		0,1	10,00	9,00	9,50	0,71	0,07	
	Tol	0,25	15,00	13,00	14,00	1,41	0,10	
0,1		15,00	11,00	13,00	2,83	0,22		

<i>S. aureus</i>	CH ₂ CL ₂	0,25	17,00	15,00	16,00	1,41	0,09
		0,1	13,00	10,00	11,50	2,12	0,18
	BuOH	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Hex:AcOEt (8:2)	0,25	16,00	10,00	13,00	4,24	0,33
		0,1	15,00	9,00	12,00	4,24	0,35
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	0,25	16,00	10,00	13,00	4,24	0,33
		0,1	15,00	9,00	12,00	4,24	0,35
	Hex:AcOEt (1:1)	0,25	15,00	15,00	15,00	0,00	0,00
		0,1	15,00	15,00	15,00	0,00	0,00
Hex:AcOEt (3:7)	0,25	16,00	14,00	15,00	1,41	0,09	
	0,1	12,00	12,00	12,00	0,00	0,00	
AcOEt	0,25	11,00	11,00	11,00	0,00	0,00	
	0,1	9,00	11,00	10,00	1,41	0,14	
EtOH directo	0,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
EtOH	0,25	11,00	11,00	11,00	0,00	0,00	
	0,1	9,00	9,00	9,00	0,00	0,00	
<i>E.coli</i>	Hex	2	11,00	13,00	12,00	1,41	0,12
		5	15,00	11,00	13,00	2,83	0,22
	Tol	2	15,00	10,00	12,50	3,54	0,28
		5	15,00	15,00	15,00	0,00	0,00
	CH ₂ CL ₂	2	14,00	16,00	15,00	1,41	0,09
		5	16,00	16,00	16,00	0,00	0,00
	BuOH	2	10,00	10,00	10,00	0,00	0,00
		5	9,00	9,00	9,00	0,00	0,00
	Hex:AcOEt (8:2)	2	12,00	12,00	12,00	0,00	0,00
		5	12,00	12,00	12,00	0,00	0,00
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	2	9,00	11,00	10,00	1,41	0,14
		5	12,00	12,00	12,00	0,00	0,00
	Hex:AcOEt (1:1)	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Hex:AcOEt (3:7)	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
AcOEt	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
EtOH directo	2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
EtOH	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	0,1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Anexo 2.

Compendio de datos de la Concentración Mínima Inhibitoria.

Tabla 4. Datos concernientes a la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria de las fracciones obtenidas del extracto etanólico y subfracciones obtenidas por el fraccionamiento por columna del floculo etanólico.

Microorganismos	Fracciones	Concentraciones (mg/pozo)					CMI (mg/pozo)
		0,1	0,25	0,75	2	5	
<i>S. mutans</i>	Hexano			11 mm			0,75
	Tolueno		9 mm				0,25
	CH ₂ Cl ₂	0 mm	0 mm				0,5
	BuOH				9,5 mm	10 mm	2
	Hex:AcOEt (8:2)	10 mm	13,5 mm				0,1
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	0 mm	9 mm				0,25
	Hex:AcOEt (1:1)	10 mm	10 mm				0,1
	Hex:AcOEt (3:7)			12 mm			0,75
	AcOEt			9 mm			0,75
	EtOH directo				10 mm	12 mm	2
EtOH	0 mm	0 mm				0,5	
<i>S. sobrinus</i>	Hexano			9,5 mm			0,75
	Tolueno			0 mm			0,5
	CH ₂ Cl ₂	0 mm	15,5 mm				0,25
	BuOH				10 mm	11 mm	2
	Hex:AcOEt (8:2)	10,5 mm	14 mm				0,1
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	10 mm	10,5 mm				0,1
	Hex:AcOEt (1:1)	10 mm	11,5 mm				0,1
	Hex:AcOEt (3:7)			11 mm			0,75
	AcOEt			0 mm			0,5
	EtOH directo				0 mm	0 mm	
EtOH				0 mm	0 mm		
<i>S. aureus</i>	Hexano	0,5 mm	14 mm				0,1
	Tolueno	13 mm	14 mm				0,1
	CH ₂ Cl ₂	11,5 mm	16 mm				0,1
	BuOH	0 mm	0 mm				0,1
	Hex:AcOEt (8:2)	12 mm	13 mm				0,1
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)	12 mm	13 mm				0,1
	Hex:AcOEt (1:1)	15 mm	15 mm				0,1
	Hex:AcOEt (3:7)	12 mm	15 mm				0,1
	AcOEt	10 mm	11 mm				0,1

	EtOH directo			0 mm			0,5
	EtOH	9 mm	11 mm				0,1
<i>E. coli</i>	Hexano				12 mm	13 mm	2
	Tolueno				12,5 mm	15 mm	2
	CH₂Cl₂				15 mm	16 mm	2
	BuOH				9 mm	10 mm	2
	Hex:AcOEt (8:2)				12 mm	12 mm	2
	Hex:AcOEt (7:3 -6:4)				10 mm	12 mm	2
	Hex:AcOEt (1:1)				0 mm	0 mm	
	Hex:AcOEt (3:7)				0 mm	0 mm	
	AcOEt				0 mm	0 mm	
	EtOH directo				0 mm	0 mm	
	EtOH				0 mm	0 mm	

 Concentraciones que no se midieron debido a las determinaciones de los ensayos iniciales.

