

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS DE LOS RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**



**ACTIVIDAD BACTERICIDA Y FUNGICIDA DE
EXTRACTOS CRUDOS DE CUATRO ESPECIES FORESTALES**

Tesis

Para optar el título de:

**INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES
MENCION FORESTALES**

JACKELINE MATHEWS FERNANDEZ

PROMOCIÓN 2004-I

Tingo María - Perú

2007

K50

M28

Mathews Fernandez, Jackeline

Actividad Bactericida y Fungicida de Extractos Crudos de Cuatro Especies Forestales. Tingo María, 2007

54 h.; 3 cuadros; 11 fgrs.; 44 ref.; 30 cm.

Tesis (Ing. Recursos Naturales Renovables Mención: Forestales)
Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de
Recursos Naturales Renovables.

ESPECIES FORESTALES / EXTRACTOS CRUDOS / BACTERICIDA –
FUNGICIDA / MATERIAL BIOLÓGICO / MICROORGANISMOS / TINGO
MARÍA / RUPA RUPA / LEONCIO PRADO / HUÁNUCO / PERÚ.



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
Tingo María - Perú



FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 14 de Diciembre de 2007, a horas 05:00 p.m. en la Sala de Conferencias de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, para calificar la tesis titulada:

“ACTIVIDAD BACTERICIDA Y FUNGICIDA DE EXTRACTOS CRUDOS DE CUATRO ESPECIES FORESTALES”

Presentado por la **Bachiller: JACKELINE MATHEWS FERNANDEZ**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de **"MUY BUENO"**.

En consecuencia la sustentante queda apta para optar el **Título de INGENIERO en RECURSOS NATURALES RENOVABLES, mención FORESTALES**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del título de conformidad con lo establecido en el Art. 81 inc. m) del Estatuto de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Tingo María, 14 de Diciembre del 2007

.....
Blgo. M.Sc. EDILBERTO CHUQUILIN BUSTAMANTE
Presidente

.....
Ing. M.Sc. RICARDO OCHOA CUYA
Vocal

AUSENTE

.....
Ing. WARREN RÍOS GARCÍA
Vocal



.....
Mtblgo. M.Sc. CÉSAR S. LÓPEZ LÓPEZ
Asesor

.....
Ing. M.Sc. LADISLAO RUIZ RENGIFO
Co Asesor

DEDICATORIA

A DIOS,
Por iluminar y guiar mi camino,
y las múltiples bendiciones
recibidas a lo largo de mi vida.

A mi adorada madre:
MARISELA,
Por su amor, comprensión,
abnegado sacrificio y por ser
mi estímulo de alcanzar mi
anhelada superación.

A mis hermanos:
DANNY, MÓNICA y DIEGO,
por su amor, cariño y
comprensión, porque son parte
importante en mi vida.

A la memoria de mi bisabuelita: **EMILIA,**
Por su dedicación, valiosas enseñanzas
en mi niñez y adolescencia.

AGRADECIMIENTOS

- **A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, que me brindó la oportunidad de estudiar en sus aulas.**
- **A mis profesores de la Facultad de Recursos Naturales Renovables que al compartir sus conocimientos y experiencias profesionales permitieron afianzar mi formación profesional.**
- **Al Mtblgo. M.Cs. César Samuel López-López, asesor de la presente tesis por sus continuos consejos para el desarrollo exitoso de la misma y por su desinteresada e incondicional amistad.**
- **Al Ing. M.Cs. Ladislao Ruiz Rengifo, co-asesor de la tesis, por su constante preocupación y apoyo para la culminación del trabajo.**
- **A Edilberto Chuquilin, Daniel Lizarzaburú, Casiano Aguirre, Luis Vivar, Armando Eneque, Manuel Ñique, Raúl Araujo, por su aprecio y cariño.**
- **A la Sra. Bertha Acho por su apoyo incondicional en el inicio de mi carrera y por sus valiosos consejos y continuos estímulos en bien de terminar mis estudios.**
- **A Genaro Yarupaitán Galván por su amistad y confianza depositada en mi persona.**
- **A mis amigos Margot Gonzáles, Wendy Cubas, Marco Ibarra, Bárbara Flores, Pilar Vásquez, Ivonne Saboya, Katy Alvarado, Rosángela Mishari,**

Karina Huamán, Erika Pinedo, Charly Morales, Douglas Cotrina, Jhon Escobar, Katia Lavado, Sonia Neyra, Yuliana Raymondi, Ronald Puerta, Milagros Tello, Gabriela Carrillo, Rosa Mendoza y demás amigos, por su lealtad, cariño y gratos e inolvidables momentos compartidos en el transcurso de mi vida universitaria.

- **A mis tíos Willy Mathews, Inés Mathews, Melita Mathews, Edison Paredes, por su apoyo material y moral.**

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
III. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Material biológico	16
3.1.1. Especies vegetales	16
3.1.2. Especies microbianas	17
3.2. Reactivación de los microorganismos	17
3.2.1. Reactivación de cepas bacterianas	17
3.2.2. Reactivación de cepas fúngicas	18
3.3. Obtención de inóculos microbianos	18
3.4. Preparación de los extractos crudos vegetales	19
3.4.1. Procesamiento del material vegetal	19
3.4.2. Extractos crudos	19
3.4.2.1. Extractos acuosos	20
3.4.2.2. Extractos metanólicos	20
3.4.2.3. Extractos etanólicos	21
3.5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	21

3.6. Controles	23
3.7. Análisis estadístico	24
IV. RESULTADOS	25
4.1. Extractos crudos vegetales	25
4.2. Actividad antimicrobiana	26
4.2.1. Extractos de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	26
4.2.2. Extractos de <i>Spondias Bombin</i>	28
4.2.3. Extractos de <i>Cedrela odorata</i>	30
4.2.4. Extractos de <i>Jacaranda copaia</i>	32
4.3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	34
V. DISCUSIÓN	36
VI. CONCLUSIONES	42
VII. RECOMENDACIONES	44
VIII. ABSTRACT	45
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.	Plantilla de cuadrículas enumeradas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos.	22
2.	Extractos crudos de cortezas y hojas en diferentes disolventes (agua, metanol y etanol).	24
3.	Tubos con sobrenadantes de los extractos crudos de vegetales	25
4.	Extractos crudos de corteza de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	26
5.	Extractos crudos de hoja de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	27
6.	Extractos crudos de corteza de <i>Spondias mombin</i>	28
7.	Extractos crudos de hoja de <i>Spondias mombin</i>	29
8.	Extractos crudos de corteza de <i>Cedrela odorata</i>	30
9.	Extractos crudos de hoja de <i>Cedrela odorata</i>	30
10.	Extractos crudos de corteza de <i>Jacaranda copaia</i>	32
11.	Extractos crudos de hoja de <i>Jacaranda copaia</i>	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Especies vegetales de donde se obtuvieron extractos crudos con actividad antimicrobiana.	15
2. Microorganismos para la prueba de susceptibilidad y/o resistencia frente a extractos crudos.	16
3. Patrones de susceptibilidad determinados por la CIM	33

RESUMEN

Se evalúa la actividad bactericida y fungicida de extractos crudos de cuatro especies forestales determinando su concentración inhibitoria mínima (CIM) en mg/mL frente a cepas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*.

Los extractos crudos acuosos de *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* demostraron tener actividad inhibitoria frente a bacterias en concentraciones de 5 a 50 mg/mL y los de *J. copaia* muestran escasa actividad antimicrobiana. Concentraciones de 5 y 10 mg/mL de extractos etanólicos y metanólicos de corteza de *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* tienen actividad antibacteriana. Siendo los extractos etanólicos y acuosos de *C. spruceanum* y *C. odorata* los que tuvieron mejor rendimiento antibacteriano.

Asimismo extractos etanólicos de hojas de *J. copaia*, *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* revelan actividad antimicótica a partir de concentraciones de 5 mg/mL, destacándose los extractos etanólicos de *J. copaia*.

Los extractos crudos obtenidos de corteza de las especies en estudio revelaron mejor comportamiento inhibitorio antimicrobiano que los obtenidos de hojas. No se encontró efecto tóxico de los solventes sobre los microorganismos indicadores utilizados.

I. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los antibióticos significó el nacimiento de una nueva era terapéutica. Los científicos se lanzaron al examen masivo de nuevas fuentes de obtención de los mismos, a partir de hongos y bacterias, en suelos, cumbres montañosas, minas o fondos marinos, con tal intensidad que, por ejemplo para el desarrollo de uno de ellos, la clorotetraciclina se hubo de aislar previamente más de 36,000 cepas de mohos. El esfuerzo global condujo al hallazgo de unos 2000 antibióticos naturales, de los cuáles solo unos 80 alcanzaron aplicabilidad práctica. Simultáneamente, los químicos fueron capaces de modificar las moléculas originales de los antibióticos, dando lugar a los antibióticos semisintéticos, de modo que hoy casi todos los nuevos antibióticos son de este tipo, dejando patente que entre cada 3000 a 10000 sustancias semisintéticas obtenidas, tan solo una puede presentar cualidades antibióticas de interés (LOZANO, 2003).

A pesar de disponer y usar este enorme arsenal terapéutico puesto a nuestra disposición, causan inquietud los fenómenos de la resistencia de las bacterias a los antibióticos y la fácil transmisión de esta resistencia entre cepas diferentes debido al uso indiscriminado de los antibióticos en la práctica médica. Muchas bacterias que causan infecciones

son resistentes a todos los antibióticos actualmente conocidos y cada vez es mayor la lista de las cepas de bacterias que presentan ese fenómeno y que sólo son sensibles a un único antibiótico (ALARCÓN *et al.*, 2004; VÁZQUEZ, 2001). Por otro lado, la perspectiva empeora si consideramos que a pesar de contar con un enorme arsenal de antimicrobianos, éste es reducido y de limitada eficacia cuando se trata de agentes antimicóticos. Existe una creciente preocupación entre investigadores y clínicos de que el uso creciente de drogas antifúngicas lleve rápidamente a la aparición de cepas resistentes (FERRO y CANELA DE ALVERANGA, 2000).

Esta situación plantea la desconcertante posibilidad de que llegará un momento en que los antibióticos, como sistema terapéutico, tendrán interés desde un punto de vista histórico. Esto ha estimulado la búsqueda de agentes antimicrobianos en fuentes naturales diferentes de las habituales (microorganismos) dirigiéndose la atención a organismos superiores como los vegetales, reforzándose esta idea aún más con los antecedentes del uso popular que se tienen para ciertas especies.

Existen plantas medicinales con poderosos efectos antibióticos directos, que conviene consumir con cierta regularidad o utilizar expresamente como alternativa a los antibióticos químicos cuando sea preciso. La búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos a partir de vegetales superiores actualmente es un área de investigación activa. La finalidad seguida en si no es entablar competencia con los quimioterápicos

sintéticos, sino la búsqueda de compuestos con diferente espectro de actividad y/o estructuras químicas novedosas que sirvan en la apertura de serie para el desarrollo de nuevos fármacos (COSSIO *et al.*, 2002).

La utilización de sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las de etiología infecciosa, constituyen en la actualidad un desafío en la medicina, especialmente en aquellas dolencias para las que no existe un remedio adecuado (DOMINGO y LOPEZ, 2003).

No hay duda de que las ventajas de consumir antibióticos naturales son innumerables. El hecho de que no generen resistencia por parte de las bacterias ya es suficiente para plantearse su empleo regular, pero no hay que olvidar que además favorecen el proceso de regeneración epitelial, estimulan los mecanismos naturales de eliminación, favorecen el funcionamiento de los órganos en general, inhiben el crecimiento de los gérmenes patógenos y aumentan las defensas del organismo, mientras que los antibióticos sintéticos suelen bajarlas.

Nuestro país ofrece una notoria biodiversidad vegetal para la búsqueda de nuevos antimicrobianos. La mayoría de investigaciones se han centrado especialmente en especies de uso común o estrictamente no maderables y muy pocas indagaciones científicas se han llevado a cabo sobre especies netamente forestales, a pesar del conocimiento de su

arraigado uso etnobotánico (por la medicina tradicional) en muchas regiones de nuestro territorio.

Ante la situación presentada, se planteó la siguiente interrogante ¿Cuál será el efecto del uso de extractos crudos de especies forestales en diferentes concentraciones sobre microorganismos infecciosos?, esbozándose la siguiente hipótesis: Los extractos crudos de especies forestales, preparados en diferentes solventes, manifiestan acción bactericida y fungicida.

Se trabaja bajo la inferencia que la investigación concerniente a la actividad de los extractos crudos de especies forestales endémicas tropicales sobre bacterias y fungi, permitiría el hallazgo de nuevos químicos antimicrobianos de uso terapéutico y a la vez impulsaría a buscar novedosas alternativas de tratamiento en la riqueza de nuestra medicina tradicional y en la diversidad de nuestra flora.

OBJETIVOS

Se formularon los siguientes objetivos:

1. Evaluar la actividad bactericida y fungicida de extractos crudos de cuatro especies forestales.

2. **Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en mg/mL de los extractos crudos frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans***

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Numerosos estudios clínicos han demostrado que el uso adecuado y controlado de los vegetales medicinales en el tratamiento de las infecciones, ya sean de origen vírico, bacteriano o fúngico, no solo puede tratar los síntomas de una infección, sino además prevenirla y acortar su duración (ORTEGA, 2005).

