



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Aislamiento y determinación de la estructura química de principios activos presentes en *Eugenia uniflora* L., obtenidos de compuestos solubles en éter de petróleo.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN PLANTAS MEDICINALES

Farmacéutica Viviana Silvina Bravi

Director: *Prof. Dr. Luis Bruno Blanch*

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos

LIDeB

Año: 2018

A mis padres

Agradecimientos

§ A la Universidad Nacional de la Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas por concederme el espacio para la realización de este trabajo.

§ Al Prof. Dr. Luis Bruno Blanch por su dirección en esta investigación, por la generosidad de su tiempo e inmensa paciencia, además de brindarme el uso de su laboratorio.

§ Al Prof. Dr. Aníbal Amat por enviar el material vegetal y realizar la determinación taxonómica.

§ A mi colega la Mgter. Farm. María Elena del Valle, con la cual compartí las primeras búsquedas bibliográficas y extracción de *Eugenia uniflora*, convirtiéndose en una amiga invaluable.

§ A mi colega, la Farm. Sandra Castello, por su ayuda generosa en el desarrollo de la actividad biológica.

§ A la Dra. Martha Nájera por su cariño e incentivarme desde un comienzo en la realización de esta carrera.

§ A la Dra. Alicia Consolini, por su gentileza en compartir parte de los ensayos experimentales en su Laboratorio.

§ A mis compañeras de la carrera y a cada una de las personas que trabajan en la Cátedra de Química Medicinal, por su desinteresada colaboración, creando un ambiente muy amigable.

§ A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Exactas, de la Universidad Nacional de La Plata, por sus enseñanzas.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Breve Historia de las Plantas Medicinales	5
1.2. Búsqueda de nuevos antimicrobianos derivados de plantas	14
2. <i>Eugenia uniflora</i> L.	17
2.1. Clasificación Taxonómica	17
2.2. Características de la familia	17
2.2.1. Clave de los géneros	19
2.2.2. Clave de las especies	20
2.3. Nombre científico	21
2.4. Nombres vulgares	22
2.5. Descripción de la planta de estudio: <i>Eugenia uniflora</i> L.	22
2.6. Fitogeografía	25
3. Fitoquímica	28
3.1. Antecedentes químicos del género <i>Eugenia</i>	28
3.2. Antecedentes químicos de <i>Eugenia uniflora</i> L.	36
4. Farmacología	45
4.1. Antecedentes farmacológicos del género <i>Eugenia</i>	45
4.2. Antecedentes farmacológicos de <i>Eugenia uniflora</i> L.	48
4.3. Usos etnofarmacológicos de <i>Eugenia uniflora</i> L.	52
5. Ensayos Farmacológicos	53
5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana	53
5.2. Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos: <i>Escherichia coli</i>	58
5.3. Cocos Gram positivos anaerobios facultativos: <i>Staphylococcus aureus</i>	60
5.4. Bacilos Gram positivos formadores de Endosporas: <i>Bacillus subtilis</i>	63
5.5. Bacilos Gram negativos no fermentadores: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64
6. Obtención de Medicamentos Herbarios	67
7. Objetivos	69
8. Materiales y Métodos	70

	Índice
8.1. Material vegetal: Procedencia	70
8.1.1. Determinación Taxonómica	70
8.1.2. Recolección, secado y acondicionamiento del material vegetal	70
8.2. Extracción del material vegetal	71
8.2.1. Obtención del extracto hexánico y metanólico	71
8.2.2 Estudio del Extracto Hexánico	71
8.3. Estudio Fitoquímico	72
8.3.1. Métodos cromatográficos utilizados	72
8.3.1.1. Cromatografía en Capa Fina o Delgada (CCD)	72
8.3.1.2. Cromatografía en Papel (CP)	73
8.3.1.3. Cromatografía en Columna (CC)	73
8.3.1.4. Cromatografía en Placa Preparativa	73
8.3.1.5. Cromatografía Bidimensional	73
8.3.1.6. Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).....	74
8.3.1.7. Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HPLC-HRMS).....	74
8.3.2. Caracterización Fitoquímica	74
8.3.2.1. Reacción con Ácido Sulfomolibdico (para compuestos reductores)	75
8.3.2.2. Reacción con el reactivo de Dragendorff (para alcaloides y compuestos nitrogenados heterocíclicos)	75
8.3.2.3. Reacción con Difenilbórico (AEDBE - Reactivo para Flavonoides y polifenoles en general)	75
8.3.2.4. Reacción de Liebermann Bouchard (Reactivo para Triterpenos/Esteroides)	75
8.3.2.5. Reacción con Ninhidrina (Reactivo para aminoácidos y aminas biógenas)	76
8.3.2.6. Reacción con Cloruro de Hierro (III) (Reactivo para Ácidos hidroxámicos y fenoles)	76

8.3.2.7. Yodo (Reactivo universal)	76
8.3.2.8. <i>p</i> -anisaldehído sulfúrico (Reactivo para terpenoides, propilpropanoides y saponinas)	76
8.3.3. Fraccionamiento del Extracto Hexánico	77
8.3.4. Evaluaciones Cromatográficas en diferentes Fases estacionarias	77
8.3.5. Cromatografía Preparativa en Columna con sílica gel	78
8.3.5.1. Estudio de la Fr ₁₋₂₂	80
8.3.5.1.1. Análisis del sólido S	81
8.3.5.1.2. CCD del Extracto EDCM _T	82
8.3.5.1.3. Cromatografía Bidimensional (CB) del Extracto EDCM _T	83
8.3.5.1.4. Cromatografía en Placa Preparativa (PLC) del Extracto EDCM _T	84
8.3.5.2. Análisis de la fracción Fr ₁₋₂₀	85
8.3.5.2.1. Purificación de la Fr ₂₋₁₀	86
8.3.6. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)	86
8.3.7. Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HPLC-HRMS)	86
9. Actividad Biológica	87
9.1. Determinación de la actividad antimicrobiana en <i>Eugenia uniflora</i> L.	87
9.1.1. Materiales y Métodos	87
9.1.1.1. Fracciones ensayadas	87
9.1.1.2. Microorganismos de referencia utilizados	88
9.1.1.3. Preparación de los inóculos	88
9.1.1.4. Método del cilindro placa (USP 29) y TLC – Bioautográfica (Contact bioautography)	89
10. Resultados	91
10.1. Estudio Fitoquímico	91
10.1.1. Reacciones de caracterización	91

10.1.2. Caracterizaciones en CCD de compuestos presentes	91
10.1.3. Análisis por HPLC-MS: Fracciones Fr ₁₋₉ y Fr ₁₋₁₅	93
10.1.3.1. Análisis de la Fracción Fr ₁₋₉	96
10.1.3.1.1. Compuesto identificado: PULEGONA	96
10.1.3.2. Análisis de la Fracción Fr ₁₋₁₅	100
10.1.3.2.1. Compuesto identificado: GERMACRONE	100
10.1.4. Análisis por HPLC-HRMS	105
10.1.4.1. Fracción Fr _{D3}	105
10.1.4.1.1. Compuesto identificado: ÁCIDO URSÓLICO	105
10.1.4.2. Fracción Fr ₂₋₁₀	112
10.1.4.2.1. Compuesto identificado: ACETATO DE BORNILO..	112
10.2. Actividad Biológica	119
10.2.1. Determinación de la actividad antimicrobiana	119
10.2.1.1. Método del cilindro placa (USP 29) y CCD – Bioautográfica (Contact bioautography)	119
11. Discusión	122
12. Conclusiones	126
13. Bibliografía	128
14. Resumen	151
15. Presentaciones a Congresos y Jornadas	153
Apéndice	i - xvii

INDICE DE IMÁGENES

Fig. 1-1: Tableta de arcilla en ruinas de Nippur	7
Fig. 1-2: Papiro de Ebers	8
Fig. 1-3: Papiros de Kahun	8
Fig. 1-4: Dioscórides, “De Materia Médica”	10
Fig. 1-5: Grabado neandertal en cueva de Gibraltar.....	11
Fig. 1-6: “ <i>La Farmacopea de Shen Nung</i> ” (<i>Shen Nung Pen Tsao Ching</i>).....	11
Fig. 1-7: “Rig Veda”	12
Fig. 1-8: Farmacéutico preparando hierbas medicinales, a principios del S. XVI.....	13
Fig. 2-1: Familia Myrtaceae: Diferentes especies y órganos.....	18
Fig. 2-2: Árbol de <i>Eugenia uniflora</i> (izquierda); hojas, flores y frutos.....	23
Fig. 2-3: Hojas de <i>Eugenia uniflora</i>	23
Fig. 2-4: Frutos de <i>Eugenia uniflora</i>	24
Fig. 2-5: Flores de <i>Eugenia uniflora</i>	24
Fig. 2-6: Distribución mundial de la Familia Myrtaceae.....	25
Fig. 2-7: Distribución geográfica de <i>Eugenia uniflora</i> L. en el continente americano.....	26
Fig. 2-8: Distribución geográfica de <i>Eugenia uniflora</i> L. en Argentina.....	27
Fig. 9-2: Método del cilindro placa	90



1. *Introducción*

“Las plantas medicinales, aliadas de nuestra salud” es una obra destacada y fecunda, luminosa y enriquecedora, en donde encontramos la recopilación de principios activos, antídotos, vacunas y medicamentos para aplicarlos con los objetivos de curar afecciones, lesiones y enfermedades, tanto físicas como psíquicas, o de fortalecer la salud ayudando a su prevención. (Garrido Montañana, R. 2005)

El conocimiento y utilización de las plantas por las sociedades humanas tiene una larga e interesante historia. Se reconoce que desde siempre las plantas han complementado diversas necesidades que incluyen tratamientos curativos, prácticas de higiene y embellecimiento y de manera especial en la recuperación y el mantenimiento de la salud.

El aprovechamiento por el hombre de las plantas medicinales consta en numerosos testimonios escritos, pertenecientes a distintas civilizaciones y culturas. Las plantas medicinales han sido usadas durante siglos como tratamientos para las enfermedades humanas, ya que contienen componentes de valor terapéutico. (Nostro *et al.*, 2000)

El reino vegetal nos provee de verdaderos recursos con que se pueden evitar y combatir las enfermedades, hallando la actividad farmacológica de sus principios activos. Por eso, la *Fitoterapia*, que es el tratamiento de las enfermedades por medio de las plantas, ha sido empleada fehacientemente por antiguas civilizaciones, y hoy se las rescata y valora en toda su extensión.

En la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos, muy frecuentes en sustancias químicas puras, de síntesis, observándose una marcada tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones. En lo que se destaca el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los

programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos adjudicados a las plantas desde la existencia de la humanidad. (Akerlele, 1987)

El conocimiento de la bioactividad de las plantas ha sido acumulado por la experimentación durante siglos por las personas que viven en asociación íntima con su entorno. Por lo tanto, la investigación étnico-dirigida es muy útil en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos naturales. (Cox & Balick, 1994; Heinrich & Gibbons, 2001)

Por siglos, muchas drogas fueron obtenidas exclusivamente de las plantas medicinales, con adecuadas técnicas químicas, se pudieron aislar e identificar los componentes activos, muchos de los cuales, a su tiempo, fueron sintetizados.

A través de estudios recopilados, se obtuvieron conocimientos etnofarmacológicos, botánicos, endo y exo-morfológicos, fitoquímicos y el correspondiente uso de cada una de las plantas analizadas.

Las plantas medicinales han sido y hoy son objeto de intensas investigaciones debido a su potencial como fuentes de fármacos o como compuestos principales en el desarrollo de medicamentos. (Cordell *et al.*, 1991)

La búsqueda de nuevas moléculas ha tomado una ruta ligeramente diferente, donde la ciencia de la etnobotánica y etnofarmacognosia están siendo rescatada como guía para dirigir la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos novedales (Gurib-Fakim, 2006). Los productos naturales derivados de plantas son una gran promesa para el descubrimiento y desarrollo de nuevos productos farmacéuticos (McChesney *et al.* 2007) en donde las plantas son la materia prima utilizada para la extracción de principios activos para la elaboración de fármacos.

Por tal motivo, las industrias farmacéuticas han sido y continuarán siendo beneficiadas por los conocimientos populares sobre el uso de las plantas medicinales. Entre 1981 y 2006, se demostró que el 50% de los medicamentos aprobado por la FDA (Food and Drug Administration), directa o indirectamente derivaron de los productos naturales. (Veiga *et al.*, 2005)

En el área farmacéutica, las plantas y los extractos vegetales continúan siendo de gran importancia en vista a la utilización de las sustancias activas como prototipos

para el desarrollo de fármacos (que son sustancias activas aisladas) y como fuente de materias primas farmacéuticas (productos utilizados en la formulación del fármaco), o incluso los medicamentos diseñados exclusivamente a base de extractos vegetales: los medicamentos herbarios. (Schenkel *et al.*, 2001)

Alrededor del 80% de la población mundial utiliza las plantas para el cuidado primario de salud (Farnsworth & Soejarto, 1991). Cerca de 50.000 especies de plantas superiores se usan para fines medicinales. Se registran usos en alimentación, limpieza, cuidados personales y en perfumería. (Bisset, 1994)

La expansión en la demanda por los medicamentos a base de plantas fue creciendo mundialmente. En los países desarrollados, la principal motivación fue por una alternativa más saludable o menos agresiva de tratamientos sin efectos colaterales a diferencia de los provocados por los medicamentos de síntesis (Klein *et al.*, 2009). En Europa, América del Norte y Asia, cada vez es mayor, estimándose un incremento entre el 8 y el 15% por año (Grünwald & Büttel, 1996). En Japón, 60 - 70% de médicos alopáticos prescriben plantas medicinales para sus pacientes, y en China, un 40% de la población las consumen. El 48% de los habitantes de Australia, el 70% en Canadá, el 42% en USA, 38% en Bélgica y 75% en Francia emplean las plantas medicinales para diferentes patologías. En Latino América, la elección por las plantas medicinales ha ido en alza. (Shanley & Luz, 2003)

En el 2011, el mercado mundial de fitoterápicos facturó US\$ 26 billones, aproximadamente el 3.2% de la cifra global relativa a la comercialización de medicamentos en el mismo año. El mayor mercado se encuentra en Europa (30%), siendo Alemania el país que consume la mitad de los extractos vegetales comercializados en toda Europa porque el 70% de los médicos en clínica general prescriben las recetas a base de hierbas (Blumentahl, 1998). Contradictoriamente, apenas el 5% referente al año 2011 pertenece a América Latina, que cuenta con siete países de elevada biodiversidad (Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, México, Panamá y Perú). Por ejemplo, el mercado específico de fitoterápicos en Brasil obtuvo un movimiento en ese mismo año de R\$ 1.1 billones. (Castro *et al.*, 2016)

Argentina es uno de los 25 países que presenta un sustancioso aporte de plantas medicinales debido a su riqueza de especies y endemismo (Caldecott *et al.*, 1996; Zuloaga *et al.*, 2008). Con una rica flora endémica, Argentina tiene 9938 especies (Zuloaga *et al.*, 2008) distribuidas en 274 familias. Por lo tanto, el potencial para el desarrollo farmacéutico es considerablemente alto. *Plantae Diaphoricae* (Hieronymus, 1882) fue el primer trabajo científico en plantas medicinales en Argentina; desde entonces, investigaciones en medicina folklórica han provisto una valuable información desde diferentes regiones.

El interés con respecto a la historia, tradición y folklore de las plantas medicinales, avalado por las investigaciones científicas con respecto a sus principios activos, acción biológica y sus usos medicinales, es el despertar de este trabajo.

En el género *Eugenia* encontramos marcadas actividades biológicas y debido a su vasta actividad farmacológica, fue elegida *Eugenia uniflora* L. perteneciente a la familia *Myrtaceae*, para la realización de este trabajo de tesis. En la selección de dicha especie se tuvo en cuenta el aspecto quimiotaxonómico-filogenético y etnofarmacológico.

Asimismo, existe un interés creciente en el tratamiento de enfermedades causadas por microorganismos (Austin *et al.*, 1999). Los efectos medicinales beneficiosos de los vegetales, típicamente resultan de productos secundarios presentes en la planta. (Kaufman *et al.*, 1999)

En el desarrollo científico, en el mundo actual, es de fundamental importancia contar con un aliado en la lucha contra gérmenes productores de diversas enfermedades y además disminuir los efectos adversos producidos por los medicamentos de síntesis. Por tal motivo y con el objetivo de poder aportar una herramienta más al beneficio de la salud, se ha realizado el presente trabajo.

1.1. Breve Historia de las Plantas Medicinales

El uso de las plantas en la historia del hombre, se remonta a los albores de la humanidad. El hombre primitivo descubrió en las plantas no solo una fuente de alimento importante sino también una cura de los males que lo aquejaban. Desde entonces, las plantas fueron adquiriendo, según sus usos, algunas connotaciones mágicas según el poder que tuvieran de paliar algún dolor o enfermedad corporal siendo muchas utilizadas en ceremonias religiosas y ritos fúnebres en todas las civilizaciones.

Antiguamente la búsqueda a la solución de las enfermedades estaba enfocada en el estudio a la naturaleza que los rodeaba. Las plantas fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el hombre; y en su uso, diferenciaron las que curaban de las que mataban, y dicho conocimiento empírico fue transmitido oralmente de generación a generación. Al desarrollarse la escritura y con la aparición del papiro como soporte de la misma se comenzaron a registrar estos conocimientos, convirtiéndose los mismos en patrimonio de las distintas culturas las cuales han atravesado la historia de la humanidad hasta nuestros días.

Nuestros antepasados tenían a su disposición las plantas de su entorno, y de muchas de ellas conocían sus propiedades curativas; los tratados antiguos de medicina natural confirman esto. Cada pueblo poseía un rico folklore relacionado a las plantas, las cuales eran recogidas y usadas para curar sus enfermedades.

El estudio de las plantas medicinales se remonta prácticamente al principio de la evolución del hombre sobre la tierra. El hombre prehistórico observaba el comportamiento instintivo de los animales a la hora de restaurar sus heridas o paliar sus enfermedades. En su continuo deambular pudo observar que ciertas especies resultaban aptas para el consumo alimenticio y otras eran tóxicas. Dichas observaciones dieron origen al proceso intuitivo que caracterizó al hombre primitivo y que permitió al mismo ensayar con diversas plantas a efectos de discernir cuáles poseían efectos medicinales y cuáles no.

En la Biblia se describen aproximadamente 200 plantas de uso medicinal y además sus aplicaciones; entre las especies citadas se encuentran: “aloe”

(Sal.45:8;), “hisopo” (Jn.19:29), “incienso” (Jer.6:20), “lino” (Gn.41:42), “lirio” (Mt.6:28), “mandrágora” (Gn.30:14-16), “menta” (Mt.23:23), “mirra” (Gn.37:25), “mostaza” (Lc.17:6), “olivo” (Éx.23:11), “ruda” (Lc.11:42), “centeno” (Ex 9:32), “palmera” (Sal.92:13), “casia”, “canela”, “nardo” (Mt.26:6-13), “tejo” (Job.20:16), “acacia” (Ex. 25:5). Los israelitas hacían uso de perfumes y de óleos perfumados, para el cuidado de cabellos y cuerpo. Las plantas aromáticas se llevaban en saquitos, se pulverizaban o quemaban. La esencia aromática, obtenida por destilación, se colocaba en cajitas que se colgaban de la cintura, mezclada con aceite, y en ocasiones se usaban como ungüentos. El “alöe”, la “casia”, la “canela”, la “mirra”, el “incienso”, el “nardo”, bien cultivados en el valle del Jordán, servían como base para los perfumes (Ratera, 1980).

Los primeros herbolarios datan de la época de los asirios, los babilonios y los fenicios y son una recopilación de los conocimientos de la época sobre las propiedades curativas de las plantas. Para la medicina antigua, el reino vegetal era una fuente muy importante en la obtención de remedios, cuya aplicación se relacionaba con las creencias y tradiciones de los diversos pueblos de Sumeria, Egipto, China, India, Persia, Caldea, Asiria, etc.

Uno de los manuales de medicina más antiguo que se conoce fue escrito hacia el final del tercer milenio antes de Jesucristo, y se halló enterrado entre las ruinas de Nippur, desde hacía más de 4.000 años. Este manual consiste en una tableta de arcilla de cerca de 16 cm de largo por 9.5 cm de ancho en el que se había inscripto, con caracteres cuneiformes, los nombres de una docena de remedios más usados. Se empleaban sustancias obtenidas de “abeto”, “higuera”, “mirto”, “peral” y “tomillo”.

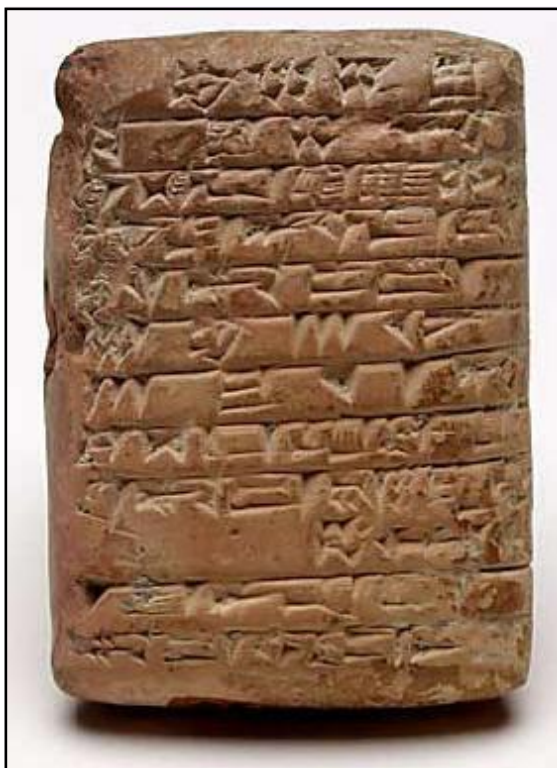


Fig. 1-1: Tableta de arcilla en ruinas de Nippur

(<https://trinityatierra.files.wordpress.com/2010/02/annu2.jpg?w=285&h=385>)

También los papiros hallados en el antiguo Egipto, son documentos muy valiosos para estudiar la historia del arte de curar. Entre ellos, el Papiro de Ebers (1500 a. de J. C.), el Papiro de Kahun (1900 a. de J. C.) y otros, contienen instrucciones terapéuticas, recetas, conjuros mágicos y otras indicaciones. Los vegetales más utilizados eran la “acacia”, “amapola”, “heno griego”, “azafrán”, “casia”, “comino”, “coriandro”, “eneldo”, “pepino” y “ricino”. (Ratera, 1980).



Fig. 1-2: Papiro de Ebers

(<http://www.cardenashistoriamedicina.net/images/3-7-papitos-smith.jpg>)

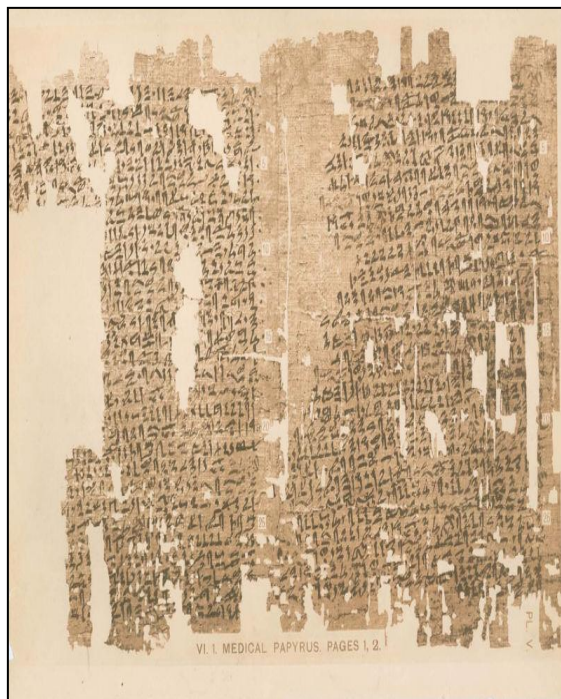


Fig. 1-3: Papiros de Kahun

(http://1.bp.blogspot.com/XzTNdvSWD8/Uk2z3lI9btI/AAAAAAAAACE/4wl93ny_sml/s1600/papirodekahun.jpg)

En China, desde tiempos remotos, emplearon en medicina diversas plantas medicinales como “acónito”, “ginseng”, “granado”, “jengibre” y “ruibarbo”. El emperador Shen Nung, considerado el dios de la medicina china, es autor de un valioso libro sobre medicina en el que se encuentran mencionadas muchas especies de plantas.

La medicina asirio-babilónica, empleó alrededor de 250 especies de vegetales, entre ellos: “aloe”, “amapola”, “belladona”, “cardamomo”, “granado”, “menta”. Se encontraron más de 800 planchas o tabletas médicas escritas con indicaciones sobre remedios y plantas medicinales, destinados a curar las más diversas enfermedades.

En la antigua Grecia se encontraron tablillas de arcilla donde se dejaba constancia del empleo de ciertas yerbas medicinales como “ajenjo”, “anís”, “lirio de Florencia”, “menta” y otras. Homero (alrededor del S. VIII antes de J.C.) hace referencia a diversas especies vegetales. Hipócrates (460 - 357 a. de J.C.), el Padre de la medicina griega, en sus trabajos menciona a la “cicuta”, “elébore negro”, “pastinaca” y otras plantas. Sócrates (470 - 401 a. de J. C.), príncipe de los filósofos de Atenas, murió heroicamente por la acción de la “cicuta”. Además, Aristóteles (384 - 322 a. de J.C.) y Teofrasto (372-287 a. de J.C.), en sus escritos nombran diversos vegetales medicinales. Galeno (131 - 201 después de J.C.), médico y filósofo griego, dejó más de 100 obras con referencia a plantas medicinales.

En Roma, se destacan Catón el Censor (234 - 149 a. de J. C.), quien escribió una obra titulada “De re rustica”, donde nombra al “espárrago”, “granado”, “higuera”, “membrillero” y “olivo”, entre otras plantas. Otro escritor célebre es Plinio el Viejo o el naturalista (23 - 79 después de J.C.); escribió una Historia Natural en 37 tomos en los cuales en los libros 21 a 28 se ocupa de la Materia Médica y hace referencia a diversas plantas. Dioscórides (Siglo I), médico cirujano del emperador Nerón, es autor de una importante obra: “De Materia Médica” en donde se hace referencia a numerosas plantas medicinales, indicando las enfermedades que curaban, lugar donde se podían encontrar, manera de emplearlas, indicaciones sobre las enfermedades, etc. Los romanos conocían y empleaban: “acanto”, “apio”, “asafétida”, “eneldo”, “euforbio”, “lúpulo”, “perejil” y otras plantas.



Fig. 1-4: Dioscórides, “De Materia Médica”

(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/52/Dioscorides_De_Materia_Medica_Byzantium_15th_century.jpg/220pxDioscorides_De_Materia_Medica_Byzantium_15th_century.jpg)

Desde el antiguo Egipto, todas las religiones de Oriente, América y Europa utilizaron las plantas con fines médicos, terapéuticos y religiosos que pasaron a nuestra Farmacopea actual como base de muchas medicinas.

Respecto al empleo medicinal de las plantas por parte de las antiguas civilizaciones, se han encontrado varios testimonios a través de expediciones arqueológicas, como la producida en el año 1975 en las paredes de una gruta perteneciente a una lejana región del sur de Asia, que fuera habitada hace unos sesenta mil años aproximadamente (Paleolítico medio superior) por el hombre de Neanderthal. En ella se encontraron dibujos y grabados de plantas, hojas y órganos humanos en clara alusión a una correspondencia terapéutica.



Fig. 1-5: Grabado neandertal en cueva de Gibraltar

(http://staticf5a.lavozdelinterior.com.ar/sites/default/files/styles/landscape_1008_566/public/nota_periodistica/Gibraltar.jpg)

En China se utilizaban las plantas medicinales en el año 5000 a.C. Un buen ejemplo es el libro *Pen Tsao* que recoge el estudio de más de 300 plantas; en él se describen 365 plantas clasificadas según su grado de importancia, frecuencia de administración, y/ o grado de toxicidad.



Fig. 1-6: “La Farmacopea de Shen Nung” (Shen Nung Pen Tsao Ching)

(<http://www.masajes-xiaoying-madrid.com/blog/wp-content/uploads/2012/04/Shen-Nung-Pen-Ts%C2%B4ao-Ching.jpg>)

En la India se menciona la utilización de las plantas medicinales en el Rig Veda, uno de los libros sagrados del brahmanismo. En la India el uso de plantas medicinales, conocido como Ayurveda, nos ha dejado referencias escritas del año 800 a. C., donde aparecen descritas unas 800 especies.

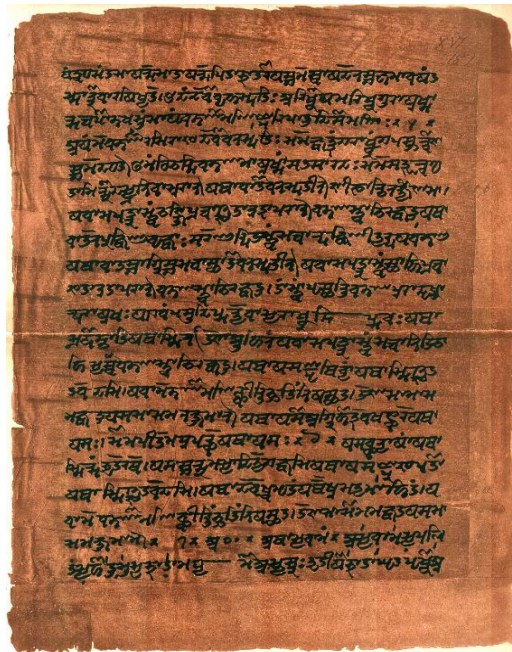


Fig. 1-7: “Rig Veda”

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/7b/AtharvaVeda_samhita_page_471_illustration.png)

Durante la Edad Media y el Renacimiento se usaban, entre otras, las siguientes plantas medicinales: “anís”, “digital”, “enebro”, “galanga”, “jengibre”, “lirio común”, “mercurial” y “ruda”. Los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria Farmacia.

En América, los aztecas conocían muy bien y empleaban diversas plantas medicinales; entre ellas se destacan: el “agave”, “ciprés de Moctezuma”, “jalapa”, “liquidámbar”, “papaya” y “ulli”. En la medicina peruana, se pueden mencionar a la “coca”, “escobilla del Perú”, “guayabo”, “maíz” (“barba de choclo”), “pinco-pinco”, “piñón”, “quina-quina”, “ratania”, etc.

En Argentina, los guaraníes, comechingones, araucanos, etc., conocían y empleaban diversas plantas para curar sus dolencias. Entre ellas, podemos citar el

“ambay”, “canelo”, caven”, “notro”, “palo pichi”, “pañil”, “pehuén”, “pichi” y “romaza”. (Ratera, 1980).

La capacidad de un medicamento en base de hierbas, para afectar al organismo depende de sus componentes químicos. Los científicos comenzaron a extraer y aislar sustancias químicas de las plantas en el siglo XVIII. Luego con el aporte de la química, física y biología se estudiaron diversas drogas vegetales y una vez bien conocido su principio activo, se pudieron obtener en algunos casos la síntesis de las mismas.

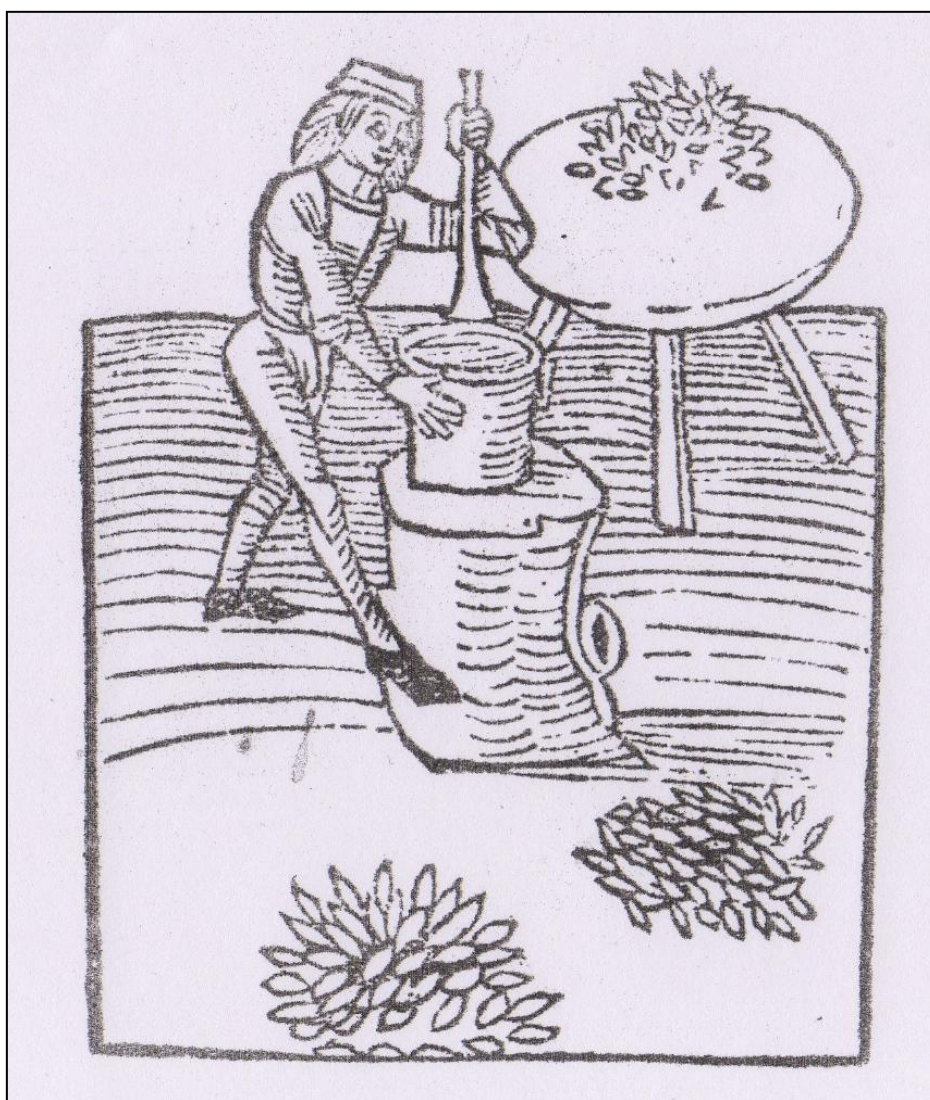


Fig. 1-8: Farmacéutico preparando hierbas medicinales, a principios del S. XVI (según *Ortus Sanitatis* - Strassburg, 1517). Tomado del *Brooklyn Botanic Garden Record*, vol. XXXII (3), 1943.

1.2. Búsqueda de nuevos antimicrobianos derivados de plantas.

Los antibióticos contribuyen al bienestar de la vida ya que actúan mejorando la salud pero, el uso inadecuado de los mismos ha traído consigo importantes problemas sanitarios con la aparición y desarrollo de las resistencias bacterianas.

En los últimos años, el uso y el abuso de los antimicrobianos ha incrementado el número y los tipos de microorganismos resistentes. En consecuencia, muchas enfermedades infecciosas podrían volverse incontrolables. Con el crecimiento del comercio mundial y los viajes internacionales, los microorganismos resistentes pueden propagarse rápidamente a cualquier parte del mundo (<https://cdcnuestrapagina.wordpress.com/2013/04/07/uso-indiscriminado-deantibioticos/>).

El objetivo de la búsqueda de un nuevo agente antimicrobiano es elegir uno con actividad selectiva para el/los microorganismos infectantes, y que presente la mínima capacidad de producir reacciones tóxicas en el paciente.

La evolución y desarrollo de las enfermedades infecciosas, las cuales prevalecen e inciden mayoritariamente en la población subdesarrollada, ha hecho evidente la necesidad de encontrar nuevas sustancias antimicrobianas para tratar tales infecciones (Becker *et al.*, 2006). Debido al uso indiscriminado que se les ha dado a las sustancias antimicrobianas, los microorganismos se defienden y adquieren resistencia (Muñoz *et al.*, 2004).

En general, la multi-resistencia puede ser el resultado del uso indiscriminado de antibióticos comerciales comúnmente utilizados para tratar las enfermedades infecciosas. Esta situación, así como la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, ha llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales. Los ensayos realizados hasta este momento revelan que las plantas representan una potencial fuente de nuevos agentes antimicrobianos (Zampini *et al.*, 2007).

La resistencia a los antimicrobianos (o fármaco-resistencia) se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones dejen de ser eficaces. Es consecuencia de la capacidad de ciertos microorganismos (por ejemplo, bacterias y virus) de modificarse para resistir o neutralizar el efecto de los medicamentos.

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas (Ramírez, R.; 2013). Actualmente, los datos sobre la actividad antimicrobiana de numerosas plantas se han confirmado científicamente, y van en paralelo con el número creciente de informes sobre los microorganismos patógenos resistentes a los agentes antimicrobianos (Silva & Fernades, 2010).

Hoy se cuenta con evidencia suficiente para colocar a las plantas en un lugar privilegiado entre las fuentes de moléculas potencialmente activas contra el efecto de bacterias, virus parásitos y hongos. Los extractos y moléculas derivadas de plantas han probado ser efectivas en cantidades tan pequeñas como lo son los antibióticos usados actualmente y algunas más efectivas porque además actúan contra bacterias multirresistentes. (Ramírez, R.; 2013).

Algunos antecedentes indican que derivados vegetales y extractos de amplio uso tradicional de origen sudamericano, muestran una fuerte actividad diferencial contra el *Streptococcus pneumoniae*, diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* metilino-resistente, así como de bacterias gramnegativas tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*. Ejemplo de estos vegetales y extractos son la “miel” y el “propóleo” de chilca, “Sangre de Drago” en Brasil, “Ulmo” y “Quillay” en Chile, “Clusia” en Cuba, “Sabadilla” y “Ajo caspi” de Perú, y en Argentina la “Retamilla”, “Jarilla macho” y “Jarilla hembra” (Bussmann et al., 2010; Salomão et al., 2008; Sherlock et al., 2010; Silva et al., 2009).

También se ha constatado la actividad sinérgica, junto a antibióticos tradicionales, de extractos de “Guayaba de Guinea”, “Cacho de cabra” y “Cariaquito” contra cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente. Antibióticos como la ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y ciprofloxacina, aumentaron en ocho veces su efectividad y disminuyeron su CIM (Concentración Inhibitoria Mínima), lo que habla de su mayor potencialidad y seguridad en la administración (Cruz-Carrillo *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2012). Todos estos antecedentes dan cuenta de la gran batería de compuestos orgánicos (alcaloides, terpenoides, flavonas, flavonoides, quinonas) que se han identificado y caracterizado desde las plantas (Orrego Escobar *et al.*, 2013).

Diversas familias botánicas nos proporcionan un abanico de actividades biológicas, entre ellas, microbiológicas. Los compuestos químicos aislados de distintos órganos de especies vegetales, se detallan en el Apéndice I con sus referencias.

2. Eugenia uniflora L

2.1. Clasificación taxonómica ⁽¹⁾

Clase: *Equisetopsida* C. Agardh

Subclase: *Magnoliidae* Novák ex Takht.

Superorden: *Rosanae* Takht.

Orden: *Myrtales* Juss. ex Bercht. & J. Presl

Familia: *Myrtaceae* Juss.

Género: *Eugenia* L.

2.2. Características de la familia

Familia Myrtaceae

Árboles, arbustos o subarbustos, aromáticos, de follaje comúnmente persistente. Hojas simples, enteras, opuestas o alternas, sésiles o pecioladas, Flores actinomorfas, hermafroditas, solitarias o agrupadas en inflorescencias diversas axilares o terminales. Cáliz de 4-6 sépalos, por lo común persistentes. Pétalos 4-6, alternisépalos, a veces ausentes, de prefloración imbricada, libres o unidos. Estambres numerosos, reunidos frecuentemente en fascículos, exsertos; filamentos filiformes; anteras bitecas, de dehiscencia poricida o por hendiduras longitudinales. Ovario ínfero, uni o plurilocular, con los lóculos uni o pluriovulados; estilo simple. Fruto drupa, baya o cápsula. Unas 3.000 especies originarias de las regiones tropicales, alcanzando algunas a las zonas templadas. (Dimitri, 1988)

Los géneros más importantes son: *Eucaliptus* (500 spp.), *Eugenia* (400 spp.), *Myrcia* (300 spp.), *Syzygium* (300 spp.), *Melaleuca* (100 spp.), *Psidium* (100 spp.). (Judd *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2004; Stevens, 2008; Wilson *et al.*, 2005)

(1) Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/>



Fig. 2-1: Familia Myrtaceae: Diferentes especies y órganos.

A, a, a', *Psidium guajava*; B, *Blepharocalyx tweediei*; C, D, *Feijoa sellowiana*; d, fruto; E, *Eugenia pungens*; F, *Hexaclamnis edulis*; h, fruto; H, *E. uniflora*; f, fruto; G, g, g', g'', *Tristania conferta*; I, *Callistemon rigidus*; J, j, *Melaleuca hypericifolia*; K, *Myrtus communis*. (Dimitri, 1988)

2.2.1. Clave de los géneros

- A. Fruta una drupa o una baya.
 - B. Ovario 1-3 locular.
 - C. Pétalos libres entre sí.
 - D. Hojas trinervadas longitudinalmente 1. *Rhodomyrtus*
 - DD. Hojas penninervadas.
 - E. Corola roja. Estambres 4-8 2. *Myrrhinium*
 - EE. Corola generalmente blanca.
 - F. Embrión con los cotiledones muy pequeños.
 - G. Flores solitarias, axilares. Frutos negros o blancos ... 3. *Myrtus*
 - GG. Flores dispuestas en dicasios.
 - Frutos rojos o purpúreos 4. *Blepharocalyx*
 - FF. Embrión con los cotiledones grandes.
 - G. Radícula más o menos igual a los cotiledones 5. *Myrceugenella*
 - GG. Radícula mucho más corta que los cotiledones.
 - H. Sépalos o pétalos generalmente 4 6. *Eugenia*
 - HH. Sépalos o pétalos 5-6 7. *Hexachlamis*
 - CC. Pétalos unidos entre sí, formando un capuchón caedizo 8. *Syzygium*
 - BB. Ovario 4-plurilocular.
 - C. Estambres rectos dentro del botón floral.
 - Hojas densamente tomentosa en la cara inferior 9. *Feijoa*
 - CC. Estambres comúnmente doblados dentro del botón floral.
 - D. Semillas con la testa o cutícula dura, córnea 10. *Psidium*
 - DD. Semillas con la testa o cutícula membranácea.
 - E. Sépalos libres en el botón floral 11. *Campomanesia*
 - EE. Sépalos concrescentes en el botón floral, rasgándose desigualmente al abrirse la flor..... 12. *Britoa*
 - AA. Fruto una cápsula.
 - B. Flores dispuestas en espigas densas, generalmente cilíndricas.
 - C. Estambres libres.
 - D. Sépalos caedizos 13. *Callistemon*
 - DD. Sépalos persistentes 14. *Kunzea*
 - CC. Estambres reunidos en fascículos 15. *Melaleuca*

- BB. Flores no dispuestas en espigas cilíndricas.
- B. Flores con el pimpollo cubierto por una caliptra o capuchón, que se desprende a la antesis 16. *Eucalyptus*
- CC. Flores provistas de pétalos normales, sin caliptra.
- D. Cáliz con 4-5 costillas y dientes prominentes 17. *Angophora*
- DD. Cáliz desprovisto de costillas y dientes prominentes 18. *Tristania*

2.2.2. Clave de las especies

- A. Hojas terminadas en un mucrón punzante. Fruto negro-violáceo 1. *E. pungens*
- AA. Hojas no terminadas en un mucrón punzante.
- B. Cáliz protegido por dos bractéolas acorazonadas de más o menos 1 cm. de diámetro 2. *E. involucrata*
- BB. Cáliz no protegido por bractéolas acorazonadas.
- C. Flores dispuestas en panojas o dicasios trifloros.
- D. Flores dispuestas en dicasios trifloros, a veces solitarias 3. *E. pyriformis*
- DD. Flores dispuestas en panojas axilares o terminales.
- Fruto rojo, más o menos de 2 cm. de diámetro 4. *E. paniculata*
- CC. Flores solitarias o en fascículos 2-3-floros.
- D. Hojas muy glaucas, especialmente en la cara inferior.
- Frutos no mayores de 1 cm. de largo 5. *E. glaucescens*
- DD. Hojas sin los caracteres precedentes. Fruto mayor de 1 cm. de largo..... 6. *E. uniflora*
- E. Fruto surcado longitudinalmente, rojo
- EE. Fruto no surcado longitudinalmente, de más o menos 2 cm. de diámetro 7. *E. mato*

2.3. Nombre Científico ^(1,2)

Eugenia uniflora L.

Sinónimos: ⁽¹⁾

- *Eugenia brasiliiana* (L.) Aubl.
- *Eugenia costata* Cambess.
- *Eugenia indica* Nicheli
- *Eugenia lacustris* Barb. Rodr.
- *Eugenia michelii* Lam.
- *Eugenia microphylla* Barb. Rodr.
- *Eugenia parkeriana* DC.
- *Myrtus brasiliiana* L.
- *Plinia pedunculata* L. f.
- *Plinia rubra* L.
- *Stenocalyx affinis* O. Berg
- *Stenocalyx brunneus* O. Berg
- *Stenocalyx dasyblastus* O. Berg
- *Stenocalyx glaber* O. Berg
- *Stenocalyx impunctatus* O. Berg
- *Stenocalyx lucidus* O. Berg
- *Stenocalyx michelii* (Lam.) O. Berg
- *Stenocalyx nhampiri* Barb. Rodr.
- *Stenocalyx strigosus* O. Berg
- *Stenocalyx uniflorus* (L.) Kausel

⁽¹⁾ Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/>

⁽²⁾ *Species Plantarum*, 1:470, 1753.