Anexo 3.

Figura 1 - 2. Gráficas de barras de la evaluación microbiológica.

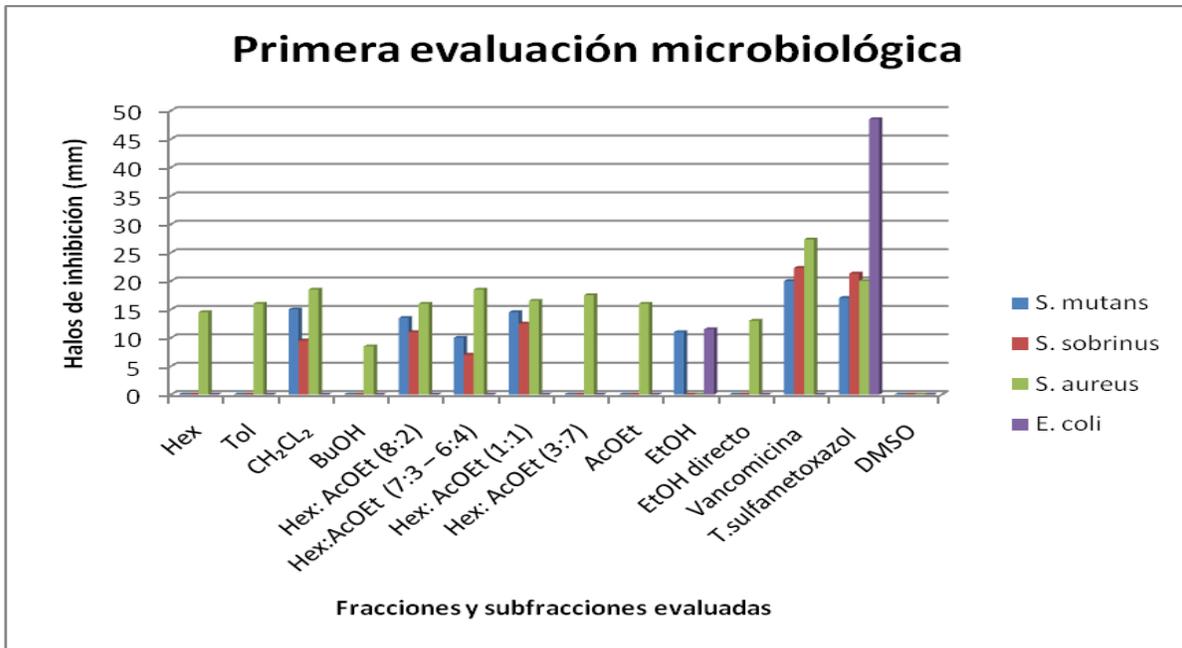


Figura 1. Primera evaluación microbiológica.