La medicina tradicional utiliza alrededor de 20,000 especies de vegetales superiores (TAGBOTO y TOWNSON, 2001) y se calcula que unos 3300 millones de personas en el mundo utilizan regularmente este tipo de medicina (ELOFF, 1998); lo que incluye tanto la población de países en desarrollo como desarrollados; por ejemplo, en 1997 un 12,1% de los norteamericanos se automedicó con productos vegetales, lo que significa un monto en ventas de 4 a 5 mil millones de dólares (PITTLER, 2002). Este interés por la medicina tradicional se refleja en la investigación de vegetales medicinales con posible efecto contra las bacterias resistentes a los antibióticos. Un ejemplo de ello es la bacteria *Helicobacter pylori* cuyo aumento de cepas resistentes a los antibióticos empleados en su tratamiento y el alto costo de esos tratamientos, es un aliciente en países en desarrollo

donde la prevalencia de este agente es mayor, para el uso de la medicina natural (TAGBOTO y TOWNSON, 2001).

Algunos ejemplos de este tipo de investigación los encontramos en la evaluación de vegetales medicinales en Kenia (FABRY *et al.*, 1996) y en la península Yucateca, México (ANKLI *et al.*, 2002). En el primer estudio se identificaron tres especies: *Terminalia spinosa*, *Harrisonia abyssinica* y *Ximenia caffra*, cuyas concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) fueron de 125 mg/mL en la primera y de 250 mg/mL en las otras dos. En el estudio mexicano se encontraron cuatro especies cuyas CIM fueron como máximo de 10 mg/mL; éstas fueron: *Casimiroa tetrameria*, *Dostenia contrajerva*, *Jatropha gaumeri* y *Piscidia piscipula*.

La evaluación de *Pteleopsis suberos*, una especie empleada en África en el tratamiento de las úlceras, mostró que presentaba efectos anti-*Helicobacter* (GERMANÓ *et al.*, 1998). Otros estudios han señalado el efecto antibacteriano de las catepsinas aisladas de *Camellia sinensis* "té", que en las concentraciones usuales de una taza inhiben a cepas de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (YAM *et al.*, 1997) y en el caso de *Helicobacter* la CIM fue de 8 mg/mL, resultando en un descenso significativo en las alteraciones histopatológicas inducidas experimentalmente en animales de laboratorio inoculados experimentalmente (MABE *et al.*, 1999); además, en un estudio se comparó el consumo de té en dos grupos de individuos, infectados y no infectados con *H. pylori*, encontrándose que en los primeros

había un menor consumo de té que en los segundos; lo que plantea la posibilidad de que el consumo de té podría interferir con la infección por *H. pylori* (YEE *et al.*, 2002).

Algunas especies empleadas tanto en medicina como en condimentos de cocina han mostrado efectos anti-*Helicobacter*, entre ellas el ajo (CELLINI *et al.*, 1996), tomillo (TABAK *et al.*, 1996) y canela (NIR *et al.*, 2000); algunos productos extraídos de este último son efectivos en bajas concentraciones (CHUNG *et al.*, 1998; OHTA *et al.*, 1999; O'GARA *et al.*, 2000).

Diversas plantas que han demostrado su actividad antimicrobiana en el aparato respiratorio son el eucalipto (indicado para el asma, bronquitis, rinitis, faringitis, amigdalitis, traqueitis y gripe), el tomillo (para la tos irritativa y antiespasmódica, laringitis, bronquitis, asma enfisema y gripe), el marrubio (tos improductiva, catarros), el llantén (bronquitis), el gordolobo (afecciones respiratorias de vías altas y bajas), las yemas de pino o el romero (ORTEGA, 2005).

Otras especies de vegetales como el *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil), han sido reconocidas por la actividad biológica de sus extractos etanólicos y acuosos contra infecciones de origen alimentario especialmente contra diarreas originadas por *Vibrio cholerae*, inhibiendo la

producción de enterotoxina y la adhesión de la bacteria (ALARCÓN *et al.*, 2004).

En la búsqueda de metabolitos secundarios que actúan sobre bacterias SILVA *et al.* (2004) determinaron que extractos hexánicos de raíces de *Jatropha dioica* presentaban mayor actividad sobre *Staphylococcus aureus* y actividad moderada sobre *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*.

Se han estudiado plantas de las familias Myrtaceae (*Syzygium aromaticum*, *Eucaliptus camaldulensis* y *Psidium guajava*) y Lauraceae (*Cinnamomum zeylanicum*) de las cuáles se obtuvieron extractos con tres solventes de distinta polaridad obteniéndose actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri* con los extractos hexánicos obtenidos por maceración a temperatura ambiente (ORANDAY *et al.*, 2004).

Se determinó que los extractos de las hojas y raíces de la leguminosa *Dalea elegans*, planta autóctona de la provincia de Córdoba, Argentina, contienen un compuesto flavonoide denominado 6-prenilpinocembrina activo contra la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente al antibiótico oxacilina y contra los hongos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* y *Trichopyton mentagrophytes* (CABRERA *et al.*, 2004).

LAPENNA *et al.* (2003) reportan la evaluación de la actividad bactericida y fungicida en *Plantago australis* "llantén", *Petiveria alliacea* "mapurite", *Mangifera indica* "mango", *Luffa cilíndrica* "esponjilla", *Psidium guíñense* "guayabo agrio" y *Phthirusa sp.* "pajarito" sobre cepas de *Escherihcia coli* enteropatogénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterotoxigénica, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida krusei* y *C. albicans*.

COSSIO *et al.* (2002) en Perú, han encontrado un compuesto antifúngico en *Tropaeolum tuberosum* "mashua", el cual se purificó, caracterizó y cuantificó su actividad biológica, el compuesto hallado fue el 4-metoxibencilsotiocinato.

En Chile se estudiaron 276 extractos de plantas para detectar actividad antibacteriana frente a uno o más microorganismos. Dentro de este grupo de plantas la que se estudió con mayor énfasis fue *Haploppapus multifolius*, especie de la cual se aislaron cumarinas con actividad antibacteriana y en los últimos 20 años se han investigado más de un centenar de plantas chilenas, con actividad antimicrobiana, entre otras propiedades, aislándose un importante número de compuestos, muchos de ellos de estructura nueva y actividad biológica interesante (BITTNER, 2002).

Asimismo se han obtenido extractos bioactivos con actividad antifúngica a partir de la corteza de *Pinus caribea var. hondurensias*

procedentes de plantaciones forestales del oriente venezolano los cuales presentaron además actividad atrapadora de radicales libres (VARGA, 2002).

De *Ibicella lutea*, se aisló el principio activo antibacteriano, que posee una buena potencia y espectro y una estructura química novedosa (VÁZQUEZ, 2001).

Como podemos observar las investigaciones realizadas han llevado a considerar a la medicina tradicional como fuente de posibles vías de análisis; así, inicialmente se investiga el posible efecto antimicrobiano mediante pruebas de inhibición *in vitro* empleando extractos crudos de las plantas y en una segunda etapa las investigaciones conducen al estudio de fracciones del extracto en búsqueda de los principios activos. Posteriormente, se plantea la evaluación *in vivo*, ya sea en animales de experimentación o con voluntarios.

El número de estructuras químicas descritas en plantas superiores llega a los cientos de miles y está aumentando continuamente. Aproximadamente 1,500 estructuras químicas nuevas de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un buen número tiene actividad biológica. Desafortunadamente los conocimientos rudimentarios de la química y bioquímica de las plantas restringe todavía nuestra capacidad de explotar completamente los productos químicos naturales (BITTNER, 2002).

En una fase más avanzada del estudio de plantas medicinales, la identificación de las moléculas activas conduce a su modificación para incrementar el efecto antimicrobiano, como es el caso de flavonoides (BAE *et al.*, 1999) y rotenoides aislados de leguminosas (TAKASHIMA *et al.*, 2002), lo que llevó a la descripción de un nuevo rotenoide, conocido como derrisin, cuya CIM es de 85 mg/mL y a la evaluación de otros conocidos como el teflosin y el toxicarol cuyas CIM son de 0,3 mg/mL.

El aprovechamiento de las especies forestales no sólo es en el sentido económico maderero, sino que se pueden aprovechar productos forestales no maderables (PFNM) que incluyen diversos tipos entre ellos vegetales medicinales, aceites esenciales y extractos vegetales. Las sustancias extraíbles de los árboles constituyen una fuente importante de fitoquímicos.

Por sustancias extraíbles vegetales se entienden aquellas sustancias que se extraen de diferentes partes de los árboles mediante agua, disolventes orgánicos, vapor de agua y mediante un exprimido mecánico (ALVAREZ, 2003).

Entre las sustancias extraíbles de la corteza se encuentran los más diversos compuestos orgánicos e inorgánicos y su presencia en diferentes especies es relativa. Se dividen en lipofílicos e hidrofílicos, aunque no existen fronteras que los delimiten. El contenido es superior que en la

madera propiamente dicha. Varía entre 20-40 % de masa de corteza seca. Incluye a un grupo heterogéneo de sustancias (SJÖSTRÖM, 1981).

La fracción lipofílica, comprende sustancias extraíbles con disolventes apolares (éter etílico, diclorometano, etc.). Consisten en grasas, ceras, terpenos y terpenoides y alcoholes alifáticos superiores. Los terpenos, ácidos resinosos y esteroides están localizados en los canales resiníferos. Abundan los triterpenoides: B-sitosterol encontrados en ceras, betulinol (ALVAREZ, 2003).

La fracción hidrofílica, constituida por los extraíbles en agua sola o con disolventes polares (acetona, alcohol etílico, etc.). Contienen grandes cantidades de constituyentes fenólicos, muchos de ellos, especialmente taninos condensados (ácidos fenólicos) pueden ser extraídos sólo como sales con disolución diluida de álcali. Por ejemplo, una cantidad considerable de flavonoides pertenece al grupo de taninos condensados están presentes en la corteza de abeto, roble, secoya. Flavonoides monoméricos que incluyen quercetina y dihidroquercetina están también presentes en la corteza. Se encuentran también pequeña cantidad de lignanos y estilbenos. En menor cantidad se encuentran carbohidratos, proteínas y vitaminas (ALVAREZ, 2003).

Es conocido que los componentes fenólicos y terpenoides presentan propiedades antifúngicas, antibióticas, antioxidantes, alelopáticas y

otras (ALVAREZ, 2003). Estos compuestos tienen ganada reputación por su actividad en las plantas como el control al ataque de insectos y a enfermedades microbianas.

Hace algunos años muchos extractivos vegetales, como los taninos, se consideraron compuestos con actividad biológica dudosa, y sin beneficios farmacológicos de relevancia reportados, ya que parte importante de su estructura aún era desconocida para la ciencia. La definición de la misma hizo posible el estudio y prescripción de nuevas propiedades para estos compuestos, así como la posibilidad de su uso en humanos (ALVAREZ, 2003).

Es por ello que a la luz de los modernos avances en botánica, fotoquímica, farmacología, farmacocinética, farmacodinamia y toxicología, el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas deberá ser constatado y validado para garantizar una terapia adecuada, eficaz y con la menor incidencia de ocasionar riesgos al paciente (DOMINGO y LOPEZ, 2003).

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de un compuesto vegetal, en muchos casos se recurrirá a procedimientos de

extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible (GARCIA, 2003).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. Especies vegetales

Se evaluaron extractos obtenidos de cuatro especies forestales recolectadas del Bosque Reservado de la UNAS (BRUNAS), del Jardín Botánico UNAS y del Vivero de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, de la ciudad de Tingo María. Se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Especies vegetales de donde se obtuvieron extractos crudos con actividad antimicrobiana.

Nombre científico	Nombre común	Familia
<i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.)	Capirona	RUBIACEAE
<i>Cedrela odorata</i> L.	Cedro colorado	MELIACEAE
<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don	Huamansamana	BIGNONIACEAE
<i>Spondias mombin</i> L.	Ubos	ANACARDIACEAE

3.1.2. Especies microbianas

Los microorganismos para la definición de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos crudos, fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS), y representan tanto a microorganismos grampositivos, gramnegativos y fungi patógenos.

Cuadro 2. Microorganismos para la prueba de susceptibilidad y/o resistencia frente a extractos crudos.

Microorganismo	Especie	Procedencia
Bacteria grampositiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lab.Microbiología UNAS
Bacteria gramnegativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lab.Microbiología UNAS
Fungi levaduriforme	<i>Candida albicans</i>	Lab.Microbiología UNAS

3.2. Reactivación de los microorganismos

3.2.1. Reactivación de cepas bacterianas

Para este propósito se aplicó la metodología recomendada por la Asociación Estadounidense de Salud Pública (APHA, 1992), utilizándose el medio Infusión Cerebro Corazón (BHI) distribuido en tubos de ensayo 15 x 125 mm.

Los viales conteniendo las cepas se vertieron en medio BHI y se llevaron a incubación por 24 horas a 37 °C.