2.4. Nombres vulgares:

“Pitanga” y “Ñangapirí” (Dimitri, 1988).

También se la llama “arrayán”, “sukesukelét”, “sukesukelí” (coloradito), “taiekok sukesukelét”, “taiekók”, “sukesukelí” (taiekok = coloradito) en lengua vilela, “taikó”, “taikok” en toba.

Otras denominaciones son “arrayán colorado”, “arrayán mato”, “cereza”, “morita del monte”, “arrayán montano”. (Barboza *et al.*, 2009)

2.5. Descripción de la planta de estudio: *Eugenia uniflora* L.

Arbusto muy ramificado y globoso, tomando a veces el tamaño y forma de un arbolito. Hojas opuestas, glabras, subsésiles, aovado-lanceoladas, de 2,5 - 5 cm. de largo. Flores blancas, de 1-1,5 cm. de diámetro, dispuestas en largos pedúnculos axilares unifloros, fasciculados. Baya depreso-globosa, de 2-3 cm. de diámetro, rojo o purpúrea, con el pericarpio surcado longitudinalmente, formando costillas redondeadas. Sudamérica tropical, Argentina. Ornamental, frutal y medicinal. Se reproduce por semillas. (Dimitri, 1988)

Hábito: Arbusto o árbol (Perenne) ⁽³⁾

Estado: Nativa ⁽³⁾

Elevación (m s. m.): Altura Min. 0 - Altura Máx. 1500 ⁽³⁾

⁽³⁾ Catálogo de las Plantas Vasculares – Flora del Cono Sur (<http://www.darwin.edu.ar>).



Fig. 2-2: Árbol de *Eugenia uniflora* (izquierda); hojas, flores y frutos
(<http://www.arbolesornamentales.es/Eugeniauniflo.jpg>)



Fig. 2-3: Hojas de *Eugenia uniflora*
([http://www.darwin.edu.ar/ImagenesIris/Eugenia%20unifloraFoto%20Grau%20\(4\).JPG](http://www.darwin.edu.ar/ImagenesIris/Eugenia%20unifloraFoto%20Grau%20(4).JPG))



Fig. 2-4: Frutos de *Eugenia uniflora*
(<http://www.tropicos.org/Image/47017>)



Fig. 2-5: Flores de *Eugenia uniflora*
(http://www.growables.org/information/TropicalFruit/images/SurinamCherry2_000.jpg)

2.6. Fitogeografía.

Distribución geográfica de la Familia *Myrtaceae*: ampliamente distribuida, pero con mayor diversidad en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. (Judd *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2004; Stevens, 2010; Wilson *et al.*, 2005)

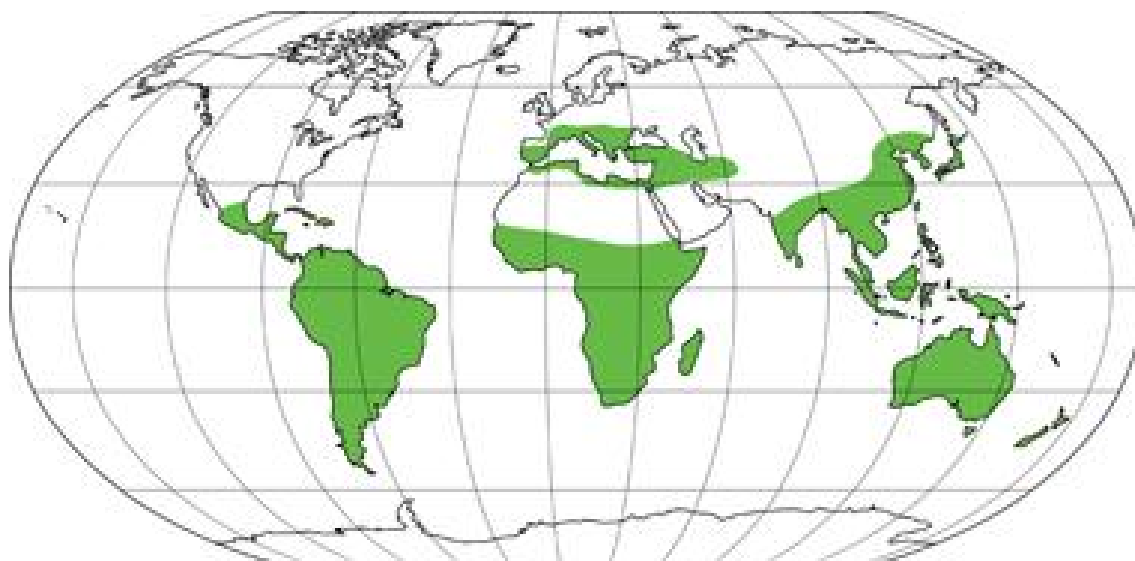


Fig. 2-6: Distribución mundial de la Familia *Myrtaceae*

(http://www.thecompositaehut.com/www_tch/images/webcurso_spv/mapas/myrtaceae.jpg)

Distribución geográfica de *Eugenia uniflora* L. en el continente americano:^(1,3)

Se encuentra en Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay, Bolivia, Colombia, Venezuela, Guayana Francesa, Guyana, El Salvador, en la región del Caribe, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Surinam, México, Panamá, Estados Unidos.

En Brasil se localiza en Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo. En Paraguay, Alto Paraguay, Amambay, Caaguazú, Caazapá, Canindeyú, Central, Concepción, Cordillera, Guairá, Ñeembucú, Paraguarí, Presidente Hayes, San Pedro y en Uruguay en las localidades de Durazno, Paysandú, Rivera, Rocha, Salto, Soriano, Tacuarembó, T. y T. Orientales.

En Bolivia crece en Chuquisaca, La Paz, Santa Cruz y Tarija; en Venezuela se desarrolla en el Distrito Federal.

En la zona del Caribe en Barbados, Cuba, Leeward Islands, Puerto Rico, Virgin Islands y Windward Islands. En El Salvador en las regiones de La Libertad, San Salvador y Santa Ana. En Panamá en Canal Area.

En México, se localiza en Chiapas y en Estados Unidos, en la Florida.

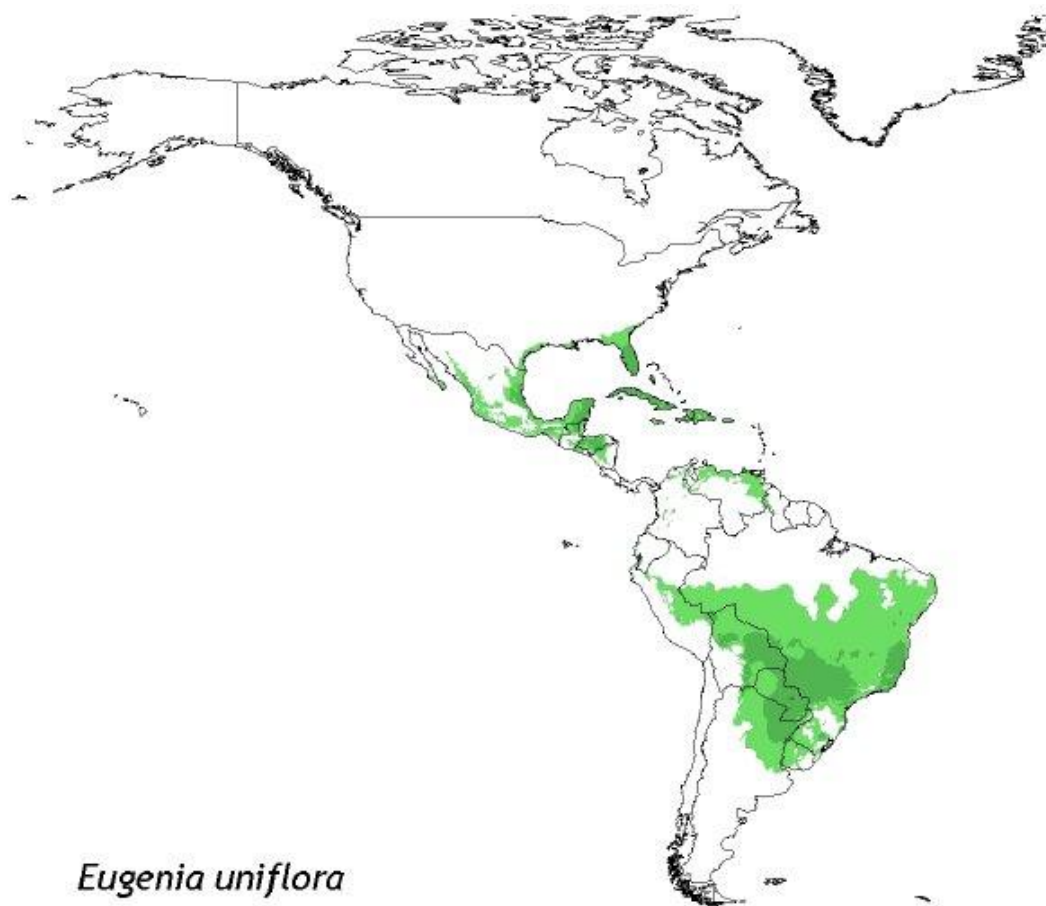


Fig. 2-7: Distribución geográfica de *Eugenia uniflora* L. en el continente americano.

(http://3.bp.blogspot.com/zT05Ewkipe0/UBRTiqW6RI/AAAAAAAAAYg/WXeDtDTnte8/s1600/Eugenia_uniflora_p.jpg)

⁽¹⁾ Missouri Botanical Garden: <http://www.tropicos.org/>

⁽³⁾ Catálogo de las Plantas Vasculares – Flora del Cono Sur (<http://www.darwin.edu.ar>).

Distribución geográfica de *Eugenia uniflora* L. en Argentina ⁽²⁾

En Argentina se encuentra en Catamarca, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe y Tucumán.

En Misiones en las localidades de Apóstoles, Cainguas, Candelaria, Iguazú, M. Belgrano, San Ignacio, San Javier, San Martín y San Pedro.



Fig. 2-8: Distribución geográfica de *Eugenia uniflora* L. en Argentina

(<http://www.sib.gov.ar/archivos/Eugenia%20uniflora.jpg>)

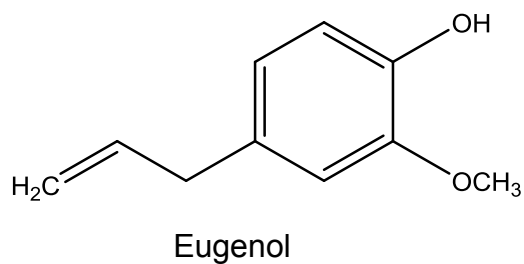
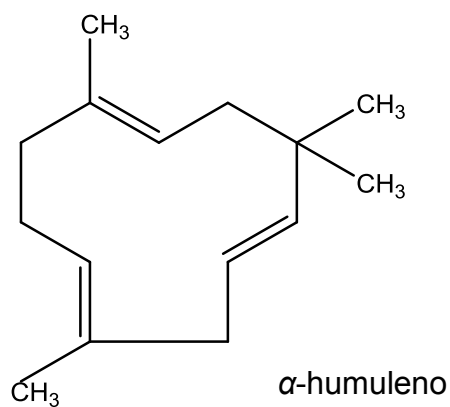
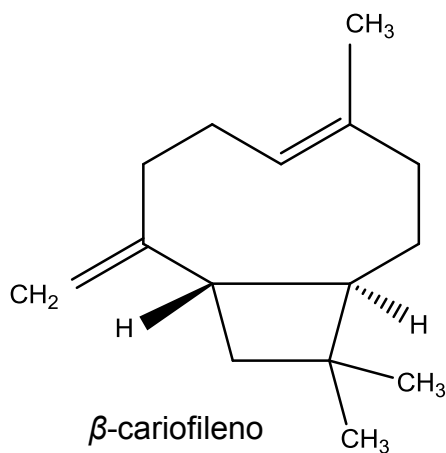
(2) Catálogo de las Plantas Vasculares – Flora del Cono Sur (<http://www.darwin.edu.ar>)

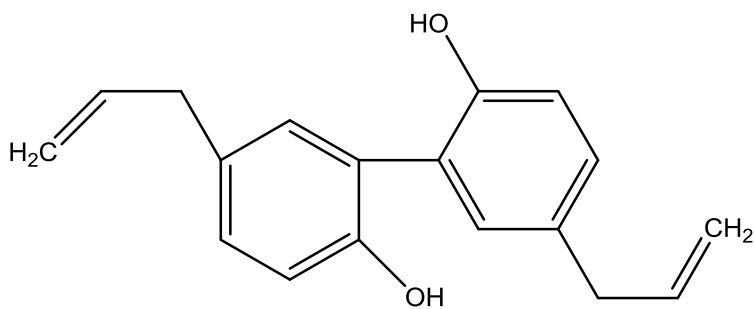
3. Fitoquímica

3.1. Antecedentes químicos del género *Eugenia*.

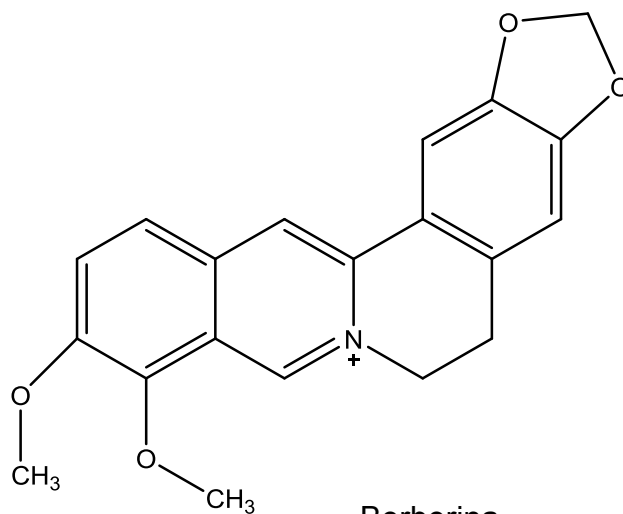
Diversos compuestos químicos han sido aislados de las distintas especies del género, entre ellas se citan:

En *Eugenia caryophyllata* Thunb., en el aceite esencial de frutos se identificaron los siguientes terpenos: β -cariofileno, β -cariofileno óxido, α -humuleno, α -humuleno epóxido I y eugenol (Zheng *et al.*, 1992). En el extracto de flores, magnolol, berberina, ácido cinámico y ácido gálico. (Bae *et al.*, 1998)

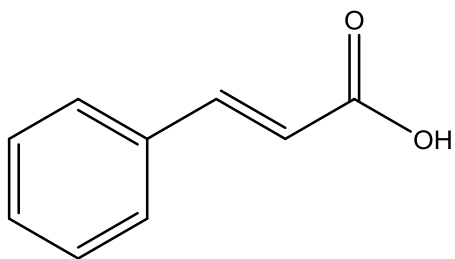




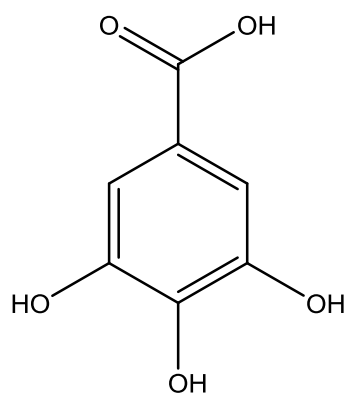
Magnolol



Berberina

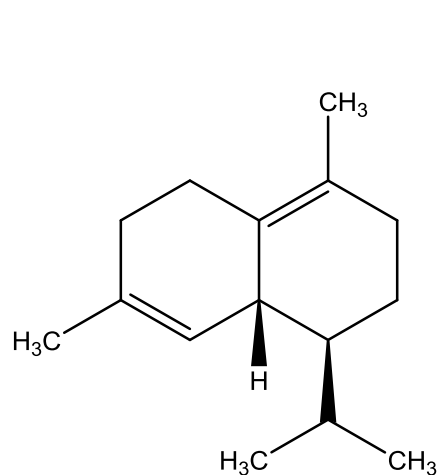
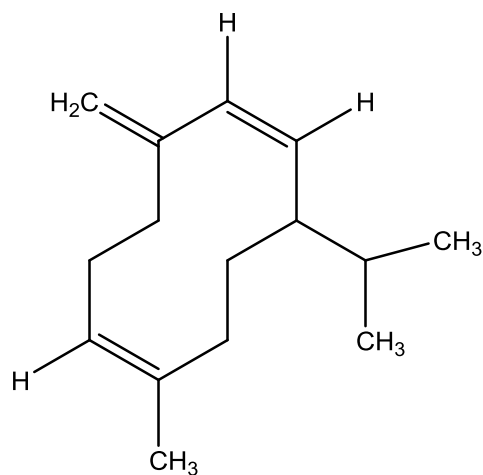


Ácido cinámico



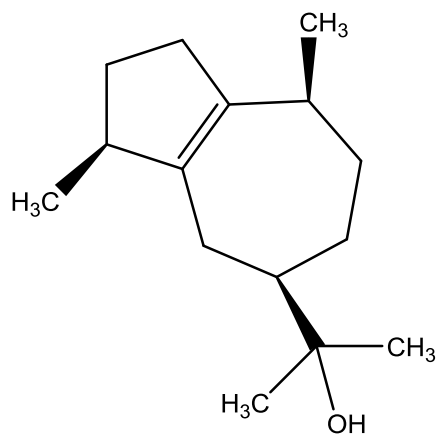
Ácido gálico

En el aceite esencial de hojas de *Eugenia argentea* Bedd. Se encuentran en mayor proporción tres clases de sesquiterpenos: β -cariofileno, δ -cadineno y germacreno D. (Gopan *et al.*, 2011)

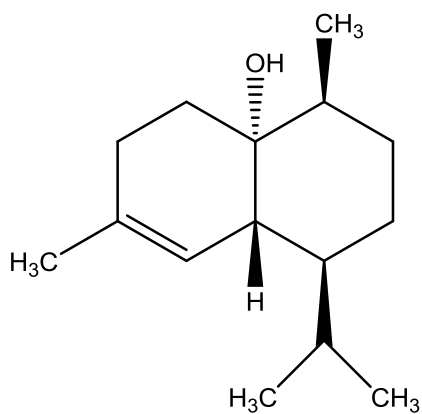
 δ -cadineno

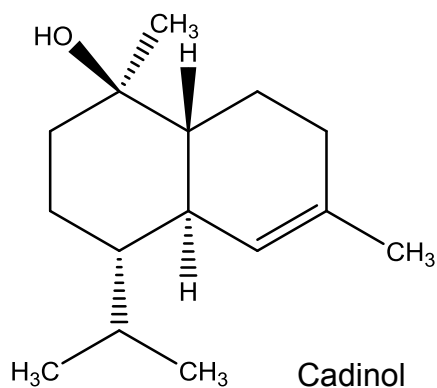
Germacreno D

En el aceite esencial de hojas de *Eugenia acutata* Miq., *Eugenia candolleana* DC. y *Eugenia copacabanensis* Kiaersk. predominaron los alcoholes guaiol, *epi*-cubenol y cadinol. (Nakamura *et al.*, 2010)

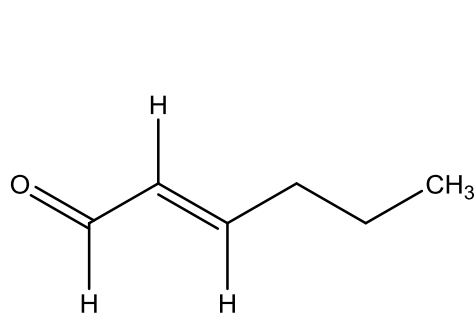


Guaiol

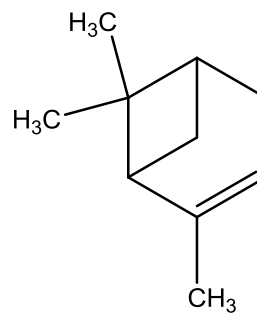
*epi*-cubenol



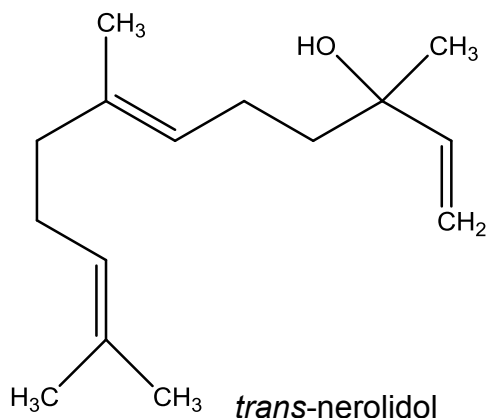
El *trans*-2-hexenal, α -pineno, α -copaeno, β -cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, *trans*-nerolidol, torreyol y linalol fueron los compuestos mayoritarios de *Eugenia austin-smithii* Standl., *Eugenia cartagensis* O. Berg, *Eugenia haberi* Barrie, *Eugenia monteverdensis* Barrie y *Eugenia zuchowskiae* Barrie. (Cole *et al.*, 2007)



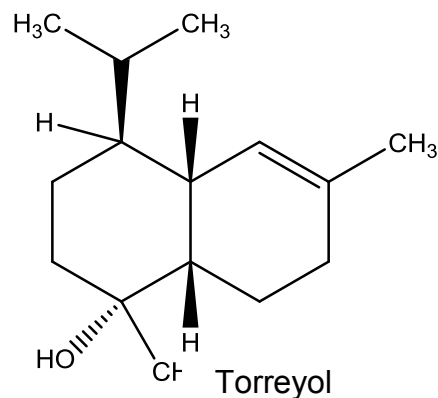
trans-2-hexenal



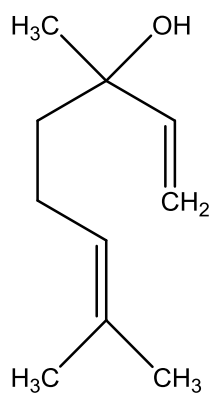
α -pineno



trans-nerolidol

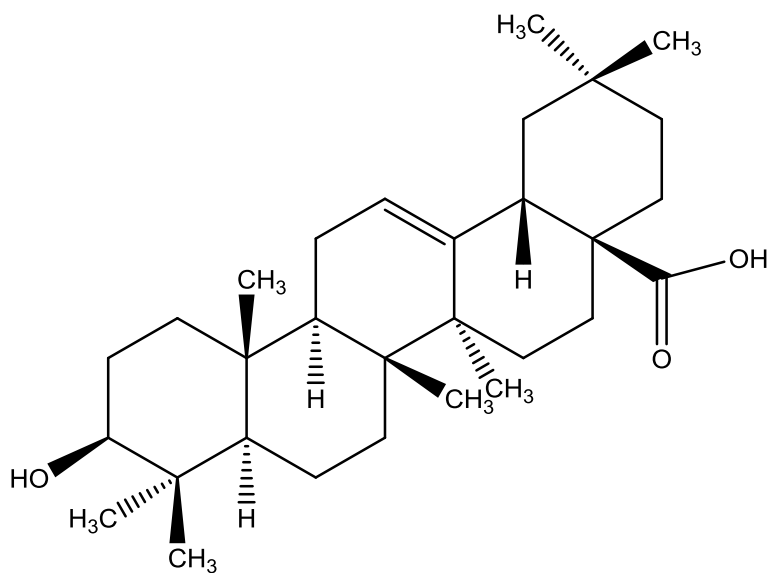


Torreyol

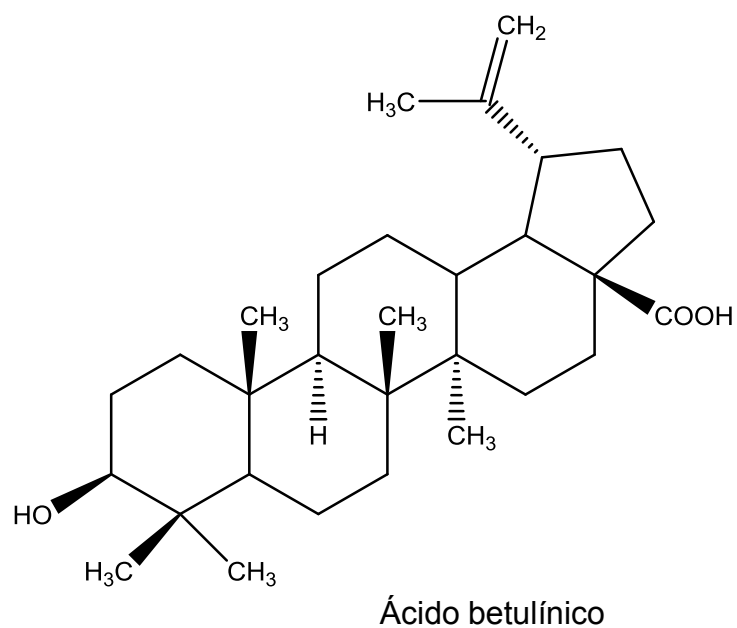
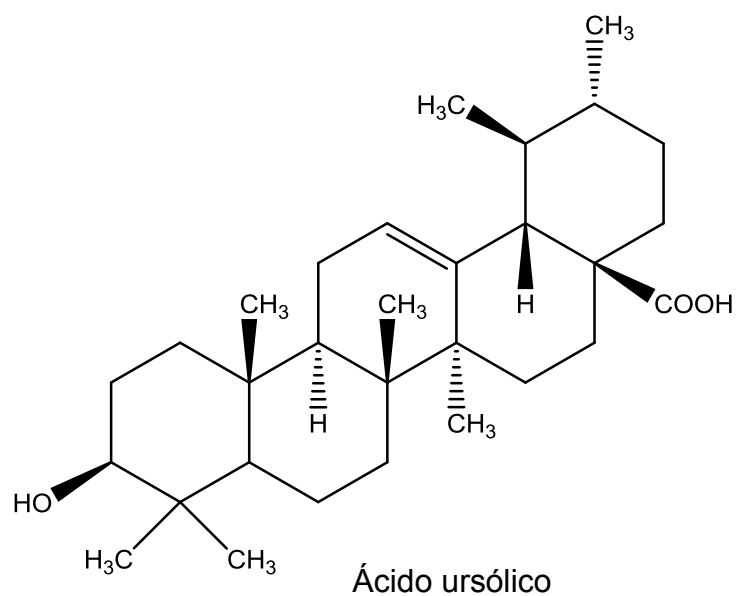


Linalol

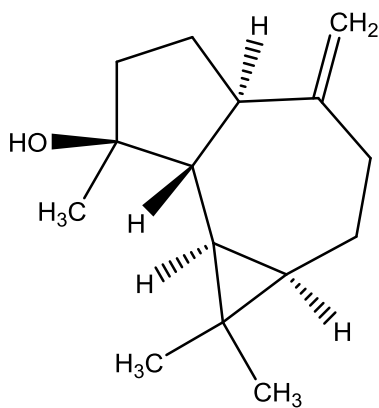
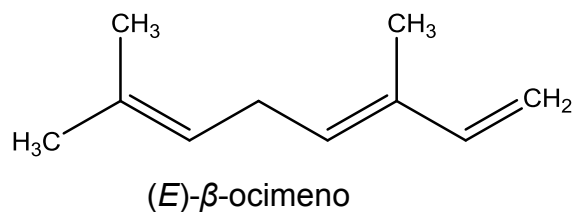
En el extracto etanólico de hojas de *Eugenia brasiliensis* Lam. se aislaron tres ácidos triterpénicos mono-hidroxilados: oleanólico, ursólico y betulínico. (Frighetto *et al.*, 2005)



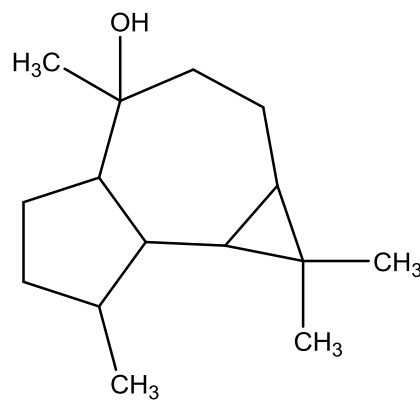
Ácido oleanólico



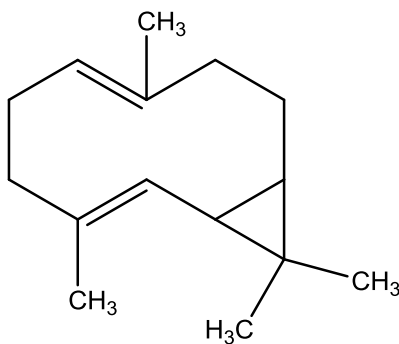
En el aceite esencial de hojas de *Eugenia pitanga* (O. Berg) Kiaersk. fueron caracterizados (*E*)- β -ocimeno, espatulenol, globulol, germacreno D y biciclogermacreno. (Apel *et al.*, 2004)



Espatulenol

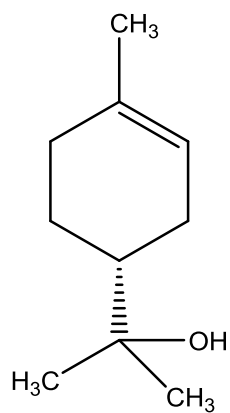


Globulol

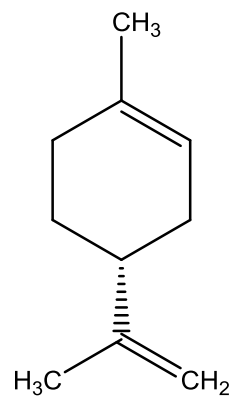


Biciclogermacreno

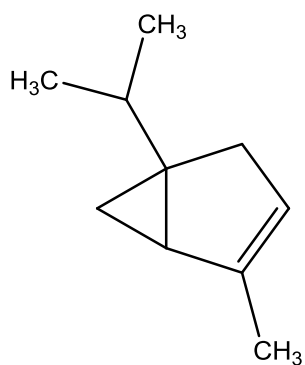
Monoterpenos oxigenados e hidrocarbonados se encontraron en el aceite esencial de hojas de *Eugenia dysenterica* DC., entre ellos: α-terpineol, limoneno, α-thujeno y sabineno. (Costa *et al.*, 2000)



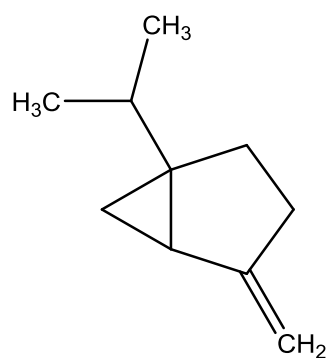
α -terpineol



Limoneno

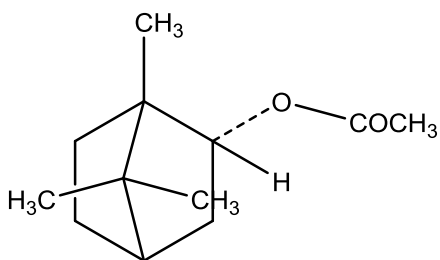


α -thujeno



Sabineno

El acetato de bornilo se halló en *Eugenia octopleura* Krug & Urb. (Santana Tenorio *et al.*, 2011)

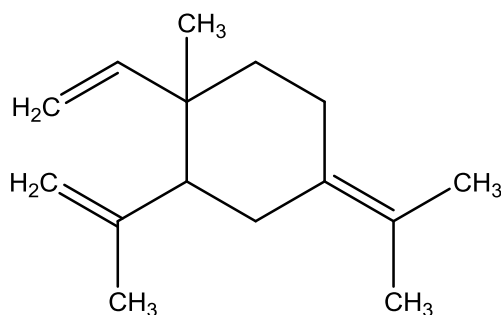


Acetato de bornilo

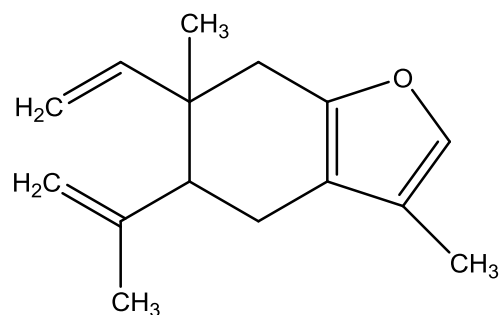
3.2. Antecedentes químicos de *Eugenia uniflora* L.

En el aceite esencial de hojas, obtenido por hidrodestilación, se aislaron compuestos en su mayoría monoterpenos y sesquiterpenos, entre ellos: β -elemeno, β -cariofileno, curzereno, germacreno B, selina-1,3,7 (11)-trien-8-ona, germacrona, selina-1,3,7 (11)-trien-8-ona epóxido los cuales se encuentran en mayor proporción. (Weyerstahl *et al.*, 1988)

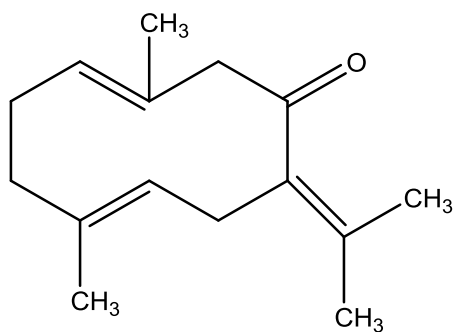
Entre otros constituyentes químicos encontrados fueron: α -thujeno, α -pineno, mirceno, α -felandreno, δ -2-careno, α -terpineno, silvestreno, *Z*- β -ocimeno, *E*- β -ocimeno, γ -terpineno, terpinoleno, linalol, geranato de metilo, δ -elemeno, isodene, α -copaeno, α -gurjunene, γ -elemene, aromadendreno, α -humulene, germacreno D, β -selineno, δ -selineno, germacreno A, γ -cadineno, δ -cadineno, α -cadineno, selina-3,7(11)-dieno, ledol, espatulenol, globulol, guaíol, α -cadinol, 7-*epi*- α -eudesmol (Gallucci *et al.*, 2010); thujopsene-2 α -ol, 14-hydroxy-9-*epi*-(*E*)-cariofileno, nootkatol (Costa *et al.*, 2010); atractylona, 3-furanoeudesmeno (Amorim *et al.*, 2009); furanodieno (Chang *et al.*, 2011); selina-1,3,7(11)-trien-8-ona óxido (Kanazawa *et al.*, 2000; Novack Victoria *et al.*, 2012); furanoelemeno (Weyerstahl *et al.*, 1988); isofuranodieno (Rücker *et al.*, 1971); nerolidol. (Henriques *et al.*, 1993)



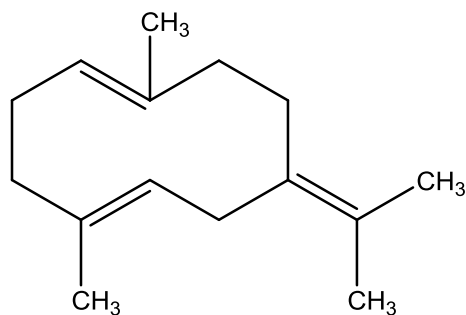
β -elemeno



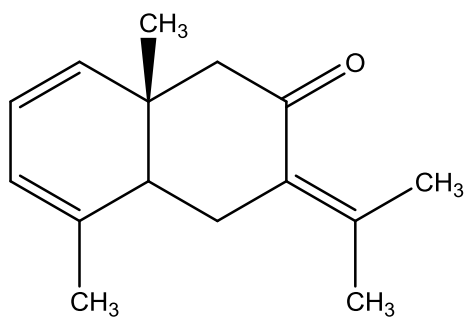
Curzereno



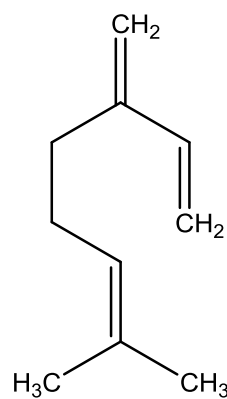
Germacrona



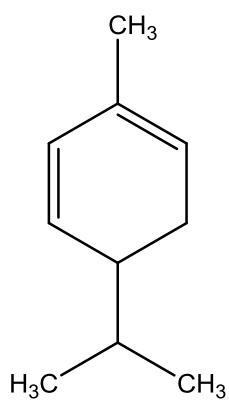
Germacreno B



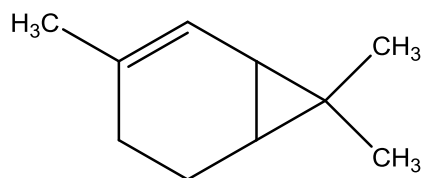
Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona



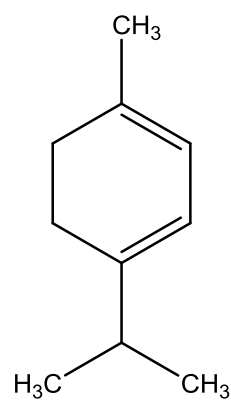
Mirceno



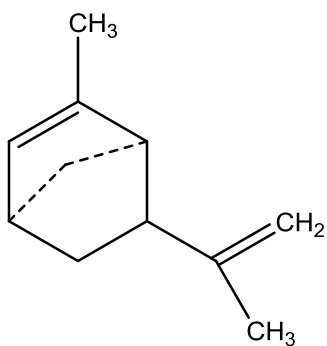
α-felandreno



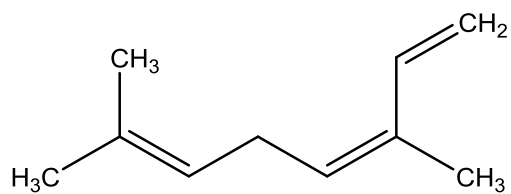
δ-2-careno



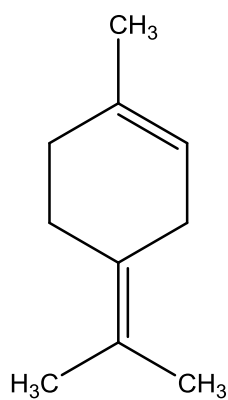
α-terpineno



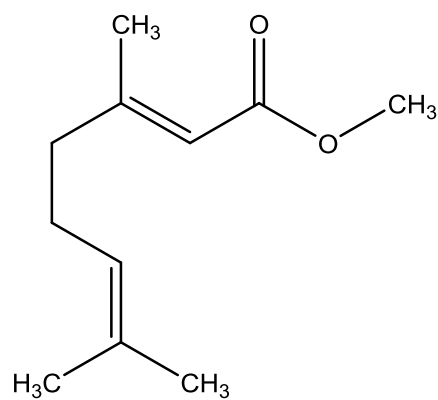
Silvestreno



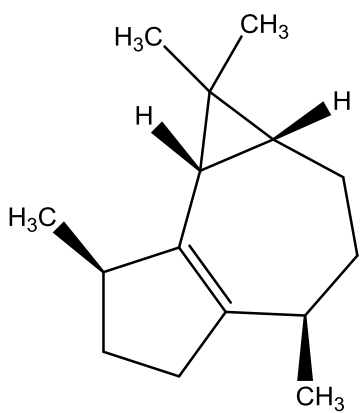
Z- β -ocimeno



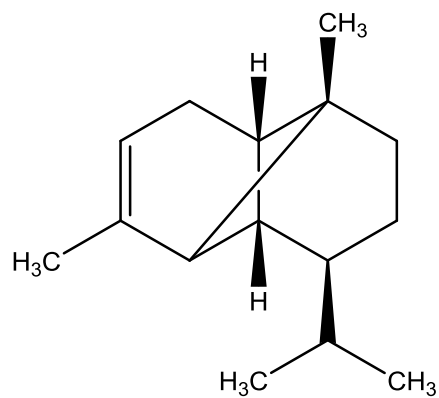
Terpinoleno



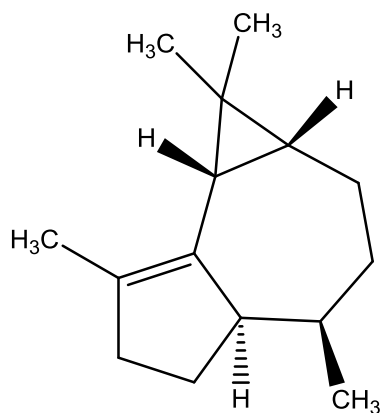
Geranato de metilo



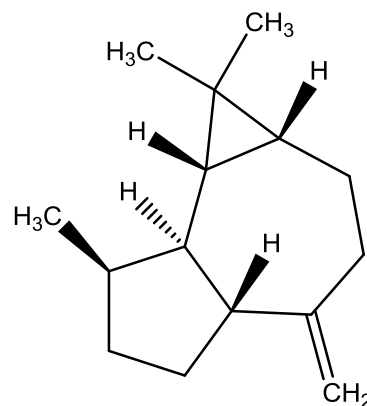
Isoledene



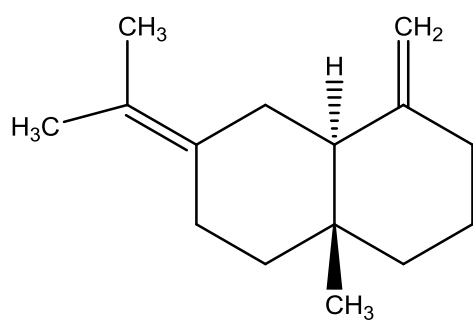
α -copaeno



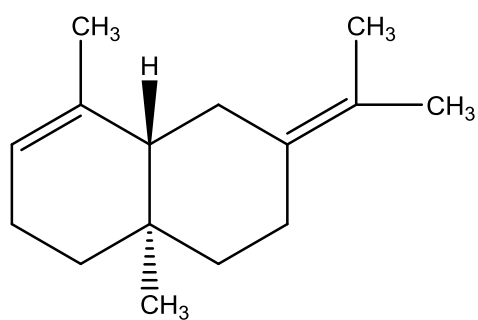
α -gurjunene



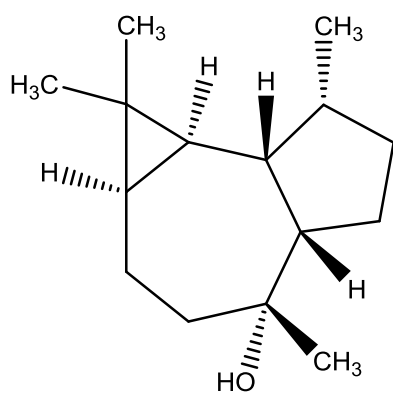
Aromadendreno



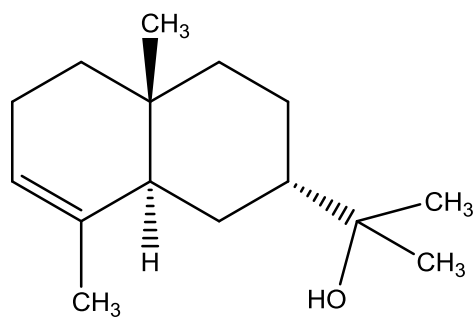
Germacreno D



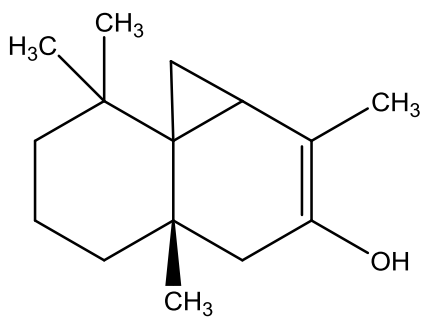
Selina-3,7(11)-diene



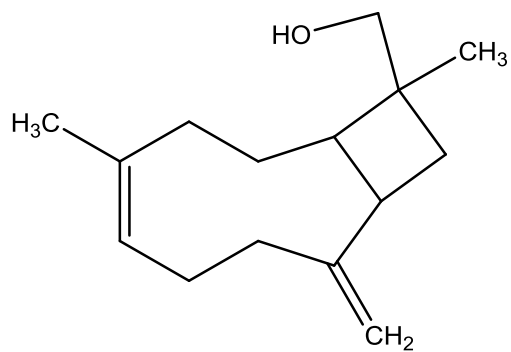
Ledol



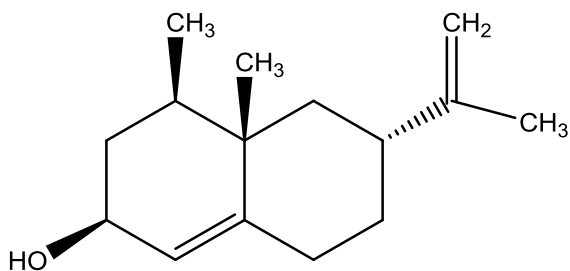
7- α -eudesmol



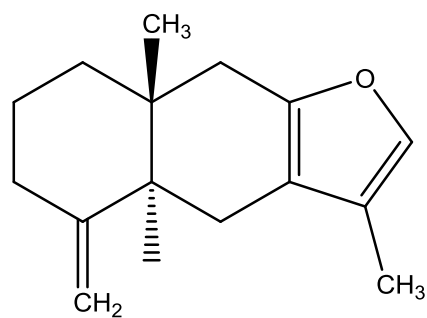
Thujopsene-2α-ol



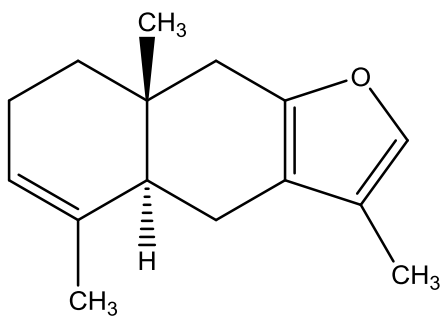
14-hydroxy-9-epi-(E)-cariofileno



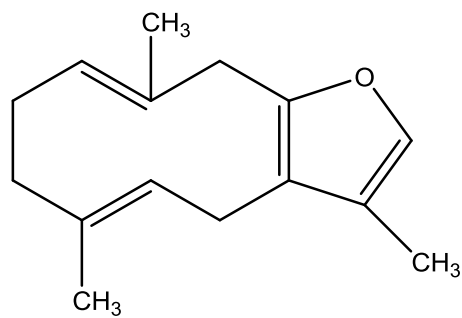
Nootkatol



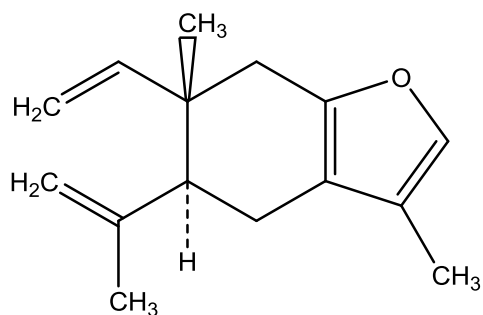
Atractylona



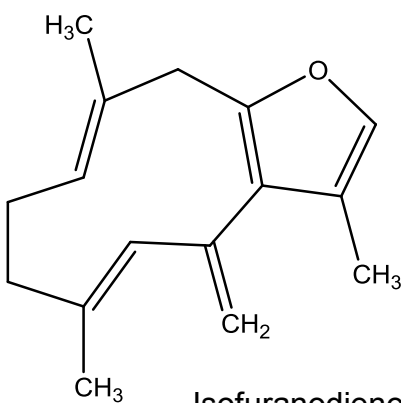
3-furanoeudesmeno



Furanodieno

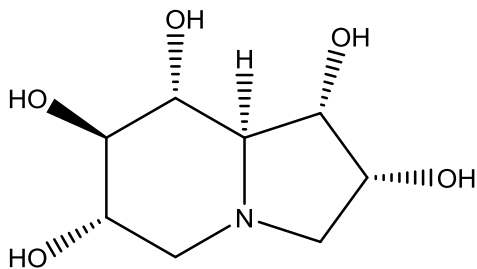


Furanoelemeno

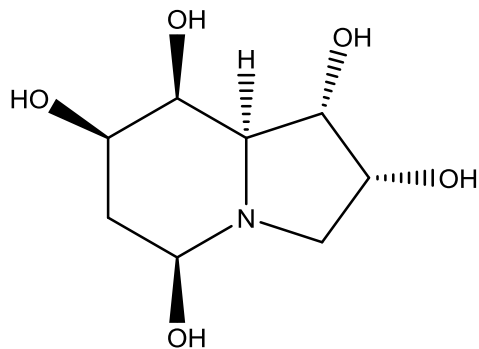


Isofuranodieno

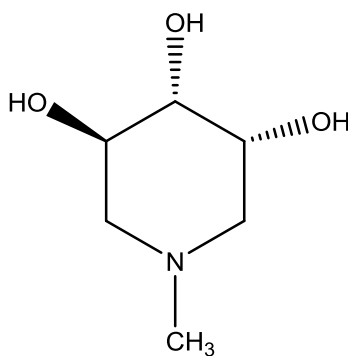
En extracto acuoso de hojas de *Eugenia uniflora* L. se lograron separar alcaloides como uniflorine A [(-)-(1S, 2R, 6S, 7R, 8R, 8aR)-1,2,6,7,8-pentahidroxiindolizidina], uniflorine B [(+)-(1S, 2R, 5R, 7R, 8S, 8aS)-1,2,5,7,8-pentahidroxiindolizidina] y (+)-(3 α , 4 α , 5 β)-1-methylpiperidine-3, 4, 5-triol. (Matsumura *et al.*, 2000)