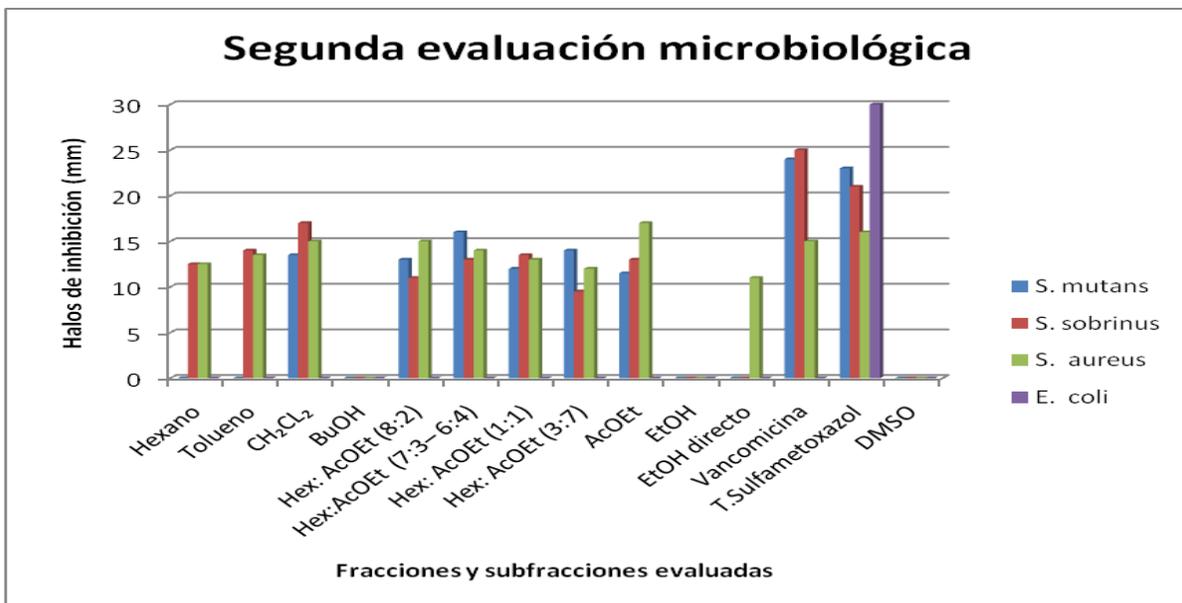


Figura 2. Segunda evaluación microbiológica.

Anexo 4.

Figura 3. Registro Fotográfico, Cromatografías en placa de cada una de las fracciones obtenidas del extracto etanólico.

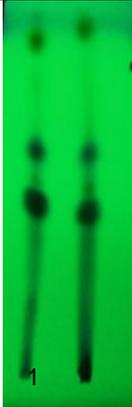
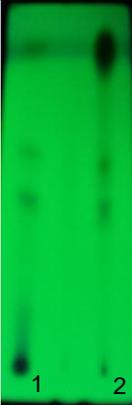
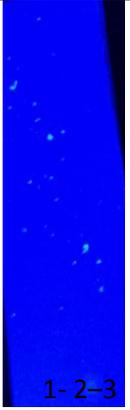
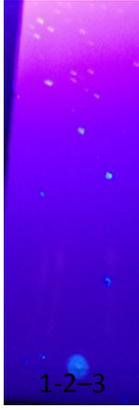
<p>CCD en Silica Gel de las fracciones obtenidas del extracto etanólico.</p> <p>Fase móvil: CH₂CL₂:MeOH (9:1)</p> <p>Fase estacionaria: Silica Gel</p>			
Cromatografía	Luz de onda larga	Luz de onda corta	Revelado vainillina
<p>1</p> <p>(Si-gel, CH₂CL₂:MeOH (9:1))</p>			
1: Fracción diclorometano			
<p>2</p> <p>(Si-gel, CH₂CL₂:MeOH (9:1))</p>			
1: Fracción tolueno. – 2: Fracción hexano			

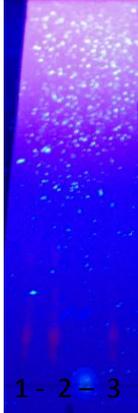
Figura 4. Registro Fotográfico, Cromatografías en placa de cada una de las subfracciones del floculo etanolico.

CCD en Silica Gel de las fracciones de la Cromatografía en Columna al Vacío del Floculo de Etanol

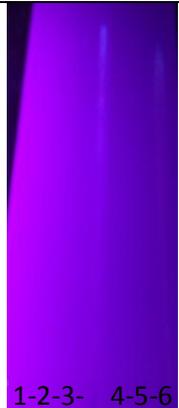
Fase móvil: Éter de Petróleo : AcOEt (8:2)

Fase estacionaria: Silica Gel

Cromatografía	Luz de onda larga	Luz de onda corta	Revelado con vainillina
<p>1</p> <p>(Si-gel, Eter de petróleo :AcOEt (8:2))</p>			
<p>1: Hexano – 2: Hex: AcOEt (8:2) – 3: Hex: AcOEt (8:2)</p>			
<p>2</p> <p>(Si-gel, Eter de petróleo :AcOEt (8:2))</p>			
<p>1: Hex: AcOEt (8:2) – 2: Hex: AcOEt (8:2) – 3: Hex: AcOEt (8:2)</p>			
<p>3</p> <p>(Si-gel, Eter de petróleo :AcOEt (8:2))</p>			

	1: Hex: AcOEt (8:2) – 2: Hex: AcOEt (8:2) – 3: Hex: AcOEt (8:2)		
4 (Si-gel, Eter de petróleo :AcOEt (8:2))			
	1: Hex: AcOEt (8:2) – 2: Hex: AcOEt (8:2) – 3: Hex: AcOEt (8:2)		
5 (Si-gel, Eter de petróleo :AcOEt (8:2))			
	1: Hex: AcOEt (8:2) – 2: Hex: AcOEt (8:2) – 3: Hex: AcOEt (7:3)		
CCD en RP-18 de las fracciones de la Cromatografía en Columna al Vacío del Floculo de Etanol Fase móvil: MeOH:CH₂Cl₂ (10:1) Fase estacionaria: RP-18			
1 (RP-18, MeOH: CH ₂ Cl ₂ (10:1))			