Al término de la incubación se repicaron las cepas sobre medio sólido Agar CLED (AC) o Agar Nutritivo Común (AN) contenido en placas petri. Se incubaron las placas por 24 horas a 37°C.

3.2.2. Reactivación de cepas fúngicas

Para la reactivación de fungi se realizó según lo descrito por AJELLO *et al.* (1966) y en la Farmacopea XXIII de los Estados Unidos de Norteamérica-USP (1995). Se dispondrá de medio de cultivo líquido, Extracto de Levadura-Glucosa (LG) o Caldo Sabouraud Glucosado (CS) distribuidos en tubos de prueba de 15 x125 mm.

El vial conteniendo la cepa fungi se vertió sobre el medio de cultivo, y se llevó a incubación de 2 a 4 días a temperatura ambiente.

Al término de la incubación se repicaron sobre medio sólido de Agar Sabouraud Glucosado (AS) o Agar Papa Glucosa (PDA), las placas se incubaron a temperatura ambiente por espacio de 2 a 4 días.

3.3. Obtención de los inóculos microbianos

De las placas de repique tanto de bacterias como de fungi, se tomaron 5 colonias en estado puro y se sembraron en medios BHI contenido

en tubos y se incubaron a 37°C de 12 a 18 horas hasta que la suspensión alcanzó una concentración celular de 10^5 a 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colonia por mililitro).

Estos medios constituyeron los inóculos con los que se sembraron las placas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos vegetales.

3.4. Preparación de los extractos crudos vegetales

3.4.1. Procesamiento del material vegetal

Se dispuso de material vegetal fresco y seco constituido por hojas y cortezas de las especies vegetales indicadas en el Cuadro 1.

Para este fin se procesó por el método descrito por CACERES *et al.* (2001). Se recolectó y separó 150 g de hojas y cortezas de las especies forestales, se lavaron con agua corriente y con agua destilada, luego se secaron en la estufa a 65 °C por 24 horas para eliminar el exceso de agua. Posteriormente se cortaron en trozos pequeños y se practicó una trituration del material para pulverizarlos hasta su homogenización.

3.4.2. Extractos crudos

Con los pulverizados se prepararon los extractos crudos empleando disolventes polares: agua, etanol y metanol. Se dispuso de 10 a

50 g de pulverizado de material vegetal seco por cada disolvente utilizado en la extracción.

3.4.2.1. Extractos acuosos

Se aplicó el método descrito por CACERES *et al.* (2001) y STAUFFER *et al.* (2003).

Se tomaron 50 g de pulverizado vegetal y se llevaron a 500 mL de agua destilada, se sometieron a ebullición (100°C) por 20 minutos, se dejaron que enfríen a temperatura ambiente por lo menos 60 minutos, posteriormente se filtraron sobre papel Whatman N° 1.

El filtrado se esterilizó por tindalización a 60°C por 2 horas y períodos de descanso de 24 horas, con dos repeticiones. Se almacenaron en refrigeración (4° a 8°C) hasta su utilización.

3.4.2.2. Extractos metanólicos

Se procedió según el método descrito por LAPENNA *et al.* (2003) modificado de acuerdo a nuestros requerimientos.

Se maceró 10 g del pulverizado en 100 mL de metanol por 24 horas, al término de la maceración se filtró en papel Whatman N° 1, posteriormente el filtrado se esterilizó por tindalización a 60°C por 2 horas y descansos de 24 horas con dos repeticiones del proceso.

Se conservaron en refrigeración entre 4° a 8°C. Para la evaluación se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos, se tomó el sobrenadante para realizar la prueba de sensibilidad y/o resistencia antimicrobiana.

3.4.2.3. Extractos etanólicos

Se procedió según el método descrito por ROSALES y GONZALES (2003).

A 10 g del pulverizado vegetal se agregaron 100 mL de etanol al 70 % y se dejó macerar por espacio de 24 horas. Al término de la maceración se filtró en papel Whatman N° 1 y al filtrado se le agregaron unos mililitros de agua destilada hirviendo con la finalidad de precipitar compuestos resinosos existentes.

Se esterilizó por tindalización y se conservaron en refrigeración (4° a 8°C). Para su evaluación se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min. y se tomó el sobrenadante para realizar las pruebas de sensibilidad y/o resistencia antimicrobiana.

3.5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se probaron cuatro concentraciones de los extractos crudos vegetales: 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL y 50 mg/mL, para determinar la CIM de los extractos tanto a partir de hojas como de corteza. La CIM es la

concentración más baja que requiere el extracto crudo vegetal para inhibir el crecimiento del microorganismo.

Los inóculos bacterianos reactivados en medio BHI, se sembraron por diseminación sobre placas conteniendo Medio Mueller Hinton (MH) adicionado con 50 mg/mL de cefazolina como presión selectiva. Los inóculos de fungi, se sembraron a partir del medio BHI en placas petri conteniendo Medio Sabouraud Glucosado (AS) o Agar Papa Glucosa (PDA), adicionado de ketoconazol 50 mg/mL como presión selectiva.

Utilizando una plantilla de cuadrículas de siembra, que se aprecia en la Figura 1, colocada debajo de cada placa sembrada con microorganismos, se depositaron con ayuda de una micropipeta automática, 25 μ L de cada una de las concentraciones ya mencionadas de los extractos preparados. Los extractos crudos se depositaron sobre las cuadrículas 1 al 3. Las placas se llevaron a la estufa, se incubaron a 37 °C por 24 horas en caso de las bacterias y a temperatura ambiente por 3 - 5 días en el caso de fungi. Al término de la incubación se observaron los resultados.

El efecto tóxico se evidenció por la aparición de halos de inhibición del crecimiento de las cepas en estudio, que se comparó con los halos producidos por sus respectivos controles. Al retirar las placas de incubación se observaron halos de inhibición que se midieron en milímetros (mm).

Los halos mayores de 20 mm se consideraron como positivos. Diámetros de halos que estuvieron entre 16 -19 mm denotó una actividad intermedia o moderada, y halos con diámetros menores a 15 mm se tomaron como de no tener actividad antimicrobiana significativa (JENKINS *et al.*, 1985; KIRBY *et al.*, 1966).

3.6. Controles

Se utilizaron como controles los solventes que intervienen en el proceso: agua, etanol, metanol, así como cefazolina 50mg/mL y ketoconazol 50mg/mL, de los cuales se depositó 50 μ L en las últimas cuadrículas (4 – 8) de cada placa sembrada con los diferentes microorganismos.

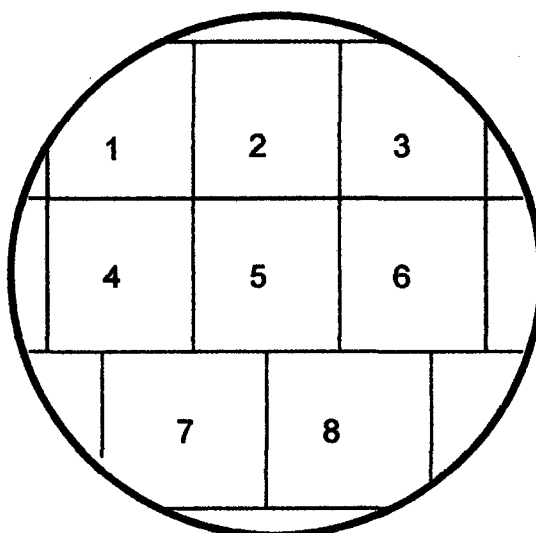


Figura 1. Plantilla de cuadrículas enumeradas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos.

3.7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados para su análisis y ajuste estadístico y asimismo la respectiva interpretación mediante el modelo de un diseño completo al azar con tres repeticiones, para lo cual se utilizó el software SPSS versión 12.

IV. RESULTADOS

4.1. Extractos crudos vegetales

Se obtuvieron veinticuatro (24) extractos crudos, seis (6) de cada especie forestal conservándose a temperatura de 0° a 4°C, los que se centrifugaron para aplicarlos en la determinación de la CIM (Figuras 2 y 3).

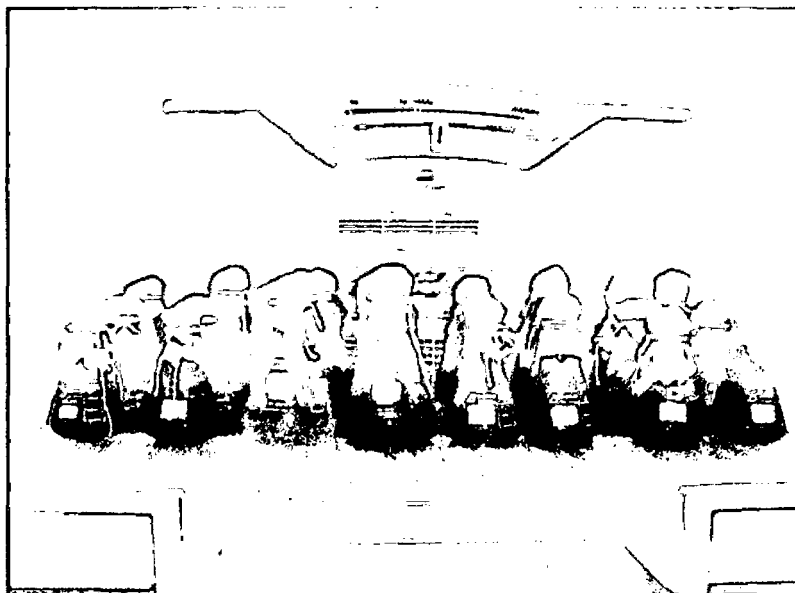


Figura 2. Extractos crudos de cortezas y hojas en diferentes disolventes (agua, metanol y etanol).

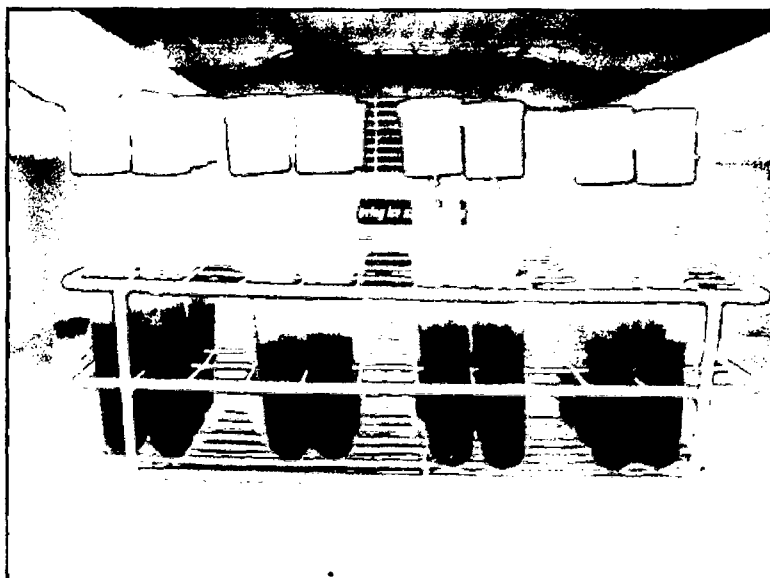


Figura 3. Tubos con sobrenadantes de los extractos crudos de vegetales.

4.4. Actividad antimicrobiana

Con respecto a la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), los extractos mostraron variada actividad frente a las cepas microbianas seleccionadas para la prueba de susceptibilidad y resistencia.

4.2.1. Extractos de *Calycophyllum spruceanum*

Del comportamiento de los extractos crudos de hojas y corteza obtenidas de *C. spruceanum* se aprecia que los extractos crudos de corteza (Figura 4) tienen mucha más actividad antibacteriana que los obtenidos a partir de hojas (Figura 5) y que además los etanólicos son mucho más eficaces que los acuosos y metabólicos en lo que se refiere a inhibir el crecimiento de las tres cepas de microorganismos ensayadas, mientras que

los acuosos sólo muestran ligero dinamismo frente a las cepas bacterianas con énfasis en *S. aureus*.

Los extractos acuosos a partir de hoja demostraron tener actividad contra *S. aureus* a concentraciones de 5 mg/mL, y contra *P. aeruginosa* en concentraciones de 50 mg/mL.

Asimismo puede apreciarse que los extractos etanólicos y metanólicos de hoja y de corteza ostentan actividad inhibitoria frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* en la concentración 5 mg/mL y frente a *C. albicans* a partir de la concentración 10 mg /mL y 50 mg /mL respectivamente.