Uniflorine A

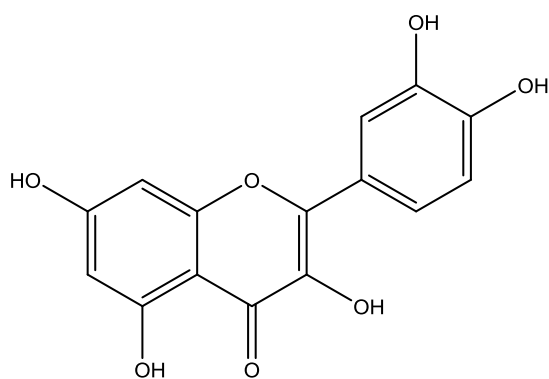


Uniflorine B

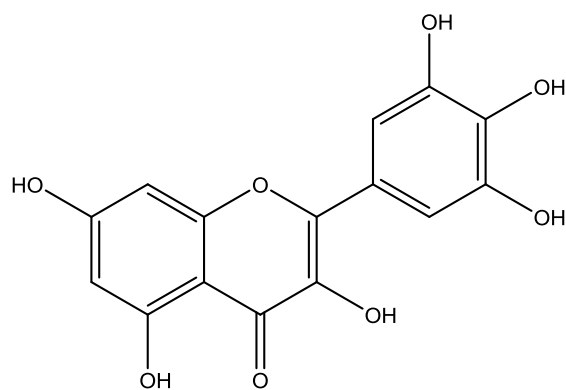


(+)-(3 α , 4 α , 5 β)-1-methylpiperidine-3, 4, 5-triol

Los flavonoides como quercetina y miricetina fueron hallados en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Eugenia uniflora* L. (Rattmann *et al.*, 2012)

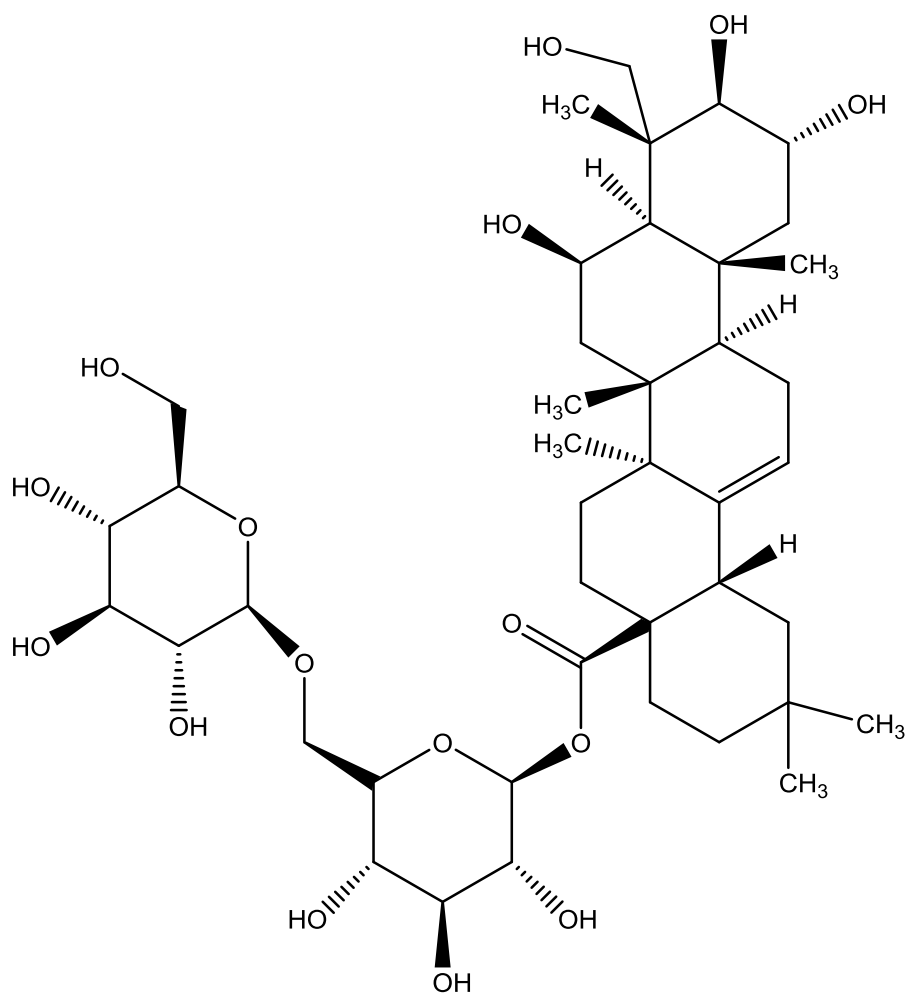
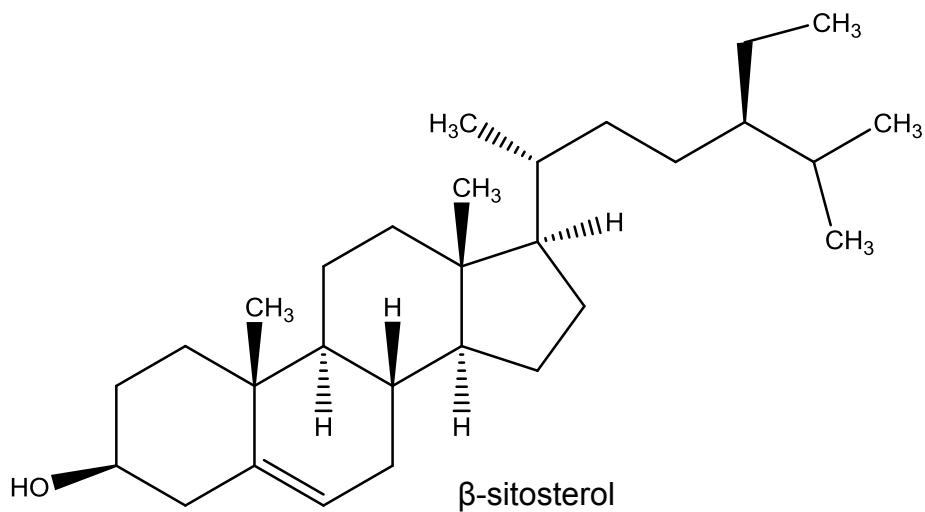


Quercetina

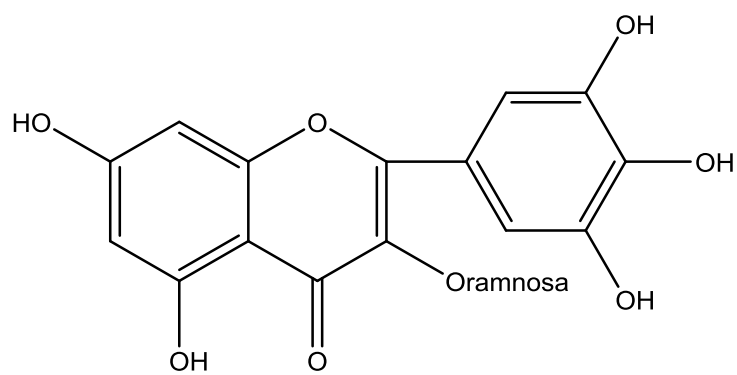


Miricetina

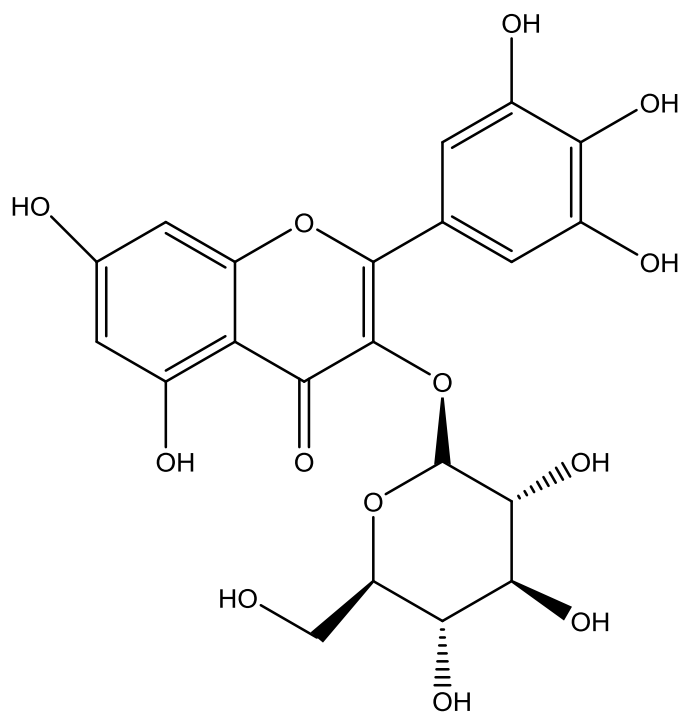
En el extracto metanólico de hojas, se aislaron un estero (β-sitosterol), triterpenos (ácido betulínico y centellósido C) y flavonoides (miricetrina, miricetin 3-O-β-D-glucopiranósido). (Samy *et al.*, 2014)



Centellosido C



Miricetrina



Miricetin 3-O- β -D-glucopiranosido

4. Farmacología

4.1. Antecedentes farmacológicos del género *Eugenia*.

Entre las diferentes actividades biológicas evaluadas en las diversas especies del género *Eugenia*, podemos destacar:

♦ En *Eugenia caryophyllata* Thunb. se ha estudiado el aceite esencial exhibiendo **actividad anticonvulsiva** contra ataques tónicos inducidos por MES (Pourgholami *et al.*, 1999). En la misma especie, el extracto de flores demostró ser activo contra la bacteria *Helicobacter pylori*. (Bae *et al.*, 1998)

Se determinaron **propiedades antioxidantes** a través de sistemas generadores de radicales libres, en donde fue comprobada la protección contra la peroxidación enzimática y no-enzimática lipídica en membranas microsomales de ratas en el extracto metanólico de *Eugenia caryophyllata* (Velázquez *et al.*, 2003). La misma actividad fue comprobada en el aceite esencial de frutos. (Gülçin *et al.*, 2004)

El ácido oleanólico, aislado de frutos de *Eugenia caryophyllata*, demostró tener **actividades anticolinesterolémica, anti-hepatotóxica, antioxidante, antiinflamatoria, antifúngica, antibiótica**; el eugenol, utilizado en perfumería como aromatizante de alimentos y cigarrillos, como **anestésico** en tratamientos odontológicos además posee **propiedades antioxidante, hepatoprotectora y antinefrotóxica** (Kelecom *et al.*, 2002), **antibacteriana y antifúngica**. (Singh *et al.*, 2012)

El aceite esencial de frutos demostró **propiedad acaricida** contra *Psoroptes cuniculi* (Fichi *et al.*, 2007). Los terpenos como β -cariofileno, β -cariofileno óxido, α -humuleno, α -humuleno epóxido I encontrados en el mismo, evidenciaron actividad significativa como inductores de la enzima detoxicante glutathione S-transferasa en el hígado del ratón (Zheng *et al.*, 1992) además de tener **propiedades anticarcinogénicas**. (Singh *et al.*, 2012)

♦ El aceite esencial de hojas de *Eugenia candolleana* DC. exhibió **propiedad antiinflamatoria**. (Guimarães *et al.*, 2009)

♦ Estudios del extracto de éter de petróleo de hojas de *Eugenia chlorantha* Duthi demostraron que el mismo presentaba **actividad citotóxica** contra la línea celular de linfoblasto T de leucemia. (Susidarti *et al.*, 2007)

♦ El extracto etanólico de hojas de *Eugenia dysenterica* DC. manifestó **actividad antiviral**. (Cecílio *et al.*, 2012)

♦ *Eugenia jambolana* Lam. reveló **propiedad antidiabética** al ser ensayado el extracto acuoso de frutos en ratas Wistar (Pepato *et al.*, 2005). También la misma actividad fue comprobada en la misma especie, pero en el aceite esencial de frutos, semillas y tallos. (Ayyanar *et al.*, 2012)

La presencia de antocianinas en el extracto metanólico del fruto de *Eugenia jambolana* Lam. presentó **actividad antioxidante** (Camacho Romero *et al.*, 2016); mientras que la **actividad antidiarreica** ha sido registrada en el extracto etanólico de corteza en la especie análoga. (Mukherjee *et al.*, 1998)

♦ Fracciones de acetato de etilo de hojas de *Eugenia malaccensis* L. mostraron **propiedades antioxidantes** (Oliveira Figueirôa *et al.*, 2013). En la misma especie, extractos etanólicos de hojas y tallos manifestaron **actividad molusquicida** contra *Biomphalaria glabrata* y **larvicida** contra *Aedes aegypti*. (Marques de Oliveira *et al.*, 2006)

♦ El extracto metanólico de hojas de *Eugenia orbiculata* Lam. exhibió **actividad antioxidante** in vitro (Neergheen *et al.*, 2006) al igual que el extracto metanólico de corteza de *Eugenia polyantha* Wight. (Lelono *et al.*, 2009)

♦ La infusión realizada de hojas de *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. evidenció **actividad antioxidante**, como así también produjo la **inhibición enzimática relacionada al síndrome metabólico**. Este último se caracteriza por anormalidades metabólicas incluyendo factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares como obesidad, hipertensión, hiperglucemia, hipertrigliceridemia y baja lipoproteína de alta densidad (HDL) en colesterol. (Lopes Galeno *et al.*, 2014)

♦ Triterpenoides aislados del extracto clorofórmico de *Eugenia sandwicensis* A. Gray, denotaron una potencial **actividad quimiopreventiva anticancerígena**. (Gu *et al.*, 2001)

♦ El extracto etanólico de hojas de *Eugenia winzerlingii* Standl. y de tallos de *Eugenia yucatanensis* Standl., demostraron **actividad antifúngica** contra *Alternaria tagetica*. (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008)

♦ Diversas especies del género *Eugenia* demostraron poseer **actividad antimicrobiana**, entre ellas fue estudiado el extracto etanólico de hojas de *Eugenia brasiliensis* Lam. el cual presentó actividad contra el bacilo gramnegativo coliforme *Escherichia coli* como así también contra el bacilo gramnegativo no fermentador *Pseudomonas aeruginosa*. Fue inactivo frente a *Staphylococcus aureus* (Coco Gram positivo - anaerobio facultativo). (Magina *et al.*, 2012)

En los aceites esenciales de hojas de *Eugenia brasiliensis* Lamarck, *Eugenia beaurepaireana* (Kiaerskou) Legrand y *Eugenia umbelliflora* Berg. fueron estudiadas sus actividades, los cuales mostraron poseer actividad frente a *Staphylococcus aureus*. *E. beaurepaireana* presentó actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que *E. umbelliflora* evidenció actividad antimicrobiana frente a esta última bacteria Gram negativa y contra *Escherichia coli*, inactividad. (Magina *et al.*, 2009)

Por otro lado, las fracciones de un extracto metanólico de hojas de *Eugenia brejoensis* Mazine, de ciclohexano, acetato de etilo y n-butanol exhibieron actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis* (bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa), *S. aureus* y *E. coli*. (Azevedo *et al.*, 2012)

En *Eugenia caryophyllata* Thunb. fueron estudiados los extractos metanólico, de acetato de etilo y de acetona del fruto, tallo y hojas. Se demostró que tanto en el extracto metanólico como el de acetona, la actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fue positiva, donde el extracto de acetato de etilo demostró ser inactivo frente a las tres bacterias (Keskin *et al.*, 2011). Además, fue evaluado el aceite esencial del fruto de la misma especie, el cual evidenció actividad positiva contra *S. aureus* y actividad negativa contra *P. aeruginosa* (Kloucek *et al.*, 2012); actividad biológica frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Nuñez *et al.*, 2012) y actividad antimicrobiana frente a *E. coli* y *S. aureus*. (Oussalah *et al.*, 2007)

En el aceite esencial de tallos, hojas y flores de *Eugenia chlorophylla* O. Berg, se manifestó actividad antibacteriana en *S. aureus* e inactividad tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*. (Stefanello *et al.*, 2008)

La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de *Eugenia jambolana* Lam., fue efectiva frente a *Staphylococcus aureus*. (Coutinho *et al.*, 2010)

El aceite esencial de hojas de *Eugenia rottleriana* Wight et Arn. reveló efectiva actividad antibacteriana tanto para la bacteria Gram-positiva *Bacillus cereus* como para la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli*. (Raj *et al.*, 2007)

El extracto metanólico de hojas y frutos de *Eugenia umbelliflora* O. Berg como así también las fracciones de diclorometano y de acetato de etilo provenientes del mismo extracto, fueron evaluados frente a *S. aureus* demostrando su efectividad. (Machado *et al.*, 2005)

4.2. Antecedentes farmacológicos de *Eugenia uniflora* L.

La utilización de *Eugenia uniflora* L. en diversas patologías ha sido comprobada por diversos estudios científicos. Entre las acciones farmacológicas determinadas, pueden citarse:

Como **astringente** para el **tratamiento de desórdenes digestivos**. (Bandoni *et al.*, 1972)

Los flavonoides presentes en las hojas tienen **propiedades inhibitorias de la xantina oxidasa** que confirma su uso en el **tratamiento de la gota**. Además estudiando la toxicidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *E. uniflora* no verificaron toxicidad en dosis de hasta 4,2 g/kg, administradas en ratones, por vía oral. La DL50, por vía intraperitoneal fue de 220 mg/kg, en ratones. (Schemeda-Hirschmann *et al.*, 1987)

Se determinó la actividad en decocción como **hipotensora** y **diurética** (Consolini *et al.*, 1999, 2002; Cirqueira *et al.*, 2005) y en el extracto hidroalcohólico se comprobó su **actividad vasorrelajante**, evaluándose también la **actividad antiinflamatoria**. (Schapoval *et al.*, 1994; Wazlawik *et al.*, 1997)

En el extracto etanólico de hojas se determinó la **acción antifúngica** contra *Paracoccidioides brasiliensis*, en una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 750 mg. ml⁻¹. (Santos *et al.*, 2004)

En la infusión de hojas de *Eugenia uniflora* L., se hallaron **propiedades antidiarreicas** (Almeida *et al.*, 1995), como así también en corteza. (Brandelli *et al.*, 2009)

Se realizaron estudios *in vitro* de fracciones del extracto etanólico al 70% de hojas de *Eugenia uniflora* los cuales demostraron **un efecto inhibitor en el incremento del nivel de triglicéridos y en el nivel de glucosa en plasma**. (Arai *et al.*, 1999). El extracto acuoso de hojas ha sido empleado como un **agente antidiabético**. (Matsumura *et al.*, 2000)

En el aceite esencial se observaron **propiedades citotóxicas** (Ogunwande *et al.*, 2005) además de poseer **acciones antineoplásicas, antiepiléptica, contra enfermedades cardíacas y diabetes** (Nóbrega de Almeida *et al.*, 2011). En propiedades **cancerígenas**, contra el carcinoma nasofaríngeo. (Lee *et al.*, 2000)

El extracto etanólico de hojas manifestó poseer **propiedad hepatopáncreas** analizado en páncreas de *Oreochromis niloticus* L. (Fiuza *et al.*, 2009)

La **actividad antinociceptiva e hipotérmica** se determinaron en el aceite esencial de hojas. (Amorim *et al.*, 2009)

El extracto etanólico de hojas exhibió **propiedades fototóxicas**. (Douglas Coutinho *et al.*, 2010)

El extracto etanólico de frutos fue evaluado *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi* demostrando que *E. uniflora* podría ser una fuente de productos naturales derivados de plantas con **actividad anti-epimastigota** y con baja toxicidad. (Santos *et al.*, 2012)

Los flavonoides aislados de frutos de *Eugenia uniflora* L., comprobaron su **actividad antioxidante** (Bonat Celli *et al.*, 2011; Bagetti *et al.*, 2011, Vasconcelos Costa *et al.*, 2013) como así también en el extracto etanólico de hojas (Kade *et al.*, 2008; Martinez-Correa *et al.*, 2011), en el aceite esencial de hojas (Victoria *et al.*, 2012) y en infusión de hojas. (Velázquez *et al.*, 2003; Oliveira Figueirôa *et al.*, 2013)

El aceite esencial de hojas demostró poseer **propiedad anti-leishmaniasis**. (da Franca Rodrigues *et al.*, 2013)

Actividad antimicrobiana

El aceite esencial de hojas, el cual se obtuvo a través de hidrodestilación empleando el aparato Clevenger, fue testeado midiendo los diámetros de los halos de inhibición empleando discos de papel de filtro sobre placa de extracto de malta. Se emplearon bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) y hongos (*Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger*). Las bacterias fueron incubadas a 30°C y los hongos a 25°C.

La mayoría de las muestras fueron inactivas contra *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* y *Yersinia enterocolitica*. La bacteria más sensible fue *Pseudomonas aeruginosa* y el hongo fue *Trichophyton mentagrophytes*. (Adebajo et al., 1989)

En extracto hidroalcohólico de hojas - obtenido a través de extracción con Soxhlet - en extracto bencénico de tallos - obtenido por digestión - como en el aceite esencial de hojas - obtenido mediante hidrodestilación - fue evaluada la propiedad antimicrobiana empleando técnicas de dilución en agar; observándose actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, y *Shigella dysenteriae*. Los extractos acuoso y bencénico demostraron acción frente a *S. aureus* y *Escherichia coli*, pero la actividad fue mayor frente a *Shigella dysenteriae* y menos activo contra *S. aureus*. En el aceite esencial se observó menor actividad frente a *E. coli* y *S. aureus* pero fue tan activo como el extracto orgánico con respecto a *Staphylococcus aureus*. Todos los extractos fueron activos frente a *E. coli* y ninguno contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*. (Fadeyit et al., 1989)

El aceite esencial de hojas además fue estudiado contra *Sarcinea lutea* y *Mycobacterium phlei*, manifestándose una significativa actividad biológica en ambos microorganismos (El-Shabrawy, 1995). Posteriormente se determinó una actividad antimicrobiana contra *Sarcinea lutea* y *Mycobacterium phlei* como así también una marcada actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes* (Kanazawa et al., 2000). Silva et al., 2012, demostraron que el aceite esencial resultó ser más activo contra *S. aureus* que frente a *Escherichia coli* como así también fue

determinada una fuerte actividad contra *Staphylococcus aureus* (Novack *et al.*, 2012). Asimismo el aceite esencial de hojas mostró inhibición frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Streptococcus equi* y *Staphylococcus epidermidis*. (Lago *et al.*, 2011)

La infusión y decocción de hojas de *E. uniflora*, no exhibieron acción antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. (Schapoval *et al.*; 1994)

El extracto hidroalcohólico de hojas de *Eugenia uniflora* L. fue empleado para determinar la actividad antimicrobiana, el cual evidenció una marcada inhibición del halo contra *Staphylococcus aureus*, seguido por *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Auricchio & Bacchi, 2001) y una moderada actividad antimicrobiana tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Escherichia coli*. (Holetz *et al.* 2002)

La actividad antimicrobiana también fue revelada en el extracto etanólico crudo y en fracciones de hojas de *Eugenia uniflora* L. contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se determinó que el extracto crudo etanólico como así también las fracciones de acetato de etilo y de diclorometano fueron efectivas ante la presencia de *P. aeruginosa*, pero no en la fracción hexánica. (Fiuza *et al.*, 2009)

Las propiedades antimicrobianas de la lecitina de las semillas de *Eugenia uniflora* L. demostraron inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella* sp. y una moderada inhibición de crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* sp. y *Escherichia coli*. (Oliveira *et al.*, 2008)

El extracto metanólico de las partes aéreas fue activo contra *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus* (de Souza *et al.*, 2004) y el extracto metanólico de hojas demostró actividad contra *Staphylococcus aureus*. (Samy *et al.*, 2014)

4.3. Usos etnofarmacológicos de *Eugenia uniflora* L.

La tintura de los frutos es utilizada para el tratamiento de la gota y reuma. El aceite, para desórdenes digestivos, eupéptico y carminativo. (Rücker *et al.*, 1977)

En la medicina folklórica de Paraguay la infusión, decocción y maceración de las hojas se emplean como diurético y antiinflamatorio (Schemeda-Hirschmann *et al.*, 1987; Schapoval *et al.*, 1994), para el tratamiento de hipercolesterolemia, gota, (Wazlawik *et al.*, 1997), enfermedades digestivas, reuma, tos, fiebre, enfermedades hepáticas, amigdalitis, dolor de garganta y hemorroides (Schemeda – H, 1988); para tratar la diabetes y la obesidad (Arai *et al.*, 1999; Matsumura, 2000); como antidiarreico (Schapoval *et al.*, 1994; Barboza *et al.*, 2009); en edemas. (Cirqueira *et al.*, 2005); en bronquitis, influenza; para tratar infecciones urinarias y respiratorias y reducir el peso corporal. Además para controlar los niveles de ácido úrico, astringente, eupéptico como así también para hernia y prolapso. (Barboza *et al.*, 2009)

En Uruguay, la infusión de hojas jóvenes y el licor alcohólico constituido con hojas y frutos, son utilizados para desórdenes del tracto digestivo. En Mauritius, la infusión caliente de hojas secas se le da a beber a mujeres adultas como emenagogo y en Nigeria como febrífugo y antimalárico. (Adebajo *et al.*, 1989)

Los frutos rojos son comestibles y las hojas son usadas en infusiones, solas o mezcladas con “yerba mate” (*Ilex paraguariensis* St. Hil., Aquifoliaceae) como un agente antihipertensivo en la medicina folklórica. (Amat *et al.*, 1991)

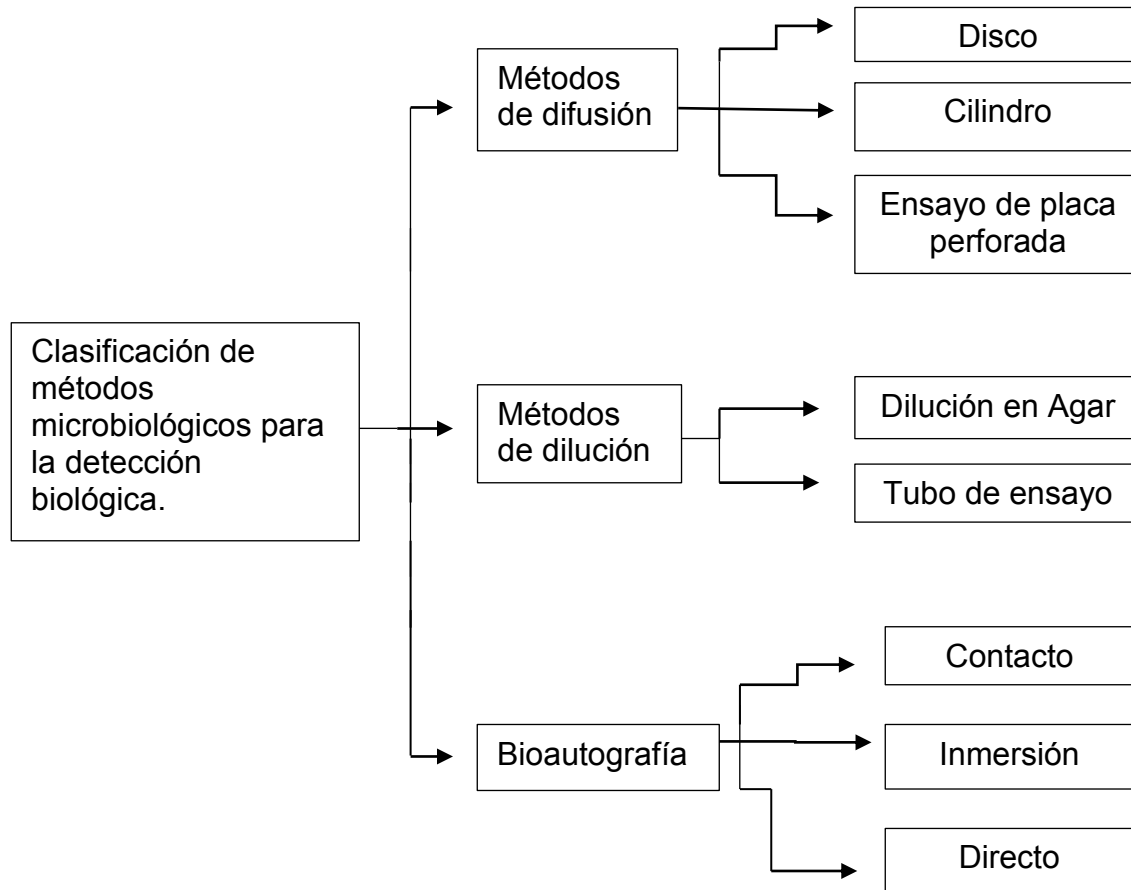
5. Ensayos Farmacológicos

5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Para determinar la actividad antimicrobiana de un compuesto, de un extracto, se pueden realizar distintos tipos de estudios “in vitro” determinando la susceptibilidad de la muestra a evaluar frente a diversas cepas de microorganismos y en presencia de un antibiótico el cual se emplea como referencia.

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. (Ríos *et al.*, 1988; Vanden Berghe *et al.*, 1991; Cole, 1994; Hadacek *et al.*, 2000)

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, Métodos de dilución y Bioautografía.



Las **técnicas de difusión** han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana (Freixa *et al.*, 1998; Salie *et al.*, 1996), frecuentemente empleadas para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de sustancias puras, en especial polares (Choma *et al.*, 2011). Los medios de cultivo más utilizados son el agar Mueller Hinton y agar tripticasa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras, como así también el agar nutritivo (E. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing). El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. (Comité l'Antibiogramme de la Société Franc de Microbiologie, 1996; National Committee for Clinical Laboratory 1997)

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar, sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en cilindro con una cantidad conocida de la sustancia (C. National for Clinical Laboratory Standards, 1998; Hacek *et al.*, 1999). A continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada durante 24 horas (Mbata *et al.*, 2006), luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia.

En el **método de difusión por disco**, los discos de papel de filtro que contienen la muestra a testear, son ubicados en la superficie de agar previamente inoculada con los microorganismos. El agente antimicrobiano difunde dentro del agar e inhibe el crecimiento del microorganismo testado. Después las cápsulas de Petri son incubadas y las zonas de inhibición son medidas. (Choma *et al.*, 2011)

En el **método del cilindro**, los tubos de forma cilíndrica de acero inoxidable o porcelana de tamaño uniforme (generalmente de 8 mm x 6 mm x 10 mm) se colocan en la superficie de agar inoculada de una placa de Petri, y se llenan con las muestras y estándares. Después de incubar, los cilindros son removidos y son medidas las zonas de inhibición. (Code of Federal Regulations, 1976; Association of Official Analytical Chemists, 1984; Maturin, 1998)

En el **método de difusión por placa perforada**, perforaciones de unos pocos milímetros de diámetro son cortadas en la superficie de agar inoculada y completadas con las muestras. La solución a analizar difunde dentro del medio de agar provocando inhibición de crecimiento de los microorganismos. Las placas de Petri son llevadas a temperatura ambiente previa a la incubación; posteriormente las zonas inhibitorias de crecimiento son medidas. (Shitandi *et al.*, 2005)

El **método de dilución** ofrece la posibilidad de estimar la concentración del compuesto a determinar en el medio de agar o en la suspensión de caldo; por esta razón, es comúnmente empleado para la determinación de los valores de CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) la cual es definida como la concentración más baja

de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar durante 24 horas. (Paxton, 1991; Isada *et al.*, 2001; Mc Dermott *et al.*, 2005)

Este método se aplica a extractos complejos, sustancias puras y muestras polares y no polares. (Otvos *et al.*, 2007)

En el procedimiento de **dilución en Agar**, se preparan diferentes concentraciones del compuesto a ensayar las cuales se mezclan con el medio de cultivo. Las placas con agar son inoculadas y luego incubadas. Se determina la Concentración Inhibitoria Mínima. (Otvos *et al.*, 2007)

En el ensayo en **tubo de ensayo**, varias concentraciones de la muestra a analizar son mezcladas con una suspensión bacteriana en una serie de tubos, se deja incubar y posteriormente se determina por turbidez o por cambio de color con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium) el crecimiento o no del microorganismo. El tubo de ensayo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la CIM. (Gil *et al.*, 1999; Otvos *et al.*, 2007)

El MTT, ha sido usado para visualizar la actividad de la enzima deshidrogenada, esta enzima remueve el hidrógeno del sustrato y lo transfiere al aceptor de hidrógenos, usualmente una coenzima. De la coenzima es transferido al MTT, el cual es reducido a un compuesto intensamente coloreado e insoluble en agua llamado formazán (Moriarty *et al.*, 2005). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma la actividad metabólica. (Gil *et al.*, 1999)

La **Bioautografía** es una técnica sencilla y rápida que combina las ventajas de la cromatografía en capa fina y la detección de la actividad antimicrobiana, logrando visualizar directamente la(s) fracción(es) con acción biológica. Determinar la eficacia de esta técnica puede facilitar el panorama en el aislamiento de sustancias antimicrobianas presentes en mezclas complejas. (Colorado *et al.*, 2007)

Es una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de screening fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento bioguiado (Schmourlo *et al.*, 2004). Se realiza el ensayo a través de cromatogramas permitiendo la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los

derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada o TLC. (Ncube *et al.*, 2008)

En la **Bioautografía por Contacto**, se colocan las muestras a estudiar en placas de TLC, se selecciona la fase móvil que de mejor separación y posteriormente esta placa es ubicada en la superficie de agar inoculado con el microorganismo a evaluar durante unos minutos u horas para permitir la difusión. Luego se retira la placa y se lleva la cápsula a incubación. Los halos de inhibición aparecen en las placas donde están los compuestos activos. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium. (Beghe *et al.*, 1972; Hamburger *et al.*, 1987; Silva *et al.*, 2005; Otvos *et al.*, 2007)

En la **Bioautografía por Inmersión**, la placa primero es sumergida o cubierta con el medio de agar, la cual después de solidificar es sembrada con los microorganismos testeados y luego incubada. Con la finalidad de permitir una mejor difusión del compuesto ensayado en la superficie del agar, las placas pueden mantenerse a baja temperatura durante unas pocas horas antes de la incubación. (Otvos *et al.*, 2007)

En la **Bioautografía directa**, la capa de agar permanece sobre la superficie del cromatograma durante la incubación y la visualización. (Otvos *et al.*, 2007)

La Bioautografía por inmersión es una combinación de la Bioautografía por contacto y de la Bioautografía directa porque los compuestos antimicrobianos son transferidos desde el cromatograma al medio de agar como en el método por contacto, pero la capa de agar se mantiene en la superficie de la placa mientras se incuba y visualiza tal como ocurre en la Bioautografía directa. (Otvos *et al.*, 2007)

El tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos: el medio de cultivo en que se realiza la prueba, la capacidad de difusión del compuesto, la cantidad de inóculo, el tiempo de generación del microorganismo, la sensibilidad al antibiótico y el período de incubación. (Ramírez *et al.*, 2009)

En los bioensayos de actividad antibacteriana se deben tener en cuenta algunos aspectos:

✂ En la selección de microorganismos a evaluar siempre debe haber microorganismos gram positivos y gram negativos.

✂ Las cepas ATCC son bien caracterizadas, aunque también se pueden utilizar aislamientos clínicos.

✂ El inóculo se recomienda que esté en el rango de 10^5 y 10^6 ufc/ml. (Cos *et al.*, 2006)

✂ La concentración de los extractos a evaluar no debe exceder el rango de 1 mg/ml para extractos y 0.1 mg/ml para compuestos aislados. (Ríos *et al.*, 2005)

Además, se deben tener en cuenta ciertos parámetros como: a) la selección del material vegetal el cual se recomienda hacerlo a partir de perspectivas etnofarmacológicas, o criterios quimiotaxonómicos; b) las técnicas empleadas para seleccionar las metodologías de acuerdo a la naturaleza del extracto, así para extractos no polares o sustancias que no difundan bien en el agar es más recomendable las técnicas de dilución que las de difusión; c) el medio de cultivo y los microorganismos a evaluar puesto que trabajos previos han demostrado que la composición del medio de cultivo puede influir la actividad de los extractos o compuestos evaluados. (Ramírez *et al.*, 2009)

5.2. Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos: *Escherichia coli*.

Dentro de las bacterias *Enterobacteriaceae*, encontramos a la *Escherichia coli* de morfología bacilar y como son anaerobias facultativas, las bacterias entéricas metabolizan los azúcares mediante fermentación cuando no disponen de oxígeno (Davis *et al.*, 1985). *Escherichia coli* es una bacteria que produce una fermentación ácido-mixta, fermenta la lactosa, no utiliza el ácido cítrico como fuente de carbono y convierte el aminoácido triptófano en indol. (Ingraham *et al.*, 2004)

Son bacilos gramnegativos facultativos que habitan en el tracto gastrointestinal del hombre y de otros animales sin causar normalmente enfermedad (Davis *et al.*, 1985);

representan sólo una pequeña proporción de la flora intestinal en general y con mayor frecuencia existe en este entorno sin comprometer la salud del huésped. (Poolman, 2017; Eusébio *et al.*, 2016). Sin embargo, los rasgos de virulencia que expresan *E. coli* son capaces de causar una variedad de síndromes de enfermedad a través de múltiples mecanismos. (Poolman, 2017)

Esta bacteria es una causa común de enfermedades diarreicas a nivel mundial, causa generalmente procesos patológicos del aparato urinario (Davis *et al.*, 1985) ocasionando infecciones del tracto urinario complicadas y no complicadas, siendo las principales causas de bacteriemia y meningitis neonatal (Poolman, 2017). *E. coli* es el agente etiológico más frecuentemente aislado en las infecciones del tracto urinario (ITU) (Eusébio *et al.*, 2016); también es responsable de infecciones extra-intestinales. (Massota *et al.*, 2016)

La *E. coli uropatogénica* (ECUP) expresa factores de virulencia tales como adhesinas, toxinas, sideróforos y proteínas de superficie responsables para la colonización, invasión y persistencia en el tracto urinario. (Eusébio *et al.*, 2016)

La gastroenteritis *Escherichia coli enterohemorrágica* (ECEH) es responsable de diversas infecciones que van desde diarrea acuosa a la colitis hemorrágica progresando al síndrome urémico hemolítico (SUH) en los niños, sobre todo los niños menores de 3 años y en los ancianos (Mariani-Kurkdjiana *et al.*, 2016; van der Mee-Marquet *et al.*, 2016). La virulencia de esta bacteria está asociada a la presencia de las toxinas *Shiga*, en donde el ganado es un importante reservorio y los seres humanos se infectan por el consumo de alimentos contaminados. (Mariani-Kurkdjiana *et al.*, 2016)

El uso de antibióticos es controvertida para el tratamiento de infecciones causadas por *Escherichia coli* (Mariani-Kurkdjiana *et al.*, 2016). El aumento de la resistencia a los antibióticos para *E. coli* contribuye a la morbilidad, la mortalidad y a costos sustanciales de salud y de la sociedad asociados con la infección. Como consecuencia de ello, muchas vacunas de *E. coli* están en desarrollo, por lo que podrían contribuir significativamente al control de la enfermedad y la resistencia a los antibióticos en todo el mundo. (Poolman, 2017)

5.3. Cocos Gram positivos anaerobios facultativos: *Staphylococcus aureus*.

En la familia de los cocos grampositivos que constituyen las micrococáceas, el género más importante es *Staphylococcus*. Estos gérmenes son anaerobios facultativos (en ausencia de oxígeno fermentan azúcares, produciendo ácido láctico como producto final) e inmóviles. El término estafilococo (del griego *staphyle*, racimo de uvas) refleja el agrupamiento de los gérmenes en racimos irregulares (Davis *et al.*, 1985). Son un amplio grupo de organismos con una morfología muy similar (son esféricos o casi esféricos), son fisiológicamente diferentes y se encuentran en hábitats diferentes. (Madigan *et al.*, 1999)

El género *Staphylococcus* contiene patógenos comunes de personas y de animales. Son relativamente resistentes a la desecación y, por lo tanto, pueden dispersarse fácilmente a través del aire, en partículas de polvo. (Madigan *et al.*, 1999)

Staphylococcus aureus es un patógeno humano importante, que puede infectar casi cualquier tejido del cuerpo; causa gran número de enfermedades supurativas en el hombre, incluyendo los abscesos superficiales y profundos (Davis *et al.*, 1985). Además provoca muchas infecciones nosocomiales (16% del total y un 60% de resistencia a los antibióticos) como la neumonía - que se adquieren en los hospitales - infecciones de heridas, osteomielitis, meningitis, artritis purulenta, septicemia y endocarditis. (Davis *et al.*, 1985; Ingraham *et al.*, 2004; Tortora *et al.*, 2007)

Aquellas cepas de *Staphylococcus aureus* que con mayor frecuencia causan enfermedades en los humanos, producen un cierto número de enzimas extracelulares o de toxinas. Se han reconocido al menos cuatro *hemolisinas* diferentes, y una misma cepa es capaz de producir más de una hemolisina. *S. aureus* puede producir también una *enterotoxina*, comúnmente asociada a los trastornos debidos a la ingestión de ciertos alimentos. Otra sustancia producida por *Staphylococcus aureus* es la *coagulasa*, un factor parecido a una enzima que hace que se coagule la fibrina y se forme un coágulo. La producción de coagulasa está generalmente asociada a la patogenecidad. Parece ser que la coagulación inducida por la coagulasa da como resultado un cúmulo

de fibrina en torno a las células bacterianas y las hace resistente a la fagocitosis. (Madigan *et al.*, 1999)

La mayoría de las cepas de *S. aureus* producen también leucocidina, que causa la destrucción de los leucocitos, haciendo que las células de *S. aureus* escapen de la fagocitosis sin ser dañadas. La producción de leucocidina en lesiones de la piel, tales como los diviesos o las espinillas, produce una gran destrucción de los tejidos y es uno de los factores responsables de la formación del pus. Otros factores extracelulares producidos por *S. aureus* incluyen enzimas proteolíticas, hialuronidasa, fibrinolisisina, lipasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa. (Madigan *et al.*, 1999)

El hábitat más común de *Staphylococcus aureus* es la parte superior del tracto respiratorio, especialmente la nariz y la garganta, así como la superficie de la piel. En los últimos años han tenido lugar epidemias hospitalarias producidas, en su mayoría, por cepas resistentes a los antibióticos. El uso extensivo de los antibióticos ha conducido a una selección natural de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*. (Madigan *et al.*, 1999)

Al ser *Staphylococcus aureus* una bacteria altamente versátil, reside como un colonizador asintomático en la piel y en la zona nasofaringe en aproximadamente el 30% de los individuos. La colonización nasofaríngea es un riesgo para adquirir infecciones por *S. aureus*, especialmente las infecciones respiratorias (Mulcahy *et al.*, 2016), como así también una variedad de síntomas clínicos que se asocian comúnmente a la piel y a infecciones de los tejidos blandos (Giersing *et al.*, 2016). Como es un patógeno oportunista que coloniza la piel, agrava la enfermedad de pacientes con dermatitis atópica. (Malhotra *et al.*, 2016)

Las infecciones por *S. aureus* son más severas en los niños pequeños, los ancianos e inmuno suprimidos (Klevens *et al.*, 2007; Farley *et al.*, 2015). La incidencia de infección en países de bajos ingresos es más alta en neonatos y niños hasta un año de edad con las tasas de mortalidad de hasta un 50% (Nickerson *et al.*, 2009); en cambio en países de altos ingresos, la enfermedad parece aumentar con la edad. (Nickerson *et al.*, 2009^{a,b} ; Allegranzi *et al.*, 2011)

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* *meticilino resistente* adquirido en la comunidad (SAMR-AC) constituyen un problema emergente debido a su elevada virulencia y gran capacidad de diseminación (Herold *et al.*, 1998; Gorak *et al.*, 1999; Vandenesch *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2005). En análisis de SAMR-AC provenientes de infecciones de piel y estructuras relacionadas (IPER) (Shukla, 2005), se encontraron que alrededor de un 7 % de los casos presentaba enfermedad invasiva (Klebens *et al.*, 2007), tales como piomiositis (Shedek *et al.*, 2007), osteomielitis (Seybold *et al.*, 2007) y artritis séptica (Ma XX *et al.*, 2005) como así también cuadros más severos como neumonía necrotizante y bacteriemia, asociados con elevada mortalidad. (Zetola *et al.*, 2005; von Specht *et al.*, 2006; de Vedia *et al.*, 2012)

En un estudio multicéntrico realizado en Argentina (López Furst *et al.*, 2013) se observó que en el 70 % de los casos el agente causal fue SAMR-AC, en donde el 88.9 % del total era metilino resistente causados por *S. aureus*. Como consecuencia de ello, la Sociedad Argentina de infectología (SADI) publicó un alerta (López Furst, 2011) en el que se indicaba que, en aquellos pacientes adultos que presentaran lesiones de piel, particularmente forúnculos, abscesos y celulitis, sin evidencia de compromiso sistémico y que requirieran tratamiento antibiótico oral, los fármacos de elección son trimetroprima-sulfametoxazol (TMP/SMX) 160/800 1 ó 2 tabletas cada 12 h, minociclina ó doxiciclina 100 mg cada 12 h y clindamicina 300 a 600 mg cada 8 h.