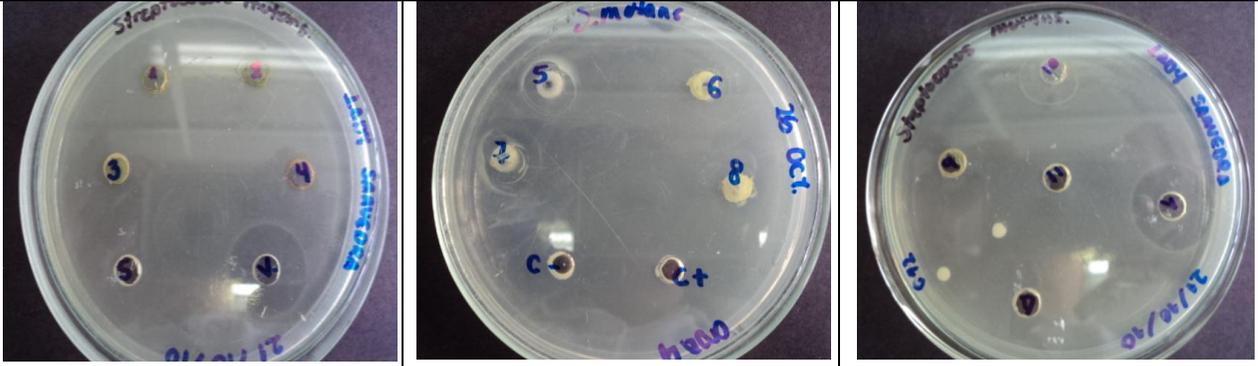
	1, 2, 3, 4, 5: Hexano : AcOEt (7:3) 6: Hexano: AcOEt (6:4)		
2 (RP-18, MeOH: CH₂Cl₂ (10:1))			
	1: Hexano: AcOEt (7:3) - 2, 3, 4, 5: Hexano : AcOEt (6:4) - 6: Hexano: AcOEt (1:1)		
3 (RP-18, MeOH: CH₂Cl₂ (10:1))			
	1, 2, 3: Hexano : AcOEt (6:4) - 4, 5: Hexano: AcOEt (3:7) 6: AcOEt		
4 (RP-18, MeOH: CH₂Cl₂ (10:1))			
	1, 2, 3, 4, 5,6: AcOEt		

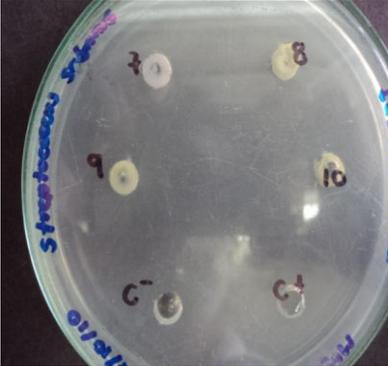
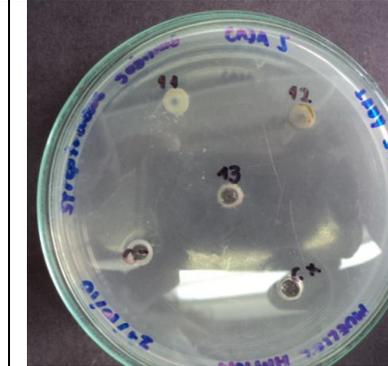
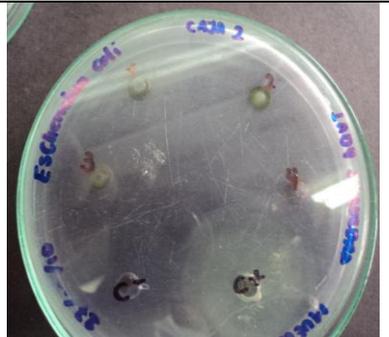
<p>5 (RP-18, MeOH: CH₂Cl₂ (10:1))</p>			
<p>1, 2: AcOEt - 3,4,5,6: Etanol</p>			
<p>6 (RP-18, MeOH: CH₂Cl₂ (10:1))</p>			
<p>1, 2, 3, 4, 5: Etanol - 6: Extracto etanólico directo.</p>			

Anexo 5.

Figura 5. Registros fotograficos de las evaluaciones microbiologicas

Primera evaluacion microbiológica.

Microorganismo	Ensayos microbiológicos		
<i>S. mutans</i>	 <p data-bbox="556 938 1814 1156">1.Hexano 0,5 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 0,5 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 0,5 mg/pozo (30µl) - 4. Butanol 0,5 mg/pozo (30µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 0,5 mg/pozo (30µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 0,5 mg/pozo (30µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 0,5 mg/pozo (30µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 0,5 mg/pozo (30µl) – 9. AcOEt 0,5 mg/pozo (30µl) – 10. EtOH directo 0,5 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 0,5 mg/pozo (30µl) – D ó C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>		