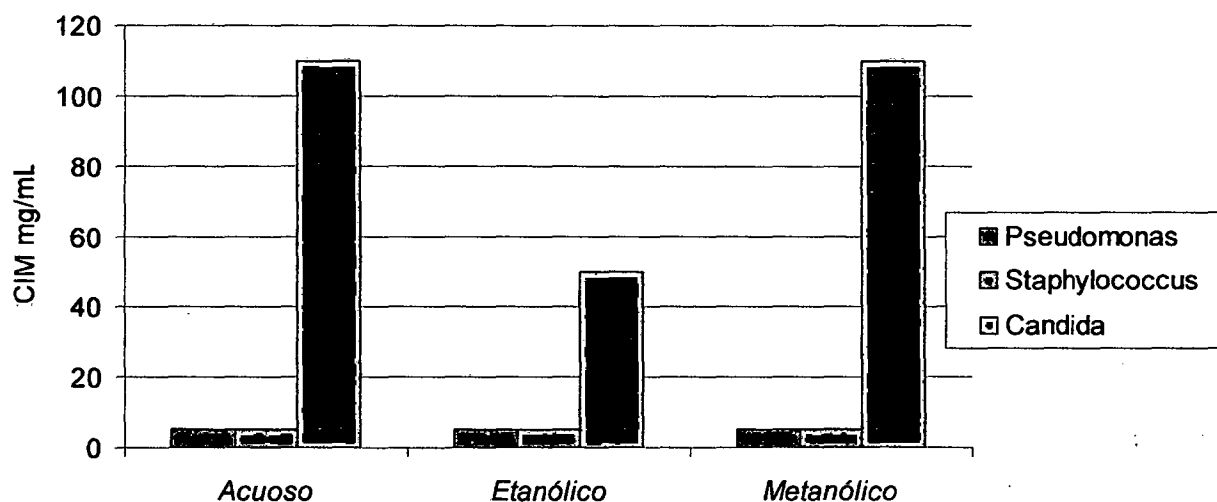


Figura 4. Extractos crudos de corteza de *Calycophyllum spruceanum*

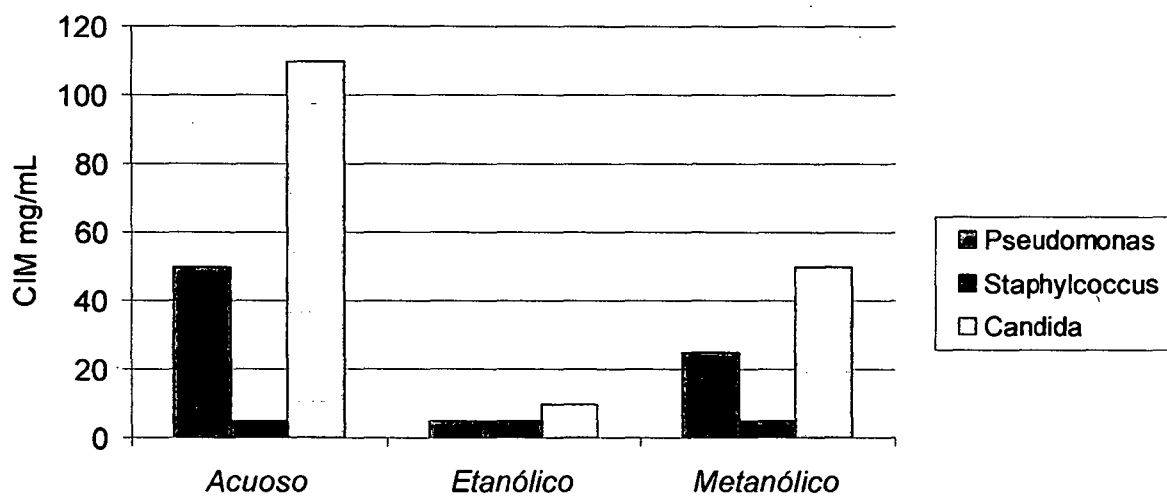


Figura 5. Extractos crudos de hoja de *Calycophyllum spruceanum*

4.2.2. Extractos de *Spondias mombin*

Los comportamientos de los extractos crudos obtenidos a partir de hojas de *S. mombin* comprueban que la acción inhibitoria de las concentraciones de los extractos acuosos tienen efectos negativos sobre *S. aureus* 10 mg/mL y que frente a *P. aeruginosa* y *C. albicans* no evidencian actividad inhibitoria.

Asimismo los extractos etanólicos a concentración de 5 mg/mL inhiben a *S. aureus* y a concentración de 50 mg/mL lo hace frente a *P. aeruginosa* mientras que la concentración de 10 mg/mL ya es eficaz contra *C. albicans*.

El extracto metanólico de hojas a 5 mg/mL tiene efectos sobre *S. aureus* y a 10 mg/mL el efecto se incrementa sobre *P. aeruginosa* mientras que con *C. albicans* se muestra infructuoso (Figura 6).

Los extractos acuosos y metanólicos a partir de corteza de la misma especie forestal muestran un comportamiento sostenido de inhibición contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* a concentraciones de 5 y 25 mg/mL para el acuoso y de 5 mg/mL, en ambas bacterias, para el metanólico.

Los extractos etanólicos de corteza, muestran actividad contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* a partir de 25 mg/mL y frente a *C. albicans* la acción inhibitoria se inicia a 10 mg/mL (Figura 7).

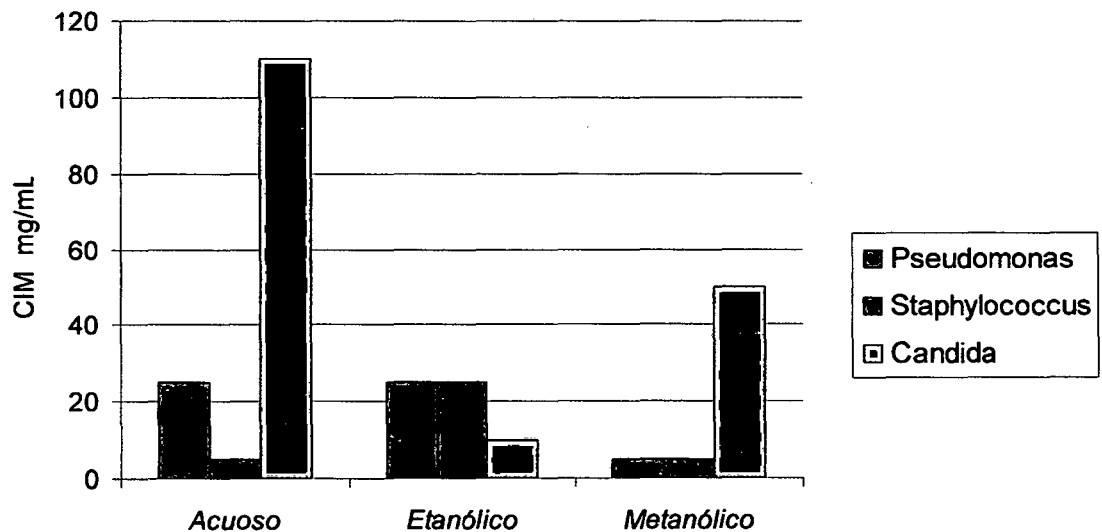


Figura 6. Extractos crudos de corteza de *Spondias mombin*

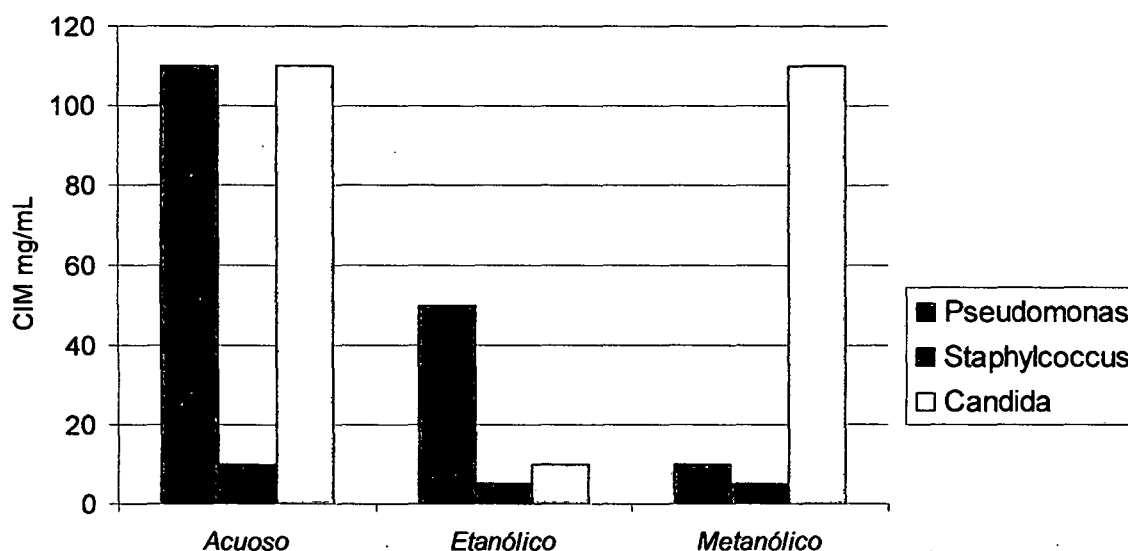


Figura 7. Extractos crudos de hoja de *Spondias mombin*

4.2.3. Extractos de *Cedrela odorata*

Los extractos acuosos obtenidos a partir de hojas de *C. odorata* mostraron en todas sus concentraciones inhibición solo frente a *S. aureus*, en tanto que el etanólico a 10 mg/ml fue activo frente a *C. albicans* y *S. aureus* y con 50 mg/mL a *P. aeruginosa* (Figura 8).

A su vez los extractos de corteza tanto acuoso como metanólico presentan actividad inhibitoria desde concentraciones menores (5 y 10 mg/mL) contra *S. aureus*, y escasa actividad contra *P. aeruginosa*; mientras que los extractos etanólicos exhiben capacidad de inhibición tanto contra las cepas bacterianas a partir de la menor concentración y contra *C. albicans* a partir de 10 mg/mL (Figura 9).

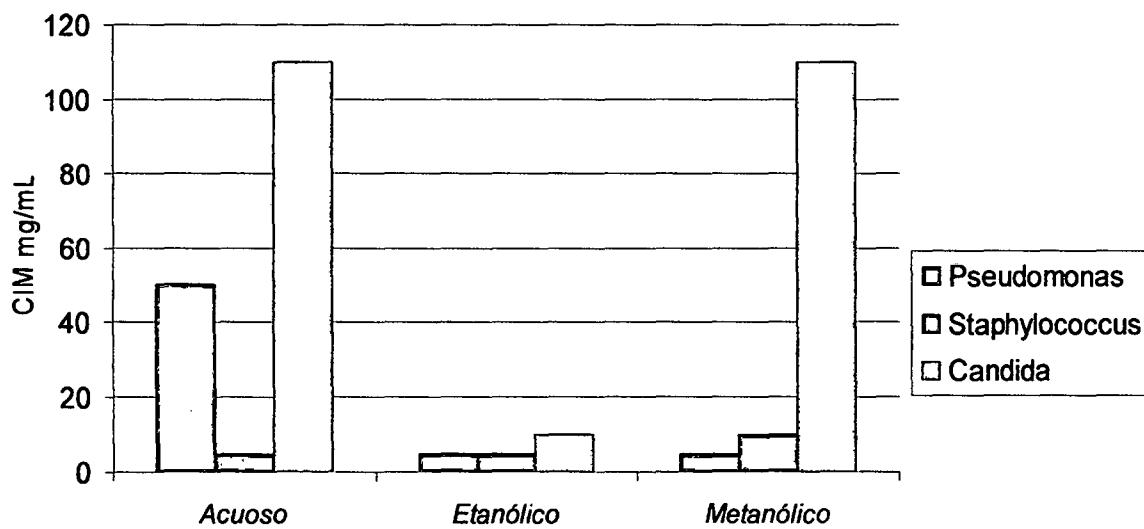


Figura 8. Extractos crudos de corteza de *Cedrela odorata*

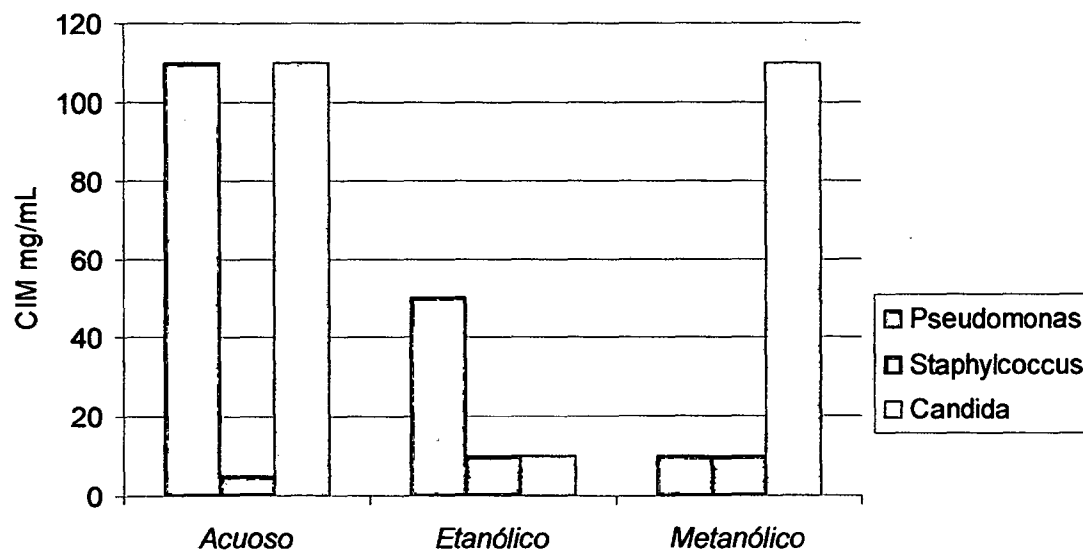


Figura 9. Extractos crudos de hoja de *Cedrela odorata*

4.2.4. Extractos de *Jacaranda copaia*

Los resultados obtenidos de la determinación de la CIM de extractos de *J. copaia*, demuestran que a concentraciones de 5 mg/mL los extractos etanólicos a partir de hojas sólo muestran actividad contra *C. albicans*, en tanto que el acuoso y el metanólico no evidencian notoria actividad inhibitoria (Figura 10), en tanto que a la misma concentración los extractos metanólicos de corteza demostraron inhibir *P. aeruginosa* y el etanólico a 10 mg/ml lo fue contra *S. aureus*, pero el acuoso no demostró ser eficaz para la inhibición microbiana (Figura 11).