En el caso de las infecciones invasivas, en pacientes con evidencia de compromiso del estado general (fiebre, hipotensión, leucocitosis) que requieran tratamiento endovenoso, las sugerencias incluyen como medicamento de elección vancomicina, la cual continúa siendo la recomendación estándar en este tipo de pacientes. (Liu *et al.*, 2011)

Además se ha demostrado que entre el 1 al 3% de pacientes sometidos a trasplante de prótesis, sufren la presencia de *S. aureus* en las denominadas Infecciones articulares periprotésicas. (Lourtet-Hascoët *et al.*, 2016)

Por ende, la aparición de cepas de *S. aureus* que son altamente resistentes a los antimicrobianos se ha convertido en una preocupación de salud pública importante (Giersing *et al.*, 2016). En la actualidad, se está trabajando en la posibilidad de vacunación contra la infección por *Staphylococcus aureus* especialmente para

trabajadores de la salud, para los adultos comprendidos en un rango de 65 años o superior y para los inmuno comprometidos, así como para los pacientes con infección estafilocócica invasiva recurrente. (Giersing *et al.*, 2016)

5.4. Bacilos Gram positivos formadores de Endosporas: *Bacillus subtilis*.

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, capaz de fermentar y/o realizar respiración anaeróbica. El género *Bacillus* se encuentra tanto en suelos como en ambientes acuáticos. *B. subtilis* tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, siendo resistente al calor lo cual permite ser utilizada como control de la esterilización. (Ingraham *et al.*, 2004; Reineke *et al.*, 2013)

Estas endosporas ofrecen propiedades de resistencia únicas y pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo bajo una serie de condiciones de estrés, tales como alta temperatura, desecación, ausencia de nutrientes y exposición a disolventes químicos. Estas características facilitan el almacenamiento y el transporte de estas endosporas. (Nicholson *et al.*, 2000)

Bacillus subtilis no es considerado patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia. (<http://bacillus8.blogspot.com.ar/2010/04/bacillus-subtilis-clasificacion.html>)

Al ser *B. subtilis* una especie bacteriana grampositiva, no patógena y formadora de endosporas, se la ha utilizado como herramienta para diferentes aplicaciones biotecnológicas, como formulaciones probióticas para seres humanos y animales y vehículos en vacunas para la administración de antígenos en mucosas. (Cutting, 2011; Tavares *et al.*, 2010; Amuquni *et al.*, 2012)

Las esporas de *Bacillus subtilis* se emplearían como adyuvantes de la vacuna. Los adyuvantes son compuestos que mejoran la potencia, calidad o longevidad de respuestas inmunes específicas. El propósito de agregar un adyuvante a una formulación de vacuna es aumentar la inmunogenicidad de los antígenos coadministrados y reducir el número de dosis necesaria para la inmunidad protectora (Damásio de Souza *et al.*, 2014). Estudios previos han demostrado que las esporas de

Bacillus subtilis muestran un efecto adyuvante significativo. (Huang *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2012)

5.5. Bacilos gramnegativos no fermentadores: *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, oportunista, cuyo depósito natural y permanente es el medio hidrófilo; crece en diversos ambientes, incluyendo suelo, agua y numerosos sitios de infección humana (Rolsma *et al.*, 2015). Esta bacteria es un bacilo muy versátil, es oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C. (Ferreira *et al.*, 2010)

P. aeruginosa es un patógeno que ocasiona una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales (Berthelot *et al.*, 2005), responsables del 10% de todas las infecciones y de hasta el 15% en unidades de cuidados intensivos (Bertrand *et al.*, 2011). En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. (Ferreira *et al.*, 2010; Kerr *et al.*, 2009)

Las infecciones por *P. aeruginosa* son raras en sujetos normales, exceptuando las pequeñas infecciones tales como la otitis externa crónica. Sin embargo, suelen producirse en aquellas personas cuyas defensas están comprometidas, incluyendo la deficiencia inmunológica natural, la inmadurez inmunológica, las quemaduras extensas, las neumopatías crónicas (como por ejemplo, la fibrosis quística (FQ) o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)), el uso de narcóticos por vía intravenosa o cirugía. (Davis *et al.*, 1985; Rolsma *et al.*, 2015)

Como *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos intra-hospitalarios globalmente dominantes; ocasiona una amplia gama de infecciones, algunas tan severas como neumonía o bacteriemia (bacterias en la sangre), cuadro que se complica aún más debido a su resistencia intrínseca a diversos antibióticos y a su notable capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, asociándola a elevados índices de mortalidad y convirtiéndola en un serio problema de salud pública. (Ferreira *et al.*, 2010; Kerr *et al.*, 2009)

La tasa de mortalidad es alta y varía entre 17 y 50%. (Micek *et al.*, 2005; Schechner *et al.*, 2011)

En algunos hospitales, *P. aeruginosa* puede ser el primer agente infeccioso, principalmente en las infecciones respiratorias y urinarias (Kerr *et al.*, 2009). Es un patógeno importante de la neumonía complicada en unidades de cuidados intensivos (UCI) y fue significativamente más frecuente en la neumonía tardía. (Venier *et al.*, 2011)

Se han descrito infecciones por este microorganismo en pacientes quemados (Mahar *et al.*, 2010), con infección de tracto urinario (Al-Hasan *et al.*, 2008), con cáncer (Cheguirián *et al.*, 2008), y neonatos. (Hoyos *et al.*, 2010)

El ectima gangrenoso es una manifestación dermatológica característica de una infección severa causada casi siempre por *Pseudomonas aeruginosa*, con o sin bacteriemia. Las infecciones severas por *P. aeruginosa* se presentan habitualmente en pacientes con inmunodepresión u hospitalizados, en los pacientes sanos existe el antecedente de foliculitis y forunculosis. (Díaz de la Noval *et al.*, 2016)

P. aeruginosa es intrínsecamente resistente a diversas clases de antibióticos que no guardan relación estructural entre sí (Strateva *et al.*, 2009), debido a la disminución de la permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión y a la producción de enzimas que inactivan a los antibióticos (Mesaros *et al.*, 2007). Además, posee la capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia vía mutaciones. (Livermore, 2002)

La resistencia a múltiples fármacos en *P. aeruginosa* es una preocupación debido a las limitadas opciones terapéuticas disponibles para tratar las infecciones debidas a este organismo (Mastera *et al.*, 2011). Se asocia con un aumento de la mortalidad y los costos debido a la hospitalización prolongada, la necesidad de cirugía y el tratamiento prolongado con antibióticos (Aloush *et al.*, 2006). Las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente (PAMR) se han asociado con infecciones persistentes y alta mortalidad en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). (Ribeiro Gomes *et al.*, 2012)

Como los regímenes antibióticos estándar contra *P. aeruginosa* son cada vez más ineficaces debido al aumento de la resistencia a los fármacos, se están realizando estudios los cuales se encuentran en las etapas preclínicas empleando fagos, probióticos, péptidos antimicrobianos, antígenos vacunales, nanopartículas antimicrobianas que tienen el potencial de actuar contra las cepas resistentes a los fármacos para convertirse en una terapéutica valiosa. (Chatterjee *et al.*, 2016)

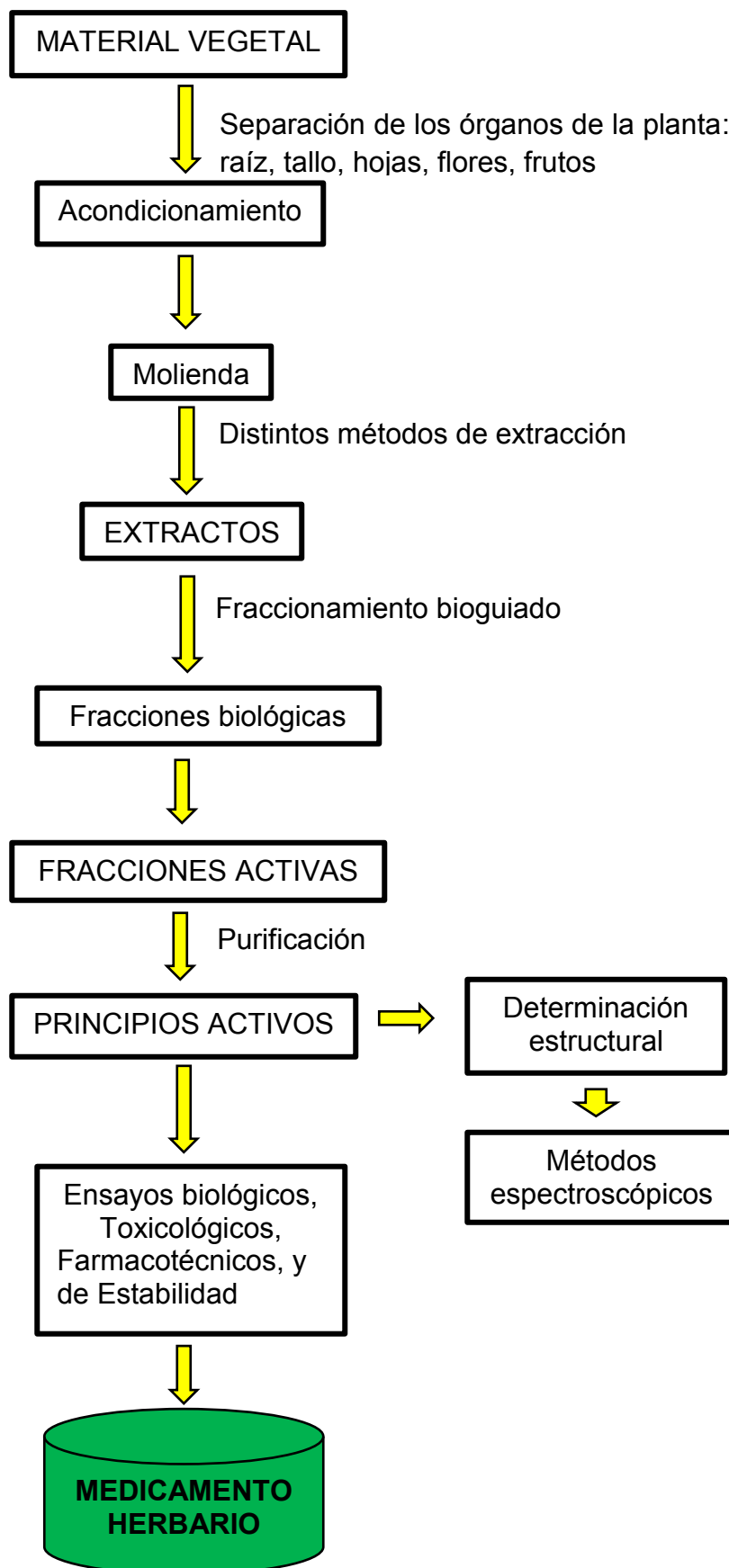
6. *Obtención de Medicamentos Herbarios*

Para la obtención de Medicamentos a base de plantas, intervienen distintas disciplinas como la Botánica, Farmacognosia, Química Orgánica de Productos Naturales, Farmacología, Toxicología, Farmacotecnia, etc.

La complejidad en la composición química de los extractos de plantas con la actividad biológica, es un gran desafío en búsqueda del aislamiento del/los principio/s activo/s puros para transformarlo/s posteriormente, a través de distintas formas farmacéuticas, en un medicamento herbario o fitoterápico donde se cumplan los requisitos de seguridad, calidad y eficacia.

Los productos de origen natural puros se definen por su estructura química y son identificados por el análisis químico. La presencia o ausencia de sustancias farmacológicamente activas pueden variar bastante dentro de las especies, puesto que la composición química cambia de acuerdo con el lugar donde fue realizada la recolección, las condiciones climáticas y del suelo, la época del año, así como las diferentes técnicas de cultivo. (Sharapin *et al.*, 2000)

Los pasos a seguir para la obtención de un Medicamento Herbario se esquematizan de la siguiente manera:



7. *Objetivos del Trabajo*

El objetivo del presente trabajo es contribuir al conocimiento de *Eugenia uniflora* L. en particular y a las plantas medicinales en general, enfocados en descubrir sus componentes activos y determinar su actividad biológica. Mucho ha aportado la etnofarmacología respecto a las propiedades terapéuticas de las plantas, las cuales a través de investigaciones clínicas han confirmado efectos farmacológicos de culturas milenarias. En base a las premisas precedentes, los objetivos propuestos para el presente trabajo fueron los siguientes:

1. Caracterización botánica del vegetal.
2. Acondicionamiento, Secado y Molienda del material vegetal.
3. Elección del método adecuado de extracción y fraccionamiento.
4. Seguimiento bioquímico de las distintas fracciones obtenidas en la fracción no polar de *Eugenia uniflora* L.
5. Aislamiento, purificación y caracterización fisicoquímica de los compuestos activos.
6. Realización de los ensayos biológicos determinando su correspondiente actividad farmacológica.
7. Evaluación y discusión de los resultados obtenidos, con la finalidad de acercar esta especie con sus actividades biológicas a la Industria Farmacéutica, para que sea fuente de nuevos medicamentos.

8. *Materiales y Métodos*

8.1. Material vegetal: Procedencia.

Las hojas de *Eugenia uniflora* L. fueron empleadas como material de estudio para el presente trabajo. Fueron recolectadas en el mes de noviembre de 1999 en horas de la mañana, en bosques secundarios de Santa Ana Departamento de Candelaria, Provincia de Misiones, Argentina.

8.1.1. Determinación Taxonómica.

La determinación taxonómica fue realizada por el Profesor Doctor Aníbal G. Amat de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. El código de la especie es N° A. G. Amat 2581 del herbario del Departamento de Farmacia correspondiente a la Facultad citada precedentemente.

8.1.2. Recolección, secado y acondicionamiento del material vegetal.

El material vegetal (*Eugenia uniflora* L.) fue recolectado por el Profesor Doctor Aníbal G. Amat de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. La especie vegetal fue secada a la sombra, a temperatura ambiente, por un período de cuatro semanas hasta peso constante. Se separaron las hojas, que fueron trituradas mecánicamente con reducción a un polvo fino empleando un molinillo Glen Creston (Stanmore England). El polvo fue secado en tambor de vacío hasta peso constante.

Agradecimiento: al Dr. Aníbal G. Amat († 11/02/2013) por su generosa contribución en facilitarnos el material sobre el cual se pudo realizar el presente trabajo.

8.2. Extracción del material vegetal.

8.2.1. Obtención del extracto Metanólico y Hexánico.

El polvo de las hojas de *Eugenia uniflora* L. (250 g) fue sometido a extracciones con hexano mediante un proceso de maceración, a temperatura ambiente, durante siete días utilizando shaker como agitador mecánico, hasta agotar el material. A continuación fue filtrado con papel de filtro por gravedad separando de esta manera el residuo sólido del sobrenadante (extracto hexánico).

El criterio seguido en la extracción para considerar al material vegetal agotado fue establecer que el peso seco, a peso constante de 10 ml de la extracción filtrada y evaporada, debe ser menor o igual a 1 mg. Si el peso es mayor, se continúa agregando solvente nuevo sobre el marco de la extracción. En este caso fue necesario realizar dos extracciones de un volumen de 1000 ml y dos de 500 ml, respectivamente para poder determinar el peso constante. Con la obtención del extracto metanólico se procedió de la misma manera.

Posteriormente los extractos hexánico y metanólico fueron reunidos separadamente, evaporados a presión reducida, en evaporador rotatorio a una temperatura de 30°C, y secados en tambor de vacío hasta peso constante. Los pesos establecidos fueron de 8.31 g para el Extracto hexánico y 11.52 g para el metanólico.

Aclaración: el extracto metanólico fue estudiado por la Mgter. Farm. María Elena del Valle en su tesis de Maestría en Plantas Medicinales.

8.2.2. Estudio del Extracto Hexánico.

Los estudios químicos y biológicos, para el presente trabajo, fueron realizados a la extracción hexánica de las hojas de *Eugenia uniflora* L.

8.3. Estudio Fitoquímico.

Los estudios experimentales para el análisis fitoquímico fueron desarrollados en el actual LIDEB (Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos), en la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), durante los períodos agosto/2000 a noviembre/2002, mayo/2007, mayo/2009 a diciembre/2009 y noviembre/2012.

Todos los solventes utilizados en el presente trabajo fueron de calidad analítica, y en el caso que fue necesario se procedió a su purificación, según técnicas descriptas en la literatura, y se le realizaron los controles correspondientes para verificar que cumpliera con dicha calidad.

8.3.1. Métodos cromatográficos utilizados.

8.3.1.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF) – Cromatografía en Capa Delgada (CCD) - Thin Layer Chromatography (TLC).

A) Fase estacionaria: cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ Merk 0.25 mm de espesor.

Fase móvil: diclorometano; éter de petróleo; éter de petróleo: diclorometano (1:1), (4:1), (6:4); diclorometano: metanol (2:1), (4:1), (10:1), (15:1), (20:1), (30:1), (95:5); tolueno: acetato de etilo (8:2); metanol.

Revelado: Luz UV 254 nm y luz UV 366 nm; vapores de Yodo; ácido sulfomolibdico; *p*-anisaldehído sulfúrico.

B) Fase estacionaria: cromatofolios de sílica gel silanizada Merk 0.25 mm de espesor.

Fase móvil: diclorometano: metanol (2:1), (4:1); acetona; etanol.

Revelado: Luz UV 254 nm, luz UV 366 nm; FeCl₃ al 3% etanólico; difenilbórico y posterior observación a luz UV de 366 nm.

C) Fase estacionaria: cromatofolios de celulosa Merk 0.25 mm de espesor.

Fase móvil: acetona; etanol; n-butanol: acetona: ácido acético: agua (35:35:20:10).

Revelado: Luz UV 254 nm, luz UV 366 nm; difenilbórico y posterior observación a la luz UV de 366 nm; ninhidrina.

8.3.1.2. Cromatografía en Papel (CP).

Fase estacionaria: Papel Watman N° 1

Fase móvil: ácido acético al 5%.

Revelado: Luz UV 254 nm, luz UV 366 nm; Solución de cloruro férrico 2%.

8.3.1.3. Cromatografía en Columna (CC)

Cromatography “CombiFlash TM Sm 50 System”

Fase estacionaria: Silica gel 60 F₂₅₄ Merk 0.63 – 0.200 mm.

Fase móvil: éter de petróleo; éter de petróleo: diclorometano (en diferentes proporciones); diclorometano; acetona.

Cromatografía en Columna (CC) tradicional

Fase estacionaria: Silica gel 60 F₂₅₄ Merk 0.63 – 0.200 mm.

Fase móvil: diclorometano; diclorometano: metanol (en diferentes proporciones); metanol; metanol: agua destilada al 30%.

8.3.1.4. Cromatografía en Placa Preparativa (PLC).

Fase estacionaria: Silica gel 60 F₂₅₄ Merk 2 mm de espesor.

Fase móvil: diclorometano: metanol (20:1)

Revelado: Luz UV 254 nm y 366 nm.

8.3.1.5. Cromatografía Bidimensional (CB).

Fase estacionaria: cromatofolios de sílica gel silanizada Merk 0.25 mm de espesor.

Fase móvil: Móvil₁ = diclorometano y Fase Móvil₂ = diclorometano: metanol (4:1)

Revelado: Luz UV 254 nm y 366 nm; ácido sulfomolibdico.

8.3.1.6. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).

Columna: PHENOMENEX C18 100 x 4.6 mm de 5 μ m de tamaño de partícula.

Solvente: acetonitrilo al 100%

Volumen de inyección: 8 μ l

Se trabajó a temperatura ambiente con una presión de 1100 psi. con un caudal de 1ml/min.

Tiempo de corrida: 32 min.

Detector: Masa APCI (Ionización Química por Presión Atmosférica), modo positivo.

8.3.1.7. Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HPLC-HRMS).

Columna: C18 BEH 130 Å, 2.1 mm X 50 mm de 1.7 μ m de tamaño de partícula.

Solvente: acetona

Volumen de inyección: 10 μ l

Se trabajó a una temperatura de 35 °C, a flujo constante en un valor de 1.8 μ l/min.

Tiempo de corrida: 38 min.

Detector: Masa de Impacto Electrónico (IE).

8.3.2. Caracterización Fitoquímica

Para la caracterización química de los diferentes grupos funcionales, se emplearon reacciones de coloración características y que se detallan a continuación. Para ello se prepararon soluciones límpidas del EHC cuya concentración utilizada es de 10mg - 0.1ml MeOH.

La preparación de los reactivos de coloración fueron preparados según “Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel” E. MERK AG. DARMSTADT (1998).

8.3.2.1. Reacción con Ácido Sulfomolibdico (para compuestos reductores).

Solución recién preparada de 5 g de ácido sulfomolibdico en 100 ml de alcohol etílico 96°. Pulverizar y calentar 5 minutos a 80 - 90°C.

8.3.2.2. Reacción con el reactivo de Dragendorff (para alcaloides y Compuestos nitrogenados heterocíclicos; según Munier y Macheboeuf).

Solución A: se disuelven 0.85 g de nitrato básico de bismuto (III) en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua.

Solución B: se disuelven 8 g de yoduro potásico en 20 ml de agua.

Solución pulverizable: se mezclan 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B y se añaden 20 ml de ácido acético glacial. La solución se completa con agua hasta 100 ml. Se revela el cromatograma por aspersion.

Con una varilla de vidrio colocar una gota de la muestra sobre un portaobjeto y posteriormente una gota del reactivo sobre la misma.

8.3.2.3. Reacción con Difenilbórico (Reactivo para flavonoides y polifenoles en general).

Disolver 1 g del éster del ácido 2 - amino etil difenil bórico (AEDBE) en 100 ml de metanol, pulverizar y observar al visible y a la luz UV 366 nm. Forma compuestos 4'-hidroxilados color amarillo-verdoso y anaranjados con los 3', 4'- dihidroxilados. (Markham, 1982)

8.3.2.4. Reacción de Liebermann Burchard (Reactivo para Triterpenos/Esteroides).

Colocar 1 ml del extracto, evaporar y agregar 0.8 ml de anhídrido acético y 0.1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Observar la coloración al minuto y a los treinta minutos de agregado el reactivo. Una coloración azul - verdosa, indica que estamos en presencia de esteroides; rojo, rosado o violeta, triterpenos y amarillo pálido, esteroides o triterpenos saturados.

8.3.2.5. Reacción con Ninhidrina (Reactivo para aminoácidos y aminas biógenas).

Disolver 30 mg de ninhidrina en 10 ml de n-butanol y 0.3 ml de Ácido acético 98%.

Después de pulverizar la placa, se calienta 5 - 10 minutos bajo observación y evaluación en el visible. (Wagner 1996)

8.3.2.6. Reacción con Cloruro de Hierro (III) (Reactivo para ácidos hidroxámicos y fenoles).

Solución pulverizable: Solución acuosa al 1% de Cloruro de hierro (III).

Una coloración roja, violácea, azul o verde indica un resultado positivo. Dicho color no es permanente, por lo que debe observarse en el momento en que se añaden las gotas de FeCl_3 .

8.3.2.7. Yodo (Reactivo universal).

El cromatograma se coloca en un recipiente cerrado, en cuyo fondo se encuentran algunos granos pequeños de yodo sublimado que han saturado la atmósfera del recipiente que los contienen. Transcurridos 15 minutos o más, se observan las manchas de los productos de tonalidades amarillo y/o marrón.

8.3.2.8. p-anisaldehído sulfúrico (Reactivo para terpenoides, propilpropanoides y saponinas).

Se mezclan 0.5 ml de anisaldehído con 10 ml de ácido acético glacial, se continúa agregándole 85 ml de metanol y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. La placa es pulverizada con 10 ml de la solución, se calienta a 100°C durante 5 - 10 minutos y luego se evalúa en visible o luz UV 366 nm.

Se observan las manchas en tonalidades rojo-violeta. (Wagner, 1996)

Al EHC le fueron realizadas las siguientes reacciones de caracterización química:

Extracto	Test químicos	
	<i>Dragendorff</i>	<i>Liebermann Burchard</i>
EHC		
Resultados	-	+ (amarillo verdoso)

Tabla. Caracterización Fitoquímica del EHC

8.3.3. Fraccionamiento del Extracto Hexánico.

Mediante cromatografía en capa delgada realizada con cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄ y reveladores físicos y químicos, se determinó la fase móvil más apropiada para llevar a cabo el fraccionamiento en columna; para ello se utilizaron diferentes sistemas de solventes como éter de petróleo, éter de petróleo: diclorometano en polaridad creciente comenzando con (1:1), (4:1), (6:4) y diclorometano: metanol también en polaridad creciente iniciando con (2:1), (4:1), (10:1), (15:1), (20:1) y metanol.

El extracto hexánico se concentró en rotavapor, pero no a sequedad, se lleva a freezer en donde se observa la formación de 2 fases. Se filtra con embudo Büchner, obteniendo un residuo en papel de filtro de 0.23 g el cual fue descartado, porque todos los intentos para solubilizar el producto resultaron infructuosos, y las pruebas en CCD, con polaridad creciente de los solventes, solo dieron punto de siembra. La fase líquida, fase del extracto hexánico, se evaporó a presión reducida en evaporador rotatorio a 30°C, y secó en tambor de vacío hasta peso constante obteniéndose 8.31 g Extracto Hexánico Concentrado (EHC) de *Eugenia uniflora* L.

8.3.4. Evaluaciones Cromatográficas en diferentes Fases estacionarias.

El EHC se solubilizó con 15 ml de diclorometano, sonificado en baño de ultrasonido y estudiado el comportamiento químico a través de diferentes sistemas cromatográficos con la finalidad de lograr separar los diferentes compuestos. La siembra fue realizada en forma puntual empleando micropipetas Accu-fill 90 (10 µl).

Siembra = H: EHC de *Eugenia uniflora* se solubiliza en diclorometano (1 mg/0.1 ml), solución límpida.

1 - *Fase estacionaria* = Sílica gel 60 F₂₅₄ Merk 0.25 mm de espesor.

Fase Móvil₁ = metanol, Fase Móvil₂ = acetato de etilo, Fase Móvil₃ = diclorometano, Fase Móvil₄ = acetona, Fase Móvil₅ = benceno, Fase móvil₆ = éter de petróleo, Fase móvil₇ = éter de petróleo: diclorometano (1:1), Fase Móvil₈ = éter de petróleo: diclorometano (4:1), Fase Móvil₉ = éter de petróleo: diclorometano (6:4), Fase Móvil₁₀ = diclorometano: metanol (4:1), Fase Móvil₁₁ = diclorometano: metanol (10:1), Fase Móvil₁₂ = diclorometano: metanol (15:1), Fase Móvil₁₃ = diclorometano: metanol (20:1).

Revelador = luz UV a 254 y 366 nm; ácido Sulfomolibdico.

2 - *Fase Estacionaria*: Sílica gel silanizada Merk 0.25 mm de espesor.

Fase Móvil₁ = diclorometano: metanol (2:1), Fase Móvil₂ = diclorometano: metanol (4:1).

Revelador = luz UV a 254 y 366 nm; FeCl₃ al 3% etanólico.

3 - *Cromatografía descendente en Papel*.

Siembra = H: extracto hexánico de *Eugenia uniflora* seco se solubilizó en metanol:

agua destilada (1:1), 1 mg/0.1 ml; M: extracto metanólico de *Eugenia uniflora* seco se solubilizó en metanol, 1 mg/0.1 ml.

Sustancia de referencia: G = Ácido Gálico, 1 mg/ml de metanol.

Fase estacionaria = Papel Watman N° 1

Fase móvil = Ácido acético al 5%.

Revelador = Luz UV 254 nm, luz UV 366 nm; Solución de Cloruro férrico 3% en etanol.

8.3.5. Cromatografía Preparativa en Columna con sílica gel.

Del análisis de las diferentes fases estacionarias y fases móviles, se resolvió usar como fase estacionaria, para purificar el EHC, sílica gel, y fases móviles solventes o mezclas de solventes con polaridad creciente.

Cromatografía en Columna con sílica gel.

Técnica = cromatografía en columna usando cromatógrafo “CombiFlash TM Sm 50 System” con detector UV de fracciones.

Presión = 2 atm Flujo 4 izquierda.

Preparación de la siembra sólida: a 7.35 g del EHC, se solubilizan en Metanol, se sonica hasta solución límpida, y se le adicionan 13.00 g aproximadamente de sílica gel. Se lleva a secar en rotavapor y a peso constante en tambor de vacío.

Fase estacionaria = 250 g sílica gel 60 (0.63 - 0.200 mm), marca Merck.

Fase móvil = éter de petróleo; éter de petróleo: diclorometano (6:1), (6:2), (6:3), (3:3); diclorometano y acetona.

Se colectaron 150 fracciones de 10 ml cada una. Las fracciones fueron examinadas por CCD con el objeto de reunir aquellas que presentan el mismo perfil cromatográfico. El sistema cromatográfico empleado fue: Fase Estacionaria = Sílica gel 60 F₂₅₄ Merk 0.25 mm de espesor, Fase móvil = éter de petróleo: diclorometano (4:1), Revelado = luz UV 254 y 366 nm; y ácido Sulfomolibdico.

Se reunieron veintidós fracciones que presentaron un comportamiento cromatográfico semejante, las cuales se detallan a continuación:

Fr₁₋₁ = Fracción 1 a 3

Fr₁₋₂ = Fracción 4 a 7

Fr₁₋₃ = Fracción 8 a 10

Fr₁₋₄ = Fracción 11 a 15

Fr₁₋₅ = Fracción 16 a 20

Fr₁₋₆ = Fracción 23 a 26

Fr₁₋₇ = Fracción 27 a 30

Fr₁₋₈ = Fracción 37 a 40

Fr₁₋₉ = Fracción 43 a 48

Fr₁₋₁₀ = Fracción 52 a 62

Fr₁₋₁₁ = Fracción 66 a 75

Fr₁₋₁₂ = Fracción 80 a 85

Fr₁₋₁₃ = Fracción 86 a 96

Fr₁₋₁₄ = Fracción 97 a 101

Fr₁₋₁₅ = Fracción 102 a 104

Fr₁₋₁₆ = Fracción 108 a 119

Fr₁₋₁₇ = Fracción 120 a 122

Fr₁₋₁₈ = Fracción 124 a 129

Fr₁₋₁₉ = Fracción 132 a 136

Fr₁₋₂₀ = Fracción 137 a 139

Fr₁₋₂₁ = Fracción 142 a 146

Fr₁₋₂₂ = Fracción 147 a 150

De las fracciones obtenidas, se tomó como criterio continuar trabajando con aquellas que presentaban actividad antimicrobiana (seguimiento bioguiado) como así también las de mayor masa, con el objeto de que se pudieran aislar e identificar los compuestos responsables de la actividad biológica. Dichas fracciones son: Fr₁₋₉, Fr₁₋₁₄, Fr₁₋₁₅, Fr₁₋₁₆, Fr₁₋₂₀ y Fr₁₋₂₂. Todas estas fracciones demostraron actividad antimicrobiana en el ensayo biológico.

8.3.5.1. Estudio de la fracción Fr₁₋₂₂

La Fr₁₋₂₂, según los resultados obtenidos en los ensayos biológicos demostró poseer actividad biológica, por lo cual se continuó con el procedimiento de purificación tal como se detalla a continuación.

La fracción Fr₁₋₂₂ fue concentrada en evaporador rotatorio a 30°C y secada a peso constante en tambor de vacío (6.00 g). Parte del extracto seco (4.84 g) fue retomado con un volumen de 5 ml de metanol, observando una solubilidad parcial del mismo. El precipitado formado se separó por centrifugación, 5 minutos a 2000 rpm a temperatura

ambiente y se extrajo la fase líquida con pipeta Pasteur. El sólido resultante (3.75 g) denominado **S** se guardó en frasco color caramelo y se llevó a freezer.

8.3.5.1.1. Análisis del sólido S

Se estudió el comportamiento químico del sólido, empleando diferentes sistemas cromatográficos:

Siembra = S solubilizado en metanol - 1 mg/0.1 ml

1 - Fase estacionaria = cromatofolios de sílica gel 60 F₂₅₄

Fase Móvil₁ = diclorometano: metanol (2:3), Fase Móvil₂ = diclorometano: metanol (5:0.5),

Fase Móvil₃ = diclorometano: metanol (0.5:5), Fase Móvil₄ = diclorometano: metanol (1:1),

Fase Móvil₅ = metanol, Fase Móvil₆ = etanol.

Revelado = luz UV 254 y 366 nm; ácido Sulfomolibdico.

2 - Fase estacionaria = cromatofolios de celulosa.

Fase Móvil₁ = metanol, Fase Móvil₂ = metanol: agua destilada (1:1), Fase Móvil₃ = diclorometano: metanol (3:1).

Revelado = luz UV 254 y 366 nm; y solución de Cloruro férrico al 5%.

3 - Fase Estacionaria: Sílica gel silanizada Merk 0.25 mm de espesor.

Fase Móvil₁ = acetona, Fase Móvil₂ = etanol.

Revelado = luz UV 254 y 366 nm; Difenilbórico.

Purificación del sólido S

Se realizaron diversos ensayos de cristalización, con solventes de polaridad creciente, para tratar de purificarlo, con resultado negativo.

Posteriormente a S se le realizaron extracciones de solventes de polaridad creciente obteniéndose cuatro extractos: el sólido S lavado con hexano ocho veces con 2.5 ml cada vez, centrifugando antes de cada separación de las fases. Para aumentar la eficacia de la extracción, al sólido S le fue incorporado diclorometano realizando tres centrifugaciones con un volumen de 2.5 ml cada una, seguido de acetato de etilo - tres extracciones de 2.5 ml cada una - y por último ese precipitado fue lavado ocho veces con metanol. Se

obtuvieron los siguientes extractos: EHC_T, EDCM_T, EAC_T y EMC_T. Las extracciones fueron realizadas hasta peso constante.

Los distintos extractos fueron concentrados en evaporador rotatorio hasta sequedad, llevados a peso constante y determinado su peso.

En la siguiente tabla se resumen los extractos obtenidos:

Extractos	Masa obtenida (mg)
EHC _T	1.7
EDCM _T	81.5
EAC _T	34.9
EMC _T	1051.0

Tabla de los diferentes Extractos con su respectiva masa

A los extractos EDCM_T y EAC_T se realizaron reacciones de caracterización del núcleo terpénico con la Reacción de Liebermann Burchard:

Extractos analizados	Resultados
EDCM _T	+ (rojo)
EAC _T	+ (rojo)

8.3.5.1.2. CCD del Extracto EDCM_T

Se realizó una Cromatografía en Capa Delgada contra Testigo; para ello fue empleado el siguiente sistema cromatográfico:

Siembra: extracto de diclorometano seco solubilizado en diclorometano, 1 mg/0.1 ml

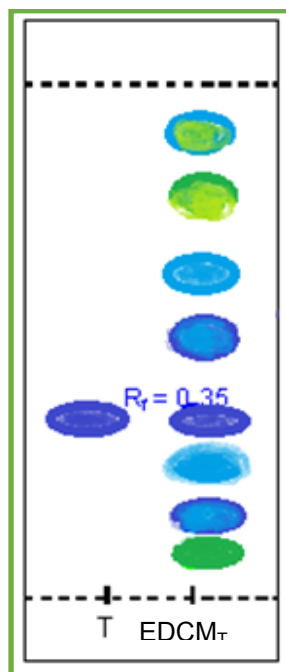
Fase estacionaria = Sílica gel 60 F₂₅₄ Merck 0.25mm

Fase Móvil₁ = tolueno: acetato de etilo (8:2), Fase Móvil₂ = diclorometano: metanol (95:5).

Testigo = solución diclorometánica 1% de ácido ursólico.

El revelado se efectuó con LUZ UV a 254 y 366 nm y con *p*-anisaldehído sulfúrico con posterior calentamiento en estufa a 110°C durante 1 minuto.

Cuando se observa el cromatograma (*) revelado con *p*-anisaldehído sulfúrico, se aprecia que el perfil cromatográfico del EDCM_T y del Testigo son similares. En el cromatograma del EDCM_T se observa un mayor número de compuestos en el tercio superior de la placa en la zona de $R_f = 0.5 - 0.9$ y menor cantidad de compuestos en el tercio inferior de la CCD, según se muestra en la figura a continuación coincidiendo en este sector el R_f de la muestra con el ácido ursólico ($R_f = 0.35$).



**Cromatograma (CCD) de los perfiles cromatográficos de EDCM_T de *Eugenia uniflora* L. contra el Testigo (T) = ácido ursólico. Fase Móvil: diclorometano: metanol (95:5).*

8.3.5.1.3. Cromatografía Bidimensional (CB) del Extracto EDCM_T

Se realizó una cromatografía bidimensional con el EDCM_T empleando el siguiente sistema cromatográfico: Fase estacionaria = Sílica gel 60 F₂₅₄; Fase Móvil₁ = diclorometano y Fase Móvil₂ = diclorometano: metanol (4:1); Revelado = LUZ UV 254 y 366 nm; ácido Sulfomolibdico. Siembra: 3λ del EDCM_T solubilizado en diclorometano.

8.3.5.1.4. Cromatografía en Placa Preparativa (PLC) del Extracto EDCM_T

Parte del EDCM_T se sembró en PLC utilizando el siguiente sistema cromatográfico: Fase estacionaria = sílica gel 60 F₂₅₄; Fase Móvil = diclorometano: metanol (20:1) (x 3); Siembra = 44 mg del EDCM_T solubilizado en diclorometano. Revelado = LUZ UV 254 y 366 nm.

Se obtuvieron cinco fracciones denominadas Fr_{D1}, Fr_{D2}, Fr_{D3}, Fr_{D4} y Fr_{D5} las cuales fueron marcadas, separadas y extraídas con diclorometano como solvente de extracción. El procedimiento empleado se detalla a continuación:

Todas las fracciones fueron sometidas a tres extracciones empleando como solvente de extracción diclorometano, centrifugando antes de cada separación de las fases. Se concentró en rotavapor y se secó en tambor de vacío hasta peso constante.

Fracciones	Masa (mg)
Fr _{D1}	1,6
Fr _{D2}	1,8
Fr _{D3}	2,5
Fr _{d4}	1,0
Fr _{D5}	1,0

CCD de las Fracciones Fr_{D1} – Fr_{D5}

Se realizó una Cromatografía en Capa Delgada, contra Testigo: ácido ursólico, de las cinco fracciones utilizando como sistema cromatográfico: Fase Estacionaria = Sílica gel 60 F₂₅₄; Fase Móvil = diclorometano: metanol (95:5); Revelado = LUZ UV a 254 y 366 nm y Reactivo revelador = *p*-anisaldehído sulfúrico.

Del análisis del revelado con la solución de *p*-anisaldehído sulfúrico, se observa que la **Fr_{D3}** presenta una mancha de igual R_f e idéntico color que la del testigo.

8.3.5.2. Análisis de la fracción Fr₁₋₂₀

CCD de la fracción Fr₁₋₂₀

La Fr₁₋₂₀ fue estudiada en diferentes sistemas cromatográficos:

Siembra = 5 µl de la Fr₁₋₂₀ solubilizada en diclorometano (0.1 mg/ml).

Fase estacionaria = Sílica gel 60 F₂₅₄

Fase Móvil₁ = diclorometano: metanol (6:1), Fase Móvil₂ = diclorometano: metanol (20:1),

Fase Móvil₃ = diclorometano: metanol (30:1), Fase Móvil₄ = diclorometano: metanol (50:1),

Fase Móvil₅ = diclorometano: metanol (85:1), Fase Móvil₆ = Diclorometano: metanol (95:1).

Revelador = LUZ UV 254 y 366 nm; ácido Sulfomolibdico.

Se continuó con el procedimiento de purificación de la fracción Fr₁₋₂₀ a través de Cromatografía en Columna con sílica gel:

Columna = longitud 30 cm y 3 cm de diámetro.

Preparación de la siembra sólida: 1.56 g de la Fr₁₋₂₀ se solubilizan en metanol, posteriormente se sonica hasta solución límpida, y se le adicionan 6.00 g aproximadamente de sílica gel. Se lleva a secar en evaporador rotatorio y en tambor de vacío a peso constante.

Fase estacionaria = 40.00 g de sílica gel 60 (0.63 - 0.200 mm), marca Merck.

Fase móvil = diclorometano; diclorometano: metanol (98:2), (96:4), (90:10), (85:15), (70:30), (60:40); metanol y metanol: agua destilada al 30%.

Se colectaron 167 fracciones de 5 ml cada una. Las fracciones fueron examinadas por CCD con el objeto de reunir aquellas que presentan el mismo perfil cromatográfico.

El sistema cromatográfico empleado fue: Fase Estacionaria = Sílica gel 60 F₂₅₄ marca Merck de 0.25 mm de espesor, Fase móvil = diclorometano: metanol (95:1). Revelador = luz UV a 254 y 366 nm; ácido Sulfomolibdico.

Se reunieron diez fracciones que presentaron un perfil cromatográfico semejante, las cuales se detallan a continuación: Fr₂₋₁; Fr₂₋₂; Fr₂₋₃; Fr₂₋₄; Fr₂₋₅; Fr₂₋₆; Fr₂₋₇; Fr₂₋₈; Fr₂₋₉; Fr₂₋₁₀.

8.3.5.2.1. Purificación de la Fr₂₋₁₀

En la Fr₂₋₁₀ se observó un precipitado de color blanco, con una masa de 32.8 mg. Fue evaluado el perfil cromatográfico empleando como Fase Estacionaria = Sílica gel 60 F₂₅₄, Fase Móvil = diclorometano: metanol (6:1); Revelado = LUZ UV a 254 y 366 nm; ácido Sulfomolibdico y vapores de Yodo.

Siembra: al sólido blanco se le incorporó dos gotas de agua destilada para lograr solubilizarlo, y llevó posteriormente a estufa a una temperatura de 40°C durante 10 minutos. Después de cumplido el tiempo, fue centrifugado y realizada la siembra de la parte superior resultante de la centrifugación (sobrenadante).