<p><i>S. sobrinus</i></p>			
<p>1.Hexano 0,5 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 0,5 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 0,5 mg/pozo (30µl) - 4. Butanol 0,5 mg/pozo (30µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 0,5 mg/pozo (30µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 0,5 mg/pozo (30µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 0,5 mg/pozo (30µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 0,5 mg/pozo (30µl) – 9. AcOEt 0,5 mg/pozo (30µl) – 10. EtOH directo 0,5 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 0,5 mg/pozo (30µl) – C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>			
<p><i>E.coli</i></p>			

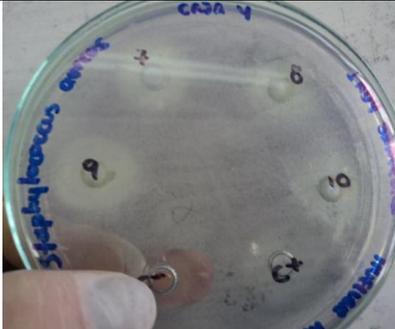
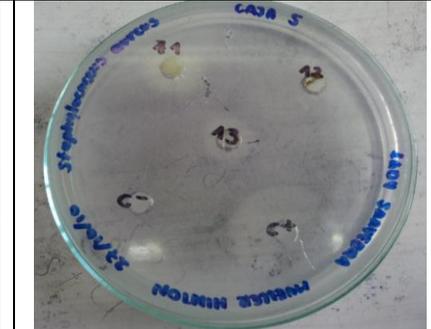
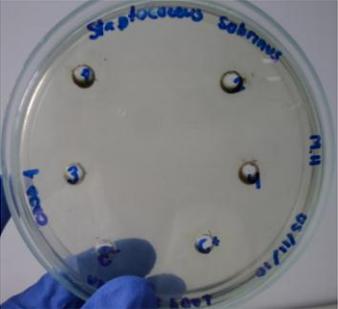
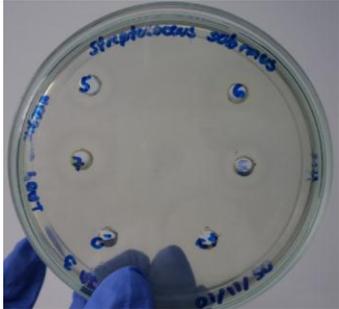
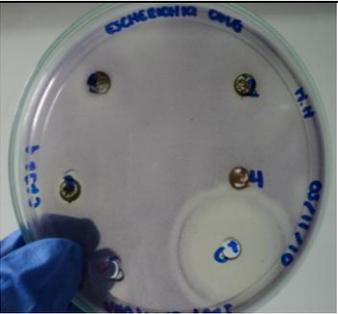
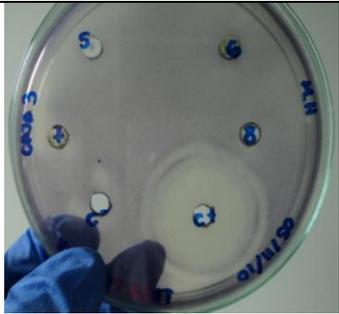
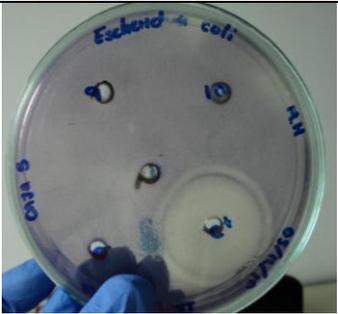
	<p>1.Hexano 0,5 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 0,5 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 0,5 mg/pozo (30µl) - 4. Butanol 0,5 mg/pozo (30µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 0,5 mg/pozo (30µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 0,5 mg/pozo (30µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 0,5 mg/pozo (30µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 0,5 mg/pozo (30µl) – 9. AcOEt 0,5 mg/pozo (30µl) – 10. EtOH directo 0,5 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 0,5 mg/pozo (30µl) – C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>		
<p><i>S. aureus</i></p>			
	<p>1.Hexano 0,5 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 0,5 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 0,5 mg/pozo (30µl) - 4. Butanol 0,5 mg/pozo (30µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 0,5 mg/pozo (30µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 0,5 mg/pozo (30µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 0,5 mg/pozo (30µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 0,5 mg/pozo (30µl) – 9. AcOEt 0,5 mg/pozo (30µl) – 10. EtOH directo 0,5 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 0,5 mg/pozo (30µl) – C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>		

Figura 6. Registros fotograficos de las evaluaciones microbiologicas

Segunda evaluacion microbiológica.