Es necesario precisar que los controles utilizados han verificado que la acción antimicrobiana se debe a los constituyentes de los extractos y no a los diluyentes usados, además no se ha presentado signos de toxicidad por éstos en ninguna de las pruebas realizadas.

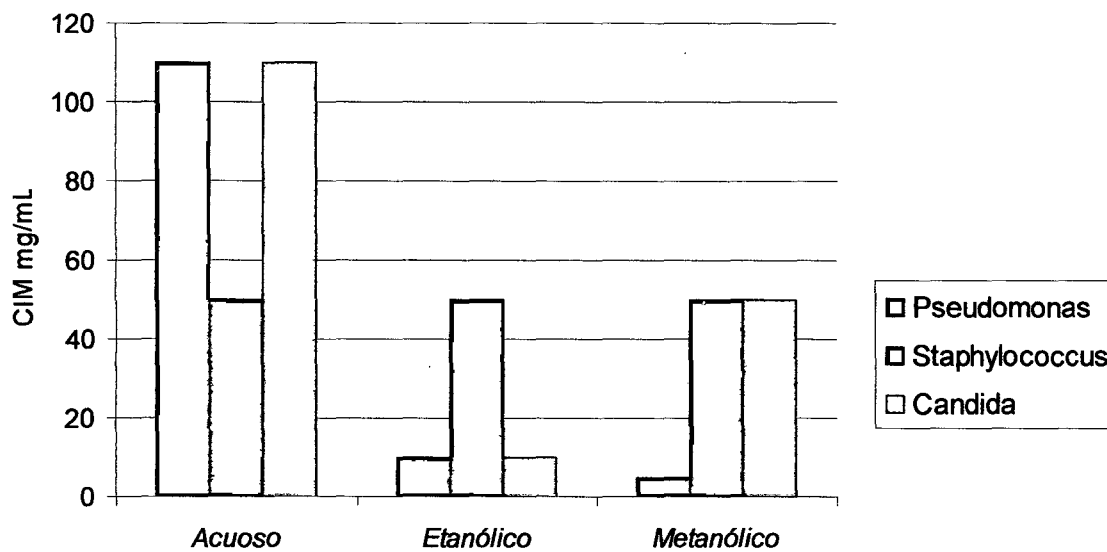


Figura 10. Extractos crudos de corteza de *Jacaranda copaia*

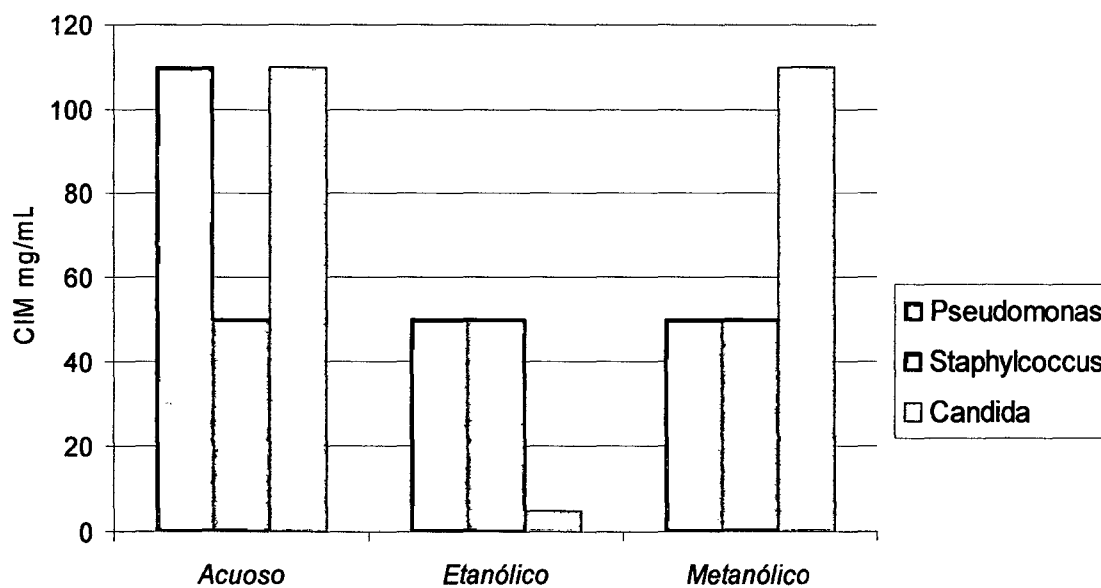


Figura 11. Extractos crudos de hoja de *Jacaranda copaia*

4.3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Según lo observado en el comportamiento de la actividad antimicrobiana de los extractos se ha determinado los patrones de susceptibilidad de acuerdo a la CIM encontrada, estos patrones se anotan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Patrones de susceptibilidad determinados por la CIM

Pseudomonas

A11⁵ A12⁵ A13⁵ A21⁵⁰ A22⁵ A23⁵ B11²⁵ B12⁵ B13⁵ B21^{>50} B22⁵⁰ B23¹⁰
 C11⁵⁰ C12⁵ C13⁵ C21^{>50} C22⁵⁰ C23¹⁰ D11^{>50} D12¹⁰ D13⁵ D21^{>50} D22⁵⁰
 D23⁵⁰

Staphylococcus

A11⁵ A12⁵ A13⁵ A21⁵ A22⁵ A23⁵ B11⁵ B12²⁵ B13⁵ B21¹⁰ B22⁵ B23⁵ C11⁵⁰
 C12⁵ C13¹⁰ C21⁵ C22¹⁰ C23¹⁰ D11⁵⁰ D12⁵⁰ D13⁵⁰ D21⁵⁰ D22⁵⁰ D23⁵⁰

Candida

A11^{>50} A12¹⁰ A13^{+/-50} A21^{>50} A22⁵ A23⁵⁰ B11^{>50} B12¹⁰ B13⁵⁰ B21^{>50} B22¹⁰
 B23^{>50} C11^{>50} C12¹⁰ C13^{>50} C21^{>50} C22¹⁰ C23^{>50} D11^{>50} D12¹⁰ D13^{+/-50}
 D21^{>50} D22⁵ D23^{>50}

Interpretación:

A: *Calycophyllum spruceanum*

B: *Spondias mombin*

C: *Cedrela odorata*

D: *Jacaranda copaia*

Primer dígito: 1, Corteza; 2, Hoja

Segundo dígito: 1, extracto acuoso; 2, extracto etanólico; 3, extracto metanólico

Exponente: CIM en mg/mL

El procesamiento de los datos mediante el SPSS versión 12 demostró que existe diferencia significativa ($p < 0.01$) entre la actividad de los extractos etanólicos, metanólicos y acuosos , ya sea a partir de corteza o de hoja de *C. spruceanum*, *C. odorata* y *S. mombin* con la actividad mostrada por extractos etanólicos y acuosos de *J. copaia* asimismo el ajuste estadístico señaló una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre la acción antimicótica de los extractos etanólicos de todas las especies probadas con los extractos metanólicos y acuosos de las mismas.

Según este ajuste es indistinto el uso de cualquier extracto, sea acuoso, metanólico o etanólico, de *C. spruceanum*, *C. odorata* y *S. mombin* para lograr inhibición del desarrollo bacteriano de los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus*. Los respectivos cuadros se anotan en Anexos.

V. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos han demostrado actividad antimicrobiana variada, observándose diferencias importantes entre las especies vegetales así como en el tipo de extracto preparado, evaluándose el efecto inhibitorio (tóxico) con la aparición de halos claros o turbios, verificándose que en algunos casos se observaron diferencias en el diámetro de los halos formados.

Comparando la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de hojas y de corteza en los distintos disolventes polares, se puede comprobar que los extractos acuosos a partir de hojas de *Spondias mombin* (Ubos) y *Cedrela odorata* (Cedro) inhiben mayormente *Staphylococcus aureus*, mientras que los acuosos obtenidos de *Calycophyllum spruceanum* (Capirona) muestran actividad contra *S.aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

De los obtenidos de *Jacaranda copaia* (Huamanamana), los acuosos de hojas muestran moderada actividad inhibitoria sólo para *S. aureus*. Refiriéndonos a los extractos acuosos obtenidos de corteza de las especies *C. spruceanum*, *S. mombin* y *C. odorata* éstas mostraron tener actividad contra las cepas bacterianas. Sin embargo, los de *J. copaia* no muestran actividad antimicrobiana.

Los extractos etanólicos y metanólicos de hojas y corteza de *C. spruceanum*, mostraron fuerte actividad bactericida y moderada fungicida, siendo los de corteza ligeramente más eficaces que los de hoja. Los extractos etanólicos de hojas de *S. mombin* exhibieron actividad contra *S. aureus* y *Candida albicans* con una ligera actividad contra *P. aeruginosa*, en cuanto a los extractos etanólicos obtenidos a partir de corteza estos manifiestan actividad antifúngica a partir de concentraciones menores acompañada de actividad antipseudomonadacea, se hace evidente que a concentraciones mayores la actividad abarca a las tres cepas microbianas ensayadas. Los extractos metanólicos de hojas y corteza obtenidos de *S. mombin* demostraron tener actividad solo contra microorganismos bacterianos (*S. aureus* y *P. aeruginosa*).

Los extractos etanólicos de hojas de *C. odorata* ostentaron inhibición de *C. albicans*. La acción antibacteriana de los extractos metanólicos a partir de hojas de *C. odorata* es más notoria a concentraciones moderadas, sin embargo no muestran acción antifúngica. Los extractos etanólicos de *C. odorata* obtenidos a partir de corteza demostraron tener capacidad de inhibir tanto las cepas bacterias como la de fungi, en tanto que los extractos metanólicos de corteza de *C. odorata* mostraron ser notoriamente eficaces contra las cepas bacterianas.

Los extractos etanólicos de hojas y corteza de *J. copaia* mostraron actividad antifúngica desde la menor concentración.

Desde el punto de vista de la actividad antimicrobiana de extractos crudos vegetales, nuestros resultados en términos generales son coincidentes con los reportados por LAPENNA *et al.* (2003) quienes indican que seis plantas de uso común en Venezuela mostraron efecto antibacteriano y antimicótico mayormente en sus extractos acuosos y metanólicos, y además señalan que existen influencia significativa en la forma de obtención de los extractos en lo relacionado a la conservación de los principios activos presentes en el vegetal.

Por otro lado las concentraciones alcanzadas en la CIM son relativamente bajas a las reportadas por DOMINGO y LOPEZ (2003) quienes sostienen que concentraciones de CIM de 100 a 1000 mg/mL de extractos crudos vegetales son comunes encontrarlos en experimentos de terapéutica, sin embargo nuestro reporte indica que las concentraciones de la CIM son similares y en algunos casos menores (5 mg/mL) a las concentraciones en que actúa los antibióticos convencionales (generalmente 25 - 30 mg/mL) (JENKINS *et al.*, 1985; KIRBY *et al.*, 1966).

No obstante CACERES *et al.* (2001) manifiestan que demostraron actividad antifúngica a concentraciones de 0.5 mg/mL con extractos acuosos de 16 especies vegetales del Caribe utilizadas como medicinales en dicha

región. En ese sentido, en lo determinado por nuestra experiencia la mínima concentración utilizada y efectiva ha sido 5 mg/mL, de acuerdo al comportamiento antimicrobiano de las especies evaluadas suponemos que a menores concentraciones nuestras especies vegetales presentan actividad antimicótica y más aún también antibacteriana, como los demuestran nuestros extractos etanólicos a partir de hojas de *C. spruceanum* y de *J. copaia*.

En lo que se refiere al tipo de extracto según el diluyente utilizado, los extractos crudos obtenidos con etanol han demostrado tener mayor actividad antibacteriana y antimicótica mayormente de los preparados a partir de corteza de las cuatro especies ensayadas. Al respecto, FERRO y CANELA DE ALVARENGA (2000), indican que extractos crudos obtenidos de la especie *Aristolochia giberti* efectuados por percolación con etanol son más activos frente a los microorganismos grampositivos como *Staphylococcus* y *Bacillus* y con cierta selectividad para *P. aeruginosa* que estos extractos mantienen una estabilidad relativa de sus componentes por más de cuatro años. Y en el mismo sentido ALARCON *et al.* (2004) mostraron que extractos etanólicos de *Haemotoxylon brasiletto* (palo de Brasil) es más efectivo para inhibir a *Vibrio cholerae* una bacteria gramnegativa, y SILVA *et al.* (2004) quienes indican que extractos etanólicos de hojas de *Ricinus communis* fueron activos contra *S. aureus*, *Escherichia coli* y *C. albicans*. Esto es comparativamente similar a nuestro hallazgo, relativo al extracto crudo etanólico, sin soslayar que las especies vegetales son muy distintas.