8.3.6. Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas (HPLC-MS).

Fase móvil: el solvente utilizado fue de calidad analítica HPLC, acetonitrilo al 100%. Se filtró por filtro Millipore Millex-HN de 0.45 mm de diámetro de poro y degasificó primero con ultrasonido y posteriormente burbujeo de gas Helio, a temperatura ambiente.

Muestra: Se inyectaron las fracciones Fr₁₋₉ y Fr₁₋₁₅ que fueron analizadas en LC/ MSD VL Agilent Technologies 1100 Series Liquid Chromatography en un rango de m/z 50 a 1500.

8.3.7. Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HPLC-HRMS).

Fase móvil: el solvente utilizado fue de calidad analítica HPLC, acetona. Se procedió igual que en el punto anterior (8.3.6.).

Muestra: Se inyectaron la fracción Fr_{D3} que deriva del extracto EDCM_T y la fracción Fr₂₋₁₀. La técnica empleada fue la ionización a presión atmosférica (API), que incluye la electronebulización o electrospray (ES).

Detección: el detector usado fue Masa de Impacto Electrónico (IE) en el modo positivo.

9. Actividad Biológica

9.1. Determinación de la actividad antimicrobiana en *Eugenia uniflora* L.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana, según fue explicado anteriormente en el capítulo 5, fueron empleados dos métodos: el Método del cilindro placa (USP 29) y CCD - Bioautográfica (Contact Bioautography). En los análisis se aplicó el test de actividad antibiótica según acordado por Walläusser. (1990)

La evaluación biológica realizada incluyó las fracciones Fr₁₋₉, Fr₁₋₁₄, Fr₁₋₁₅, Fr₁₋₁₆, Fr₁₋₂₀, Fr₁₋₂₂, el extracto EDCM_T y la fracción Fr₂₋₁₀. Dicha actividad fue realizada en el Laboratorio de Control de Calidad del Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires por la Farm. Sandra Castello.

9.1.1. Materiales y métodos

Como método de difusión fue empleado el método del “cilindro placa”, en donde fueron utilizados cilindros de vidrio estéril de tamaño uniforme (diámetro interno 5 mm, altura 8 mm), placas de Petri, medio de cultivo: agar TSA (Agar Tripteína de Soja) inoculado con distintas cepas de microorganismos y como antibiótico estándar, *Ceftazidina*.

Dentro de los métodos bioautográficos, fue empleado el “Contact bioautography” utilizándose para el mismo cromatofolios de sílica gel 60 F254 (Merck) (2.5 cm de ancho y 5 cm de alto), medio de cultivo: agar TSA (Agar Tripteína de Soja) inoculado con distintas cepas de microorganismos y solución 0.1% de TTC (2,3,5-triphenil-2H-tetrazolium chloride).

9.1.1.1. Fracciones ensayadas.

Las fracciones analizadas fueron Fr₁₋₉, Fr₁₋₁₄, Fr₁₋₁₅, Fr₁₋₁₆, Fr₁₋₂₀ y Fr₁₋₂₂ provenientes del Extracto Hexánico Concentrado (EHC) sometido a cromatografía en

columna de sílica gel, explicado en 8.3.5. como así también el extracto EDCM_T proveniente de la purificación del sólido S (ver 8.3.5.1.1.) y la fracción Fr₂₋₁₀ que deriva de la fracción Fr₁₋₂₀.

9.1.1.2. Microorganismos de referencia utilizados.

Los microorganismos de ensayo utilizados fueron: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29737.

Microorganismos	Tipo de microorganismo	N° de Código
<i>Bacillus Subtilis</i>	Bacilo Gram +	ATCC 6633
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo Gram -	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo Gram -	ATCC 9027
<i>Staphylococcus aureus</i>	Coco Gram +	ATCC 29737

Tabla. Microorganismos utilizados en el Ensayo Antimicrobiano

9.1.1.3. Preparación de los inóculos.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29737, *Bacillus Subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 fueron mantenidos en agar TSA. Todos los medios fueron esterilizados a 120°C durante 120 min.

Previamente al ensayo, los cultivos bacterianos fueron subcultivados en el medio TSA a 37°C durante 24 h, fueron diluídas una parte de las suspensiones stock y determinadas la transmitancia de estas diluciones de prueba a 580 nm con espectrofotómetro. Se ajustó la concentración (cantidad) tal que los inóculos tuvieran una transmitancia del 25% contra la sal tetrazolium como un blanco (igual a 1 correspondiendo a aproximadamente 10⁶ cell/ml).

Los inóculos microbianos se prepararon a partir de cultivos “overnight” de los microorganismos de prueba en agar tripteína de soja (Merck, Argentina) en pico de

flauta, obteniendo una suspensión en solución fisiológica (NaCl 8.5 ‰, Farmacopea Argentina VI ed.), de 35% de transmitancia a 580 nm para *Escherichia coli* ATCC 8739, del 25% de transmitancia a 580 nm para *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y del 32% de transmitancia a 520 nm para *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Las suspensiones microbianas se inocularon en agar tripteína de soja (Merck, Argentina) previamente fundido y mantenido a 45°C, en volumen de 0.1 ml por cada 10 ml del medio de cultivo que a continuación se vertió en una caja de Petri de 90 mm de diámetro, estéril, descartable y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente para su solidificación.

9.1.1.4. Método del cilindro placa (USP 29) y CCD - Bioautográfica (Contact bioautography).

Sobre el medio de cultivo inoculado, fueron depositados cilindros de vidrios estériles y a continuación se agregaron 100 µl del extracto en diferentes concentraciones. Se dejó absorber durante 15 minutos y se llevó a incubar a 37°C durante 18 horas. Transcurrida la incubación, se efectuó la lectura de los resultados y medición del diámetro de los halos de inhibición, generados por la difusión de la sustancia antimicrobiana alrededor de los cilindros.

Las fracciones ensayadas fueron Fr₁₋₉, Fr₁₋₁₄, Fr₁₋₁₅, Fr₁₋₁₆, Fr₁₋₂₀, Fr₁₋₂₂, EDCM_T y la fracción Fr₂₋₁₀: al extracto seco de cada una de las fracciones se lo resuspendió en agua destilada a una concentración de 67.000 µg/ml. Las soluciones de cada fracción fueron sembradas en placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck); las manchas fueron visualizadas bajo luz ultravioleta a 254 nm. Las placas de capa fina fueron cubiertas con 2 ml de medio blando (0.3 ‰ medio de cultivo agar TSA – Merck) previamente inoculado con 10⁶ unidades formadoras de colonias por cada ml (ufc/ml) de cada organismo e incubado a 37°C durante 24 h. Luego las placas fueron esprayadas con solución 0.1% de TTC (2,3,5-triphenil-2H-tetrazolium chloride) y posteriormente incubadas a 37°C durante 60 minutos en la oscuridad.

Las zonas de inhibición fueron visualizadas por la detección de la actividad deshidrogenasa con la sal tetrasolium. El ensayo en CCD visualiza las zonas de

inhibición de crecimiento cuando la sal tetrazolium es convertida a formazan roja por la deshidrogenasa del organismo multiplicador (Walläusser 1990). Las zonas de inhibición aparecen rojas contra un trasfondo incoloro.

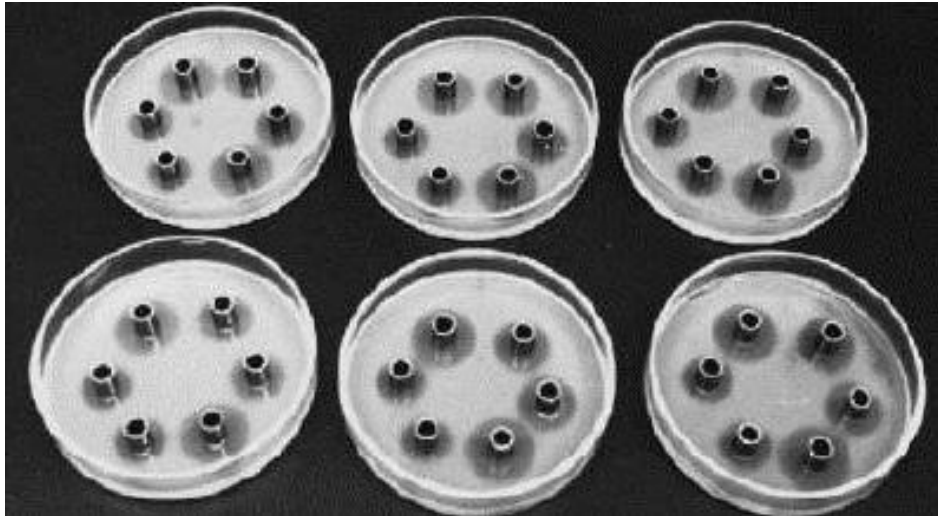


Fig. 9-1. Método del cilindro placa

(<http://image.slidesharecdn.com/doseamentomicrobiologico-120603074512-phpapp01/95/doseamento-microbiologico-26-728.jpg?cb=1338709611>)



CCD - Bioautográfica (Contact bioautography)

10. Resultados

10.1. Estudio fitoquímico

El Extracto Hexánico Concentrado (EHC) de *Eugenia uniflora* L. fue evaluado fitoquímicamente, según lo descrito previamente en la sección 8.3.2., observándose que la única reacción de caracterización positiva fue la de Liebermann Burchard resaltando la presencia de esteroides o triterpenos saturados (coloración verde amarillenta).

10.1.1. Reacciones de caracterización

En la reacciones de caracterización fitoquímica de EDCM_T y EAC_T, a través de la Reacción de Liebermann Burchard, se observa la presencia de triterpenos (coloración rojiza).

10.1.2. Caracterizaciones en CCD de los compuestos presentes

En la CCD de EDCM_T y Fr_{D3} proveniente de la fracción Fr₁₋₂₂, fueron analizados en cromatofolios de sílica gel empleando como Testigo: ácido ursólico al 1% en cloroformo. Se utilizó el sistema cromatográfico explicado en el capítulo 8. Materiales y Métodos.

Del análisis del revelado con la solución de *p*-anisaldehído sulfúrico, se pudo observar que tanto EDCM_T como Fr_{D3} presentan una mancha de igual R_f e idéntico color que la del testigo = ácido ursólico.

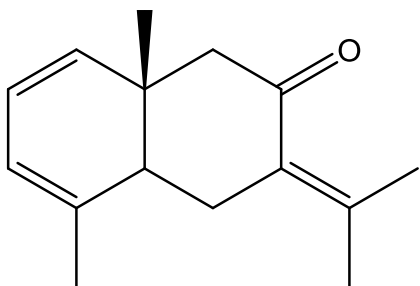
Fracciones	Fase estacionaria	Fase móvil	Revelado		
			UV 254	UV 366	Reactivo revelador
EDCM _T	Sílica gel 60 F ₂₅₄	diclorometano: metanol (20:1)	6 sust. pardas	2 sust. amarillas	ácido Sulfomolíbdico 6 sust. azules
	Sílica gel 60 F ₂₅₄	tolueno: acetato de etilo (8:2)	7 sust. 4 verdes y 3 amarillas	7 sust. 3 rojas, 3 negras y 1 amarilla	Se detecta la presencia de ácido ursólico contra testigo <i>p</i> -anisaldehído sulfúrico 9 sust. (1 azul fuerte que es característica del ácido ursólico, 2 verdes y 6 azules)
	Sílica gel 60 F ₂₅₄	diclorometano: metanol (95:5)	8 sust. 6 verdes, 1 gris y 1 amarilla	8 sust. 3 rojas y 5 negras	Se detecta la presencia de ácido ursólico contra testigo <i>p</i> -anisaldehído sulfúrico 8 sust. (1 azul fuerte que es característica del ácido ursólico, 4 celestes y 3 verdes).
Fr _{D3}	Sílica gel 60 F ₂₅₄	diclorometano: metanol (20:1)	4 sust. pardas	2 sust. amarillas	ácido Sulfomolíbdico 4 sust. azules

	Sílica gel 60 F ₂₅₄	diclorometano: metanol (95:5)	6 sust. 4 verdes y 2 amarillas	6 sust. 3 rojas y 3 negras	Se detecta la presencia de ácido ursólico contra testigo <i>p</i> -anisaldehído sulfúrico 6 sust. (1 azul fuerte que es característica del ácido ursólico, 3 celestes y 2 verdes).
	Sílica gel 60 F ₂₅₄	tolueno: acetato de etilo (8:2)	5 sust. 3 verdes y 2 amarillas	5 sust. 2 rojas, 2 negras y 1 amarilla	Se detecta la presencia de ácido ursólico contra testigo <i>p</i> -anisaldehído sulfúrico 6 sust. (1 azul fuerte que es característica del ácido ursólico, 2 verdes y 3 azules)

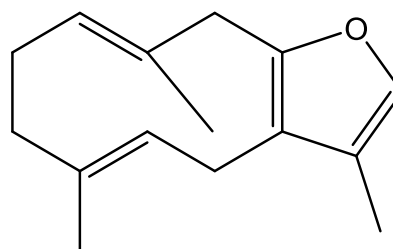
Tabla 10-1. Perfil cromatográfico (TLC) de las fracciones con ácido ursólico

10.1.3. Análisis por HPLC-MS: Fracciones Fr₁₋₉ y Fr₁₋₁₅

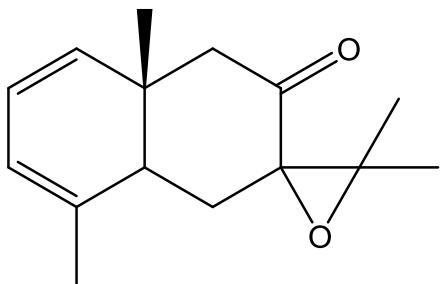
La mezcla de sesquiterpenos como selina-1,3,7,(11)-trien-8-ona, furanodieno, oxidoselina-1,3,7,(11)-trien-8-ona (El-Shabrawy, 1995; de Morais *et al.*, 1996; Kanazawa *et al.*, 2000), limoneno, verbenona, pulegona, carvona, nerolidol, (Ubiergo *et al.*, 1987; Henriques *et al.*, 1993) y germacrone, curzerene (Rücker *et al.*, 1977; Maia *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2007) son los compuestos químicos encontrados en mayor proporción en *Eugenia uniflora* L., según literatura internacional anteriormente mencionada.



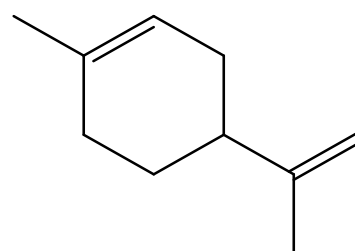
Selina-1,3,7,(11)-trien-8-ona



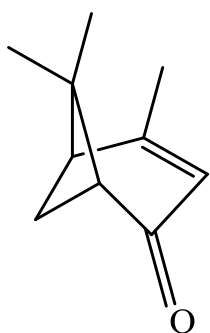
Furanodieno



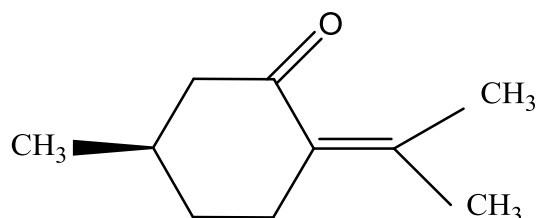
Oxidoselina-1,3,7(11)-trien-8-ona



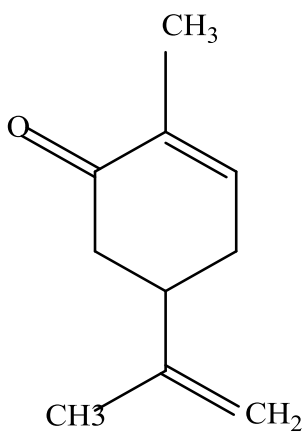
Limoneno



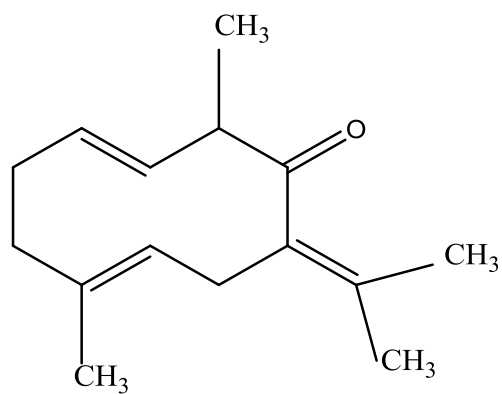
Verbenona



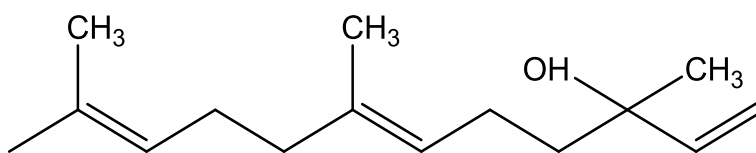
Pulegona



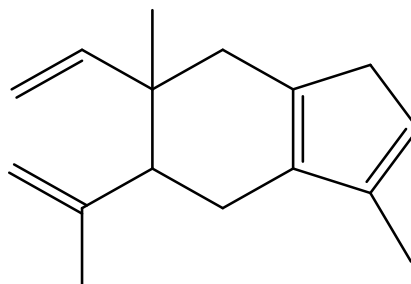
Carvona



Germacrone



Nerolidol



Curzerene

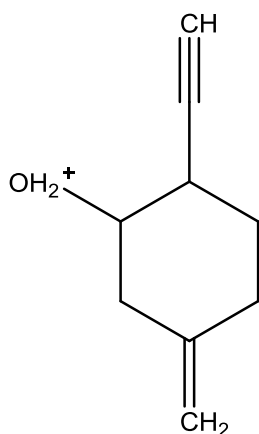
Las fracciones Fr₁₋₉ y Fr₁₋₁₅, que demostraron tener actividad antimicrobiana, fueron investigadas estructuralmente a través de un HPLC-MS *LC/ MSD VL Agilent Technologies 1100 Series Liquid Chromatography m/z 50-1500*.

10.1.3.1. Análisis de la Fracción Fr₁₋₉

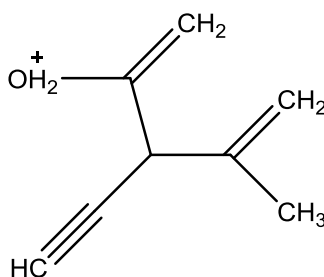
10.1.3.1.1. Compuesto identificado: PULEGONA

En el cromatograma de la Fig. 1, a un Tr.1.991 se observa la posible presencia de Pulegona que al comparar con su espectro homónimo (Fig. 2) aportado por la base de datos HMDB (<http://www.hmdb.ca>), se visualizan algunos picos característicos del compuesto hallado, encerrados en un círculo.

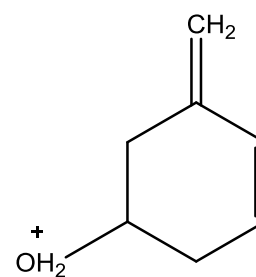
Se encuentra un ión molecular m/z 152 [M^+] correspondiente con la fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$. El fragmento m/z 137 se corresponde al (2-etinil-5-metilenciclohexil) oxonio, $C_9H_{13}O^+$, el de m/z 123 al (3-etinil-4-metilpenta-1,4-dien-2-il) oxonio con la fórmula molecular $C_8H_{11}O^+$ y el de m/z 111 ($C_7H_{11}O^+$), correspondiente al (5-metileneciclohex-3-en-1-il) oxonio según base de datos consultada (HMDB).



m/z 137



m/z 123



m/z 111

Print of window 80: MS Spectrum

```
=====
Injection Date   : 18 May 07   4:14 pm
Sample Name      : 9EUV
Acq. Operator    : IVANA
Acq. Method      : QMVJ.M
Analysis Method   : C:\HPCHEM\1\METHODS\QMVJ.M
Last changed     : 5/3/2007 5:56:33 PM by Valentina
Location : Vial 1 ,
Inj : 1
=====
```

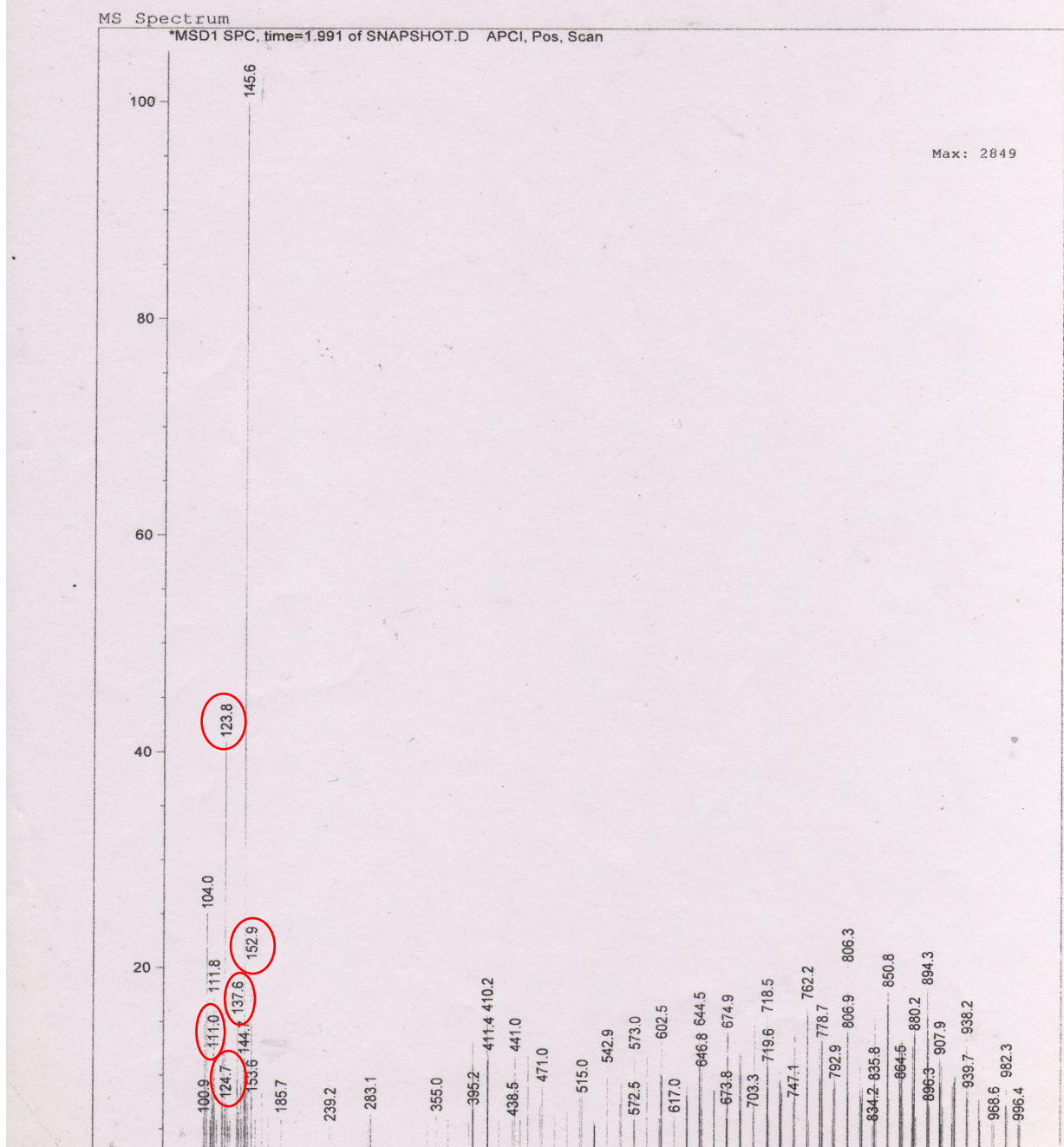


FIGURA N° 1. HPLC-MS de la Fr₁₋₉

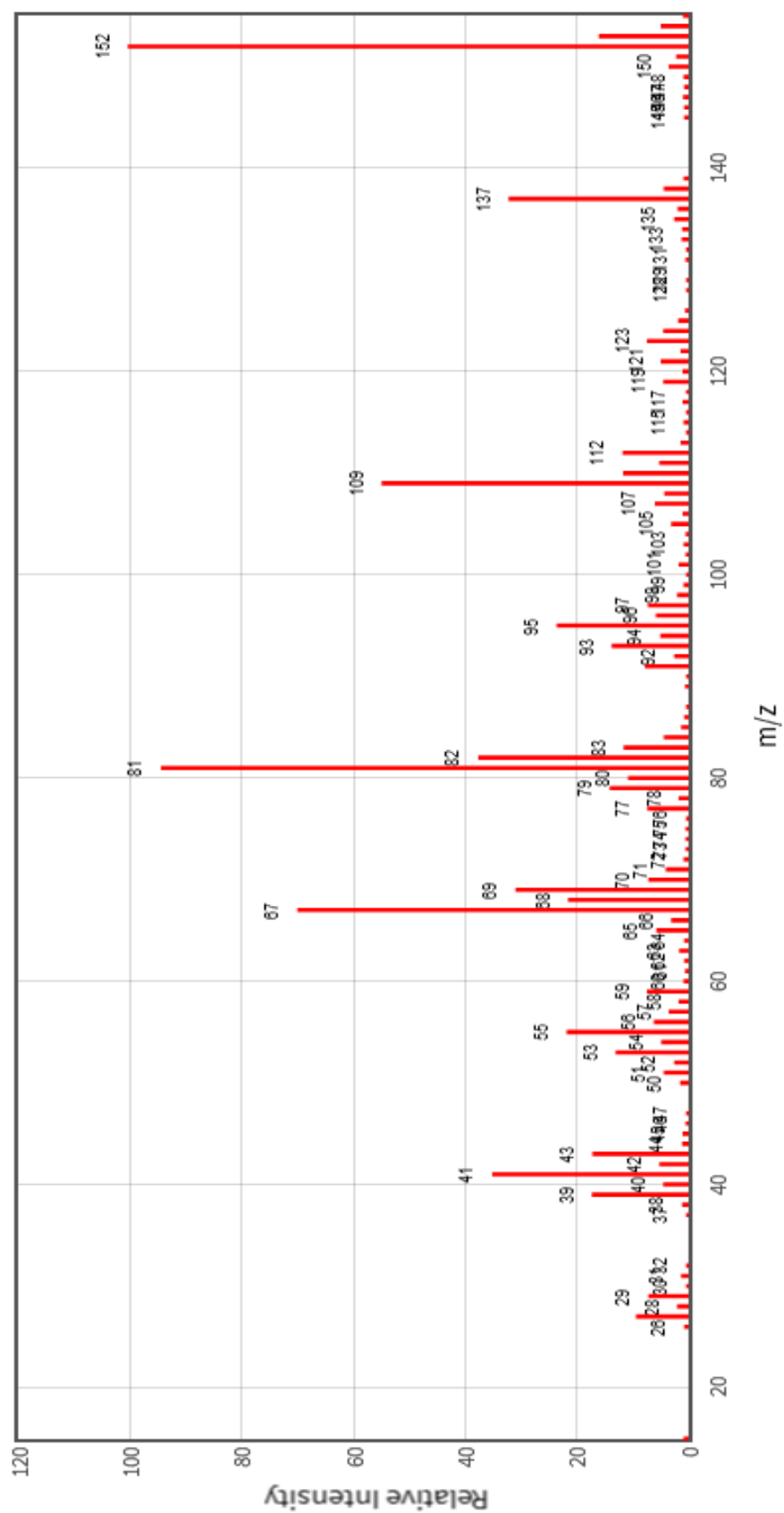
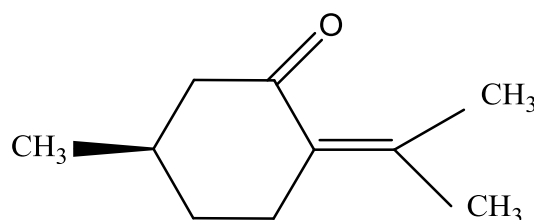


FIGURA N° 2. Espectro de Masas: PULEGONA

Datos de Pulegona: ^(*)**Fórmula:** C₁₀H₁₆O**Peso molecular:** 152.2334**IUPAC InChI Estándar:**

InChI=1S/C10H16O/c1-7(2)9-5-4-8(3)6-10(9)11/h8H,4-6H2,1-3H3/t8-/m0/s1

IUPAC InChIKey Estándar: NZGWDASTMWDZIW-QMMMGPBSA-N**Número de registro CAS:** 89-82-7**Estructura química:****Estereoisómeros:** Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethylidene)- 5-Methyl-2-(1-methylethenylidene) cyclohexanone

Otros nombres: (+)-Pulegone; β-Pulegone; Cyclohexanone, 5-methyl-2-(1-methylethylidene)-, (R)-; p-Menth-4(8)-en-3-one, (R)-(+)-; (+)-(R)-Pulegone; (R)-(+)-Pule-gone; d-p-Menth-4(8)-en-3-one; d-Pulegone; p-Menth-4(8)-en-3-one; Pulegone, (d); 1-Isopropylidene-4-methyl-2-cyclohexanone; 1-Methyl-4-isopropylidene-3-cyclo-hexanone; 3-Methyl-6-isopropylidenecyclohexanone; 4(8)-p-Menthen-3-one, (R)-(+)-; Pulegon; (+)-4(8)-Para-menthen-3-one; 5-Methyl-2-(1-methylethylidene) cyclo-hexanone, (R)-; (1R)-(+)-p-Menth-4(8)-en-3-one; (R)-Pulegone.

^(*) <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=89-82-7&Units=SI&cMS=on>

10.1.3.2. Análisis de la Fracción Fr₁₋₁₅

10.1.3.2.1. Compuesto identificado: GERMACRONE

En la muestra (Fr₁₋₁₅) analizada por el Laboratorio Analítico - Facultad de Ciencias Exactas, U.N.L.P. - se obtuvo el perfil cromatográfico de la Fig. 3. A un Tr. 12.660 se observa la posible presencia del Germacrone, con un ión molecular m/z 218 correspondiente con la fórmula molecular $C_{15}H_{22}O$. Con la pérdida de un propeno ($H_2C=CH-CH_3$) y posteriormente un metilo ($-CH_3$), se obtendría el fragmento m/z 162 correspondiente a $C_{11}H_{16}O$ el cual con la pérdida de un HO^- se obtendría el fragmento m/z 145 ($C_{11}H_{15}$).

Los otros fragmentos característicos serían m/z 103 que podría obtenerse a partir de la pérdida de un propeno (m/z 42) y el de m/z 121, de la pérdida de un H^+ obteniendo el fragmento m/z 161 equivalente a $C_{11}H_{15}O$ y finalmente al perderse un $H_2C=CH-CH_3$ se obtendrían los fragmentos m/z 121 y m/z 42.

Con los datos aportados por la base de datos Nist (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>), en donde se observa el Espectro de Masas del Germacrone (Fig. 4), se indican algunos de los picos característicos con un círculo rojo, pertenecientes a dicho compuesto en la muestra de análisis (Fig. 3).

Injection Date : 18 May 07 3:47 pm
 Sample Name : 15EUV
 Acq. Operator : IVANA
 Acq. Method : QMVJ.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\QMVJ.M
 Last changed : 5/3/2007 5:56:33 PM by Valentina

Location : Vial 1 ..
 Inj : 1

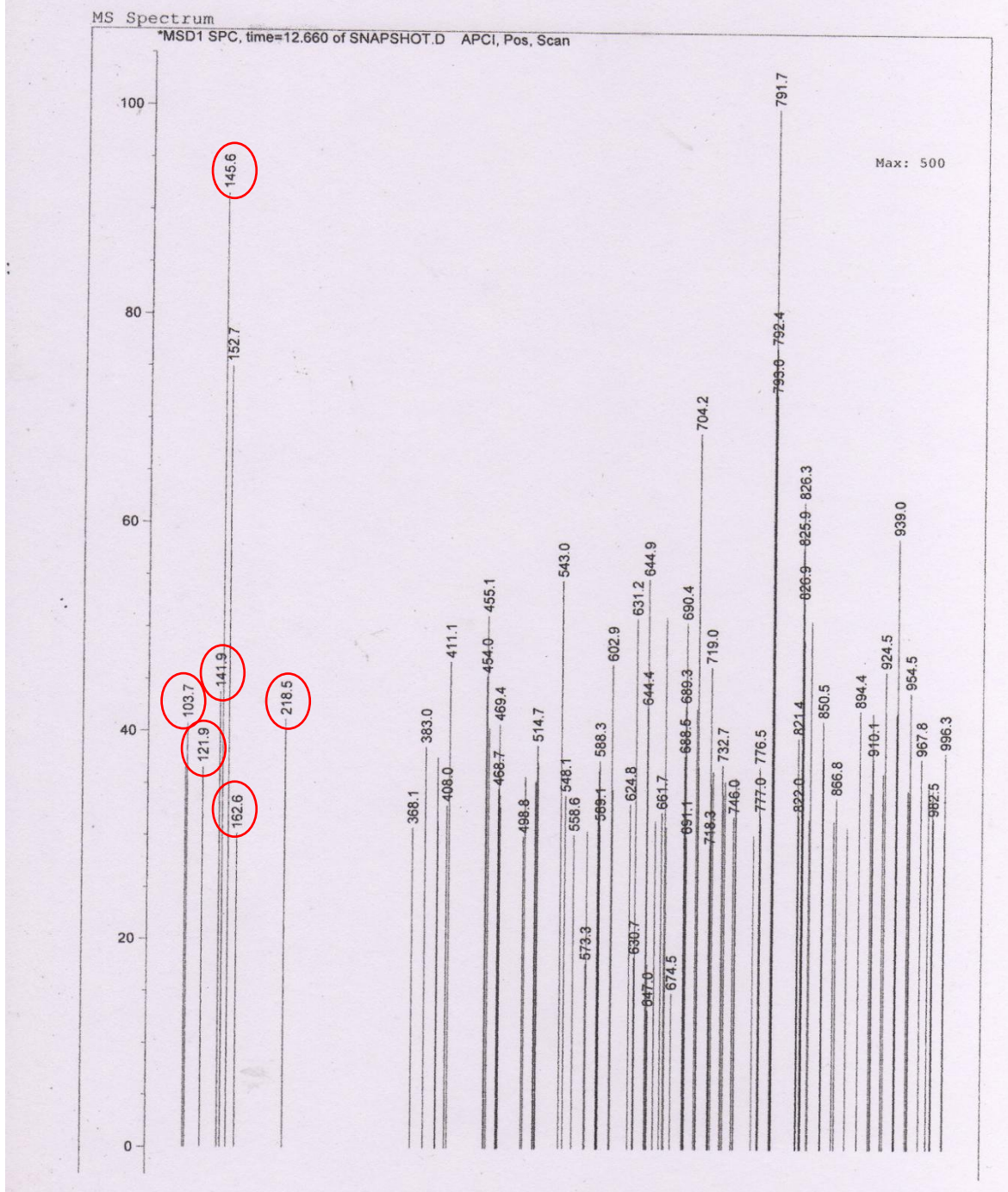


FIGURA N° 3. HPLC-MS de la Fr₁₋₁₅

A continuación se detalla el esquema de fragmentación propuesto para la fracción Fr₁₋₁₅:

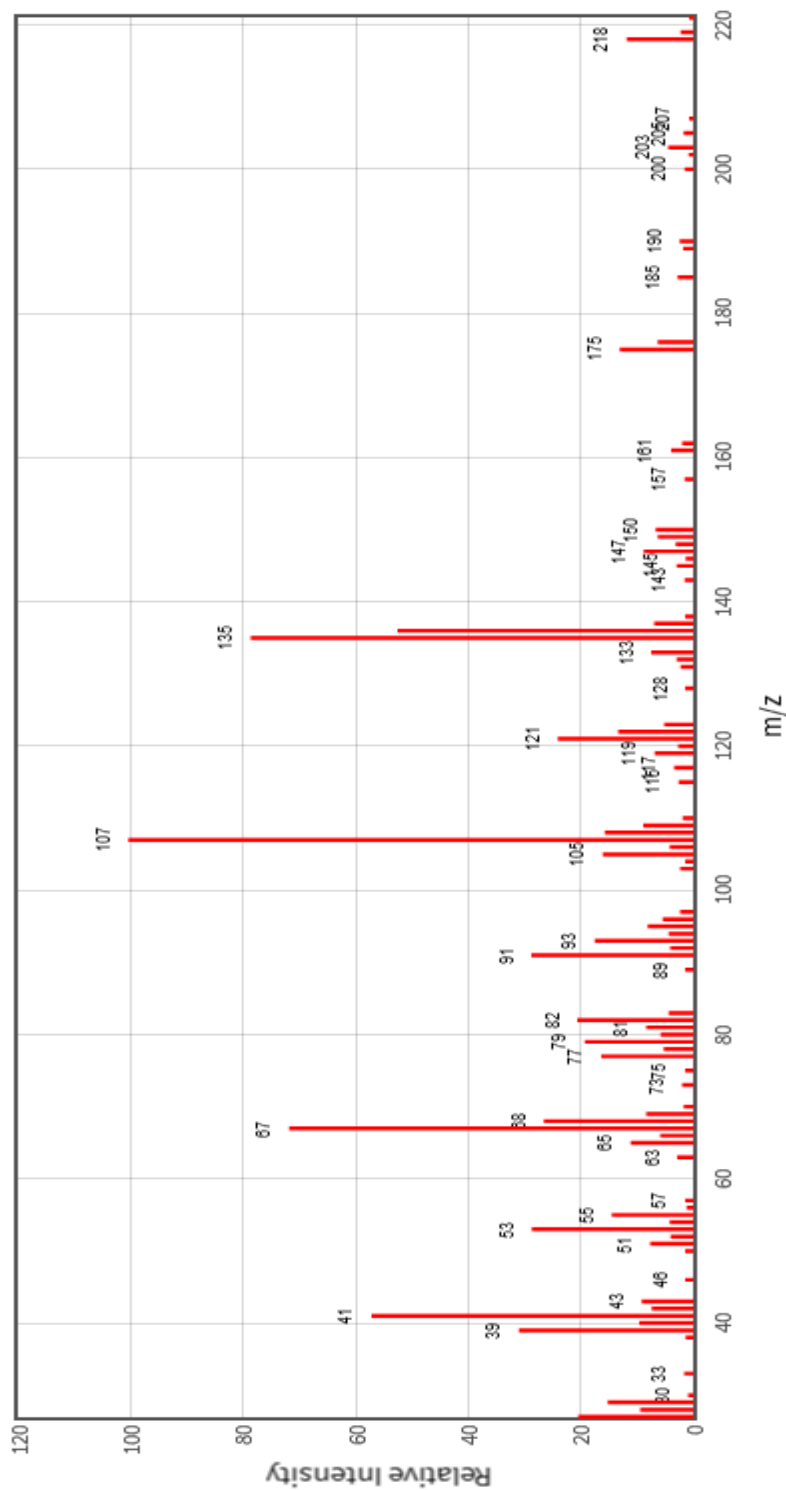
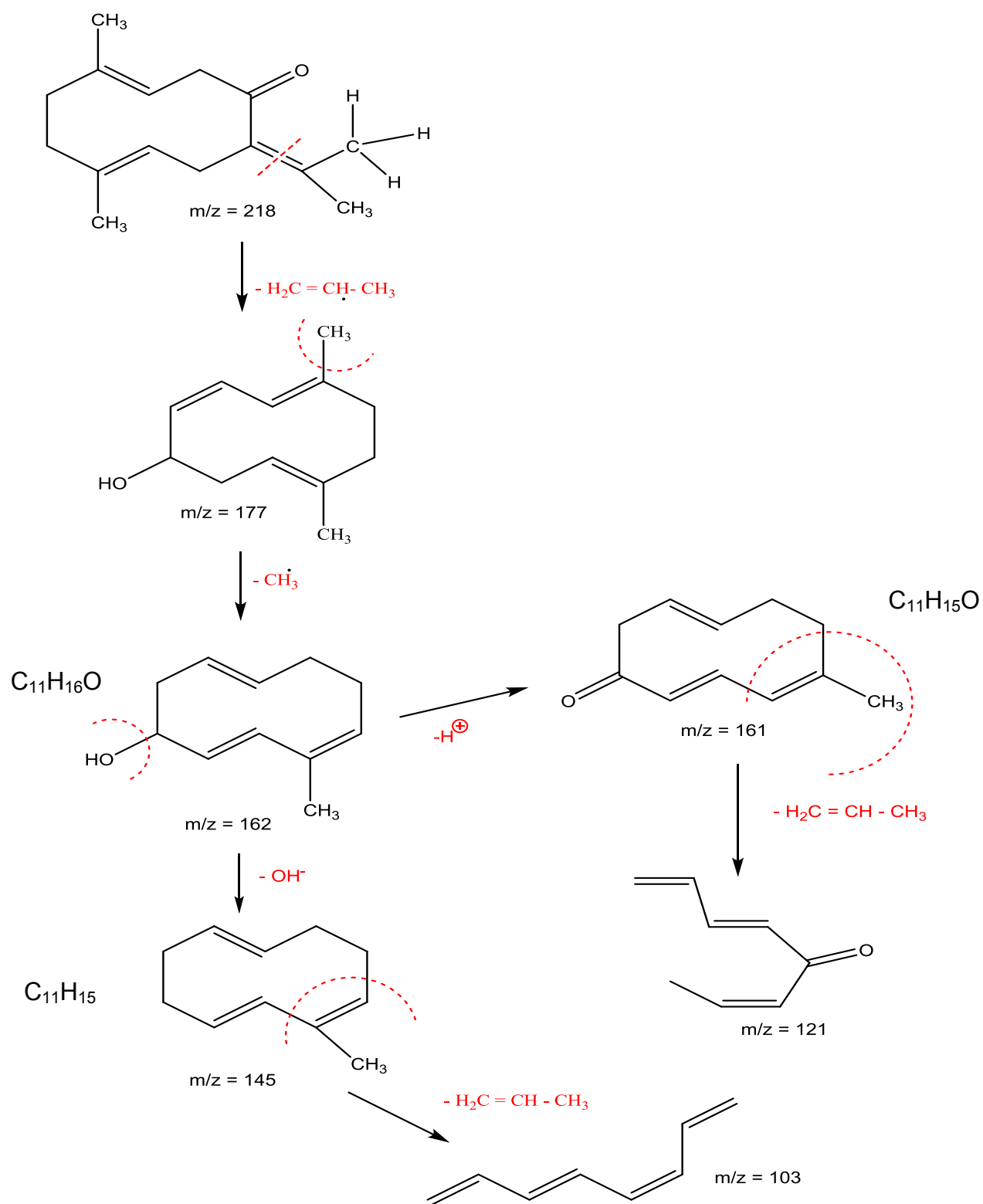
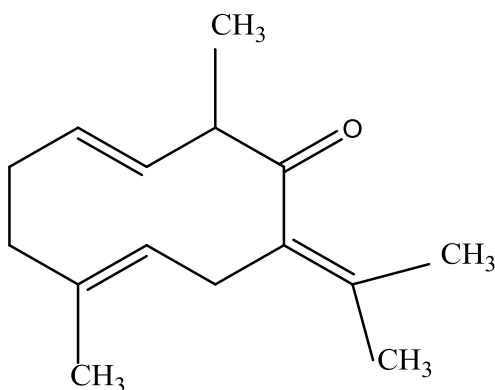


FIGURA N° 4. Espectro de Masas: GERMACRONE



Datos del Germacrone: (*)**Fórmula:** C₁₅H₂₂O**Peso molecular:** 218.3346**IUPAC InChI Estándar:**

InChI=1S/C15H22O/c1-11(2)14-9-8-12(3)6-5-7-13(4)10-15(14)16/h7-8H,5-6,9-10H2,1-4H3/b12-8-,13-7-

IUPAC InChIKey Estándar: CAULGCQHVOVVRN-SVGXSMIJS-A-N**Número de registro CAS:** 6902-91-6**Estructura química:****Estereoisómeros:** Germacrol**Otros nombres:** (E, E)-germacrone; 3,7-Cyclodecadien-1-one, 3,7-dimethyl-10-(1-methylethylidene)-, (E,E)-; Germacra-3,7(11),9-trien-6-one, (E,E)-; Germacron; 3,7-Dimethyl-10-(1-methylethylidene)-3,7-cyclodecadien-1-one, (trans,trans)-(*) <http://webbook.nist.gov/chemistry>

10.1.4. Análisis por HPLC-HRMS

10.1.4.1. Fracción Fr_{D3}

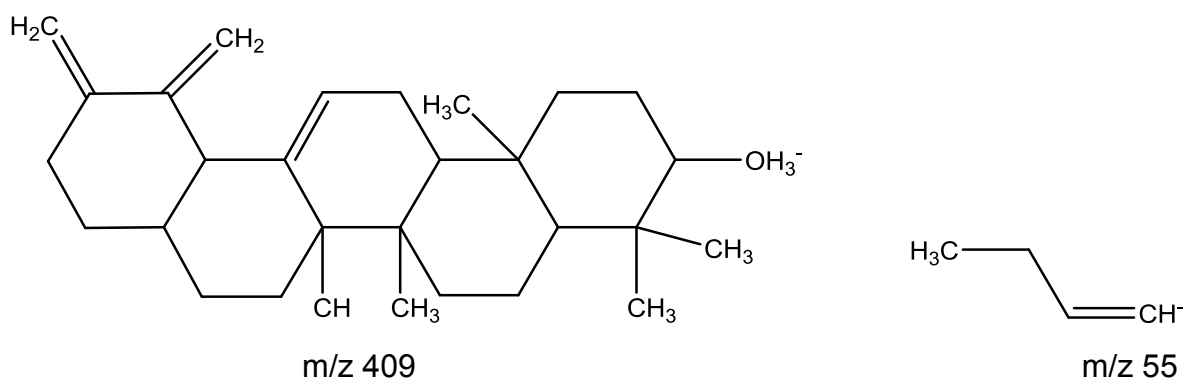
La fracción Fr_{D3} que deriva del extracto EDCM_T proveniente del sólido S₁, originario de la fracción F₁₋₂₂ como ha sido explicado en la sección 8.3.5.1.1., fue analizado por HPLC-HRMS utilizando la técnica Electrospray.