Microorganismo	Ensayos microbiológicos		
<p><i>S. mutans</i></p>			
	<p>1.Hexano 1 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 1 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 0,5 mg/pozo (20µl) - 4. Butanol 1 mg/pozo (30µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 0,5 mg/pozo (20µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 0,5 mg/pozo (20µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 0,5 mg/pozo (20µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 1 mg/pozo (30µl) – 9. AcOEt 1 mg/pozo (30µl) – 10. EtOH directo 1 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 0,5 mg/pozo (20µl) – C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>		

<p><i>S. sobrinus</i></p>			
<p>1.Hexano 1 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 1 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 0,5 mg/pozo (20µl) - 4. Butanol 1 mg/pozo (30µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 0,5 mg/pozo (20µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 0,5 mg/pozo (20µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 0,5 mg/pozo (20µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 1 mg/pozo (30µl) – 9. AcOEt 1 mg/pozo (30µl) – 10. EtOH directo 1 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 1 mg/pozo (30µl) – C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>			
<p><i>E.coli</i></p>			

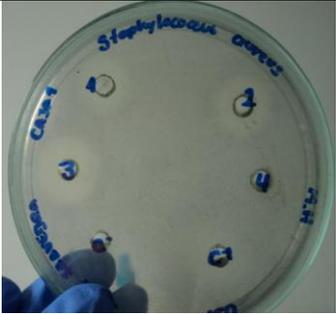
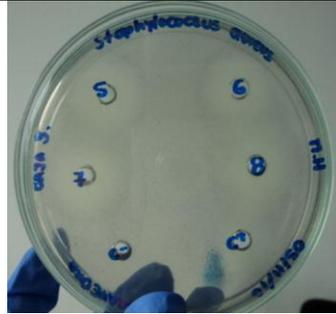
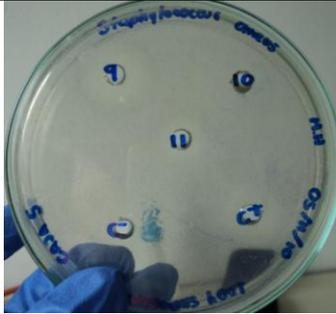
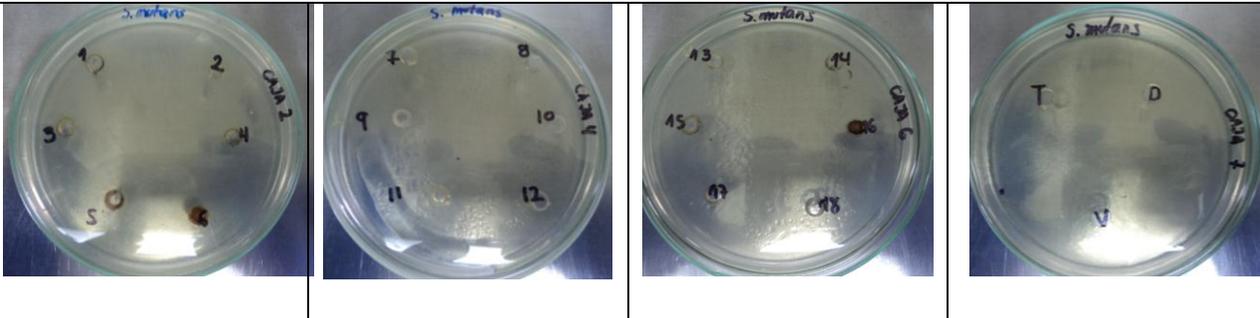
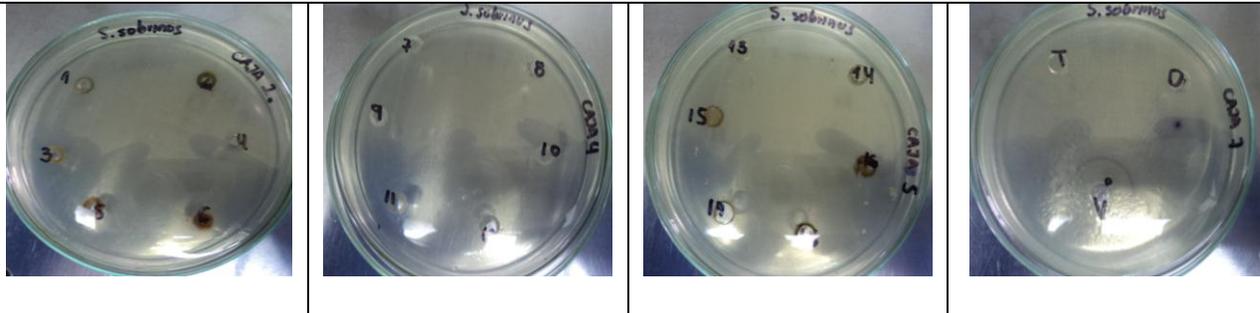
	<p>1.Hexano 1 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 1 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 1 mg/pozo (30µl) - 4. Butanol 1 mg/pozo (30µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 1 mg/pozo (30µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 1 mg/pozo (30µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 1 mg/pozo (30µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 1 mg/pozo (30µl) – 9. AcOEt 1 mg/pozo (30µl) – 10. EtOH directo 1 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 0,5 mg/pozo (20µl) – C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>		
<p><i>S. aureus</i></p>			
	<p>1.Hexano 0,5 mg/pozo (20µl)- 2. Tolueno 0,5 mg/pozo (20µl)- 3. Diclorometano 0,5 mg/pozo (20µl) - 4. Butanol 0,5 mg/pozo (20µl) – 5. Hexano:AcOEt (8:2) 0,5 mg/pozo (20µl) - 6. Hexano:AcOEt (7:3) 0,5 mg/pozo (20µl) - 7. Hexano:AcOEt (1:1) 0,5 mg/pozo (20µl) - 8. Hexano:AcOEt (3:7) 0,5 mg/pozo (20µl) – 9. AcOEt 0,5 mg/pozo (20µl) – 10. EtOH directo 1 mg/pozo (30µl) – 11. EtOH 0,5 mg/pozo (20µl) – C- : DMSO - C+: Trimetoprima-sulfametoxazol o V: vancomicina.</p>		