Es interesante tener en cuenta que los extractos crudos acuosos de tres especies probadas (exceptuando a *J. copaia*) han brindado un rendimiento antimicrobiano aceptable y una selectiva acción frente a las cepas bacterianas gramnegativas y grampositivas, demostrando que estas especies podrían ser utilizadas mediante cocimientos de corteza u hojas para evitar infecciones mediados por estos microorganismos.

Los extractos metanólicos manifestaron actividad antimicrobiana muy variada frente a las bacterias siendo los más eficaces en la inhibición los extraídos de corteza de tres especies (con excepción de *J. copaia*), sin embargo no fueron efectivos contra *C. albicans*. Este resultado es contrario a lo reportado por LAPENNA *et al.* (2003) quienes argumentan que los extractos metanólicos obtenidos de las especies *Manigera indica* y *Psidium guineense*, presentan mayor actividad antimicrobiana. Es posible que esto se deba a lo muy variado de las especies que ellos utilizaron con referencia a nuestras especies forestales y que sus extractos fueron concentrados y resuspendidos en un volumen de hasta 100 veces de lo que se ha realizado en nuestra investigación.

La actividad antimicrobiana demostrada por nuestros extractos denotan que sus constituyentes activos se han mantenido sin alterar en el proceso de extracción, estos podrían ser mucílagos, sustancias reductoras, aminoácidos, taninos y flavonoides que se encuentran en el material seco y

fresco, que no se alteran con el secado, lo que si ocurre con las antocianidinas, según lo fundamenta MÁRQUEZ *et al.* (1999). Dado la actividad antimicótica verificada podemos asumir la existencia de flavonoides y de ácidos fenólicos que además de ser tóxicos para las levaduras inhibirían la actividad enzimática de la hialuronidasa y la actividad de la dihidrofolatoreductasa podrían dar explicación a los efectos antimicrobianos mostrados. Además la posible presencia de componentes cinámicos y taninos, traerían como consecuencia la alteración de las membranas y motilidad bacterianas.

Con referencia a los métodos de obtención de los extractos, éstos han revelado que los extractos resultantes han conservado sus propiedades fotoquímicas intactas por la actividad antimicrobiana demostrada *in vitro*, y que comparándolos con los utilizados por investigadores extranjeros, han funcionado óptimamente.

VI. CONCLUSIONES

- 1. Los extractos crudos acuosos de *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* son activos frente a bacterias y los de *J. copaia* muestran escasa actividad antimicrobiana.**
- 2. Extractos etanólicos y metanólicos de corteza de *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* tienen actividad antibacteriana.**
- 3. Los extractos etanólicos de hojas de *J. copaia*, *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* denotan actividad antimicótica.**
- 4. Los extractos crudos obtenidos de corteza de las especies en estudio revelaron mejor comportamiento inhibitorio antimicrobiano que los obtenidos de hojas.**
- 5. Los extractos etanólicos y acuosos de *C. spruceanum* y *C. odorata* tuvieron mejor rendimiento antibacteriano.**

6. Extractos etanólicos de *J. copaia* manifestaron notoria actividad antimicótica.

7. No se encontró efecto tóxico de los solventes sobre los microorganismos indicadores utilizados.

VII. RECOMENDACIONES

- 1. Profundización de la investigación de nuevos agentes antimicrobianos.**
- 2. Incrementar en número de microorganismos de prueba a grupos más específicos de patógenos.**
- 3. Realizar ensayos de biotoxicidad de los extractos crudos que se obtengan de diferentes especies forestales.**
- 4. Complementar el estudio con la determinación e identificación fitoquímica correspondiente de los principios activos presentes en los extractos por cromatografía en capa fina delgada y líquida de alto rendimiento.**
- 5. Determinación de: fracciones por Absorción-Desorción en silicagel G60, del punto de fusión, de los espectros UV, espectros IR y espectros RMN (resonancia magnética nuclear).**

ABSTRACT

Bactericidal and fungicide activity is valued from raw extracts of four forest species determining its minimal inhibiting concentration (MIC) in mg/mL front of indicative strains *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*.

Watery raw extracts from *Calycophyllum spruceanum*, *Spondias mombin*, *Cedrela odorata* demonstrated to have inhibiting activity in concentrations 5 to 50 mg/mL front of bacteria and them *Jacaranda copaia* show scarce antimicrobial activity. Concentrations 5 and 10 mg/mL .from *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* ethanolycs and methanolycs bark extracts have antibacterial activity. Being the ethanolics and watery extracts from *C. spruceanum* and *C. odorata* those that had better antibacterial yield.

Also ethanolics leaves of *J. copaia*, *C. spruceanum*, *S. mombin*, *C. odorata* reveals fungicide activity starting from concentration 5 mg/mL, standing out the extracts ethanolics of *J. copaia*.

The obtained raw extracts bark of the species in study revealed better behavior antimicrobial inhibiting that the obtained ones give leaves.

No was toxic effect for the solvents on the used indicative microorganisms.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJELLO, L., GEORG, L.K., KAPLAN, W.A. and KAUFMAN, L., 1966. Laboratory Manual for Mycology, Communicable Disease Center, Atlanta; Georgia, USA.

ALARCÓN, F.G., GARCIA, J.S., HEREDIA, N.L., GÓMEZ, M., QUINTANILLA, R., GARCIA, S., SÁNCHEZ, E. y MALDONADO, E. 2004. Inhibición del crecimiento, la producción de enterotoxina y la adhesión de *Vibrio cholerae* a células por extractos de *Haemotoxylon brasiletto* (palo de Brasil). Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Rev. Fac. Salud Pública y Nutrición, Edición Especial N° 3 – 2004.

ALVAREZ, G.E. 2003. Extractivos del árbol. [En línea]: Eco Portal, (<http://www.ecoportail.net/content/view>, Contenidos, 7 Mar. 2005).

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 1992. Compendium of methods for the microbiological examination. 2ª Ed., Washington, USA.

ANKLI, A., HEINRICH, M. and BORK, P. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: Evaluation based on indigenous uses. J Ethnopharmacol 79: 43-52.

- BAE, E., HAN, M. and KIM, D. 1999. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of some flavonoids and their metabolites. *Planta Med* 65: 442-443.
- BITTNER, M. 2002. FAO: Compuestos de acción biológica, Laboratorio Químico de Productos Naturales de la Universidad de Concepción, Chile. [En línea]: FAO, (<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/forestry>, Información, 26 Feb. 2005).
- CABRERA, J.L., PEREZ, C., TIRABOSCHI, I.N., ORTEGA, M.G. and AGNESE, A.M. 2004. Further Antimicrobial Studies of 2'4'-dihidroxy-5'-(1-dimethylallyl)-6-prenylpinocembrin from *Dalea elegans*. *Pharmaceutical Biology*, May. 2003, 41: 3, 171 – 174.
- CACERES, A., MORALES, C., GIRON, L. y NAVARRO, M., 2001. Demostración de la actividad antimicrobiana de algunas especies vegetales y usadas popularmente como medicinales en la cuenca del Caribe. *Rev. Ciencia y Tecnología*, 2001 (1): 81-87.
- CELLINI L., CAMPLI E.D., MASULLI M., DI BARTOLOMEO S., and ALLOCATI N. 1996. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13: 273-277.
- CHUNG, J.G., CHEN, G.W., WU, L.T., CHANG, H.L., UN, J.G., YEH, C.C. and WANG, T.F. 1998. Effects of garli compounds diallyl sulfide and diallyl

disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Am. J. Clin. Med.* 26: 353-364.

COSSIO, C., VALER, K. y GONZALES, N. 2002. Identificación de compuestos antifúngicos en raíces y tubérculos andinos como herramienta biotecnológica para el incremento de la resistencia a patógenos en papa. Instituto de Estudios Ambientales. [En línea]: PUCP, (<http://www.pucp.edu.pe/invest/idea/bioq.htm>, Investigación, 26 Feb. 2005).

DOMINGO, D. y LOPEZ-BREA, M., 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev. Esp. Quimioterap*, 16 (4) : 385 – 393.

ELOFF, J. N. 1998. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. *J. Ethnopharmacol* 60: 1-8.

FABRY, W., OKEMO, P. y ANSORG, R. 1996. Activity of East African medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *J. Microbiology* 42: 315-317.

FERRO, E. y CANELA DE ALVERANGA, N. 2000. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Aristolochia giberti* (patito). Dirección de Investigaciones – UNA - *Rev. Ciencia y Tecnología*, Vol.1 N° 2, 2000, 71 – 77.

GARCIA, F.I. 2003. Técnicas de comprobación de actividad terapéutica. [En Línea]: Plantas Medicinales, (<http://www.plantasmedicinales.org/farmacognosia/mayo2003/tecnicas.htm>, Feb. 2005).

GERMANÓ, M.P., SANOGO, R., GUGLIELMO, M., DE PASCUALE R., CRISAFI G. and BISIGNANO G. 1998. Effect of *Pteliopsis suberosa* extracts on experimental gastric ulcers and *Helicobacter pylori* growth. J Ethnopharmacol 59: 167-172.

HERNÁNDEZ, A.M.; GARCIA, L., ROJO D.M. y OLIVARES P. 2003. Almendro de la India: Potencial biológico valioso, Rev. Cubana Invest Biomed 2003: 22(1) 41 – 47.

JENKINS, R.D., STEVENS, S.L., CRAYTHORN, J.M., THOMAS, T.W., GUINAN M.E. and MATSEN, J.M. 1985. False susceptibility of enterococci to aminoglycosides with blood-enriched Muelle-Hinton agar for disk susceptibility testing. J. Clin. Microbiol., 22: 369 – 374.

KIRBY, W.M.M., BAUER, A.W., SHERRIS, J.C. and TURCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amr.J.Clin.Pathol. 45: 493 – 496.

LAPENNA, E.A., MEDINA, G., DIAZ, L., AGUILÓN, K. y MARÍN, H. 2003. Actividad bactericida y funguicida de algunas plantas utilizadas en la medicina

tradicional venezolana. Rev. Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, ISSN 0798-0477, Vol. 34, N° 1, Enero 2003.

MABE, K., YAMADA, M., OGUNI, I. and TAKAHASHI, T. 1999. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 43: 1788-1791.

MARQUEZ, H.I., CUELLAR, A., MARTINEZ, J., ALEMAN, A., LORA, J. y VÉLEZ, H. 1999. Estudio fotoquímico de la especie *Hibiscus elatus* S.W., Rev. Cubana Farm. 33 (2): 127 – 131.

NIR, Y., POTASMAN, I., STERMER, E., TABAK, M. and NEEMAN, I. 2000. Controlled trial of the effect of cinnamon extracts on *Helicobacter pylori*. Helicobacter 2000, 5: 94-97.

O'GARA, E.A, HILL, D.J., MASLIN, D.J. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Appl Environ Microbiol 66: 2269-2273.

OHTA, R., YAMADA, N. and KANEDO, H. 1999. In vitro inhibition of the growth of *Helicobacter pylori* by oil-macerated garlic constituents. Antimicrob Agents Chemother 43: 1811-1812.

ORANDAY, C.,A., RIVAS, C., CRUZ, D., CARRANZA, P., PADRÓN, B. y VERDE, M.J. 2004. Actividad antimicrobiana y citotoxicidad de *Syzygiun aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Psidium guajava*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Rev. Fac. de Salud Publica y Nutrición. Edición Especial, N° 3 – 2004.

ORTEGA, T. 2005. Plantas Medicinales. Medico Directo. [En línea]: Médico directo, (<http://www.medicodirecto.com/temassalud/indexnot.html>, Mar. 2005)

PEREZ, J.E., ISAZA, G., BUENO, J.G., ARANGO, M.C., HINCAPIÉ, B., NIETO, A.M. y LONDOÑO, D.P. 2004. Efecto de los extractos de *Phenas rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althemantera williamsii* y *Solanum dolichosepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas. Universidad de Caldas. Rev. Med. Risaralda, Nov. 2004, 10 (2): 13 – 21.

PITTLER, E.E. 2002. Herbal medicine. Med Clin North Amer 86: 149 161.

ROSALES, C.M, y GONZÁLEZ R. 2003. Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. Rev. Madera y Bosques 9 (2) :41-49.

SJÖSTRÖM, E. 1981. Wood Chemistry, Fundamentals and Applications. Academic Press. New York. 223p.