10.1.4.1.1. Compuesto identificado: ÁCIDO URSÓLICO

La muestra (Fr_{D3}) fue sometida a un análisis por HPLC-HRMS (Cromatografía Líquida de Alta Performance acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución).

En el cromatograma de la Fig. 5 se observa a un Tr. 35.536 la posible presencia del ácido ursólico en donde se evidencia el pico del ión molecular m/z 456 [M⁺] correspondiente con la fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃. El estudio fue complementado con la presencia de tablas, pertenecientes a la misma muestra analizada, en donde se especifican los distintos picos, a diferentes señales, con su respectiva m/z resaltando aquellas coincidentes con m/z del espectro de masas del ácido ursólico provenientes de una base de datos del *National Metrology Institute of Japan (NMIJ)* (http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi) (Fig. 6).

El fragmento de m/z 409, correspondería al compuesto cuya fórmula molecular es C₂₉H₄₄O⁻ y el de m/z 55, a 1-butene (C₄H₇⁻), según base de datos consultada (<http://www.hmdb.ca/metabolites>).

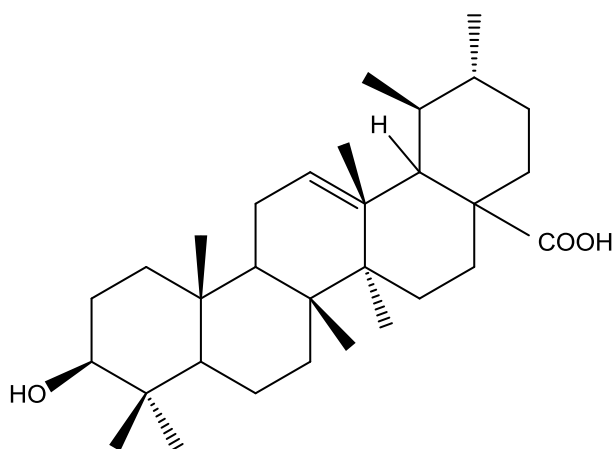


Además el compuesto había sido identificado en la misma fracción (Fr_{D3}) y en EDCM_T aplicando cromatografía en capa delgada contra Testigo (ácido ursólico) en distintos sistemas cromatográficos, en donde el R_f tanto de la muestra como de la sustancia de referencia fue coincidente (ver pág.82).

Datos del ácido ursólico: (*)

Fórmula: C₃₀H₄₈O₃

Estructura química:



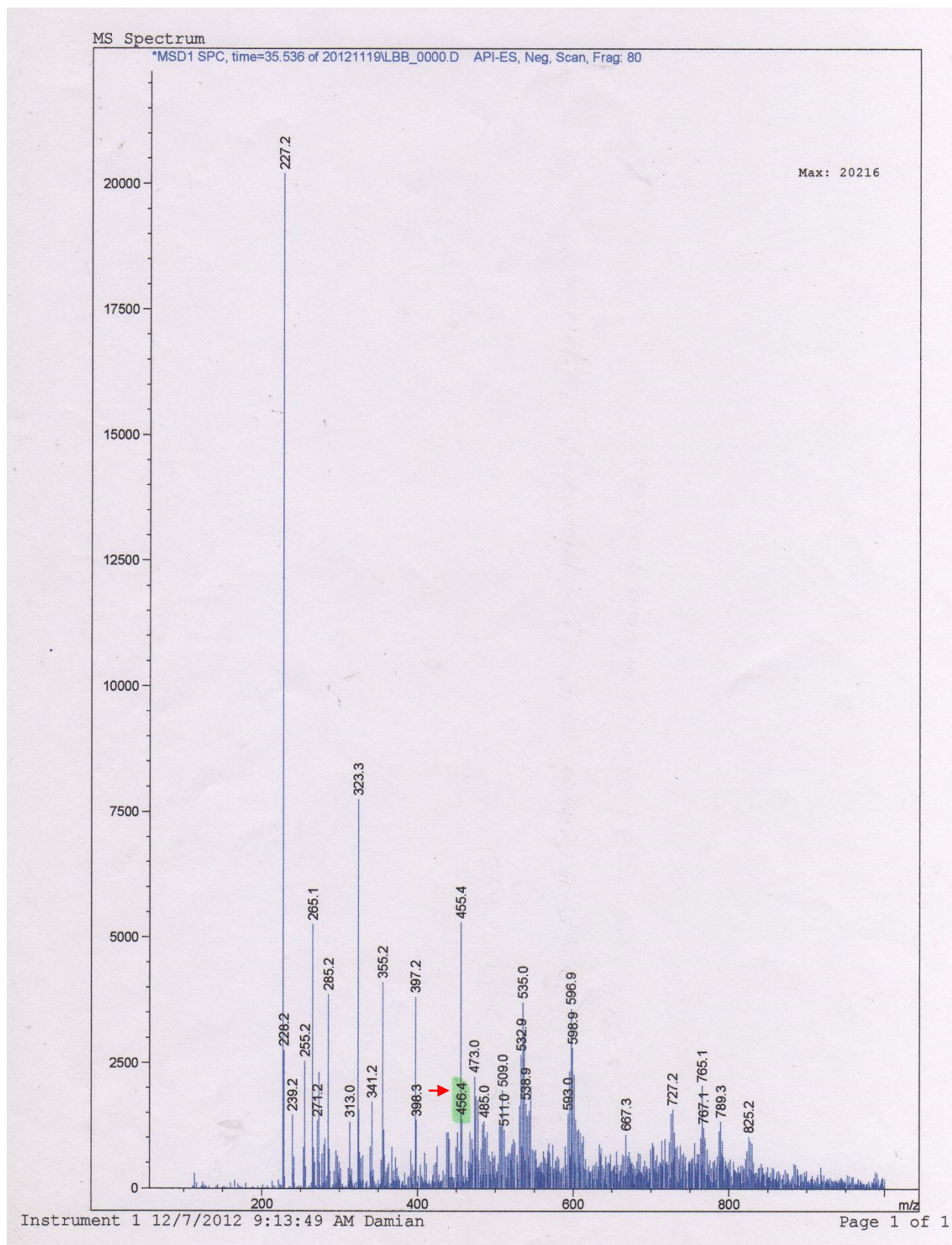
Peso molecular: 456.70

Identificador Químico Internacional de IUPAC: InChI = S/C30H48O3/c!-18-10-15-30(25(32)33)17-16-28(6)20(24(30)19(18)2)8-9-22-27(5)13-12-23(31)26(3,4)21(27)11-14-29(22,28)7/h8,18-19,21-24,31H,9-17H2,1-7H3,(H,32,33)/t18-,19+,21+,22-,23+,24+,27+,28-,29-,30+/m1/s1

Número de registro CAS: 77-52-1

Otros nombres: Prunol, Malol, beta-ursolic acid, 3-beta-hydroxyurs-12-en-28-oic acid.

(*) <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=89-82-7&Units=SI&cMS=on>

FIGURA N° 5. HPLC-HRMS de FrD_3

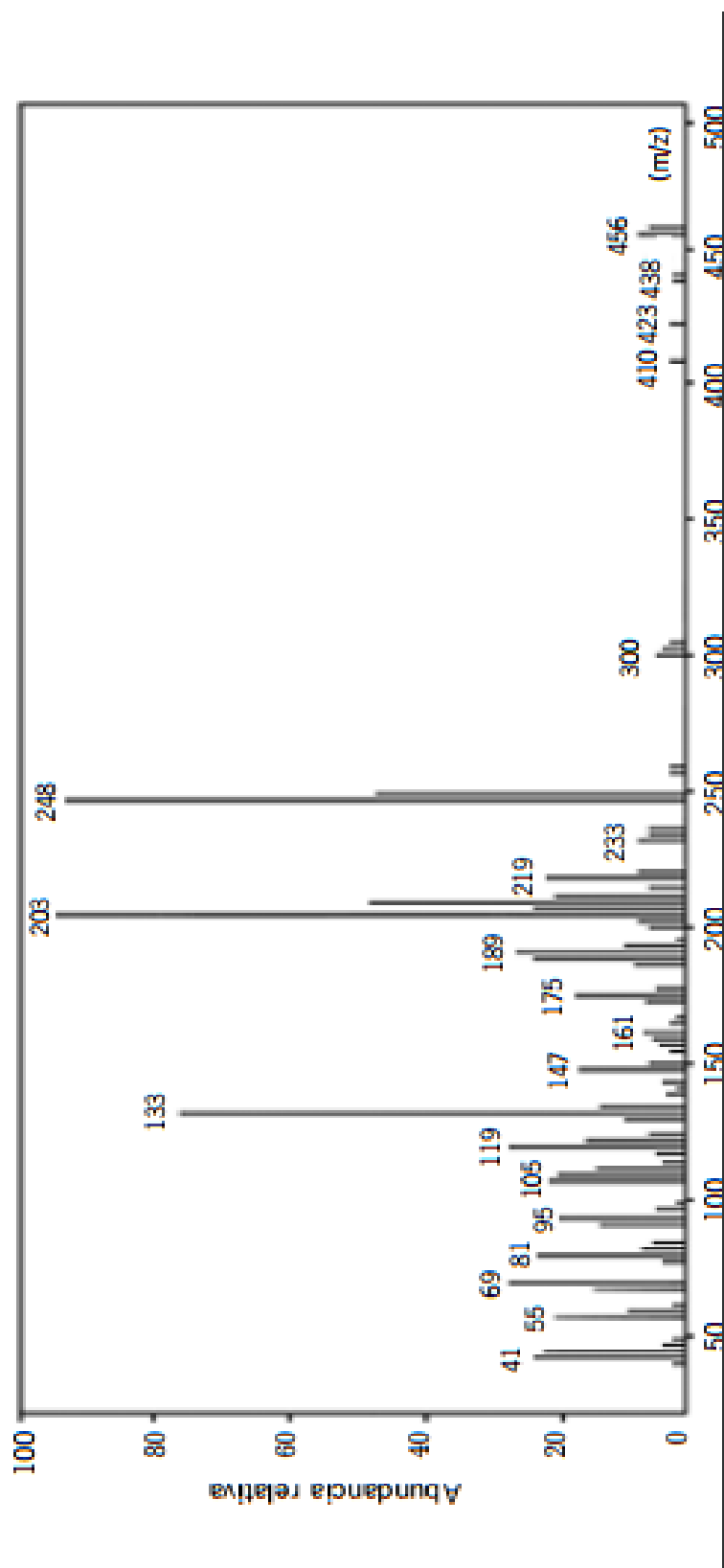


FIGURA N° 6: Espectro de masa del ácido ursólico

Spectral Database for Organic Compounds (http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\20121119\LBB_0000.D

Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.130	VV	0.2725	3.71074e4	1784.88354	34.7487
2	3.310	VV	0.0565	7021.04102	1761.85144	6.5748
3	3.426	VV	0.0900	1.24016e4	1764.66064	11.6133
4	3.508	VV	0.0510	6788.37012	1761.33569	6.3569
5	3.622	VB	0.2448	2.98176e4	1767.26233	27.9223
6	6.490	BP	0.2494	45.46720	2.48609	0.0426
7	11.572	PP	0.1714	15.05491	1.26002	0.0141
8	18.675	BB	0.2511	278.61716	15.85070	0.2609
9	21.056	BP	0.1596	17.03854	1.36529	0.0160
10	22.303	BV	0.3069	67.72809	2.69800	0.0634
11	23.567	BB	0.3164	87.40633	3.63683	0.0819
12	24.670	BB	0.2305	83.79650	5.18733	0.0785
13	27.553	BP	0.1648	14.39037	1.12858	0.0135
14	28.338	PV	0.2114	29.49990	1.74376	0.0276
15	28.993	BV	0.1742	26.11102	1.95058	0.0245
16	29.573	BV	0.1903	33.59180	2.44493	0.0315
17	30.069	VB	0.2142	382.47336	26.21482	0.3582
18	30.919	BB	0.1720	16.80067	1.48501	0.0157
19	32.575	BV	0.2714	335.16995	17.82199	0.3139
20	32.954	VP	0.3512	832.70203	36.08677	0.7798
21	34.680	BV	0.3470	717.70154	28.57457	0.6721
22	35.224	VV	0.2508	1076.23730	56.86770	1.0078
23	35.451	VV	0.2309	1537.85156	94.97736	1.4401
24	35.698	VV	0.2144	1250.99377	81.82584	1.1715
25	35.966	VV	0.1673	645.16931	55.63797	0.6042
26	36.201	VV	0.1493	583.86298	56.15761	0.5468
27	36.430	VV	0.1867	853.27460	63.54810	0.7990
28	36.650	VV	0.2325	1151.76392	68.39332	1.0786
29	36.994	VV	0.2321	1273.02759	77.31800	1.1921
30	37.250	VP	0.3849	2295.98462	87.29039	2.1500

Totals : 1.06788e5 9631.94522

Signal 2: DAD1 B, Sig=320,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.298	PV	0.2296	1784.62317	101.25693	58.4402
2	3.433	VB	0.1926	1175.98218	87.63711	38.5093
3	15.442	BP	0.1856	12.36476	1.01845	0.4049
4	33.061	BP	0.2561	34.62995	2.03985	1.1340
5	35.210	BB	0.2038	16.15280	1.13682	0.5289
6	36.059	BV	0.2702	30.00694	1.43362	0.9826

Totals : 3053.75980 194.52278

Signal 3: DAD1 C, Sig=210,8 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	2.433	VV	0.0898	11.11740	1.66819	8.152e-3
2	2.532	VV	0.0951	18.24040	2.62465	0.0134
3	2.834	VV	0.1870	1114.23523	93.55251	0.8171
4	3.322	VV	0.1808	2537.28638	181.83698	1.8606
5	3.446	VV	0.2384	3069.89209	178.72287	2.2511
6	4.341	VV	0.0945	17.43622	2.24676	0.0128
7	4.887	VV	0.0674	7.31965	1.43676	5.367e-3
8	4.955	VB	0.0834	10.39325	1.65226	7.621e-3
9	5.069	BV	0.0506	8.55439	2.45592	6.273e-3
10	5.290	VV	0.1486	58.64542	5.00959	0.0430
11	5.364	VV	0.2296	97.82224	5.29327	0.0717
12	6.304	VP	0.7153	1922.44128	32.72923	1.4097
13	11.019	BV	0.4233	55.64455	1.56327	0.0408
14	11.546	VP	0.1659	40.69411	3.00677	0.0298
15	13.413	VV	0.2931	24.86415	1.03177	0.0182
16	13.664	VP	0.3809	69.51231	2.19827	0.0510
17	15.046	BV	0.2819	45.14556	1.95142	0.0331
18	15.557	VV	0.0695	8.56699	1.73913	6.282e-3
19	15.654	VV	0.0793	11.68153	2.15414	8.566e-3
20	15.725	VV	0.0754	12.05377	2.14918	8.839e-3
21	15.822	VP	0.5740	122.56215	2.54447	0.0899
22	18.181	VV	0.3080	387.33362	17.25079	0.2840
23	18.666	VP	0.2391	377.37830	22.56550	0.2767
24	19.702	PP	0.2693	35.79603	1.61071	0.0262
25	20.339	VB	0.1353	26.54649	2.43333	0.0195
26	21.051	BV	0.2416	103.18592	5.74366	0.0757
27	22.315	VV	0.3973	3354.83325	111.42252	2.4601
28	23.556	VV	0.6177	1999.12646	38.38157	1.4659
29	23.897	VV	0.1030	310.22363	39.76381	0.2275
30	24.066	VV	0.1166	379.53458	42.32221	0.2783
31	24.250	VV	0.1613	556.31262	45.27847	0.4079
32	24.674	VV	0.3522	1528.30359	53.35182	1.1207
33	25.135	VV	0.2742	1397.33301	63.14934	1.0246
34	25.315	VV	0.2294	1151.70020	67.38718	0.8445
35	25.623	VV	0.2200	1105.79773	62.02356	0.8109
36	26.141	VV	0.4783	2727.15259	71.93723	1.9998
37	26.727	VV	0.1988	1180.38733	72.17020	0.8656
38	27.089	VV	0.3567	2330.08008	78.86275	1.7086
39	27.521	VV	0.4242	3043.54810	89.61769	2.2318
40	27.964	VV	0.1265	866.86932	89.93269	0.6357
41	28.354	VV	0.3618	3010.11597	102.75710	2.2073
42	28.688	VV	0.2363	1869.26575	108.87082	1.3707
43	29.037	VV	0.4084	4458.11719	139.67992	3.2691
44	29.610	VV	0.2956	2529.66406	111.97857	1.8550
45	30.055	VV	0.5999	5298.21191	111.60309	3.8851
46	30.983	VV	0.2647	2028.66760	92.19882	1.4876
47	31.182	VV	0.5350	4193.20850	94.25372	3.0748
48	32.143	VV	0.3056	2545.66187	101.14226	1.8667
49	32.566	VV	0.2817	2410.14526	107.44080	1.7673
50	32.945	VV	0.4153	4019.60010	117.45526	2.9475
51	33.407	VV	0.2190	1962.76538	108.52529	1.4393
52	34.987	VV	0.6367	1.48051e4	284.70584	10.8564
53	35.462	VV	0.6008	1.65947e4	343.98102	12.1687
54	36.062	VV	0.3032	8103.22021	356.44156	5.9420
55	36.447	VV	0.2267	6137.93945	364.04260	4.5009
56	36.696	VV	0.2748	7365.47412	365.97369	5.4010
57	37.304	VP	0.5741	1.69149e4	409.35349	12.4035

Totals : 1.36372e5 4823.17629

Signal 4: DAD1 D, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.300	BV	0.2615	2.76358e4	1357.37488	37.0153
2	3.432	VB	0.2756	2.28218e4	1320.86145	30.5674
3	6.311	BP	0.4255	670.98358	20.84959	0.8987
4	12.109	BP	0.1469	14.76203	1.44815	0.0198
5	18.652	BP	0.2221	39.05121	2.52986	0.0523
6	20.350	PP	0.1617	22.41593	2.22239	0.0300
7	21.062	VP	0.1785	15.34057	1.41457	0.0205
8	23.555	BP	0.2016	48.21148	3.61517	0.0646
9	25.639	BV	0.2096	96.15564	7.21146	0.1288
10	26.126	VP	0.2088	140.87062	9.97158	0.1887
11	27.028	BB	0.3129	71.53740	3.05795	0.0958
12	27.516	BB	0.3131	140.48294	6.00056	0.1882
13	28.340	BV	0.2619	187.61964	9.77767	0.2513
14	28.679	VV	0.2417	170.64868	9.58551	0.2286
15	29.026	VV	0.3069	175.10670	7.43180	0.2345
16	29.596	VV	0.2443	183.49060	10.37529	0.2458
17	30.057	VP	0.1874	104.40667	8.49298	0.1398
18	31.109	VV	0.3648	106.16139	3.83746	0.1422
19	32.150	VV	0.2791	197.85072	10.07476	0.2650
20	32.550	VV	0.2752	225.80620	11.69599	0.3024
21	33.005	VV	0.4745	724.22589	20.58391	0.9700
22	35.468	VV	0.7489	5660.88184	95.04540	7.5822
23	35.770	VV	0.1666	1084.01782	91.25455	1.4519
24	36.067	VV	0.2508	3120.00610	164.88290	4.1789
25	36.449	VV	0.3697	4481.34424	166.67273	6.0023
26	37.320	VP	0.5113	6521.61328	180.61522	8.7350

Totals : 7.46606e4 3526.88380

10.1.4.2. Fracción Fr₂₋₁₀

Al ensayar la fracción Fr₁₋₂₀ se observó que posee actividad antimicrobiana. Dicha fracción fue sometida a cromatografía en columna obteniéndose diez fracciones (Fr₂₋₁ - Fr₂₋₁₀) tal como se explica en la sección 8.3.5.2.

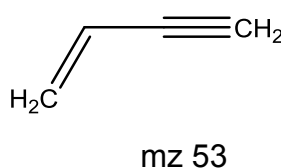
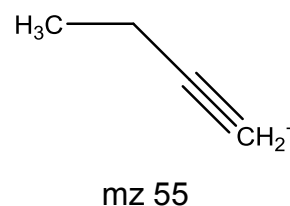
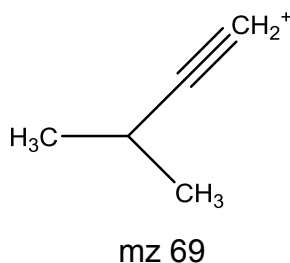
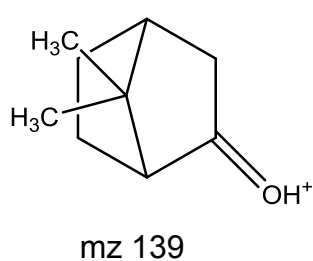
En la fracción Fr₂₋₁₀ se pudo comprobar también la acción antimicrobiana observándose un precipitado blanquecino el cual fue posteriormente analizado mediante HPLC-HRMS.

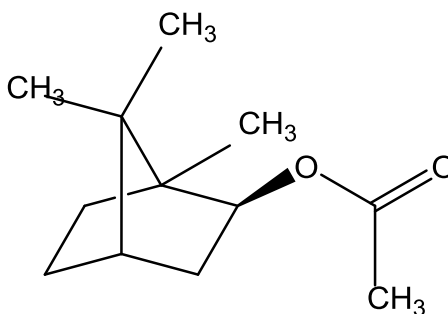
10.1.4.2.1. Compuesto identificado: ACETATO DE BORNILO

La evaluación de la muestra (Fr₂₋₁₀) se realizó analizando los datos de tablas en donde se especifican los distintos picos con su m/z de la fracción de estudio, contrastándolos con aquellos del acetato de bornilo provenientes de su Espectro de Masa (Fig.7) y de la base de datos del National Metrology Institute of Japan (NMIJ) (http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi). El ión molecular de m/z 196 [M⁺] sería compatible con la fórmula molecular C₁₂H₂₀O₂.

El fragmento m/z 139 sería correspondiente a la fórmula molecular C₉H₁₅O⁺, el de m/z 69 perteneciente a C₅H₉⁺, m/z 55 relacionado con C₄H₇⁺ y m/z 53 con C₄H₅ según la Base de Datos HMDB (<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0040397>).

Los compuestos químicos pertenecientes a los fragmentos precedentes se detallan a continuación:



Datos del acetato de bornilo: (*)**Fórmula:** C₁₂H₂₀O₂**Estructura química:****Peso molecular:** 196.2860**Identificador Químico Internacional de IUPAC:** InChI=1S/C12H20O2/c1-8(13)14-10-7-9-5-6-12(10,4)11(9,2)3/h9-10H, 5-7H2,1-4H3/t9,10-,12/m0/s1**Número de registro CAS:** 76-49-3

Otros nombres: Bicyclo [2.2.1] heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, acetate, endo-; Borneol, acetate; Bornyl acetic ether; 2-Camphanol acetate; endo-2-Camphanyl ethanoate; 1,7,7-Trimethylbicyclo (2.2.1) heptan-2-ol acetate; borneyl acetate; bornyl aceate; 1,7,7-Trimethylbicyclo [2.2.1] hept-2-yl acetate; endo-1,7,7-trimethylbicyclo [2.2.1] hept-2-yl acetate.

(*) <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=89-82-7&Units=SI&cMS=on>

SDBS-Mass

MS2014-05107CW

SDBS NO. 7146

bornyl acetate

C₁₂H₂₀O₂

(Mass of molecular ion: 196)

Threshold :

1

Change

29.0	1.7
39.0	1.0
41.0	8.3
43.0	27.1
44.0	1.4
53.0	1.8
55.0	7.4
57.0	1.5
67.0	3.9
69.0	8.9
70.0	4.0
71.0	4.2
72.0	2.6
80.0	11.6
81.0	6.8
82.0	6.6
83.0	5.6
84.0	3.4
85.0	1.0
92.0	8.1
93.0	18.2
94.0	2.6
95.0	100.0
96.0	8.1
97.0	2.1
99.0	1.4
108.0	13.3
109.0	13.4
110.0	13.4
111.0	5.9
113.0	2.2
121.0	29.8
122.0	2.9
123.0	2.0
125.0	1.1
135.0	1.3
136.0	44.7
137.0	6.2
139.0	1.7
153.0	1.3
154.0	13.6
155.0	1.5
196.0	6.9
197.0	1.4

*m/z del acetato de bornilo resaltando los encontrados en la muestra de estudio**(Fr₂₋₁₀) – National Metrology of Japan (NMIJ)*

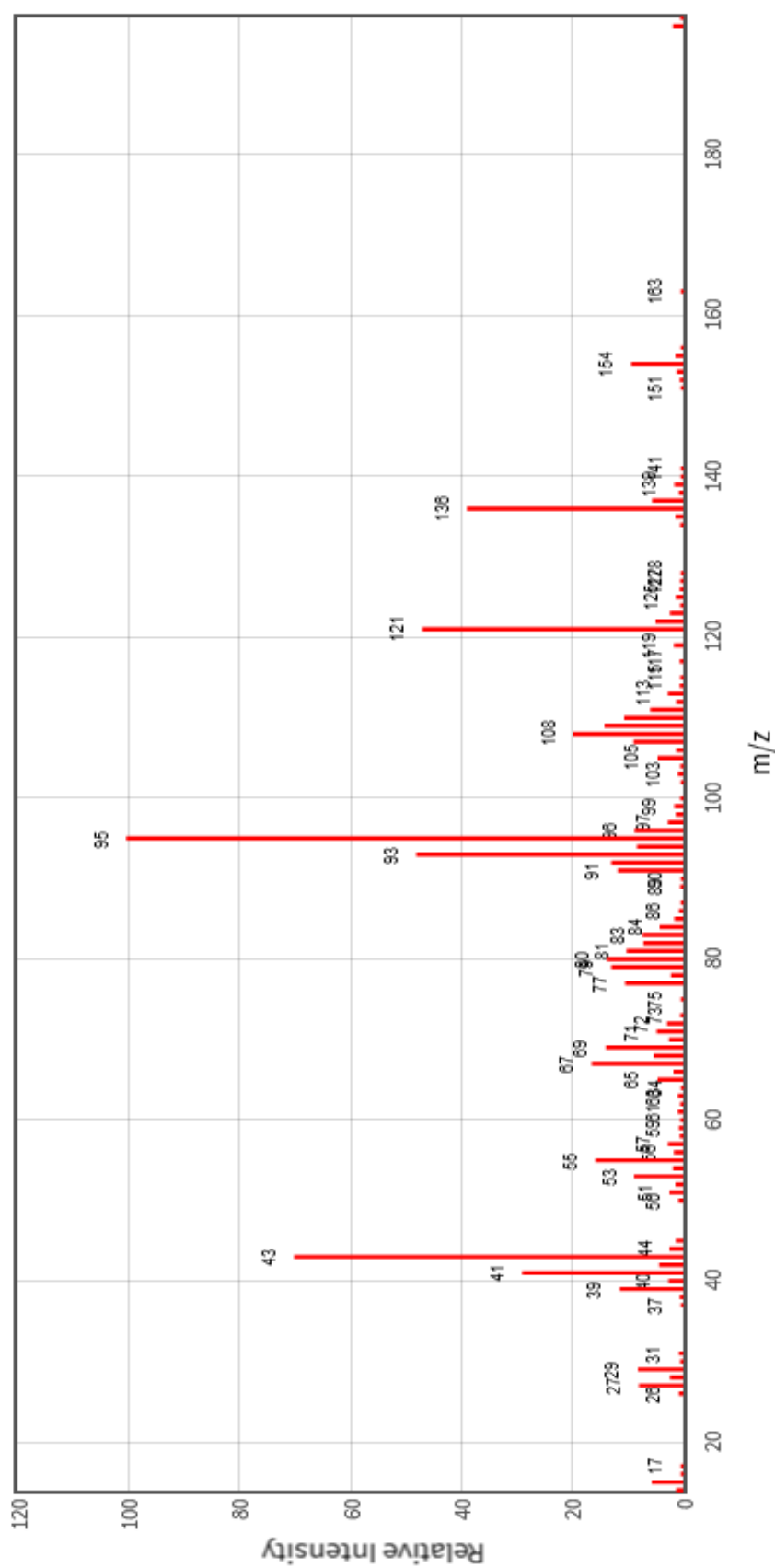


FIGURA N° 7: Espectro de masa del acetato de bornilo
Spectral Database for Organic Compounds (http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)

Se detallan los distintos picos con su respectiva m/z resaltando aquellas coincidentes con m/z del espectro de masas del acetato de bornilo:

Data File C:\HPCHEM\1\DATA\20121119\LBB_0004.D

=====
Area Percent Report
=====

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 2: DAD1 B, Sig=320,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.295	BV	0.2184	2017.67969	139.78314	51.4327
2	3.407	VB	0.1959	1852.37097	133.48872	47.2188
3	35.194	BB	0.2310	52.90156	3.10188	1.3485

Signal 3: DAD1 C, Sig=210,8 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.098	BV	0.0696	14.29110	2.79828	7.881e-3
2	0.237	VV	0.0981	50.91647	6.74542	0.0281
3	0.422	VV	0.1071	94.25034	11.09394	0.0520
4	0.889	VV	0.3012	574.66577	23.34756	0.3169
5	1.056	VV	0.0944	199.40680	26.93370	0.1100
6	1.557	VV	0.4441	1611.74890	44.75617	0.8888
7	1.886	VV	0.0998	382.27509	48.60114	0.2108
8	1.959	VB	0.0940	377.60214	50.06160	0.2082
9	2.142	BV	0.0804	314.52658	53.66640	0.1734
10	2.831	VP	0.3444	4206.02197	168.95720	2.3193
11	3.415	VV	0.4408	9431.59082	273.16754	5.2009
12	4.157	VV	0.0858	475.38571	69.48115	0.2621
13	4.609	VV	0.5845	3236.17871	65.26952	1.7845
14	5.574	VV	0.3562	1624.25806	55.05952	0.8957
15	5.743	VV	0.1344	565.24890	53.87428	0.3117
16	5.809	VV	0.1666	729.89349	53.03469	0.4025
17	6.045	VV	0.0799	296.80402	48.15371	0.1637
18	6.165	VB	0.1103	407.67068	46.49514	0.2248
19	6.352	BV	0.1835	651.77972	44.33869	0.3594
20	6.536	VV	0.5282	1787.13098	40.54524	0.9855
21	7.974	VB	0.0754	15.32760	2.73636	8.452e-3
22	14.630	BP	0.1622	40.45457	3.22802	0.0223
23	15.910	VB	0.1697	24.79906	1.81179	0.0137
24	17.467	VV	0.1772	22.29098	1.55573	0.0123
25	18.216	VV	0.2598	65.65238	3.11623	0.0362
26	18.539	VV	0.0527	6.44158	1.68198	3.552e-3
27	18.628	VV	0.1090	17.02958	2.04894	9.391e-3
28	18.785	VB	0.1768	41.84775	2.96171	0.0231
29	20.311	BP	0.2546	132.27722	7.32931	0.0729
30	21.937	BV	0.1765	69.37983	4.80343	0.0383
31	22.230	VV	0.2586	167.50305	8.85839	0.0924
32	22.462	VV	0.0509	15.39001	3.99475	8.487e-3
33	22.618	VV	0.1766	64.60110	5.07150	0.0356
34	22.779	VV	0.0748	23.96337	4.31345	0.0132
35	23.344	VV	0.3555	259.40405	8.70826	0.1430
36	23.907	VV	0.4352	531.48755	14.86317	0.2931
37	24.348	VV	0.3184	317.89053	12.18428	0.1753
38	25.048	VV	0.3057	305.28412	12.21008	0.1683
39	25.704	VV	0.3973	630.17944	19.28354	0.3475
40	26.108	VV	0.2829	446.99713	20.94821	0.2465
41	26.383	VV	0.2138	269.12448	16.03786	0.1484
42	26.802	VV	0.1830	231.10898	16.54037	0.1274
43	27.761	VV	0.4657	2605.10254	70.40820	1.4365
44	28.346	VV	0.2403	933.36163	51.29798	0.5147
45	28.682	VV	0.2559	1298.84802	68.27668	0.7162
46	29.035	VV	0.2266	1267.57788	77.57718	0.6990
47	29.224	VV	0.6409	4253.29004	78.89655	2.3454
48	30.462	VV	0.3892	1539.54858	49.18119	0.8490
49	30.855	VV	0.5217	2186.07959	50.23580	1.2055
50	32.348	VV	0.4094	1356.82361	46.36952	0.7482
51	32.708	VV	0.1963	393.58221	26.64482	0.2170
52	33.131	VV	0.3756	839.22327	29.52394	0.4628
53	33.506	VV	0.3294	564.40112	22.43929	0.3112
54	35.439	VV	0.5885	1.52675e4	323.54034	8.4190
55	35.820	VV	0.6178	1.72063e4	333.59012	9.4881
56	36.716	VV	0.7847	2.08967e4	329.15967	11.5231
57	37.823	VV	0.4198	9349.29297	301.44260	5.1555
58	38.633	VV	0.2674	1.78948e4	817.36505	9.8678
59	38.731	VV	0.0630	3715.16016	817.95477	2.0487
60	38.850	VV	0.1056	6561.66602	818.25391	3.6183

Signal 4: DAD1 D, Sig=230,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.563	BP	0.2087	40.69673	2.51555	0.0230
2	2.831	PV	0.1286	364.13351	46.87245	0.2057
3	3.297	VV	0.2567	2.19439e4	1250.79785	12.3954
4	3.401	VB	0.3256	2.49636e4	1246.64819	14.1011
5	14.622	BP	0.1979	60.88729	4.73870	0.0344
6	20.310	BP	0.2757	107.21001	5.69196	0.0606
7	21.906	BV	0.2892	93.05430	4.35611	0.0526
8	22.225	VB	0.2269	56.47319	3.37987	0.0319
9	22.599	BP	0.1557	19.66478	1.91637	0.0111
10	23.893	BP	0.2105	54.98684	3.76262	0.0311
11	25.073	BV	0.2030	39.62267	2.52624	0.0224
12	25.620	VV	0.3212	400.32516	18.16066	0.2261
13	26.099	VB	0.2713	358.87689	18.58385	0.2027
14	26.760	BV	0.1876	36.10219	2.74269	0.0204
15	27.014	VV	0.2390	69.50119	4.07442	0.0393
16	27.756	VV	0.2564	614.01202	32.79613	0.3468
17	28.340	VV	0.2350	292.66266	16.81921	0.1653
18	28.672	VV	0.2340	383.29990	22.36000	0.2165
19	29.230	VV	0.7029	1609.74524	28.32864	0.9093
20	30.567	VP	0.6859	1044.64600	18.13810	0.5901
21	32.343	VP	0.3359	456.24078	21.82339	0.2577
22	33.151	VV	0.3262	224.80365	10.07865	0.1270
23	33.499	VP	0.2668	97.03718	4.90565	0.0548
24	34.943	VV	0.3063	1531.76099	66.10167	0.8652
25	35.413	VV	0.3464	1911.89331	75.25982	1.0800
26	35.808	VV	0.3100	1805.41162	79.18420	1.0198
27	36.303	VV	0.3453	2467.88550	92.48682	1.3940
28	36.509	VV	0.2335	1542.69971	92.03894	0.8714
29	36.877	VV	0.3929	2666.31030	90.70497	1.5061
30	37.829	VV	0.4398	3874.51221	119.01886	2.1886
31	38.588	VV	0.1699	1.94282e4	1435.48914	10.9743
32	38.649	VV	0.0552	5314.88379	1435.59717	3.0022
33	38.738	VV	0.0792	7527.34961	1435.62402	4.2519
34	38.802	VV	0.0684	7438.54150	1436.22839	4.2018
35	38.923	VV	0.1008	1.09373e4	1436.23645	6.1781
36	39.006	VBA	0.4794	5.72547e4	1435.17334	32.3413

10.2. Actividad Biológica

10.2.1. Determinación de la actividad antimicrobiana.

Las fracciones Fr₁₋₉, Fr₁₋₁₄, Fr₁₋₁₅, Fr₁₋₁₆, Fr₁₋₂₀ y Fr₁₋₂₂ provenientes del EHC como así también el extracto EDCM_T hallado del S de la fracción Fr₁₋₂₂ y la Fr₂₋₁₀, de la Fr₁₋₂₀, demostraron tener propiedad antimicrobiana.

Estas fracciones se ensayaron frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. El experimento consistió en la determinación de la actividad antimicrobiana empleando dos métodos para su análisis: el método de “cilindro placa” (USP 29), entre los métodos de difusión y el “Contact bioautography” como método bioautográfico.

10.2.1.1. Método del cilindro placa (USP 29) y CCD - Bioautográfica (Contact bioautography).

Las fracciones Fr₁₋₉, Fr₁₋₁₄, Fr₁₋₁₅, Fr₁₋₁₆, Fr₁₋₂₀, Fr₁₋₂₂, EDCM_T y Fr₂₋₁₀, fueron evaluadas por este procedimiento tal como se explica en la sección 9.1.1.4. Se implementó esta técnica en donde se observaron las manchas de cada una de las fracciones que presentaron actividad antimicrobiana.

Las placas cromatográficas de cada una de las fracciones ensayadas fueron corridas empleando como fase móvil: éter de petróleo: diclorometano (4:1).

Para visualizar las manchas que presentaban actividad antimicrobiana (halo de inhibición), los cromatofolios después de ser incubados, fueron esprayados con sal de tetrazolio. Se observaron las zonas de inhibición por la detección de la actividad deshidrogenasa con dicha sal, visualizándose las manchas activas de color rojo en contraste con un fondo incoloro.

Las zonas de actividad antimicrobiana fueron evidenciadas, en las cromatografías en placa fina, en un rango de R_f que osciló entre 0,5 a 0,8.

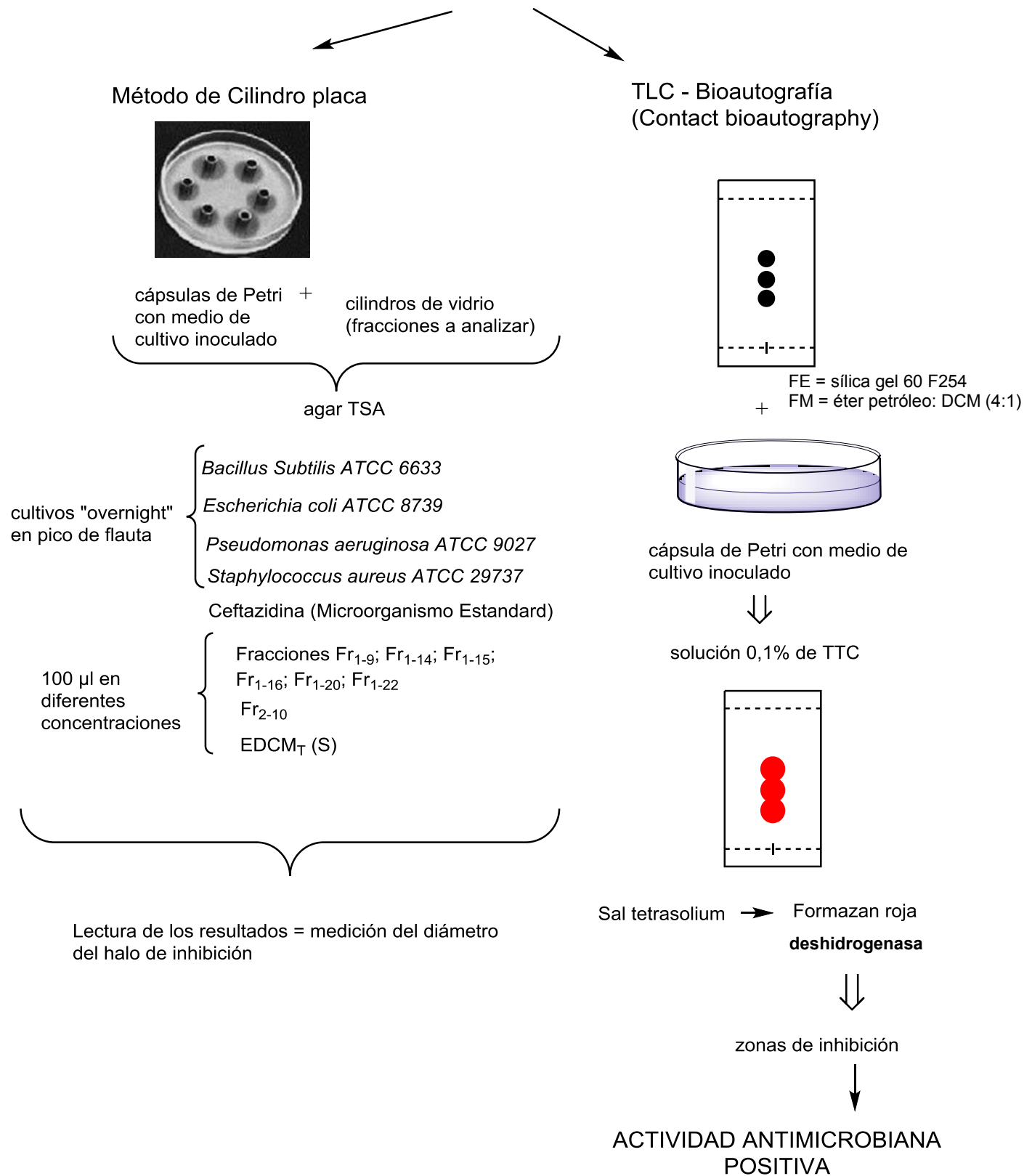
Se observó que las soluciones de las muestras testeadas dentro del agar causaron inhibición de crecimiento únicamente frente a *Staphylococcus aureus*.

La siguiente tabla resume la actividad antimicrobiana de las diferentes fracciones del Extracto Hexánico de *Eugenia uniflora* L.: se puede apreciar que únicamente hubo actividad biológica contra la bacteria Gram + *Staphylococcus aureus* y se detectó una actividad negativa frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El rango de concentraciones ensayadas para cada microorganismo osciló entre 67.000 y 195 µg/ml.

# FRACCIONES	MICROORGANISMOS			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fr ₁₋₉	++	0	0	0
Fr ₁₋₁₄	++	0	0	0
Fr ₁₋₁₅	++	0	0	0
Fr ₁₋₁₆	++	0	0	0
Fr ₁₋₂₀	++	0	0	0
Fr ₁₋₂₂	++	0	0	0
EDCM _T	++	0	0	0
Fr ₂₋₁₀	++	0	0	0

Tabla 10-2. Actividad antimicrobiana por los métodos del cilindro placa y CCD – Bioautográfica (Contact Bioautography). La inhibición fue registrada como: 0 (sin inhibición) y ++ con $dr > 1.00$ (donde $dr > 1.00$ es el diámetro de la zona de inhibición en cm.).

ESQUEMA - ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA



11. *Discusión*

Actividad antimicrobiana en *Eugenia* spp.

El género *Eugenia* es muy estudiado en cuanto a su actividad biológica. Estudios realizados en dicho género, demostraron poseer actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*; tal como lo registra Magina *et al.* (2009) en el aceite esencial de hojas de *Eugenia brasiliensis* y Stefanello *et al.* (2008) en *Eugenia umbelliflora* O. Berg. Ambos investigadores comprobaron que el aceite esencial de tallos, hojas y flores de *Eugenia caryophyllata* Thunb. evidenció actividad biológica frente a *Staphylococcus aureus* pero no frente a *Escherichia coli* y a *Pseudomonas aeruginosa*.

El extracto crudo y fracciones de cloruro de metileno y acetato de etilo de hojas y frutos de *Eugenia umbelliflora* O. Berg, confirmaron ser activos frente a *Staphylococcus aureus*. (Machado *et al.*, 2005). El extracto metanólico de tallos, hojas y frutos de *Eugenia brejoensis* Mazine evidenció actividad positiva frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Azevedo *et al.*, 2012) como así también los extractos metanólico, de acetato de etilo y de acetona provenientes de tallos y frutos de *Eugenia caryophyllata* Thunb.: demostraron ser activos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Keskin *et al.*, 2011)

El extracto etanólico de hojas de *Eugenia brasiliensis* Lam. reveló inactividad contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* y actividad positiva contra las bacterias Gram negativa *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Magina *et al.*, 2012)

El aceite esencial de fruto de *Eugenia caryophyllata* Thunb., también evidenció actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e inactividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*. (Kloucek *et al.*, 2012); igualmente Nuñez *et al.*, 2012, demostraron su actividad biológica contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y

Pseudomonas aeruginosa como así también el trabajo realizado por Oussalah *et al.* (2007), mostró su actividad frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Actividad antimicrobiana en *Eugenia uniflora* L.

En el aceite esencial de hojas, Silva *et al.* (2012), comprobaron que resultó ser más activo frente a *Staphylococcus aureus* que en *Escherichia coli*. Asimismo, Adebajo *et al.* (1989) demostraron actividad positiva frente a *Pseudomonas aeruginosa* pero inactividad contra *Staphylococcus aureus*. Novack Victoria *et al.*, 2012, a través del método de difusión en agar de disco y empleando como control positivo Sulfadiazina y Cefalotina, comprobaron una fuerte actividad frente a *Staphylococcus aureus*.