Figura 7. Registros fotograficos de las evaluaciones microbiologicas

Concentración mínima inhibitoria

Microorganismo	Concentracion Mínima Inhibitoria				
<i>S. mutans</i>	 <p data-bbox="359 769 1961 1073"> 1.Hexano 0,75 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 0,25 mg/pozo (20µl)- 3. Tolueno 0,1 mg/pozo(20µl)-4. Diclorometano 0,25 mg/pozo(20µl)- 5. Butanol 2 mg/pozo (30µl) – 6. Butanol 5 mg/pozo (30µl) - 7. Hexano:AcOEt (8:2) 0,25 mg/pozo (20µl) - 8. Hexano:AcOEt (8:2) 0,1 mg/pozo (20µl) - 9. Hexano:AcOEt (7:3) 0,25 mg/pozo (20µl) - 10. Hexano:AcOEt (7:3) 0,1 mg/pozo (20µl) - 11. Hexano:AcOEt (1:1) 0,25 mg/pozo (20µl) - 12. Hexano:AcOEt (8:2) 0,25 mg/pozo (20µl) - 13. Hexano:AcOEt (3:7) 0,75 mg/pozo (30µl) - 14. AcOEt 0,75 mg/pozo (30µl) – 15. EtOH directo 2 mg/pozo (30µl) - 16. EtOH 5 mg/pozo (30µl) - T: Trimetoprima-sulfametoxazol – V: vancomicina – D: DMSO </p>				
<i>S. sobrinus</i>					

	<p>1.Hexano 0,75 mg/pozo (30µl)- 2. Tolueno 0,75 mg/pozo (30µl)- 3. Diclorometano 0,25 mg/pozo(20µl)-4. Diclorometano 0,1 mg/pozo(20µl)- 5. Butanol 2 mg/pozo (30µl) – 6. Butanol 5 mg/pozo (30µl).- 7. Hexano:AcOEt (8:2) 0,25 mg/pozo (20µl) - 8. Hexano:AcOEt (8:2) 0,1 mg/pozo (20µl) - 9. Hexano:AcOEt (7:3) 0,25 mg/pozo (20µl) - 10. Hexano:AcOEt (7:3) 0,1 mg/pozo (20µl) - 11. Hexano:AcOEt (1:1) 0,25 mg/pozo (20µl) - 12. Hexano:AcOEt (1:1) 0,1 mg/pozo (20µl) - 13. Hexano:AcOEt (3:7) 0,75 mg/pozo (30µl) - 14. AcOEt 0,75 mg/pozo (30µl) – 15. EtOH directo 2 mg/pozo (30µl) - 16. EtOH 5 mg/pozo (30µl) - T: Trimetoprima-sulfametoxazol – V: vancomicina – D: DMSO</p>
<p><i>E.coli</i></p>	<div data-bbox="363 532 653 808" data-label="Image"> </div> <div data-bbox="682 532 972 808" data-label="Image"> </div> <div data-bbox="1001 532 1291 808" data-label="Image"> </div> <div data-bbox="1320 532 1610 808" data-label="Image"> </div> <div data-bbox="1640 532 1950 808" data-label="Image"> </div> <p>1.Hexano 2 mg/pozo (30µl)- 2. Hexano 5 mg/pozo (30µl) – 3. Tolueno 2 mg/pozo (30µl)- 4. Tolueno 5 mg/pozo (30µl) - 5. Diclorometano 2 mg/pozo (30µl) - 6. Diclorometano 5 mg/pozo (30µl) – 7. Butanol 2 mg/pozo (30µl) – 8. Butanol 5 mg/pozo (30µl) - 9. Hexano:AcOEt (8:2) 2 mg/pozo (30µl) - 10. Hexano:AcOEt (8:2) 5 mg/pozo (30µl) - 11. Hexano:AcOEt (7:3) 2 mg/pozo (30µl) - 12. Hexano:AcOEt (7:3) 5 mg/pozo (30µl) - 13. Hexano:AcOEt (1:1) 2 mg/pozo (30µl) - 14. Hexano:AcOEt (1:1) 5 mg/pozo (30µl) - 15. Hexano:AcOEt (3:7) 2 mg/pozo (30µl) – 16. Hexano:AcOEt (3:7) 5 mg/pozo (30µl) - 17. AcOEt 2 mg/pozo (30µl) – 18. AcOEt 5 mg/pozo (30µl) - 19. EtOH directo 0,25 mg/pozo (30µl) – 20. EtOH directo 0,1 mg/pozo (30µl) - 21. EtOH 2 mg/pozo (30µl) – 22. EtOH 5 mg/pozo (30µl) - T: Trimetoprima-sulfametoxazol – V: vancomicina – D: DMSO</p>