- SILVA, S.Y., RIVAS, C., ORANDAY, A., VERDE, M.J., CRUZ, D. y CARRANZA, P. 2004. Determinación de la actividad antimicrobiana y citotóxica de las fracciones obtenidas de extracto hexánico de la raíz de *Jatropha dioica*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. Rev. Fac. de Salud Pública y Nutrición. Edición Especial, N° 3 – 2004.
- STAUFFER, B.A., ORREGO A. y AQUINO, A. 2003. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida, Fac. Cs. Agrarias, Div. Fitopatología, UNA. [En línea], NEWTON, (www.newton.cnc.una.py/id47.htm 25 Mar. 2005).
- STEEL, 1988. Bioestadística, Principios y procedimientos, 2da. Edición, Editorial Servicios Gráficos de Comunicaciones S.A., México.
- TABAK, M., ARMON R., PATASMAN I. and NEEMAN I. 1996. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. J. Appl. Bacteriol. 80: 667-672.
- TAGBOTO, S. and TOWNSON, S. 2001. Antiparasitic properties of medicinal plants and other natural occurring products. Adv Parasitol 2001, 50: 199-295.
- TAKASHIMA, J., CHIBA, N., YONEDA, K. and OHSAKI, A. 2002. Derrisin, a new rotenoid from *Derris malaccensis* plant and anti-*Helicobacter pylori* activity of its related constituents. J Nat Prod 65: 611-613.

**UNITED STATES PHARMACOPEIA XXIII, 1995. Chapter "Microbial Limit Tests",
USP, Washington, USA.**

VARGA, J. 2002. Comportamiento de algunos extractos de la corteza del pino caribe (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) sobre el crecimiento de hongos xilófagos y su acción antioxidante. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Forestales. Universidad de Pinar del Río. Cuba.

VÁZQUEZ, A. 2001. Desarrollo de nuevos antimicrobianos. Estrategias y expectativas. [En línea]: AGFU, (<http://www.agfu.Org.uy/>, Farmacognosia, 6 Mar. 2005).

YAM, T.S., SHAH, S. and HAMILTON-MILLER, K.M.T. 1997. Microbiological activity of whole and fractionated crude extracts of tea (*Camellia sinensis*), and of tea components. Fems Microbiol Lett 152: 169-174.

YEE. Y.K., KOO, M.W. and SZETO, M.L. 2002. Chinese tea consumption and lower risk of Helicobacter infection. J Gastroenterol Hepato 17: 552-555.

ANEXOS

A. Preparación de los extractos crudos

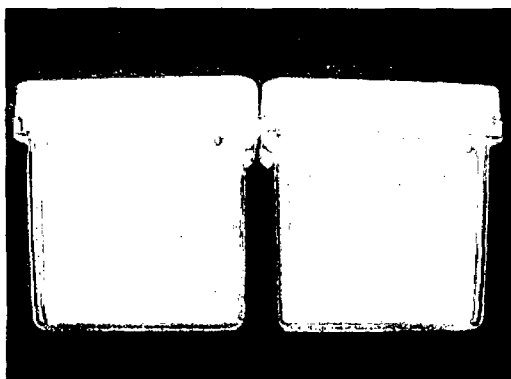


Figura 12. Material pulverizado de corteza y hojas de *Calycophyllum spruceanum*

Figura 13. Material pulverizado de corteza y hojas de *Spondias mombin*

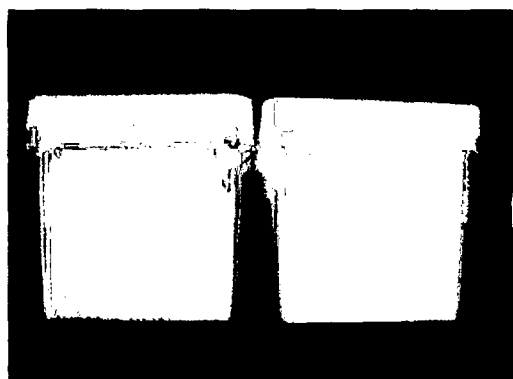
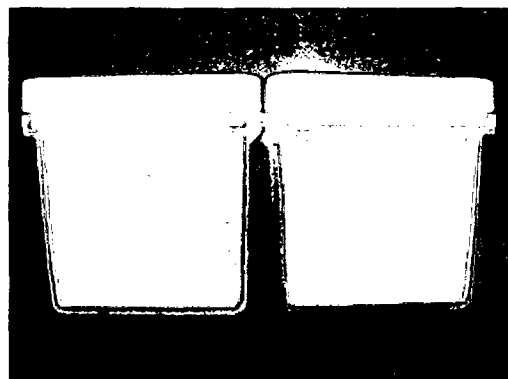


Figura 14. Material pulverizado de corteza y hojas de *Cedrela odorata*

Figura 15. Material pulverizado de corteza y hojas de *Jacaranda copaia*

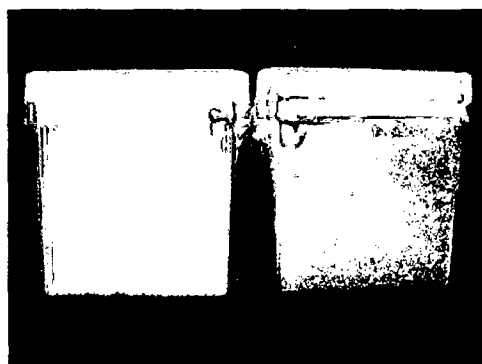


Figura 16.
Pulverizados de
corteza y de hojas de
las especies
forestales en estudio

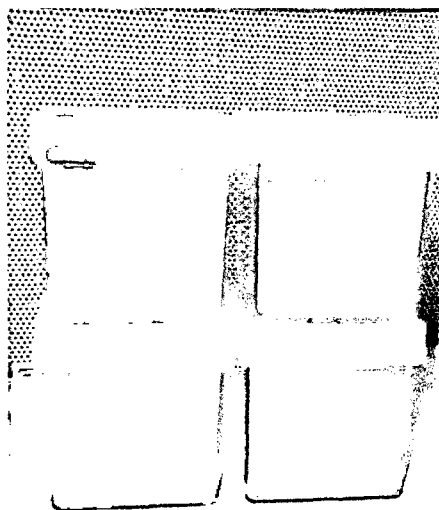
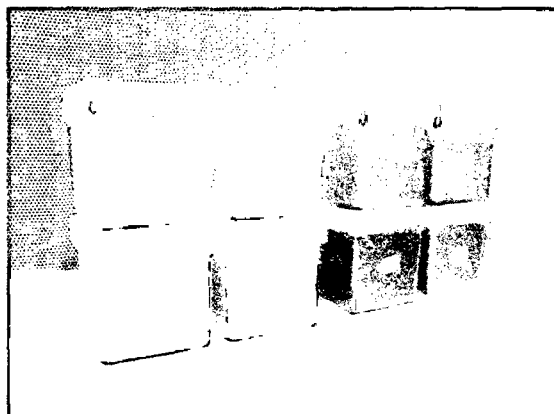


Figura 17. Pulverizados
de hoja de las especies
en estudio

Figura 18. Pulverizados
de corteza de las
especies en estudio

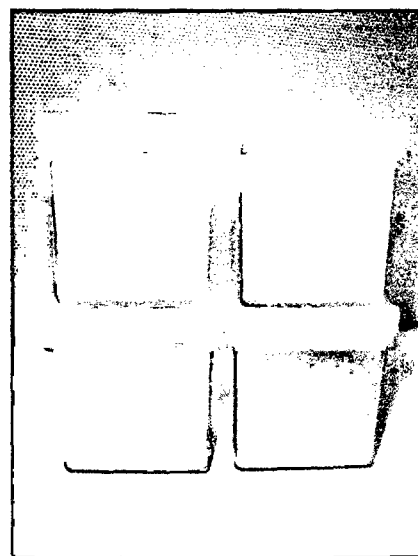


Figura 19. Extractos
crudos preparados



Figura 20. Extractos
crudos en matraces



Figura 21.
Conservación de los
extractos crudos
preparados



B. DETERMINACIÓN DE LA CIM

B1. SIEMBRA DE CEPAS MICROBIANAS INDICADORAS

Figura 22. Siembra por diseminación en superficie sobre placas con cuadrícula donde se realizará la CIM de los extractos



Figura 23. Realizando la siembra por diseminación sobre las placas con cuadrícula

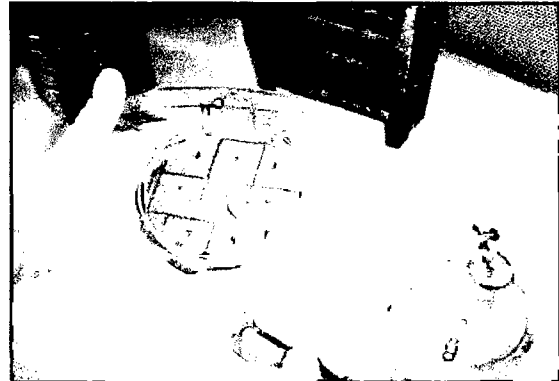


Figura 23. Incubación de las placas sembradas

B2. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS DE EXTRACTOS CRUDOS

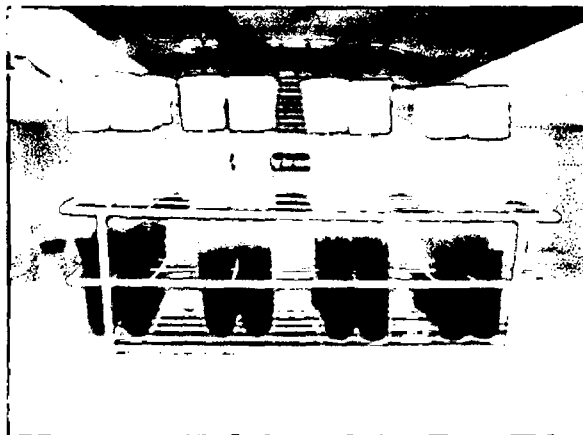


Figura 24. Tubos con sobrenadantes resultantes del centrifugado de los extractos

Figura 25. Sobrenadantes trasvasados en viales para su distribución en la CIM

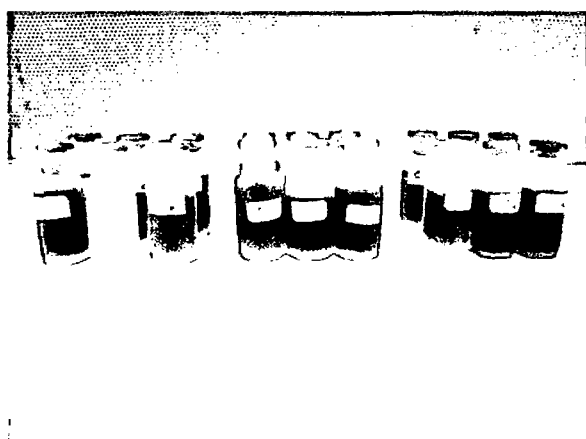


Figura 26. Viales con los extractos que se han de evaluar en la CIM

Figura 27. Viables con extractos de *J. copaia*

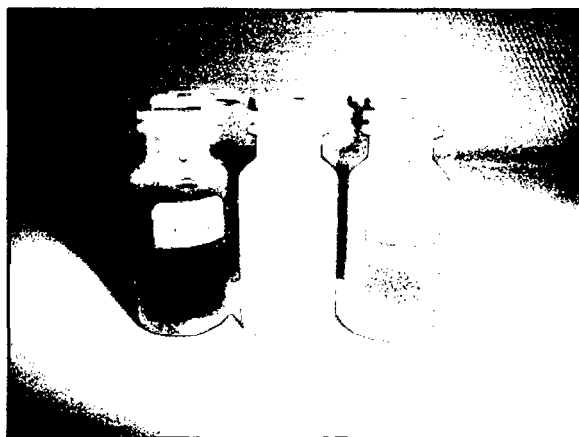
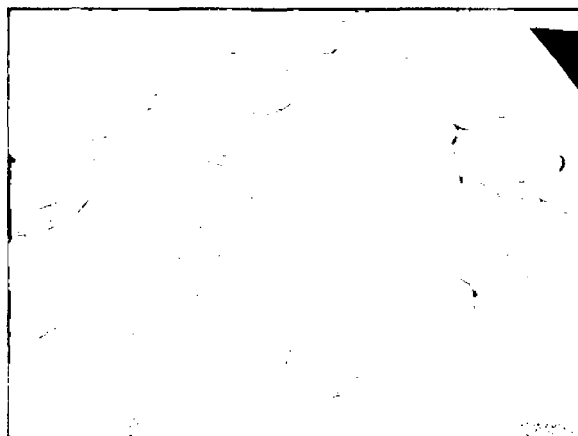


Figura 28. Serie de placas que se realizan en la CIM de los extractos crudos



Figura 29. Serie de placas utilizadas en la determinación de la CIM



B3. REALIZACIÓN DE LA CIM

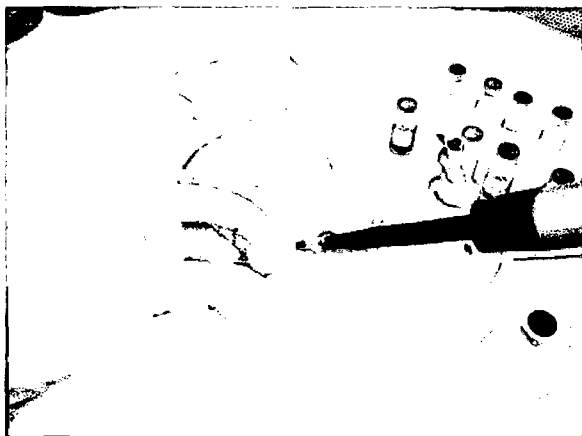


Figura 30. Técnica de tomar el inóculo para la determinación de la CIM

Figura 31. Depósito del inóculo sobre un recuadro de la cuadrícula de la placa de CIM