A través del ensayo de difusión en disco y empleando como control positivo Cloranfenicol, Lago *et al.* (2011) revelaron que el aceite esencial de hojas poseía actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Fiuza *et al.* (2009), evaluaron también a través del método de difusión en disco, la actividad antimicrobiana del extracto crudo etanólico de hojas y fracciones de acetato de etilo, de diclorometano y de hexano de dicho extracto. Tanto el extracto etanólico como las fracciones de acetato de etilo y de diclorometano, fueron activos frente a *Pseudomonas aeruginosa*, no así la fracción hexánica revelando una marcada diferencia con la presente investigación.

El trabajo ejecutado por Schapoval *et al.* (1994), demostró que tanto la infusión como la decocción de hojas, no demostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y a *Escherichia coli*. Semejante a nuestro trabajo, realizaron el método de difusión en gel de agar, el cilindro placa, pero utilizando como medio de cultivo el de Grove-Randall y como sustancia de referencia el Cloranfenicol, a diferencia de la *Ceftazidina* empleada en este estudio.

Holetz *et al* (2002), evidenciaron que el extracto hidroalcohólico de hojas fue prácticamente inactivo tanto para *Pseudomonas aeruginosa* como para *Bacillus subtilis*, pero su actividad fue moderada frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Similar a este análisis, emplearon la técnica de Bioautografía para evaluar la acción

biológica. En contraposición, Gonçalves *et al* (2005), comprobaron una buena actividad frente a *E. coli* y *S. aureus*.

El trabajo realizado por Auricchio *et al.* (2007), demostró una actividad importante frente a *Staphylococcus aureus* y moderada contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en el extracto hidroalcohólico de hojas de *Eugenia uniflora* L. El extracto metanólico de hojas fue activo frente a *Staphylococcus aureus*, empleando como control positivo Anfotericina B y Oxacilina. (Samy *et al.*, 2014)

Oliveira *et al.*, 2008, verificaron que el extracto crudo de semillas determinó una actividad contra las bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus* y Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa*. El mismo extracto mostró una moderada inhibición frente a *Bacillus subtilis* (bacteria Gram positiva) como así también con la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*.

Compuestos químicos identificados

En la fracción Fr₁₋₉ fue encontrado **Pulegona** mediante un análisis de HPLC-MS como fue explicado en 10.1.3.1. (pág. 96). Estudios previos muestran la presencia de este compuesto en el aceite esencial de hojas mediante hidrodestilación, Peixoto *et al.* (2008).

El **Germacrone** fue identificado en la Fracción Fr₁₋₁₅ a través del análisis de HPLC-MS (detallado en resultados, en la sección 10.1.3.2.). Es uno de los compuestos químicos que se encuentra en mayor proporción en el aceite esencial de hojas del género *Eugenia*. Estudios realizados en *Eugenia uniflora* L. revelan la presencia del compuesto Germacrone: en el aceite esencial de hojas - Weyestahl *et al.* (1988), Melo *et al.* (2007).

El **ácido ursólico** fue hallado en la fracción Fr_{D3} por HPLC-HRMS, ayudado por una base de datos del National Metrology Institute of Japan (NMIJ). Su presencia además fue avalada por la realización de una cromatografía en capa delgada contra testigo tal como fue explicado en el capítulo 8, en 8.3.5.1.2. En una fracción de éter de

petróleo derivada de un extracto etanólico de hojas de *Eugenia brasiliensis* Lam., fue identificado también este ácido triterpénico monohidroxlado. (Frighetto *et al.*, 2005)

El **acetato de bornilo** fue encontrado en la fracción Fr₂₋₁₀ a través de un análisis por HPLC-HRMS, hallando fragmentos provistos por la base de datos HMDB; fue identificado también en el aceite esencial de hojas de *Eugenia octopleura* Krug & Urb. (Santana Tenorio *et al.*, 2011).

12. Conclusiones

La evolución y el desarrollo de las enfermedades infecciosas y la resistencia a los antibióticos actuales generados en gran parte por el consumo indiscriminado de los mismos, revelan la necesidad de búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas para tratar tales infecciones. Las fracciones obtenidas del extracto hexánico de hojas de *Eugenia uniflora* L. revelaron una marcada actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* pero no contra las otras bacterias ensayadas (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*).

En la fracción Fr₁₋₉ se halló el compuesto químico Pulegona.

En la fracción Fr₁₋₁₅ se identificó el componente químico Germacrone.

En la fracción Fr_{D3} se identificó el ácido ursólico.

En la Fracción Fr₂₋₁₀, fue encontrado el acetato de bornilo.

De acuerdo al R_f del ácido ursólico, en los sistemas cromatográficos empleados, y la ubicación de los componentes químicos en la placa cromatográfica con actividad antimicrobiana (manchas de color rojo), podría presumirse que uno de los compuestos presentes en el extracto hexánico con acción biológica sería el ácido ursólico.

Debido a que la fracción Fr_{D3} derivada de EDCM_T que posee actividad antimicrobiana, como así también la fracción Fr₁₋₂₂ que fue evaluada inicialmente, podría inferirse dicha acción biológica en Fr_{D3} en donde la actividad se deba posiblemente en parte a la presencia del compuesto químico hallado (ácido ursólico).

La “Bioautografía” resultó ser un método útil para encontrar nuevas moléculas antimicrobianas ya que mediante esta técnica se han encontrado componentes naturales activos contra *Staphylococcus aureus*. Su aplicación fue exitosa en la detección de sustancias antimicrobianas en las fracciones provenientes del extracto hexánico de hojas de *Eugenia uniflora* L.

Los resultados se presentaron interesantes ya que la resistencia bacteriana será una de las primeras causas de muerte a nivel mundial calculadas para el año 2050.

13. Bibliografia

- ADEBAJO, A. C.; OLOKE, K. J.; ALADESANMI, A. J. 1989. Antimicrobial activities and microbial transformation of volatile oils of *Eugenia uniflora*. *Fitoterapia*, Vol. LX, N° 5.
- AKERELE, O. 1987. The best of both worlds: Bringing traditional medicine up to date. *Social Science & Medicine* 24(2):177-81.
- ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO, R. *et al.* 1995. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saúde Pública* 29 (6), 428 – 433.
- ALLEGIANZI, B.; BAGHERI NEJAD, S.; COMBESCURE, C. *et al.* 2011. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *Lancet (Lond, Engl)* 377:228–41.
- AL-HASAN, M. N.; WILSON, J. W.; LARH, B. D. *et al.* 2008. Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: A population-based study. *Am J Med* 121 (8): 702-8.
- ALOUSH, V.; NAVON-VENEZIA, S.; SEIGMAN-IGRA, Y. *et al.* 2006. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:43 – 8.
- AMAT, A. G. & VAJIA, M.E. 1991. Plantas Medicinales y Etnofarmacología en la Provincia de Misiones (Argentina). *Acta Farm. Bonaerense* 10 (3) 153-9.
- AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C. *et al.* 2009. Antinociceptive and hypothermic avaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). *Phytomedicine* 16, 923 – 928.
- AMUQUINI, H.; TZIPORI, S. 2012. *Bacillus subtilis*: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. *Hum Vaccin Immunother* 8: 979–986.
- APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. *et al.* 2004. Essential oils from *Eugenia* species – Part VII: sections Phyllocalyx and Stenocalyx. *J. Essent. Oil Res.* 16, 135 – 138.
- APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S. *et al.* 2004. Chemical composition of the essential oils of *Eugenia hyemalis* and *Eugenia stigmatis*. Part VI: section Biflorae. *J. Essent. Oil Res.* 16, 437 – 439.

- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y. *et al.* 1999. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J. Ethnopharmacol.* 68 (1-3):307-14.
- Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 1984, 14th ed., secs 16.163, AOAC, Arlington, VA, p. 42.299.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M. *et al.* 2007. Actividades antimicrobiana e antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora*. *Lat. Am. J. Pharm.* 26(1): 76- 81.
- AUSTIN, D. J.; KRISTINSSAN, K. G.; ANDERSAN, R. M. 1999. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1152 – 1156.
- AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 240 – 246.
- AZEVEDO, P. R.; SILVA, L. C. N.; SILVA, A. G. *et al.* 2012. Antimicrobial activity and phytochemical screening of branches, fruits and leaves of *Eugenia brejoensis*. *Scientia plena Vol. 8, N° 5*.
- BAE, E. A.; HAN, M. J.; KIM, N. J. *et al.* 1998. Anti-helicobacter pylori activity of herbal medicines. *Biol. Pharm. Bull.* 21 (9):990 – 992.
- BANDONI, A. L.; MENDIONDO, M. E.; RONDINA, R.V.D. *et al.* 1972. Survey of argentine medicinal plants. I. Folklore and phytochemical screening. *Llodya* 35, 69-80.
- BAGETTI, M.; FACCO, E. M.; PICCOLO, J. *et al.* 2011. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas* 31(1): 147-154.
- BARBOZA, G.; CANTERO, J. J.; NUÑEZ, C. *et al.* 2006. *Flora Medicinal de la Provincia de Córdoba (Argentina). Pteridófitas y Antófitas silvestres o naturalizadas*. Museo Botánico de Córdoba. Córdoba.
- BARBOZA, G.; CANTERO, J. J.; NUÑEZ, C. *et al.* 2009. *Museo Botánico - KURTZIANA. Volumen especial: Plantas Medicinales*. Córdoba. Argentina; Tomo 34 (1-2): 7-365.

- BECKER, K.; HU, Y.; BILLER-ANDORNO, N. 2006. Infectious Diseases: A global challenge. *Int. J. Med. Microbiol.* 296 (4-5): 179-185.
- BEGHE, W. J.; KLINE, R. M. 1972. The use of tetrazolium salts in bioautography procedures, *Chromatogr Vol.* 64, p. 182.
- BERTRAND, X.; SLEKOVEC, C.; CHOLLEY, P. *et al.* 2011. Épidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Revue Francophone des Laboratoires. Issue 435, Pages 35-40.*
- BERTHELOT, P.; GRATTARD, F.; MALLAVAL, F.O. *et al.* 2005. Épidémiologie des infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*. *Pathol Biol (Paris)* 53 (6): 341-8.
- BISSET N. (ed.). 1994. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis.* Ed. Medpharm. Sc. Publishers, Stuttgart-CRC Press, Boca Raton.
- BLUMENTAHL M. 1998. *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines.* Austin: American Botanical Council.
- BONAT CELLI, G.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. 2011. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International* 44, 2442–2451.
- BRANDELLI, C.L.; GIORDANI, R.B.; DE CARLI, G.A. *et al.* 2009. Indigenous traditional medicine: in vitro anti-giardial activity of plants used in the treatment of diarrhea. *Parasitol Res.* 104(6):1345-9.
- BUSSMANN, R.W.; MALCA-GARCÍA, G.; GLENN, A. *et al.* 2010. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J. Ethnopharmacol.* Oct 28; 132 (1):101-8.
- C. NATIONAL FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS., *Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico.*1998.
- CALDECOTT, J. O.; JENKINS, M. D.; JOHNSON, T. H. *et al.* 1996. Priorities for conserving global species richness and endemism. *Biodiversity & Conservation* 5: 699 – 727.

- CAMACHO ROMERO, O.; MELGAREJO, I. S.; GÓMEZ, I. C. 2016. Correlación del contenido de fenoles y antocianinas con la capacidad antioxidante *Syzygium cumini* (L.) Skeels, (jambolan). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 21(1):63-70.
- CASTRO, RAFAELA A.; ALBIERO, ADRIANA L.M. 2016. *Revista Fitos, Rio de Janeiro, Vol. 10(1), 1-93.*
- CECÍLIO, A. B.; DE FARIA, D. B.; CARVALHO OLIVEIRA, P. *et al.* 2012. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. *Journal of ethnopharmacology* 141, 975- 981.
- CHANG, R.; DE MORAIS, S. A. L.; NAPOLITANO, D. R. *et al.* 2011. A new approach for quantifying furanodiene and curzerene. A case study on the essential oils of *Eugenia uniflora* (pitangueira) leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21 (3): 392 – 396.
- CHATTERJEEA, M.; ANJUA, C.P.; BISWASA, L. *et al.* 2016. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *International Journal of Medical Microbiology Volume 306, Issue 1, p. 48–58.*
- CHEGUIRIÁN, M. L.; CARVAJAL, L.R.; LEDESMA, E.M. *et al.* 2008. Prevalencia de microorganismos causantes de bacteriemias y fungemias en pacientes oncológicos pediátricos. Patrones de sensibilidad a los antimicrobianos. *Rev Arg Microbiol* 40 (2): 111-5.
- CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. 2011. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A* doi:10.1016/j.chroma.2010.12.069
- CIRQUEIRA, R.T.; ALVES, M. J. Q. F. 2005. Efeitos hipotensivo e diurético dos extratos aquosos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e jambolão (*Eugenia jambolana* Lam.) anestesiados. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v. 7, n. 2, p. 86. – 91.*
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS, 1976. Title 21, Sec. 436.105, U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- COLE, M. D. 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assay – a critical review. *Biochemical Systematics and Ecology* Vol. 22, p. 837.

- COLE, R. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. 2007. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 877 – 886.
- COLORADO, J. R.; GALEANO, E. J.; MARTÍNEZ, A. M. 2007. Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica ISSN 0121-4004 Volumen 14 número 1.
- COMITÉ L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIÉTÉ FRANC DE MICROBIOLOGIE., Technical recommendations for in vitro susceptibility testing. 1996. *Clin Microbiol Infect* Vol. 2, S11.
- CONSOLINI, A.; BALDINI, O.; AMAT, A. 1999. Pharmacological basic for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. *Journal of ethnopharmacology* 66, 33-39.
- CONSOLINI, A. E.; SARUBBIO, M. G. 2002. Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rat's heart. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 57-63.
- CORDELL, G. A.; BEECHER, C. W. W.; PEZZUTO, J. M. 1991. Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *J. Ethnopharmacol.* 32, 117 – 133.
- COS, P.; VLIETINCK, A. J.; VANDEN BERGHE, D. *et al.* 2006. Antiinfective potntial of natural products: How to develop a steronger in vitro proof of concept. *Ethnopharmacology Vol.106*, p. 290.
- COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C. *et al.* 2000. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 111 – 117.
- COSTA, D. P.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A. *et al.* 2010. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *J. Braz. Chem. Soc. Vol. 21, N° 5*, 851 – 858.
- COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O. *et al.* 2010. Anti-staphylococcal activity of *Eugenia jambolana* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Properties* 13: 1405 – 1410.

- COX, P. A.; BALICK, M. J. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American* 270: 82 -87.
- CRUZ-CARRILLO, A.; RODRÍGUEZ, N.; RODRÍGUEZ, C. E. 2010. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Rev UDCA Act. & Div Cient.* 13(2):117-124.
- CUTTING, S.M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol* 28: 214–220.
- DA FRANCA RODRIGUES, K. A.; AMORIM, L. V.; GUERRA DE OLIVEIRA, J. M. *et al.* 2013. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 279726, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/279726>.
- DAMÁSIO DE SOUZA, R.; TAVARES BATISTA, M.; BARROS LUIZ, W. *et al.* 2014. *Bacillus subtilis* Spores as Vaccine Adjuvants: Further Insights into the Mechanisms of Action. *PLOS ONE Volume 9, Issue 1*, e87454.
- DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N. *et al.* 1985. *Tratado de Microbiología*. 3ª edición, Editorial Salvat, España.
- DE MORAIS, S.; CRAVEIRO, A.; MACHADO, M. *et al.* 1996. Volatile Constituents of *Eugenia uniflora* Leaf Oil from Northeastern Brazil. *J. Essential Oil Res.* 8 (4), 449 – 451.
- DE SOUZA, G.C.; HAAS, A.P.; VON POSER, G.L. *et al.* 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 90(1):135-43.
- DE VEDIA, L.; LISTA, N.; PIOVANO, G. *et al.* 2012. *Staphylococcus aureus* metilicilino resistente adquirido en la comunidad: una nueva amenaza. *Rev Am Med Resp* 4:131-9.
- DÍAZ DE LA NOVAL, B.; VEGA JIMÉNEZ, M. A.; GÓMEZ ALARCÓN, A. 2016. Ectima gangrenoso por *Pseudomona aeruginosa*. *Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia Vol. 43. Núm. 4*.
- DIMITRI, MILÁN J. 1988. *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Tomo I: Descripción de las Plantas cultivadas. Vol II Editorial ACME S.A.C.I., Buenos Aires.

- DOUGLAS COUTINHO, H.; MARTINS COSTA, J. G.; PINTO SIQUEIRA JR. *et al.* 2010. In vitro screening by phototoxic properties of *Eugenia uniflora* L., *Momordica charantia* L., *Mentha arvensis* L. and *Turnera ulmifolia* L. *R. bras. Bioci., Porto Alegre v. 8, n. 3, p. 299-301.*
- E. EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. 2000. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution, *Clinical Microbiology and Infection Vol. 6(9), p. 509.*
- EL-SHABRAWY, A. 1995. Essential oil composition and tannin contents of the leaves of *Eugenia uniflora* L. grown in Egypt. *Bull Fac. Pharm. Cairo Univ. 33(3):17-21.*
- EUSÉBIOA, A.; ARAÚJOA, C.; ANDRADEA, M. *et al.* 2016. Escherichia coli nas infecções urinárias da comunidade: comensal ou patogénica?. *Acta Urológica Portuguesa. 33(2):37- 42.*
- FADEYIT, M. O. ; AKPAN, U. E. 1989. Antibacterial Activities of the Leaf Extracts of *Eugenia uniflora* Linn. (Synonym *Stenocalyx michelli* Linn.) *Myrtaceae. Phytotherapy Research Vol. 3, No. 4, p. 154 – 155.*
- FARLEY, J.E.; HAYAT, M.J.; SACAMANO, P.L. *et al.* 2015. Prevalence and risk factors for methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an HIV-positive cohort. *Am. J. Infect Control 43(4):329–35.*
- FARNSWORTH N. R. & D. D. SOEJARTO. 1991. Global importance of medicinal plants, en O. Akerele, V. Heywood & H. Synge (eds.). *Conservation of Medicinal Plants* Cambridge University Press, Cambridge, UK. p. 25 – 51.
- FERREIRA, H.; LALA, E.R.P. 2010. Pseudomonas aeruginosa: Um alerta aos profissionais de saúde. *Rev Panam Infectol 12 (2): 44-50.*
- FICHI, G.; FLAMINI, G.; GIOVANELLI, F. *et al.* 2007. Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. *Experimental Parasitology 115, p. 168 – 172.*
- FIUZA, T. S.; SABÓIA – MORAIS, S. M. T.; PAULA, J. R. *et al.* 2009. Antimicrobial activity of the crude ethanol extract and fractions from *Eugenia uniflora* leaves against *Pseudomonas aeruginosa*. *Lat. Am. J. Pharm. 28 (6): 892 – 8.*
- FREIXA, B.; VILA, R.; VARGAS, L. *et al.* 1998. Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants. *Phytotherapy Research Vol. 12, (6), p. 427.*

- FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R. M.; SILVA, A. M. P. *et al.* 2005. Aplicação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15(4): 338 – 343.
- GALLUCCI, S.; NETO, A. P.; PORTO, C. *et al.* 2010. Essential oil of *Eugenia uniflora* L.: an industrial perfumery approach. *Journal of Essential Oil Research* Vol. 22, 176 – 179.
- GAMBOA-ANGULO, M. M.; ALEJO, J. C.; MEDINA-BAIZABAL, I. L. *et al.* 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan península, Mexico. *World J. Microbiol. Biotechnol* 24: 1955 – 1959.
- GARRIDO MONTAÑANA, R. 2005. Las Plantas medicinales aliadas de nuestra salud. 1ª edición, Editorial Morales i Torres, S.L., España.
- GIERSING, B. K.; DASTGHEYB, S. S.; MODJARRAD, K. *et al.* 2016. Status of vaccine research and development of vaccines for *Staphylococcus aureus*. *Vaccine* 34, 2962–2966.
- GIL, M.J.; MANU, M.; MARTINEZ, V. *et al.* 1999. Nuevos agentes antineoplásicos: diseño, síntesis y determinación experimental, *ANALES Sis San Navarra* Vol. 22(3), p. 85.
- GOMES, T.; CARNEIRO, A.R.; PERRELLI, K. *et al.* 2012. In Vitro Synergistic Effect of *Psidium guineense* (Swartz) in Combination with Antimicrobial Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Scientific World Journal*. ID 158237.
- GOPAN, R.; VARUGHESE, G. 2011. Chemical Analysis of essential oil from the leaves of *Eugenia argentea* Bedd. *Journal of Essential Oil Research* vol. 23, p. 55 – 57.
- GORAK, E.J.; YAMADA, S.M.; BROWN, J.D. 1999. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. *Clin Infect Dis*. 29(4):797-800.
- GRÜNWALD, J.; BÜTTEL, K. 1996. The European phytotherapeutics market. *Drugs Made in Germany* 39: 6 – 11.
- GU, J. - Q.; PARK, E. J.; LUYENGI, L. *et al.* 2001. Constituents of *Eugenia sandwicensis* with potential cancer chemopreventive activity. *Phytochemistry* 58, 121 – 127.

- GUIMARÃES, A. G.; MELO, M. S.; BONFIM, R. R. *et al.* 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Eugenia candolleana* DC., *Myrtaceae*, on mice. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19 (4): 883 – 887.
- GÜLÇİN, I.; GÜNGÖR, S.; BEYDEMİR, S. *et al.* 2004. Comparasion of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry* 87, 393 – 400.
- GURIB-FAKIM, A. 2006. Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. Special Edition. Elsevier Publications, UK.
- HACEK, D. M.; DRESSEL, D. C.; PETERSON, L. R. 1999. Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique", *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 37(6).
- HADACEK, F.; GREGER, H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, Vol. 11(3), p. 137.
- HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. 1987. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Natural Products* Vol. 50, p. 19.
- HEINRICH, M.; GIBBONS, S. 2001. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contributions. *J. Pharm. & Phatmacol.* 53: 425 – 432.
- HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M. E.; CAUDURO, A. D. *et al.* 1993. Aromatic Plants from Brazil II. The Chemical Composition of Some *Eugenia* Essential Oils. *J. Essent. Oil Res.* 5,501-505.
- HEROLD, B.C.; IMMERGLUCK, L.C.; MARANAN, M.C. *et al.* 1998. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. *JAMA.* 279(8):593-8.
- HIERONYMUS, J. 1882. *Plantae diaphoricae florum argentinæ*. Ed. Kraft, Buenos Aires.
- HMDB (<http://www.hmdb.ca>).
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R. *et al.* 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* Vol. 97 (7): 1027 – 1031.

- HOYOS, A.; SUAREZ, M.; MASSARO, M. *et al.* 2010. Infección del torrente circulatorio en una unidad de neonatología de Medellín-Colombia, 2008-2009. *Rev Chil Infect* 27 (6): 491-8.
- <https://cdcnuestrapagina.wordpress.com/2013/04/07/uso-indiscriminado-de-antibioticos/>
- http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi
- <http://www.fda.gov>, 2009.
- <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- <http://www.nutropedia.es/secciones/guia-de-empresas/fitoterapia/>
- http://www.who.int/drugresistance/microbes_and_antimicrobials/es/
- HUANG, J.M.; HONG, H.A.; VANTONG, H. *et al.* 2010. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. *Vaccine* 28: 1021–1030.
- INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. 2004. Introducción a la Microbiología. Editorial Reverté S.A., España.
- INSTITUTO DE BOTÁNICA DARWINION (<http://www.darwin.edu.ar>).
- ISADA, C. M.; BERNARD, L. K.; GOLDMAN, M. P. *et al.* 2001. Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures.
- JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A. *et al.* 2007. Plant Systematics: A phylogenetic approach. 3rd Edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- KADE, I. J.; OLUWAFEMI IBUKUNA, E.; WAYNE NOGUEIRAB, C. *et al.* 2008. Sun-drying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. *Experimental and Toxicologic Pathology* 60, 365–371.
- KANAZAWA, A.; PATIN, A.; GREENE, A. E. 2000. Efficient highly enantioselective synthesis of selina – 1, 3, 7 (11) – trien – 8 – one, a major component of the essential oil of *Eugenia uniflora*. *J. Nat. Prod.* 63, 1292 – 1294.
- KAPLAN, S.L.; HULTEN, K.G.; GONZALEZ, B.E. *et al.* 2005. Three-year surveillance of community-acquired *Staphylococcus aureus* infections in children. *Clin Infect Dis.* 40(12):1785-91.
- KAUFMAN, P. B.; CSEKE, L. J.; WARBER, S. *et al.* 1999. *Natural Products from Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

- KELECOM, A.; ROCHA, M. A.; MAJDALANI, E. C. *et al.* 2002. Novas atividades biológicas em antigos metabólitos: ácido oleanólico e eugenol de *Eugenia caryophyllata*. *Rev. Bras. Farmacogn.* v. 12, supl. p. 70 – 71.
- KERR, K.G.; SNELLING, A.M. 2009. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J. Hosp. Infect.* 73: 338–44.
- KESKIN, D.; TOROGLU, S. 2011. Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. *J. Environ. Biol.* 32, 251 – 256.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L. *et al.* 2009. Fitoterápicos: um mercado promisor. Maringá – PR. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* v. 30, n. 3, p. 241 – 248.
- KLEVENS, R.M.; MORRISON, M.A.; NADLE, J. *et al.* 2007. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *JAMA.* 298 (15):1763-71.
- KLOUCEK, P.; SMID, J.; FRANKOVA, A. *et al.* 2012. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. *Food Research International* 47, 161 – 165.
- LAGO, J. H. G.; SOUZA, E.; MARIANE, B. *et al.* 2011. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of *Myrtaceae* – *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules* 16, 9827 – 9837.
- LEE, M. - H.; CHIOU, J. - F.; YEN, K. – Y. *et al.* 2000. EBV DNA polymerase inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*. *Cancer Letters Volume* 154, Issue 2, p. 131-136.
- LELONO, R. A. A.; TACHIBANA, S.; ITOH, K. 2009. *In vitro* Antioxidative activities and polyphenol conten of *Eugenia polyantha* Wight grow in Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12 (24): 1564 – 1570.
- LIU, C.; BAYER, A.; COSGROVE, S. E. *et al.* 2011. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Adults and Children. *Clin Infect Dis.* 52 (3):18-55.
- LIVERMORE, D. M. 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 34 (5): 634-40.
- LÓPEZ FURST, M.J. 2011. Grupo de Estudio de Infecciones por *Staphylococcus aureus* de la Comunidad - Sociedad Argentina de Infectología (SADI). Community-

- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the emergency of a pathogen. *Medicina (B Aires)*, 71(6):585-6.
- LÓPEZ FURST, M.J.; DE VEDIA, L.; FERNÁNDEZ, S. *et al.* 2013. Prospective multicenter study of community-associated skin and skin structure infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Buenos Aires, Argentina. *PLoS ONE* 8(11):e78303.
- LOPES GALENO, D. M.; PICCOLOTTO CARVALHO, R.; ARAÚJO BOLETI, A. P. *et al.* 2014. Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits enzymes related to metabolic síndrome. *Appl. Biochem. Biotechnol* 172: 311 – 324.
- LOURTET-HASCOËT, J.; BICART-SEE, A.; FÉLICE, M.P. *et al.* 2016. *Staphylococcus lugdunensis*, a serious pathogen in periprosthetic joint infections: comparison to *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Infectious Diseases* 51, 56–61.
- MA XX, GALIANA, A.; PEDREIRA, W.; MOWSZOWICZ, M.; CHRISTOPHERSEN, I.; MACHIAVELLO, S.; *et al.* 2005. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Uruguay. *Emerg Infect Dis.* 11:973–6.
- MACHADO, K. E.; FILHO, V. C.; TESSAROLO, M. L. *et al.* 2005. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology* Vol. 43, N° 7, p. 636 – 639.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. BROCK. 1999. *Biología de los Microorganismos*. 8ª edición revisada, Editorial Prentice Hall, España, p. 933 – 935.
- MAGINA, M.; DALMARCO, E.; WISNIEWSKI, A. *et al.* 2009. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. *J. Nat. Med.* 63: 345 – 350.
- MAGINA, M.; MONGUILHOT DALMARCO, E.; BASTOS DALMARCO, J. *et al.* 2012. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. *Quim. Nova* Vol. 35, N° 6, 1184 – 1188.
- MAHAR, P.; PADIGLIONI, A. A.; CLELAND, H. *et al.* 2010. *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia in burn patients: Risk factors and outcomes. *Burns* 36 (8): 1228-36.
- MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, M. H. L. *et al.* 1999. A new chemotype of *Eugenia uniflora* L. from North Brazil. *J. Essent. Oil Res.* 11, 727 – 729.

- MALHOTRA, N.; YOON, J.; LEYVA-CASTILLO, J. M. *et al.* 2016. IL-22 derived from $\gamma\delta$ T cells restricts *Staphylococcus aureus* infection of mechanically injured skin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* Volume 138, Issue 4, p. 1098 –1107.
- MARIANI-KURKDJIANA, P.; BONACORSIA, S. 2016. Diagnostic des infections à *Escherichia coli* entérohémorragique. *Revue Francophone des Laboratoires*, Issue 486, p. 45–52.
- MARKHAM, K. R. 1982. Techniques of flavonoids identification. *Academia Press* ed., New York. 1-113.
- MARQUES DE OLIVEIRA, A.; DOS SANTOS HUMBERTO, M. M.; DA SILVA, J. M. *et al.* 2006. Estudio fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (*Myrtaceae*). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16 (Supl.): 618 – 624.
- MARTINEZ-CORREA, H. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L. *et al.* 2011. Extracts from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves: Influence of extraction process on antioxidant properties and yield of phenolic compounds. *J. of Supercritical Fluids* 55, 998–1006.
- MASSOTA, M.; PICARDA, B.; DENAMURA, E. 2016. Diversité des populations d'*Escherichia coli* et leurs variations au cours du temps au sein du microbiote intestinal. *Revue Francophone des Laboratoires* Volume 2016, Issue 486, p. 35–43.
- MASTERA, R. M.; CLARKA, R. B.; KARLOWSKYB, J. A. *et al.* 2011. Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 1997 to 2009. *International Journal of Antimicrobial Agents*. Volume 38, Issue 4, p. 291–295.
- MATSUMURA, T.; KASAI, M.; HAYASHI, T. *et al.* 2000. α – glucosidase inhibitors from paraguayan natural medicine, ñangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*. *Pharmaceutical Biology* Vol. 38, N° 4, p. 302 – 307.
- MATURIN, L. J. 1998. FDA Bacteriological Analytical Manual, Revision A, 8th ed. (Chapter 20A).
- MBATA, T.I.; DEBIAO, L.; SAIKIA, A. 2006. Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea, *African Journal of Biotechnology* Vol. 7(19), p. 1571.

- MCCHESENEY, J.; VENKATARAMAN, S.; HENRI, J. 2007. Plant natural products: back to the future or into extinction? *Phytochemistry* 68: 2015 – 2022.
- MCDERMOTT, P. F.; BODEIS-JONES, S. M.; FRITSCH, T. R. *et al.* 2005. Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection* Vol. 43, p. 6136.
- MELO, R. M.; CORRÊA, V. F. S.; AMORIM, A. C. L. *et al.* 2007. Identification of impact aroma compounds in *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga) leaf essential oil. *J. Braz. Chem. Soc.* 18, N° 1, 179 – 183.
- MESAROS, N.; NORDMANN, P.; PLÉSIAT, P. *et al.* 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: résistance et options thérapeutiques à l'aube du deuxième millénaire. *Antibiotiques* 9 (3): 189-98.
- MICEK, S.T.; LLOYD, A.E.; RITCHIE, D. J. *et al.* 2005. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: Importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (4): 1306-11.
- MISSOURI BOTANICAL GARDEN: <http://www.tropicos.org/>
- MORIARTY, F.; ELBORNB, S.; TUNNEY, M. 2005. *International Journal of Microbiological Methods*. vol. 61, p. 171– 179.
- MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T. *et al.* 1998. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of specific region of West Bengal, India. *J. Ethnopharmacology* 60 (1), 85-9.
- MULCAHY, M. E.; MCLOUGHLIN, R. M. 2016. Host–Bacterial Crosstalk Determines *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization. *Trends in Microbiology* Volume 24, Issue 11, p. 872–886.
- MUÑOZ, D.C.; ARANGO, G. J.; JARAMILLO, M.C. 2004. Los antibióticos y su situación actual. *Vitac* 11(1): 21-33.
- NAKAMURA, M. J.; MONTEIRO, S. S.; BIZARRI, C. H. B. *et al.* 2010. Essential oils of four *Myrtaceae* species from the Brazilian southeast. *Biochemical Systematics and Ecology* 38, 1170 – 1175.

- NCUBE, N. S.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. 2008. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7(12), p. 1797.
- NEERGHEEN, V. S.; SOOBRATTEE, M. A.; BAHORUN, T. *et al.* 2006. Characterization of the phenolic constituents in Mauritian endemic plants as determinants of their antioxidant activities in vitro. *Journal of Plant Physiology* 163, 787 – 799.
- NICHOLSON, W.L.; MUNAKATA, H.; HORNECK, G. *et al.* 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 548–572.
- NICKERSON, E.K.; WEST, T.E.; DAY, N.P. *et al.* 2009^a. *Staphylococcus aureus* disease and drug resistance in resource-limited countries in south and east Asia. *Lancet Infect Dis* 9(2):130–5.
- NICKERSON, E.K.; WUTHIEKANUN, V.; WONGSUWAN, G. *et al.* 2009^b. Factors predicting and reducing mortality in patients with invasive *Staphylococcus aureus* disease in a developing country. *PLoS ONE* 4(8):e6512.
- NÓBREGA DE ALMEIDA, R.; DE FÁTIMA AGRA, M.; NEGROMONTE SOUTO MAIOR, F. 2011. *et al.* Essential Oils and Their Constituents: Anticonvulsant Activity. *Molecules* 16, 2726-2742; doi: 10.3390/molecules16032726.
- NOSTRO, A.; GERMANÒ, M. P.; D'ANGELO, V. *et al.* 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 30, 379 – 384.
- NOVACK VICTORIA, F.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. *et al.* 2012. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology* 50, 2668 – 2674.
- NUÑEZ, L.; AQUINA, M. D. 2012. Microbicide activity of clove essential oil (*Eugenia caryophyllata*). *Brazilian Journal of Microbiology* 1255 – 1260.
- OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N.O.; EKUNDAYO, O. *et al.* 2005. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *International Journal of Aromatherapy Volume* 15, Issue 3, p. 147–152.

- OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS – MAGALHÃES, N. S. *et al.* 2008. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology* 46, 371 – 376.
- OLIVEIRA FIGUEIRÔA, E.; NASCIMENTO DA SILVA, L. C.; LAGOS DE MELO, C. *et al.* 2008. Evaluation of Antioxidant, Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: Correlation with polyphenol and flavanoid content. *The Scientific World Journal*, Article ID 125027, 7 pages.
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD) DOCUMENTO (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf).
- ORREGO ESCOBAR, E. F. 2013. Plant-derived antibacterial agents: Latin American ethnopharmacology reinvented. *Medwave* 13(2).
- OTVOS, L.; CUDIC, M. in: G.B. Fields (Ed.). 2007. Peptide Characterization and Application Protocols (Methods in Molecular Biology), Part II, vol. 386, Humana Press, Totowa, NJ p. 309 (Chapter 12).
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L. *et al.* 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18, 414 – 420.
- PAXTON, J.D. IN: K. HOSTETTMANN (Ed.), 1991. Methods in Plant Biochemistry – Assays for Bioactivity, vol. 6, Academic Press, London, p. 33.
- PEPATO, D.M.; MORI, A.M.; BAVIERA, J.B. *et al.* 2005. “Fruit of the jambolan tree (*Eugenia jambolana* Lam.) and experimental diabet.” *J. Ethnopharmacol.* 96 (1-2):43-8,
- POOLMAN, J. T. 2017. “Escherichia coli”. *International Encyclopedia of Public Health (Second Edition)* 585–593.
- POURGHOLAMI, M. H.; KAMALINEJAD, M.; JAVADI, M. *et al.* 1999. Evaluation of the anticonvulsant activity of *Eugenia caryophyllata* in male mice. *Journal of Ethnopharmacology* 64,167-171.

- RAJ, G.; VARUGHESE, G.; NEDIYAPARAMBIL, S. *et al.* 2007. Volatile constituents and antibacterial activity of *Eugenia rotteriana* Wight et Arn. *J. Essent. Oil Res.* 19, 588 – 590.
- RAMIREZ, L. S.; CASTAÑO, D. M. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* Año XV, No 42. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.
- RATERA, E. L.; RATERA, M.O. 1980. *Plantas de la flora argentina empleadas en medicina popular* 1ª edición, Editorial Hemisferio Sur, Argentina, Capítulo I.
- RATTMANN, Y. D.; MERA DE SOUZA, L.; MALQUEVICZ-PAIVA, S. M. *et al.* 2012. Analysis of Flavonoids from *Eugenia uniflora* Leaves and Its Protective Effect against Murine Sepsis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 623940, 9 pages, doi:10.1155/2012/623940.
- RAMÍREZ, R. Y. 2009. Productos derivados de plantas en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Una aproximación a la búsqueda racional del efecto antimicrobiano. DOI: 10.13140/2.1.2786.9122.
- RATERA, E. L.; RATERA, M. O. 1980. *Plantas de la Flora Argentina Empleadas en Medicina Popular*. Buenos Aires, Editorial Hemisferio Sur.
- REINEKE, K.; ELLINGER, N.; BERGER, D. *et al.* 2013. Structural analysis of high pressure treated *Bacillus subtilis* spores. *Innovative Food Science & Emerging Technologies Volume 17*, p. 43–5.
- RIBEIRO GOMES, M. Z.; VASCONCELLOS C. DE OLIVEIRAC, R.; ROMERO MACHADO, C. *et al.* 2012. Factors associated with epidemic multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in a hospital with AIDS-predominant admissions. *Braz. J. Infect. Dis.* 16(3):219-225.
- RÍOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology* Vol. 23, p. 127.
- RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 80–84.

- ROLSMA, S.; FRANK, D. W.; BARBIERI, J. T. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* toxins. *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins (Fourth Edition)* p. 133–160.
- RÜCKER, G.; ASSIS BRASIL E SILVA, G. A.; BAUER, L. 1971. Die struktur des isofuranodiends aus *Stenocylax michelii* (Myrtaceae). *Phytochemistry* Vol. 10, p. 221 – 224.
- RÜCKER, V. G.; ASSIS BRASIL E SILVA, G. A.; BAUER, L.; SCHIKARSKI, M. 1977. New constituents of *Stenocylax michelii*. *Planta médica* Vol. 31, 322 – 327.
- S. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY. 1997. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.*, Vol. 17(1).
- SALIE, F.; EAGLES, P.F.K.; LENS, H.M.J. 1996. Preliminary antimicrobial screening of four South African *Asteraceae* species. *Ethnopharmacology* Vol. 52 (1), pp. 27.
- SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.; CAMPOS, L.C. et al. 2008. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med.* 5(3):317-24.
- SAMY, M. N.; SUGIMOTO, S.; MATSUNAMI, K. et al. 2014. Bioactive compounds from the leaves of *Eugenia uniflora*. *Journal of Natural Products* Vol. 7: 37 – 47.
- SANTANA TENORIO, A. I.; VARGAS, D.; ESPINOSA, A. et al. 2011. Chemical composition of leaf essential oils of *Calypttranthes microphylla* B. Holts & M. L., *Myrcia aff fosteri* Croat and *Eugenia octopleura* Kruz & Urb from Panamá. *Journal of Essential Oil Research* Vol. 23, 29 – 33.
- SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; TINTINO, S. R. et al. 2012. Anti-Trypanosoma cruzi and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Experimental Parasitology* 131, 130–132.
- SANTOS, S. C.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O. et al. 2004. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L. fractions against *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida. *Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu* v.7, n. 1, p. 30 – 33.
- SCHAPOVAL, E. E. S.; SILVEIRA, S. M.; MIRANDA, M. L. et al. 1994. Evaluation of some pharmacological activities of *Eugenia uniflora* L. *Journal of Ethnopharmacology* 44, 137 – 142.

- SCHEMEDA – H, G. 1988. Ethnobotanical observations on Paraguayan *Myrtaceae*. I. J. *Ethnopharmacol.* 22, 73 – 79.
- SCHECHNER, V.; GOTTESMAN, T.; SCHWARTZ, O. *et al.* 2011. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia upon hospital admission: risk factors for mortality and influence of inadequate empirical antimicrobial therapy. *Diag Microbiol Infect Dis* 71 (1): 38-45.
- SCHEMEDA-HIRSCHMANN, G.; THEODULOZ, C.; FRANCO, L. *et al.* 1987. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 21, 183-186.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. 2001. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões C. M. O. (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: p. 301-332.
- SCHMOURLO, G.; MENDONCA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S. *et al.* 2004. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal food plants. *Ethnopharmacology Vol.* 96(3), p. 563.
- SEYBOLD, U.; TALATI, N.J.; KIZILBASH, Q. *et al.* 2007. Hematogenous osteomyelitis mimicking osteosarcoma due to community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection.* 35:190–93.
- SHANLEY, P.; LUZ, L. 2003. The impacts of forest degradation on medicinal plant use and implications for health care in Eastern Amazonia. *Bioscience* 53: 573 – 584.
- SHARAPIN, N.; MACHADO ROCHA, L.; SOUZA CARVALHO, E. *et al.* 2000. *Fundamentos de tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. 1^{era} edición, Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Colombia.
- SHEDEK, B. K.; NILLES, E. J. 2008. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pyomyositis complicated by compartment syndrome in an immunocompetent young woman. *Am. J. Emerg. Med.* 26:737.e3-4.doi: 10.1016/j.ajem.2007.11.034.
- SHERLOCK, O.; DOLAN, A.; ATHMAN, R. *et al.* 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complement Altern Med.* 2; 10:47.

- SHITANDI, A.; GATHONI, K. 2005. Evaluation of the *Bacillus calidolactis* plate for post screening assay of β -lactam antimicrobial residues in Kenyan dairies. *Food Control* 16, 227.
- SHUKLA, S. K. 2005. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Its Emerging Virulence. *Clinical Medicine & Research Volume 3, Number 2*: 57-60.
- SILVA, I.; CECHINEL, V.; ZACCHINO, S. A. *et al.* 2009. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19(1B):242-248.
- SILVA, M.T.G.; SIMAS, S.M.; BATISTA, T.G.F.M. *et al.* 2005. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (*Solanaceae*) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz Vol. 100 (7)*, pp. 779.
- SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N. *et al.* 2012. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural Product Research Vol. 26, N° 16*, 1510 – 1514.
- SILVA, N., & FERNADES, J. A. 2010. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity The Journal of Venomous Animals and Toxins Including. *Tropical Diseases* 16(3), 402-413.
- SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A. *et al.* 2004. Flowering Plants of the Neotropics. The New York Botanical Garden, Princeton university press, New Jersey, USA.
- SINGH, J.; BAGLOTIA, A.; GOEL, S. P. 2012. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family *Myrtaceae*): A Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences Vol.3 (4)*.
- SONG, M.; HONG, H.A.; HUANG, J.M. *et al.* 2012. killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine* 30: 3266–3277.
- STEFANELLO, M. E.; CERVI, A. C.; ITO, I. Y. *et al.* 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research Vol. 20*, 75 – 78.
- STEVENS, P.F. 2008. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9.