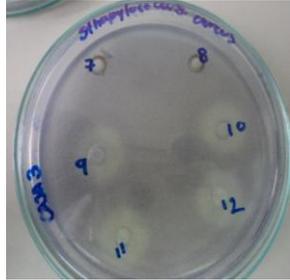
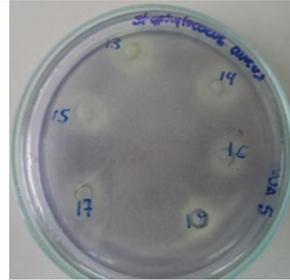
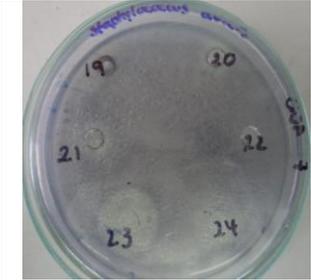
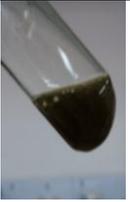
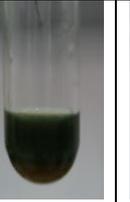
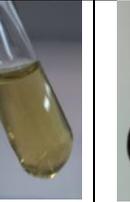
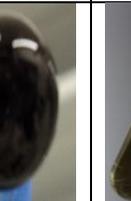
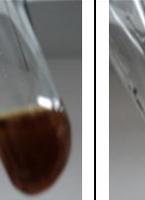
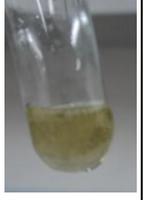
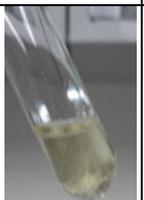
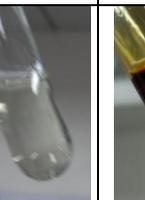
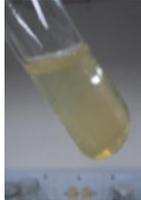
<p><i>S. aureus</i></p>					
	<p>1.Hexano 0,25 mg/pozo (20µl)- 2. Hexano 0,1 mg/pozo (20µl) 3. Tolueno 0,25 mg/pozo (20µl)- 4. Tolueno 0,1 mg/pozo (20µl)- 5. Diclorometano 0,25 mg/pozo(20µl) - 6. Diclorometano 0,1 mg/pozo(20µl) – 7. Butanol 0,25 mg/pozo (30µl).- 8. Butanol 0,1 mg/pozo (30µl) - 9. Hexano:AcOEt (8:2) 0,25 mg/pozo (20µl) - 10. Hexano:AcOEt (8:2) 0,1 mg/pozo (20µl) - 11. Hexano:AcOEt (7:3) 0,25 mg/pozo (20µl) - 12. Hexano:AcOEt (7:3) 0,1 mg/pozo (20µl) - 13. Hexano:AcOEt (1:1) 0,25 mg/pozo (20µl) - 14. Hexano:AcOEt (1:1) 0,1 mg/pozo (20µl) - 15. Hexano:AcOEt (3:7) 0,25 mg/pozo (20µl) - 16. Hexano:AcOEt (3:7) 0,1 mg/pozo (20µl) - 17. AcOEt 0,25 mg/pozo (20µl) – 18. AcOEt 0,1 mg/pozo (20µl) - 19. EtOH directo 0,75 mg/pozo (30µl) - 20. EtOH 0,25 mg/pozo (30µl) – 21. EtOH 0,1 mg/pozo (30µl) - 22: DMSO - 23: Trimetoprima-sulfametoxazol – 24: vancomicina .</p>				

Figura 8. Registros fotograficos de las pruebas químicas preliminares

Fracciones y subfracciones	Pruebas químicas preliminares								
	Lieberman-Burchard	Salkowski	Baljet	Hidroxamato	Shinoda	Antrona	Espuma	Dragendroff	Cloruro férrico
Hex									
Tol									
CH ₂ Cl ₂									

BuOH									
Hex:AcOEt (8:2)									
Hex:AcOEt (7:3-6:4)									
Hex:AcOEt (1:1)									

Hex:AcOEt (3:7)									
AcOEt									
EtOH directo									
EtOH									

ANEXO 6. Procedimiento utilizado en el estudio.