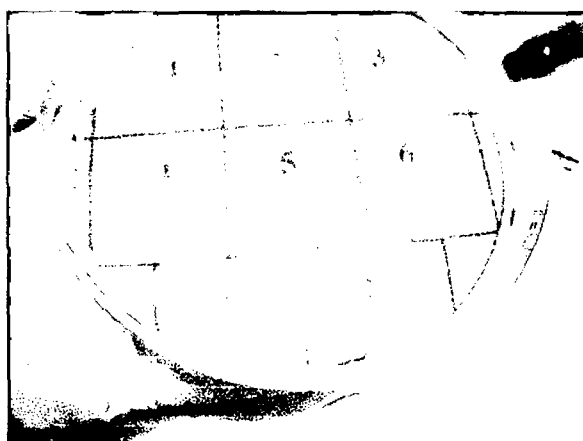


Figura 32. Depósito de la alícuota sobre la placa de CIM



Figura 33. Realizando las siembra para la CIM

Figura 34.
Determinación de la CIM

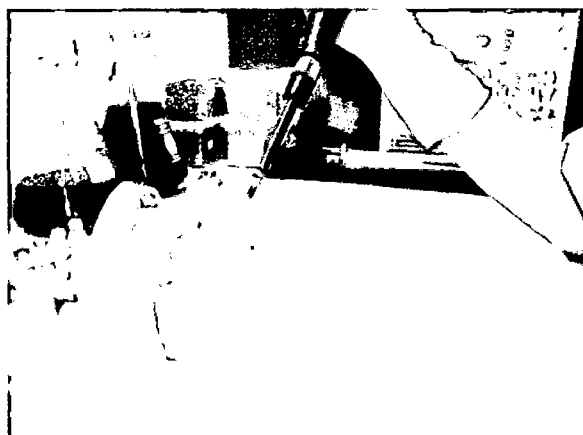


Figura 35. Depósito de inóculo de extracto para la CIM

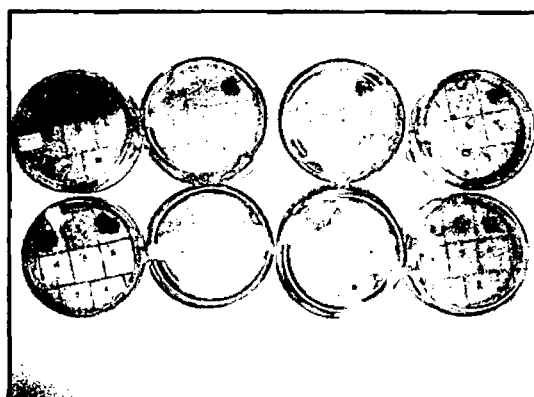


Figura 36. Placas mostrando el resultado de la CIM

Figura 37. Resultado de la CIM se puede apreciar los halos de inhibición formados

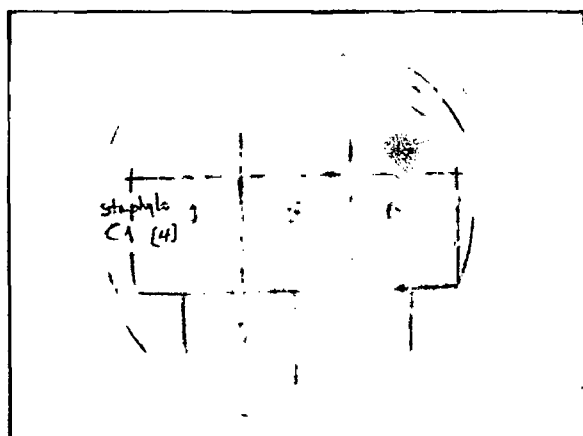
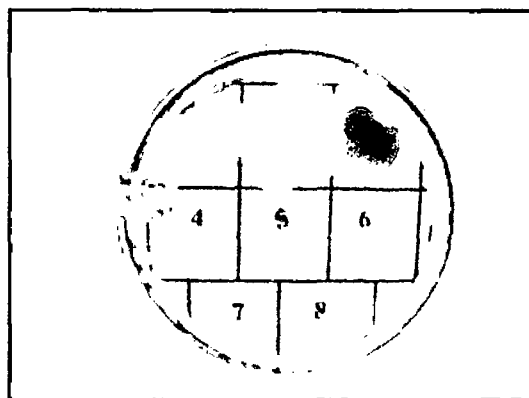


Figura 38. Halos de inhibición formados luego de la incubación

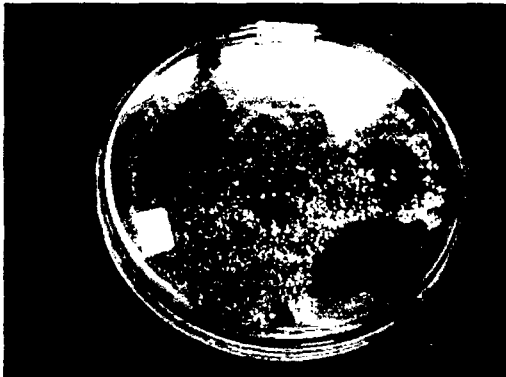


Figura 39. Desarrollo de halos de inhibición en placas de CIM con *P. aeruginosa*

Figura 40. Apariencia de una placa de CIM con *S. aureus* luego de la incubación

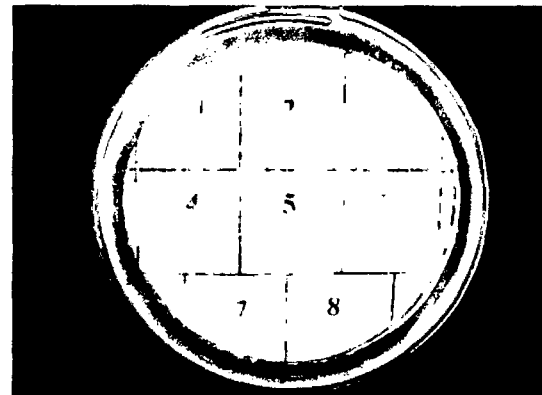


Figura 41. Observación de halos de inhibición en placa de CIM con *C. albicans*

C. Datos originales

C1. Determinación de la CIM

Calycophyllum spruceanum "capirona" (A)

Halos de inhibición (mm)

cc.	T	HOJA (A2)						CORTEZA (A1)											
		Pseudomona			Staphylococcus			Candida			Pseudomona		Staphylococcus		Candida				
5 mg/ mL	1	0	0	0	27	26	26	0	0	0	18	20	20	25	20	24	0	0	0
	2	30	27	29	34	33	32	20	20	20	25	30	27	25	20	26	15	10	10
	3	22	21	21	30	29	28	11	10	9	27	30	28	21	30	24	10	10	10
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	21	20	20	25	24	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	27	29	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30
10 mg/ mL	1	0	0	0	19	18	18	0	0	0	18	20	21	26	30	28	0	0	0
	2	32	30	29	37	38	36	34	21	22	31	30	30	25	20	27	21	19	20
	3	36	32	33	36	35	34	15	14	14	26	30	27	31	30	32	11	10	10
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	20	21	23	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30
25 mg/ mL	1	15	13	14	27	26	27	0	0	0	20	20	20	28	30	30	0	0	0
	2	36	34	31	34	34	32	25	26	24	27	30	28	26	30	28	23	19	22
	3	24	23	23	43	41	40	16	14	14	31	25	26	31	26	24	13	10	12
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	2	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30
50 mg/ mL	1	30	31	29	30	30	31	0	0	0	30	30	31	32	30	30	0	0	0
	2	36	34	35	35	33	31	37	35	37	32	32	33	42	40	37	30	30	31
	3	35	33	33	33	30	32	32	30	30	31	30	29	43	40	36	18	16	15
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	2	2	3	3	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	20	20	20	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30

Spondias mombin "ubos" (B)
Halos de inhibición (mm)

cc.	T	HOJA (B2)						CORTEZA (B1)											
		Pseudomonas			Staphylococcus			Candida			Pseudomonas			Staphylococcus			Candida		
5 mg/ mL	1	0	0	0	16	18	16	0	0	0	17	18	16	22	22	20	0	0	0
	2	0	0	0	28	29	30	12	17	15	18	18	18	0	0	0	15	12	12
	3	0	0	0	26	24	23	0	0	0	20	20	25	25	24	25	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20
10 mg/ mL	1	0	0	0	22	20	20	0	0	0	17	18	20	22	22	22	0	0	0
	2	0	0	0	28	28	25	21	20	20	18	16	16	0	0	0	25	25	23
	3	35	32	30	30	30	30	0	0	0	20	26	28	28	26	28	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20
25 mg/ mL	1	0	0	0	30	34	30	0	0	0	20	21	22	20	22	19	0	0	0
	2	15	10	10	30	30	30	25	25	24	32	34	35	29	30	32	31	26	24
	3	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	32	36	30	30	30	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	21	0	0	0	0	0	0	20	20	20
50 mg/ mL	1	0	0	0	30	30	30	0	0	0	32	30	32	16	14	15	0	0	0
	2	20	20	18	33	33	30	30	35	32	36	34	33	29	28	32	36	32	34
	3	30	30	30	33	32	26	0	0	0	40	40	40	30	30	35	26	26	26
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20

***Cedrela odorata* "cedro" (C)**
Halos de inhibición (mm)

cc.	T	HOJA (C2)						CORTEZA (C1)											
		Pseudomonas			Staphylococcus			Candida			Pseudomonas			Staphylococcus			Candida		
5 mg/ mL	1	0	0	0	22	21	20	0	0	0	16	16	13	20	20	20	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	19	13	15	27	25	26	21	20	20	15	15	12
	3	0	0	0	8	6	8	0	0	0	25	25	25	15	18	15	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	26	29	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20
10 mg/ mL	1	0	0	0	17	22	22	0	0	0	17	18	17	30	28	28	0	0	0
	2	0	0	0	27	28	28	20	20	22	32	30	30	30	30	31	19	22	20
	3	25	25	20	30	30	30	0	0	0	33	32	32	30	29	25	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20
25 mg/ mL	1	0	0	0	18	20	20	0	0	0	15	15	16	30	30	30	0	0	0
	2	0	0	0	28	30	30	28	30	30	30	31	29	32	31	30	30	33	30
	3	25	20	20	30	20	25	0	0	0	33	35	35	35	29	27	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	30	30	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 mg/ mL	1	10	10	12	18	14	20	0	0	0	15	20	20	25	26	26	0	0	0
	2	25	28	28	30	24	30	27	30	29	44	40	40	32	30	31	32	32	30
	3	30	28	30	30	25	23	0	0	0	40	40	41	30	28	25	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Jacaranda copaia "huamansamana" (D)
Halos de inhibición (mm)

cc.	T	HOJA (D2)						CORTEZA (D1)											
		Pseudomonas			Staphylococcus			Candida			Pseudomonas			Staphylococcus			Candida		
5 mg/ mL	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	9	10	10	23	22	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	20	21	19	20	21	15	16	15
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20
10 mg/ mL	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	28	30	30	30	30	30	19	22	20	21	23	22
	3	0	0	0	0	0	0	10	10	9	30	30	30	21	20	20	14	15	15
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	30	30	30	30	30	0	0	0	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	21	20	20
25 mg/ mL	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	30	28	28	23	23	25	18	16	19	22	23	20
	3	27	27	28	0	0	0	10	10	10	30	30	30	23	24	28	15	15	15
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	21	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20
50 mg/ mL	1	0	0	0	30	30	30	0	0	0	0	0	0	30	30	30	0	0	0
	2	30	30	30	30	30	29	30	32	30	30	30	30	30	30	30	22	23	24
	3	30	30	30	36	34	33	10	10	10	30	30	30	30	30	30	16	15	15
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	30	30	30	30	30	30	30	30	30	40	32	34	30	30	30	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20

C2. Análisis estadísticos.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Pseudomonas1	Extractos	6159.969	7	879.996	18.604	.000
	Error	1135.250	24	47.302		
	Total	7295.219	31			
Staphylococcus1	Extractos	6531.000	7	933.000	22.116	.000
	Error	1012.500	24	42.188		
	Total	7543.500	31			
Candida1	Extractos	5182.875	7	740.411	39.401	.000
	Error	451.000	24	18.792		
	Total	5633.875	31			

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Pseudomonas1	Concentración	82.094	3	27.365	.106	.956
	Error	7213.125	28	257.612		
	Total	7295.219	31			
Staphylococcus1	Concentración	212.500	3	70.833	.271	.846
	Error	7331.000	28	261.821		
	Total	7543.500	31			
Candida1	Concentración	123.125	3	41.042	.209	.890
	Error	5510.750	28	196.813		
	Total	5633.875	31			

SPSS V.12 ES