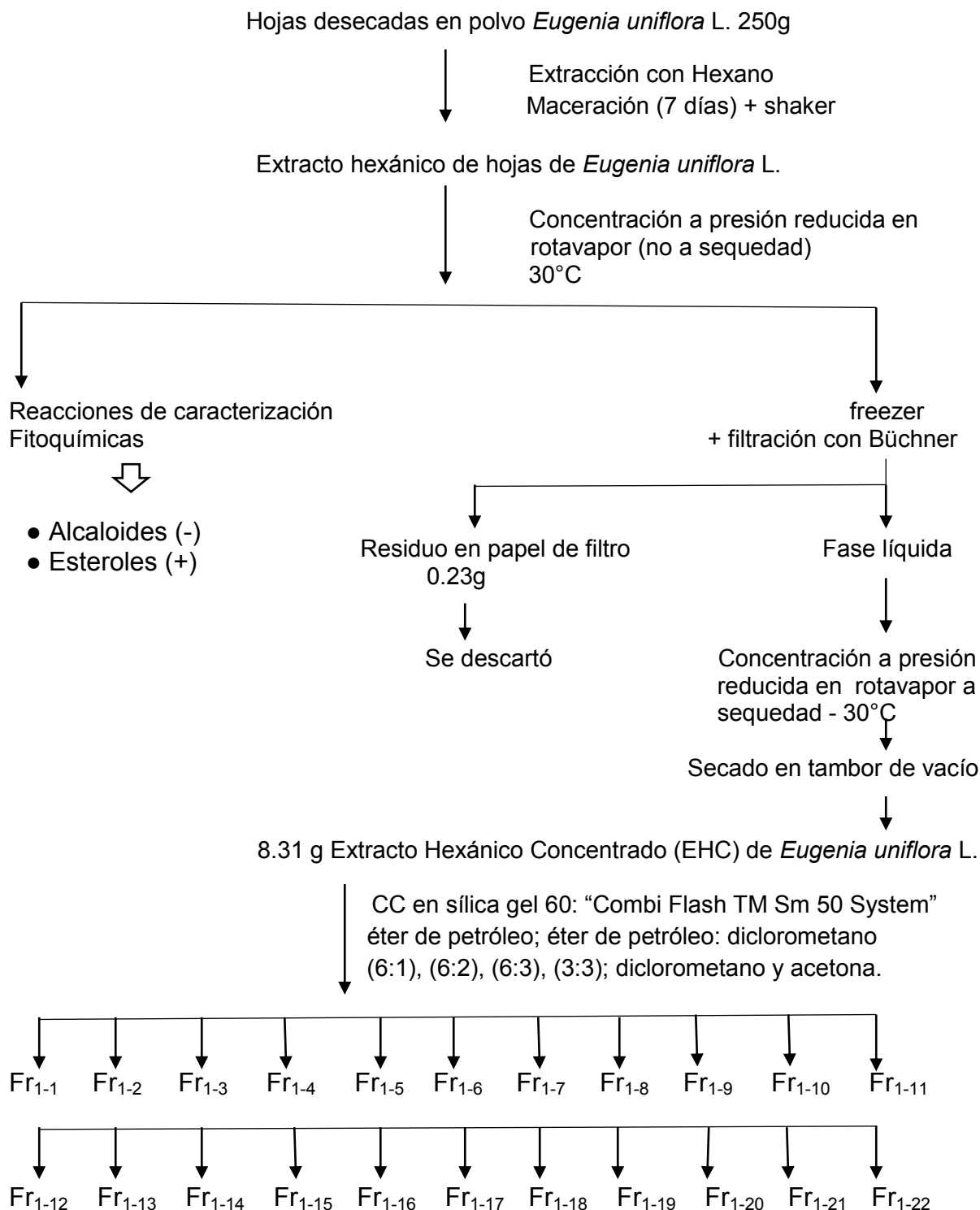
- STRATEVA, T.; YORDANOV, D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J. Med. Microbiol.* 58 (9): 1133-48.
- SHUKLA, S. K. 2005. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Its Emerging Virulence. *Clinical Medicine & Research Volume 3, Number 2*: 57-60.
- SUSIDARTI, R. A.; RAHMANI, M.; ALI, A. M. *et al.* 2007. Friedelin from Kelat Merah (*Eugenia chlorantha* Duthie). *J. Pharm. Sci.* 31:1-8. 167.
- TAVARES, M.B.; SILVA, B.M.; CAVALCANTE, R.C.M. *et al.* 2010. Induction of neutralizing antibodies in mice immunized with an amino-terminal polypeptide of *Streptococcus mutans* P1 protein produced by a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 131–142.
- THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX (IPNI): <http://www.ipni.org/>
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9ª edición, Editorial Médica Panamericana.
- VAN DER MEE-MARQUET, N. 2016. Conduite à tenir en cas de gastroentérites à *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC). *Revue Francophone des Laboratoires*, Issue 486, p. 53–59.
- VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. 1991. Screening for antibacterial and antiviral agents. *Methods in Plant Biochemistry Assay for Bioactivity*. Academic Press, In Hostettmann, K (Ed). Vol. 6, p. 47. Londres.
- VANDENESCH, F.; NAIMI, T.; ENRIGHT, M.C. *et al.* 2003. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis.* 9(8):978-84.
- VASCONCELOS COSTA, A. G.; GARCIA-DIAZ, D. F.; JIMENEZ, P. *et al.* 2013. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. *Journal of functional foods* 5, 539 –549.
- VELAZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO, P. *et al.* 2003. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia* 74 (1-2), 91-7.
- VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova* 28, 519.

- VENIER, A.G.; GRUSON, D.; LAVIGNE, T. *et al.* 2011. Identifying new risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in intensive care units: experience of the French national surveillance, REA-RAISIN. *Journal of Hospital Infection Volume 79, Issue 1, p. 44–48.*
- VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L. *et al.* 2012. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology 50, 2668–2674.*
- VON SPECHT, M.; GARDELLA, N.; TAGLIAFERRI, P. *et al.* 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired meningitis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25(4):267-9.*
- WAGNER, H.; BLADT, S. 1996. Plant Drug Analysis. 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. (29) 303.
- WALLÄUSSER; K. H. 1990. *Thin Layer Chromatography Laboratory Handbook – Capítulo Antibióticos*; editado por Stahl, E. p. 566 -571.
- WASLAWIK, E.; DA SILVA, M.A.; PETERS, R. *et al.* 1997. Analysis of the role of nitric oxide in the relaxant effect of the crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* in the rat thoracic aorta. *Journal of Pharmacy and Pharmacology 49 (4), 433-437.*
- WEYESTAHL, P.; MARSCHALL – WEYERSTAHL, H.; CHRISTIANSEN, C. *et al.* 1988. Volatile constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil. *Planta Med. 54 (6): 546 – 549.*
- WILSON, P.G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M. *et al.* Relationships within *Myrtaceae sensu lato* based on a matK phylogeny. *Pl. Syst. Evol. 251: 3-19.* 2005.
- ZAMPINI, I. C.; CUDMANI, N.; ISLA, M. I. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta bioquím. clín. latinoam. v.41 n.3 La Plata.*
- ZETOLA, N.; FRANCIS, J.S.; NUERMBERGER, E.L. *et al.* 2005. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis. 5 (5):275-86.*
- ZHENG, G.; KENNEY, P. M.; LAM, L. 1992. Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia caryophyllata*) as Potential Anticarcinogenic Agents. *J. Nat. Prod. 55 (7), p. 999–1003.*

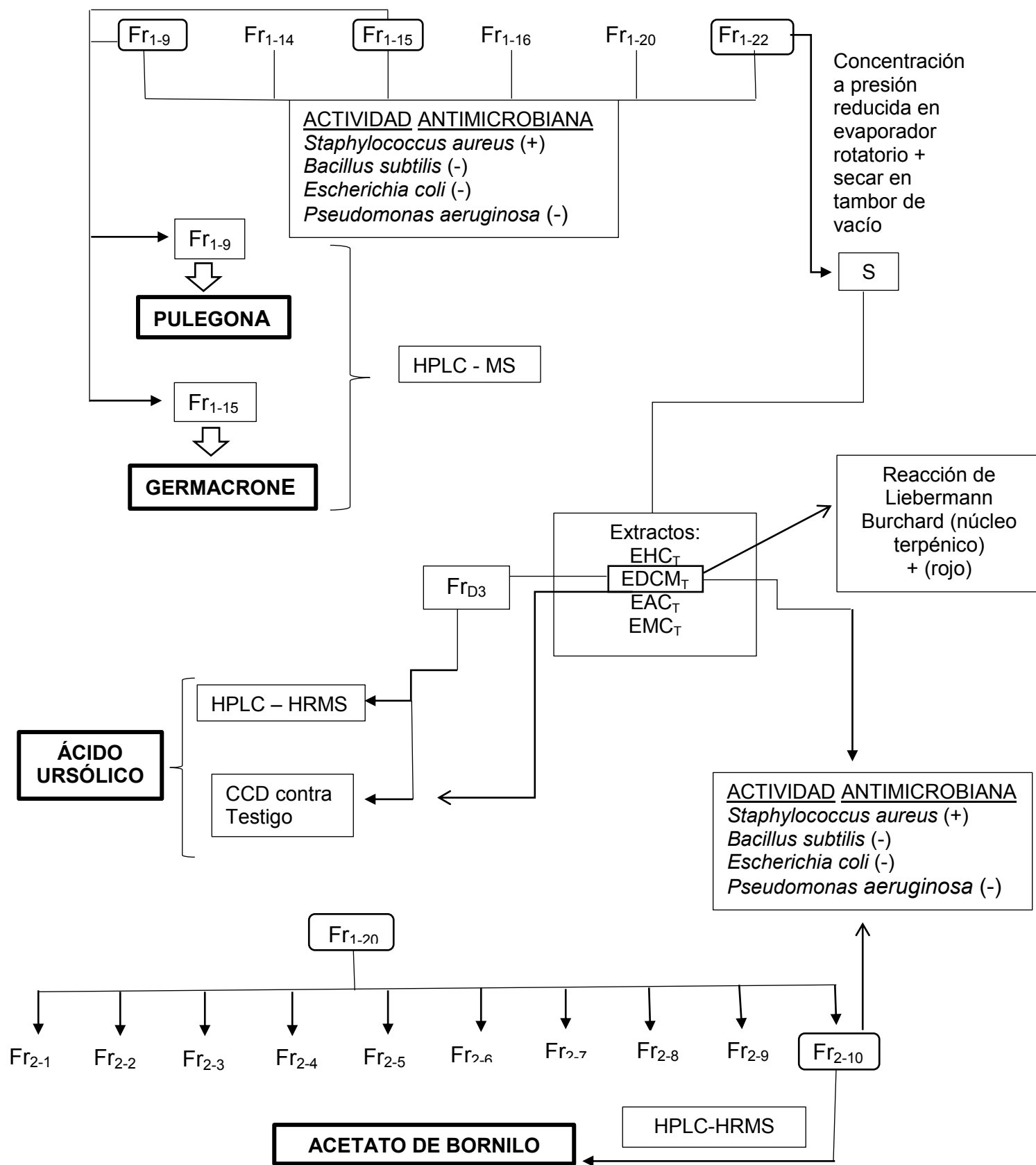
ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O.; BELGRANO, M. J. (eds.). 2008. *Catálogo de Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay)*. Vol. 1-3. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, Missouri.

14. Resumen


Proceso de extracción y separación del Extracto Hexánico de hojas de *Eugenia uniflora* L.



Compuestos químicos identificados en distintas fracciones del Extracto Hexánico y su actividad biológica.



15. Presentaciones a Congresos y Jornadas

	
Universidad Nacional de La Plata FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS	
PRIMERAS JORNADAS DE EDUCACION FARMACEUTICA EN EL NUEVO MILENIO 6, 7 Y 8 de Noviembre del 2001	
POR EL PRESENTE SE CERTIFICA QUE:	
Bravi, V.:	Castello, S. : Bruno-Blanch, L.
Han presentado el siguiente Trabajo a las Primeras Jornadas de Educación Farmacéutica en el Nuevo Milenio: "El Farmacéutico Integrante del Equipo de Salud"	
*ANEXO 1: DOCUMENTACIÓN DE ESTRUCTURA CURRICULAR DE PREMIOS ALCANZADOS EN EDUCACIÓN FARMACÉUTICA EN EL NUEVO MILENIO.	
La Plata, Noviembre de 2001	Decano Facultad de Ciencias Exactas
Presidente Comité Organizador	



**SILAE**
Sociedad Italo-Latinoamericana de Etnomedicina



XVI CONGRESO ITALO-LATINOAMERICANO DE ETNOMEDICINA
“Carlo L. Spegazzini”
La Plata, Argentina. 4 al 8 de Septiembre de 2007

Por cuanto **Bravi Viviana Silvina** ha participado en carácter de Expositora del trabajo “Aislamiento y Caracterización de Principios Activos Presentes en Eugenia uniflora L. solubles en éter de petróleo y determinación de su Actividad Antimicrobiana” (Bravi, Viviana; Castello, Sandra & Bruno-Blanch, Luis) se extiende la presente constancia, en la ciudad de La Plata, Argentina, a los ocho días del mes de septiembre de dos mil siete.


Dra. Étile Spegazzini
Pte. Congreso


Dr. Néstor Caffini
Pte. Comité Científico


Lic. Teresita Di Bernardi
Pte. Comité Organizador

Apéndice I. Especies vegetales con Actividad antimicrobiana

Nombre científico	Nombre común	Familia botánica	Órgano del vegetal empleado	Compuestos químicos
<i>Cheilanthes glauca</i> (Cav.) Mett.	“Doradilla”	<i>Pteridaceae</i>	Hoja	Rutina, kaempferitrina
<i>Pityrogramma calomelanos</i> (L.) Link var. <i>calomelanos</i>	“Hierba de la seca”	<i>Pteridaceae</i>	Partes aéreas	Calomelanolactona (sesquiterpeno)
<i>Ephedra americana</i> Humb. & Bonpl. ex Willd.	“Tramontana”	<i>Ephedraceae</i>	Partes aéreas	Alcaloides: Efedrina, pseudo-efedrina, N-metilefedrina; taninos; flavonoides: hesperidina, crisina, 5, 7, 3'-4'-tetrahidroxi-6,8'-flavona, 5,7,3'-trihidroxi-6,4'-dimetoxi-flavonol, 4'-hidroxi-7-metoxi-5-O-glucosil-flavonona; proantocianidinas.
<i>Echinodorus grandiflorus</i> subsp. <i>Aureus</i> (Cham. & Schltdl.) Micheli	“Cucharero”	<i>Alismataceae</i>	Hoja	Fitol, (E)-cariofileno, α -humuleno, (E)-nerolidol, linalol, (E)-farneseno, β -selineno, α -farneseno, γ -cadineno, bisabolol, drimenol, ácido echinoico.
<i>Carum carvi</i> L.	“Alcaravea”	<i>Apiaceae</i>	Fruto	(S)-(+)-carvona, (R)-(+)-limoneno, α y β pineno, sabineno, 3-careno, dehidrocarvona, dehidrocarveol, carveol; Flavonoides: quercetina, quercetina 3-glucurónido, quercetina 3-O-cafeilglucósido, isoquercitrina.
<i>Pistia stratiotes</i> L.	“Lechuga cimarrón”	<i>Araceae</i>	Planta entera	α -asarona, fenilpropanoide, ácido linoleico (lípidos); 24(S)-etil-cholesta-4-22-dieno-3-6-diona (esteroide); lucenina, luteolin-7-glicósido.
<i>Tillandsia capillaris</i> f. <i>cordobensis</i> (Hieron.) L. B. Sm.	“Clavel del aire”	<i>Bromeliaceae</i>	Partes aéreas	Cicloartanol, 24-metilen cicloartanol (triterpenos).
<i>Commelina erecta</i> L. var. <i>erecta</i> f.	“Yerba de Santa Lucía”	<i>Commelinaceae</i>	Flores	Esteroides, taninos, mucílago.

<i>erecta</i>				
<i>Cyperus rotundus</i> L.	“Cebollón”	<i>Cyperaceae</i>	Planta entera	Sesquiterpenos: γ -cadineno, 1,8-cineol, α -copaeno, α -ciperona, cariofileno, ciperonona, ciperol, β -elemeno, α -humuleno, mustakone, α -rotundol, β -rotundol, β -selineno; ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico, ácido vainílico.
<i>Eichhornia crassipes</i> (Mart.) Solms	“Camalote”	<i>Pontederiaceae</i>	Hoja, tallo, raíz	Alanina, fenilalanina, arginina, putrescina, espermidina, ácido linoleico.
<i>Gomphrena celosioides</i> Mart. var. <i>celosioides</i>	“Peludilla”	<i>Amaranthaceae</i>	Partes aéreas	Esteroides: ecdisoma.
<i>Schinus fasciculatus</i> (Griseb.) I. M. Johnst. var. <i>fasciculatus</i>	“Moradillo”	<i>Anacardiaceae</i>	Partes aéreas	Limoneno, β -felandreno, α -felandreno.
<i>Schinus areira</i> L.	“Molle”	<i>Anacardiaceae</i>	Corteza/hoja/fruto	Monoterpenos oxigenados: cineol, linalol, borneol, α -terpineol, β -cariofileno, α -copaeno, α -muroleno, δ -cadineno. Terpeneol, felandreno, cadineno, elemeno, elemol, α y β pineno. Ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico. Ácidos carboxílicos: ácidos tricosanoico, pentacosanoico, hexacosanoico, heptacosanoico, octacosanoico. Ácidos triterpénicos y sus derivados: ácidos isomasticadienónico, masticadienónico, dihidromasticadienólico, isomasticadienólico, masticadienólico; Flavonoides: quercetina, quercitrina, rutina, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido; Taninos: galotaninos, ácido gálico; Glúcidos: glucosa, fructosa, rafinosa, pectina.

<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze	“Torito”	<i>Asteraceae</i>	Parte entera	Espatunelol, germacreno C (sesquiterpenos); I-O-acetato (diterpenos); 5-7-4'-trihidroxi-3-6-dimetoxi flavona (flavonol).
<i>Ambrosia elatior</i> L.	“Altamisa”	<i>Asteraceae</i>	Parte entera	4- β -10- α -allo aromandreno, ácido clorogénico, ácido iso clorogénico.
<i>Artemisia dracunculus</i> L.	“Estragón”	<i>Asteraceae</i>	Hoja	Metil chavicol, <i>trans</i> ocimeno, limoneno, α -pineno, <i>d</i> sabineo, mirceno, anetol, anisol, ácido anísico, canfeno, eugenol, aldehído p-metoxicinámico.
<i>Baccharis crispa</i> Spreng.	“Carqueja”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Apigenina, 7-4'-dimetilapigenina, 3'-5-dihidroxi-4'-7-dimetoxi flavona, ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido 3,5-dicafeilquínicos.
<i>Bidens pilosa</i> L.	“Amor seco”	<i>Asteraceae</i>	Hoja/Flores/raíz	Lípidos: ácidos grasos, ácidos cáprico C10, láurico C12, mirístico 14, palmítico C14, esteárico C16, ácidos palmitoleico, oleico, elaídico, linoleico; Esteroles: estigmasterol, daucosterol, β -sitosterol; Terpenos: borneol, cadinol, murulol, limoneno; Friedelanos: friedelin, Ácidos orgánicos: butenodioicos, cafeico, <i>p</i> -cumárico, fitoenoico, elaídico; Flavonoides: quercetina, isoquercitrina, luteolina; Cumarinas: <i>p</i> -cumarina, esculetina; Taninos: ácido gálico, cafeico, protocatéquico.
<i>Chaptalia nutans</i> (L.) Pol.	“Cerraja”	<i>Asteraceae</i>	Raíz	Nutanocumarina, prunasina.
<i>Dasyphyllum diacanthoides</i> (Less.) Cabrera	“Palo santo”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Lupeol, acetato de lupeol.
<i>Dolichlasium lagascae</i> D. Don	“Yerba del ciervo”	<i>Asteraceae</i>	Planta entera	Ácido cafeico; pereflorin, 3-4-8-trimetoxi (cumarina); iso skuranetina (flavanona).
<i>Eupatorium macrocephalum</i> Less.	“Teyú caá”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	β -cariofileno, germacrene D.

<i>Eupatorium buniifolium</i> Hooker et Arnott	“Chilca”	<i>Asteraceae</i>	Hoja/flores	Monoterpenos: α -pineno, canfeno, β -pineno, limoneno, cineol, <i>p</i> -cimeno; Sesquiterpenos: β -cariofileno, α -humuleno, germacreno-D, bisaboleno, óxido de cariofileno; Flavanonas: eriodictol, quercetina; Cumarinas: escopoletina; ácido cafeico, ácido clorogénico.
<i>Eupatorium inulaefolium</i> H. B. K.	“Dotorcito”	<i>Asteraceae</i>	Hoja/flores	Flavonósidos: quercetina, quercitrina, isoquercitrina, kamferol, rutina; Lactonas sesquiterpénicas: germacranólidos, furanoheliangólidos; Neuroleninas: Neurolenina A, B y C, Lobatina A y B, Helenalina, Florilenalina.
<i>Gochnatia glutinosa</i> (D. Don) Hook & Arn.	“Jarililla”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	3'-4'-5'-trihidroxi-3-7-dimetoxy flavone (flavonol); 8-hidroxi-3-7-11-trimeti dodeca- <i>cis</i> -2- <i>trans</i> -6-10-trien-13, 1-olide (sesquiterpeno).
<i>Mikania micrantha</i> Kunth	“Guaco”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	α -amirina (triterpeno); cumarina; alpinetina (flavanona); mikamicranolido (sesquiterpeno); mikanin-3-O-sulfato (flavonol); 3,4',5,7-tetrahidroxi-6-metoxiflavona 3-O- β -glucopiranosido; luteolina; 3,5-di-O-ácido cafeoilquínico <i>n</i> -butil éster; 3,4-di-O-ácido cafeoilquínico <i>n</i> -butil éster.
<i>Nardophyllum armatum</i> (Wedd.) Reiche	“Suruyanta”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Flavonoides, compuestos fenólicos.
<i>Pluchea sagittalis</i> (Lam.) Cabrera	“Lucera”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Fenilpropanoide (ácido cafeico); crisofenol D (flavonol); polifenoles.
<i>Porophyllum ruderale</i> (Jacq.) Cass.	“Mboi-morotí”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Flavonoides: Quercetina 3'-O-arabinósido; Quercetina 7-O-glucósido; gossypetina 4'-metil éter 3-O-arabinósido; gossypetina 4'-metil éter 3-O-glucósido.
<i>Proustia cuneifolia</i> var. <i>mendocina</i> (Phil.) Ariza	“Alpete”	<i>Asteraceae</i>	Hoja	Sesquiterpenos: Cedren-14- β -15-olido; 9- β -acetoxi-14- α -hidroxi-3- α -senecioil-oxy; Flavanona: sakuranetina.

<i>Schkuhria pinnata</i> (Lam.) Kuntze ex Thell.	“Matapulgas”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Schkuhripinnatolido A, B, C, eucannabinolido (sesquiterpenos); pectolarigenina; germacranolido; santhemoidina A; sitosterol; stigmasterol; α -amirina; taraxasterol.
<i>Senecio eriophyton</i> J. Rémy	“Chachaco- ma”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Ácido isovalérico.
<i>Solidago chilensis</i> Meyen var. <i>chilensis</i>	“Romerillo amarillo”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Diterpeno: pumiloxido; Sesquiterpenos: limoneno; γ -cadineno.
<i>Tagetes terniflora</i> Kunth	“Suico”	<i>Asteraceae</i>	Hoja	Sesquiterpenoides: <i>trans</i> -tagetona; (<i>E</i>)- β -ocimeno; ocimenonas; limoneno; isomentona; espatulenol; Fenilpropanoides: <i>cis</i> - y <i>trans</i> -anetol.
<i>Tessaria integrifolia</i> Ruiz & Pav.	“Aliso del río”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	α -amirina; artemisina; ácido 3-4-di-O-cafeoil quínico; ácido isoclorogénico; ácido 3,5-O-di-cafeoil quínico; ácido 4,5-O-di-cafeoil quínico.
<i>Thelesperma megapotamicum</i> (Spreng.) Kuntze	“Té pampa”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Timolhidroquinona dimetil éter (monoterpeno).
<i>Verbesina encelioides</i> (Cav.) Benth. & Hook. f. ex A. Gray	“Santa María”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Triterpeno: α -amirina; Esteroide: campesterol, daucosterol; Alcaloide: galegina; Lípido: ácido linoleico.
<i>Vernonia tweedieana</i> Baker	“Mata campo”	<i>Asteraceae</i>	Raíz	Palmitato de lupenilo; mezcla de α y β palmitato de amirina.
<i>Xanthium cavanillesii</i> Schouw	“Abrojo”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Xantatina; 24-metilencicloartanol; lupeol; β -amirina; estigmasterol; campesterol; sitosterol; xantanólidos.
<i>Zinnia peruviana</i> (L.) L.	“Flor de papel”	<i>Asteraceae</i>	Partes aéreas	Sesquiterpenos: 6- β -acetoxi-9- α -angeloil-oxi-15-oxo elemanoido; germacreno D; zinaflorine II, III.
<i>Anredera cordifolia</i> (Ten.) Steenis	“Papa santa”	<i>Basellaceae</i>	Hoja	Esteroides.

<i>Berberis buxifolia</i> Lam.	“Calafate”	<i>Berberidaceae</i>	Brotes	Argemonina; berberina (alcaloide derivado de la isoquinolina).
<i>Alnus acuminata</i> Kunth	“Aliso blanco”	<i>Betulaceae</i>	Partes aéreas	Esteroles, triterpenos, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos; δ -amirona (Olean-13-(18)-en-3-ona), apigenina-4’7-dimetil éter (5-hidroxi-c’7-dimetoxiflavona).
<i>Tabebuia heptaphylla</i> (Vell.) Toledo	“Lapacho”	<i>Bignoniaceae</i>	Corteza	Furanonaftoquinonas.
<i>Bixa Orellana</i> L.	“Urucú”	<i>Bixaceae</i>	Hoja	Apigenina-7-bisulfato, hipoaletina, cosmosiina; geraniol, geranil formiato, farnesil acetona; ácido gálico.
<i>Cordia ecalyculata</i> Vell.	“Colita”	<i>Boraginaceae</i>	Hoja	(+)-espatulenol, β -sitosterol, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico.
<i>Alliaria officinalis</i> Andr.	“Aliaria”	<i>Brassicaceae</i>	Hoja/tallo	Glucosinolatos: sinigrina, glucotropeolina; vitaminas: C y A.
<i>Lepidium bonariense</i> L.	“Yerba de la pastora”	<i>Brassicaceae</i>	Planta entera	<i>p</i> -metoxibencilisocianato.
<i>Carica papaya</i> L.	“Mamón”	<i>Caricaceae</i>	Raíz	Saponinas, alcaloides, taninos, fenoles, glicósidos; compuestos cianogenéticos.
<i>Cecropia pachystachya</i> Trécul	“Ambay”	<i>Cecropiaceae</i>	Hoja	Flavonoides: luteolina-C-glicósido, isoorientina, catequina; Flavonol: isoquercitrina; β -sitosterina, estigmast-4-en-3-ona, α - y β -amirina, β -sitosterol; Aminoácidos: alanina, glicina, serina, valina, isoleucina, asparagina, prolina, ácido aspártico, fenilalanina, ácido glutámico, arginina; Azúcares: glucosa, fructosa, galactosa; Glucósidos: ambaina, ambainina; cecropina, cecropinina, ácido araquidónico; mucílagos, saponinas.

<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek	“Congorosa”	<i>Celastraceae</i>	Hoja	Terpenoides: α -amirina, cangorosina A y B; Triterpenoides: eritrodiol, betulina, betulin-3-cafeato, moradiol, eritrodiol-3-cafeato, 20 α -hidroximaitenina, 22 β -hidroximaitenina, celastrol; Taninos: afzelequina, epi-afzelequina, catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, 4-O-metil-(epi)catequina, 4'-O-metil-(epi) catequina; quercetina, kaemferol; α -tocoferol, simiarenol, lupeol, lupenona, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol, escualeno, ácido hexadecanoico, vitamina E, ácido dodecanoico, acetato de geranilo; Fe, K, Mg, S, Na, Ca.
<i>Celtis tala</i> Gillies ex Planch.	“Tala”	<i>Celtidaceae</i>	Hoja	Flavonoides.
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	“Paico macho”	<i>Chenopodiaceae</i>	Partes aéreas	Limoneno, <i>cis</i> -ascaridol, α -terpineno, camfor, <i>trans</i> -ascaridol, <i>p</i> -cimeno, pinocarvona, α - y β -pineno, geraniol, α - y β -terpineol, timol, β -cariofileno, γ -gurjuneno, mirceno, felandreno, safrol, <i>n</i> -docosano, <i>n</i> -hentriacontano, <i>n</i> -heptacosano, <i>n</i> -octacosano, <i>p</i> -cimol, espinasterol, acetato de terpinilo, salicilato de terpinilo.
<i>Chenopodium multifidum</i> L.	“Paico hembra”	<i>Chenopodiaceae</i>	Partes aéreas	<i>Cis</i> -endoperóxido, <i>trans</i> -endoperóxido, hidroxicetonas, <i>p</i> -cimeno, 7-acetoxi- <i>p</i> -mentano, <i>p</i> -ment-5-en- <i>cis</i> -1,2,4-triol, <i>p</i> -ment-5- <i>trans</i> -1,2,4-triol, <i>p</i> -ment-5-en- <i>cis</i> -1,3,4-triol, carveol; flavonoides.
<i>Convolvulus hermanniae</i> L' Hér.	“Campanilla”	<i>Convolvulaceae</i>	Hoja, tallo, fruto	Higrina, cuscohigrina, propilhigrina, <i>N</i> -metilpirrolidinohigrina, nicotina, tropinona, tropina, pseudotropina, 6- β -hidroxitropan-3-ona, 3- α -aciloxitropano, 3- β -aciloxitropano.
<i>Coriaria ruscifolia</i> L.	“Deu”	<i>Coriariaceae</i>	Fruto	Corianina (sesquiterpeno).

<i>Cucurbita maxima</i> subsp. <i>Andreana</i> (Naudin) Filov	“Zapallo del diablo”	<i>Cucurbitaceae</i>	Hoja	Ácido gentísico; giberelina a-12, 12- α -hidroxi.
<i>Fitzroya cupressoides</i> Mol. Johnson	“Alerce”	<i>Cupresaceae</i>	Corteza/semilla	α y β pineno, canfeno, β -felandreno, ácido levopimárico, ácido abiético, ácido dextropimárico.
<i>Aristolitia chilensis</i> (Molina) Stuntz	“Maqui”	<i>Elaeocarpaceae</i>	Tallo, hoja	Alcaloides: aristotelina, aristotelona, aristotelina, aristona, aristotelinona, makonina, 8-oxo-9-dehidrohobartina, 8-oxo-9-dehidromakomakina, aristoquinolina, makomakina, hobartina, serratolina.
<i>Acalypha communis</i> Müll. Arg.	“Albahaquilla”	<i>Euphorbiaceae</i>	Partes aéreas	Ácidos triterpenos: ácido 16 α -hidroximólico, ácido 15- α -hidroximólico, ácido 7- β -, 16- β -dihidroxi-1,23-dideoxijésico.
<i>Colliguaja integerrima</i> Gillies & Hook.	“Duraznillo”	<i>Euphorbiaceae</i>	Tallo, hoja	Lupeol, β -sitosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico.
<i>Croton urucurana</i> Baill.	“Sangre de drago”	<i>Euphorbiaceae</i>	Tallo	Borneol, acetato de bornilo, cadina-4, 10(14)-dien-1a ol, sesquicineol, germacreno D, biciclogermacreno.
<i>Euphorbia hirta</i> var. <i>ophthalmica</i> (Pers.) Allem & Irgang	“Leche de golondrina”	<i>Euphorbiaceae</i>	Partes aéreas	Inositol; ácido linoleico; sitosterol.
<i>Sebastiania brasiliensis</i> Spreng.	“Ibirá-cambú”	<i>Euphorbiaceae</i>	Hoja	Galato de metilo, ácido protocatechuico, quercetina, kaempferol, quercitrina, ácido gálico.
<i>Acacia aroma</i> Gillies ex Hook. & Arn.	“Tusca”	<i>Fabaceae</i>	Hoja, tallo, flor	Apigenina, rhamnetina, linamarina.
<i>Adesmia boronioides</i> Hook. f.	“Paramela”	<i>Fabaceae</i>	Partes aéreas	α -copaen-11-ol, δ -cadineno, 10- <i>epi</i> - γ -eudesmol, 4- α -hidroxidihidroagarofurano, 1- <i>epi</i> -cubenol, α -pineno.

<i>Caesalpinia gilliesii</i> Hook	“Barba de chivo”	<i>Fabaceae</i>	Hoja/flores	Flavonósidos: flavonas, biblavonas; Esteroles: β -sitosterol, fitol, espatulenol; Ácido ascórbico.
<i>Caesalpinia paraguariensis</i> (D. Parodi) Burkart	“Guayacán”	<i>Fabaceae</i>	Partes aéreas	Caesalpinol, bilobetina, stigma-5-en-3-O- β -6'-estearoilglucopiranósido, stigma-5-en-3- β -6'-palmitoilglucopiranósido, ácido oleanólico, ácido 3-O-(<i>E</i>)-hidroxicinamoil oleanoico, ácido betulínico, ácido 3-O-(<i>E</i>)-hidroxicinamoil betulínico, lupeol.
<i>Erythrina crista-galli</i> L. var. <i>crista-galli</i>	“Seibo”	<i>Fabaceae</i>	Hoja	Isoquinolina: cristadina, cristamidina; triterpeno: ácido oleanólico.
<i>Myroxylon peruiferum</i> L. f.	“Quina”	<i>Fabaceae</i>	Corteza	Cabreuvina (isoflavona); nerolidol (sesquiterpeno).
<i>Prosopis chilensis</i> (Molina) Stuntz emend. Burkart var. <i>chilensis</i>	“Algarrobo”	<i>Fabaceae</i>	Planta entera	Luteolina, vitexina, isovitexina, rutina, quercetrin-3-meti éter; fenetilamina, triptamina.
<i>Rhynchosia senna</i> Gillies ex Hook. var. <i>senna</i>	“Porotillo”	<i>Fabaceae</i>	Partes aéreas	Glicósidos fenólicos.
<i>Zuccagnia punctata</i> Cav.	“Jarilla macho”	<i>Fabaceae</i>	Partes aéreas	Chalconas: 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona, 2',4'-dihidroxichalcona; Flavonol: flavona, 3-7-dihidroxi.
<i>Centaureum erythraea</i> Rafn	“Centaurea”	<i>Gencianaceae</i>	Flores	Secoiridoides: swetiamarina.
<i>Hypericum connatum</i> Lam.	“Cabo toril”	<i>Hypericaceae</i>	Partes aéreas	Ácido clorogénico: fenilpropanoide; Flavonol: quercitrina; Derivado de floroglucinol: hiperbrasilol B; Flavonoides: amentoflavona, guaijaverina, luteoforol.
<i>Clinopodium bolivianum</i> (Benth.) Kuntze	“Muña-muña”	<i>Lamiaceae</i>	Partes aéreas	Pulegona, α -felandreno, mirceno, <i>p</i> -cimeno, <i>E</i> -cariofileno, germacreno-D, γ -cadineno, <i>epi</i> - α -cadinol, α -cadinol, espatulenol.
<i>Lepechinia meyenii</i> (Walp.) Epling	“Salvia”	<i>Lamiaceae</i>	Partes aéreas	Pisiferol, rosmanol, ácido carnósico, salvicanol, isosalvicanol, ácido oleanoico.

<i>Ocimum selloi</i> Benth.	“Albahaca del campo”	<i>Lamiaceae</i>	Hoja	Ácido rosmarínico, ácido litospérmico, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido hidroxi-benzoico.
<i>Melissa officinalis</i> L.	“Toronjil”	<i>Lamiaceae</i>	Hoja/flores	Monoterpenos aldehídicos: citral, citronelal; Ácidos triterpénicos: ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido pomólico; Ácidos fenólicos: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico, ácido romárico, ácido malítrico A y B; Flavonoides: quercitrina, ramnocitrina.
<i>Salvia cuspidata</i> subsp. <i>gilliesii</i> (Benth.) J.R.I. Wood	“Salvia morada”	<i>Lamiaceae</i>	Hoja	Sesquiterpeno: aromadendreno, biciclogermacreno; Monoterpeno: limoneno.
<i>Satureja hortensis</i> L.	“Ajedrea de jardín”	<i>Lamiaceae</i>	Hoja/flores	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno, timol, α , β y γ - terpinenos; Ácidos fenólicos: ácidos cafeico, siríngico, vanílico, <i>p</i> -hidroxibenzoico, ferúlico y rosmarínico; ácido ursólico; Flavonoides: apigenina, escutelarina.
<i>Stachys officinalis</i> Trev.	“Betónica”	<i>Lamiaceae</i>	Hoja/flores	Alcaloides piridínicos: trigonellina; Alcaloides pirrolidínicos: estaquidrina, betonicina; Ácidos fenólicos, cafeico, clorogénico y rosmarínico.
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Ness	“Canela”	<i>Lauraceae</i>	Corteza	Aldehído cinámico, eugenol, acetato de cinamilo.
<i>Balbisia calycina</i> (Griseb.) Hunz. & Ariza	“Té de burro”	<i>Ledocarpaceae</i>	Partes aéreas	Flavonoides: luteolina, apigenina, quercitrina, quercetina, isoquercitrina.
<i>Lawsonia inermis</i> L.	“Henna”	<i>Litraceae</i>	Hoja/Tallo	Manitol (glúcido); hennataninos, ácido gálico (taninos); luteolina, glucósido-7-luteolina, acacetina, glucósido-7-acacetina (flavonoides); 5-alil oxi-7-hidroxycumarina (cumarina); hennósidos A, B y C (glucósidos de hidroxi-1,4-naftoquinona); lawsona (aglucon).

<i>Caioophora coronata</i> (Gillies ex Arn.) Hook. & Arn.	“Ortiga de la sierra”	<i>Loasaceae</i>	Partes aéreas	Monoterpeno iridoide: iso booneina; monoterpeno secoiridoide: loganina; Iridoides: 1 α -metoxi-6 α -, 10-dihidroxiisoeptiridomirmecina.
<i>Ligaria cuneifolia</i> (Ruiz & Pav.) Tiegh.	“Muérdago criollo”	<i>Loranthaceae</i>	Hoja, tallo	Quercetina, epicatequina, quercitrina-3-O-xilósido, catequina-4- β -ol, quercitina-3-O- α -arabinósido, dímeros de catequina-4- β -ol, quercitina-3-O- β -arabinósido, oligómeros de catequina-4- β -ol, quercitina-3-O- β -ramnósido, polímeros de catequina-4- β -ol, flavonol y proantocianidinas, heterósidos cardenólidos.
<i>Tripodanthus acutifolius</i> (Ruiz & Pav.) Tiegh.	“Corpo”	<i>Loranthaceae</i>	Hoja, tallo	Rutina: 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona 3- β -ramnosilglucósido; Iso-quercitrina: 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona 3- β -glucósido.
<i>Heimia salicifolia</i> (Kunth) Link	“Quiebra arado”	<i>Lythraceae</i>	Partes aéreas	Alcaloides quinolicínicos: abresolina, 10-epiabresolina, vertina, lifolina, litrina, nesodina.
<i>Sida rhombifolia</i> L.	“Escoba dura”	<i>Malvaceae</i>	Partes aéreas	Betaina, arginina; Ecdiesteroides: 20-hidroxiecdisona, 2-deoxi-20- hidroxiecdisona-3-O- β -D-glucopiranosido; Esteroides y/o triterpenoides y sus glicósidos; Flavonoides y sus glicósidos.
<i>Ibicella lutea</i> (Lindl.) Van Eselt.	“Cuernos del diablo”	<i>Martyniaceae</i>	Partes aéreas	Flavona: apigenina; Triterpenos: 3-acetil-24-epi-polacandrina, 1,3-diacetil-24-epi-polacandrina, 11-O-(6'-O-acetil- β -D-glucopiranosil) ácido esteárico.
<i>Cedrela odorata</i> L.	“Cedro”	<i>Meliaceae</i>	Tallo	Alcohol de más de 5 C: D-Octacosano; 11 β -acetoxoobacunilacetato, 11 β -,19-diacetoxi-1-deacetil-1-epidihidronomilina; 8 β , 14 α -dihidrowietenólido; 3 β , 6-dihidroxidihidrocarapina, swietenólido.
<i>Laureliopsis philippiana</i> (Looser) Schodde	“Tepa”	<i>Monimiaceae</i>	Hoja	Alcaloides bisbencilisoquinolina: laureliopsina A.

<i>Blepharocalyx salicifolius</i> (Kunth) O. Berg	“Anacahuita”	<i>Myrtaceae</i>	Hoja	1-8-cineol, linalool, β -cariofileno.
<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg var. <i>xanthocarpa</i>	“Guabirá”	<i>Myrtaceae</i>	Hoja	Flavonoides, saponinas, taninos.
<i>Myrcianthes cisplatensis</i> (Cambess.) O. Berg	“Guayabo Colorado”	<i>Myrtaceae</i>	Partes aéreas	Monoterpenos hidrocarbonados: canfeno, <i>p</i> -cimeno, limoneno, α -pineno, β - pineno; Sesquiterpenos hidrocarbonados: δ -cadineno, γ -cadineno, β -cariofileno; Sesquiterpenos oxigenados: T-cadinol.
<i>Myrcianthes pungens</i> (O. Berg) D. Legrand	“Mato”	<i>Myrtaceae</i>	Partes aéreas	Monoterpenos: 1,8-cineol, nerol, geraniol, α -pineno, α -tujeno, <i>p</i> -cimeno, β - pineno, mirceno, D-limoneno, α -felandreno, terpinoleno.
<i>Psidium guajava</i> L.	“Guayabo”	<i>Myrtaceae</i>	Partes aéreas	Polihidroxicalconoides (pirrolidinos), taninos y compuestos fenólicos, guajaverina (un glicósido de quercetina), triterpenoides.
<i>Psidium guineense</i> Sw.	“Arazay”	<i>Myrtaceae</i>	Hoja	(Z)-nerolidol, cariofileno, β -selineno.
<i>Nothofagus obliqua</i> (Mirb.) Oerst. subsp. <i>obliqua</i>	“Roble pillín”	<i>Nothofagaceae</i>	Hoja	Flavonol: quercitrina, rutina, hiperósido.
<i>Fuchsia magellanica</i> Lam.	“Chilco”	<i>Onagraceae</i>	Partes aéreas	Flavonoles: astragalina, hiperósido.
<i>Oxalis erythrorhiza</i> Gillies ex Hook. & Arn.	“Boldo de la cordillera”	<i>Oxalidaceae</i>	Planta entera	Embelina, benzoquinone, 3-heptadecil-5-metoxifenol.
<i>Argemone subfusiformis</i> G. B. Ownbey	“Cardo santo”	<i>Papaveraceae</i>	Semilla	Sanguinarina, dihidroxisanguinarina, nor-hidro-sanguinarina.
<i>Passiflora foetida</i> L. var. <i>foetida</i>	“Granadilla”	<i>Passifloraceae</i>	Hoja	Flavona: apigenina, 4-7-di-O-metilo.

<i>Phyllanthus niruri</i> L.	“Rompe piedras”	<i>Phyllanthaceae</i>	Partes aéreas	Filantina, hipofilantina, geraniina, elagitaninos, ácido elágico, glicoflavonas, astragalina, isoquercitrina, quercetina, quercitrina, rutina, lignanos, taninos hidrolizables, cianoglucósido.
<i>Petiveria alliaceae</i> L. var. <i>alliaceae</i>	“Pipí”	<i>Phytolaccaceae</i>	Hoja	Leridol, leridol 5-metil éter, dihidrokaemferol-3-O- α -ramnósido, dihidroquercetina 3-O- α -ramnósido, mircetina 3-O- α -ramnósido.
<i>Phytolacca dioica</i> L.	“Ombú”	<i>Phytolaccaceae</i>	Planta entera	Flavonol: ombuosido; Carbohidrato: fructosa; Proteína inactivadora de ribosoma: PD-S2.
<i>Peperomia tetraphylla</i> (G. Forst.) Hook. & Arn. var. <i>tetraphylla</i>	“Siempreviva chica”	<i>Piperaceae</i>	Partes aéreas	Peperotetrafin, norlignano, fenilpropanoide, α -asarona, ácido vainílico, ácido verátrico.
<i>Piper aduncum</i> L. var. <i>aduncum</i>	“Matico”	<i>Piperaceae</i>	Hoja	Monoterpenos: α - y β -pineno, limoneno, <i>cis</i> -ocimeno, <i>trans</i> -ocimeno, linalol; α -copaeno, β -elemeno, α -gurjuneno, β -cariofileno, aromadendreno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, α -muuroleno, γ -cadineno, δ -cadineno, germacreno B, nerolidol, espatulenol, globulol.
<i>Piper regnellii</i> (Miq.) C. DC.	“Pariparoba”	<i>Piperaceae</i>	Hoja	Neolignanos: eupomatenoide-6, eupomatenoide-5, eupomatenoide-3.
<i>Scoparia dulcis</i> L.	“Hiel de tierra”	<i>Plantaginaceae</i>	Partes aéreas	Diterpeno: scoparinol; Flavona: cirsitakaosido; ácidos diterpenos tipo labdano: ácido scopárico, ácido scopárico A y B; terpenoides, alcaloides, taninos, saponinas, glicósidos cardíacos.
<i>Muehlenbeckia sagittifolia</i> (Ortega) Meisn.	“Zarzaparrilla colorada”	<i>Poligonaceae</i>	Partes aéreas	Alcaloides.

<i>Polygonum hydropiperoides</i> Michx. var. <i>hydropiperoides</i>	“Lagunilla”	<i>Poligonaceae</i>	Partes aéreas	Triterpenos y/o esteroides, cumarinas, flavonoides, polifenoles, taninos, saponinas.
<i>Ruprechtia triflora</i> Griseb.	“Palo estaca”	<i>Poligonaceae</i>	Partes aéreas	Triterpeno: lupeol; Esteroides: β -hidroxi-estigmast-5-en-7-ona,3-; 5 α ,8 α -epidioxiergosta-6,22-dien-3 β -il estearato.
<i>Lomatia ferruginea</i> (Cav.) R. Br.	“Fuinque”	<i>Proteaceae</i>	Hoja, tallo	Quinoide: lawsona, valdiviona.
<i>Acaena magellanica</i> (Lam.) Vahl	“Abrojo”	<i>Rosaceae</i>	Partes aéreas	Quercetina, Quercetina-3-O- β -D-glucósido, Quercetina-3-O- β -D-galactósido, ácido elágico, catequina, 28-O- β -D-glucopiranosido.
<i>Polylepis australis</i> Bitter	“Tabaquillo”	<i>Rosaceae</i>	Hoja, corteza del leño	Triterpeno: metil éster del ácido oleanólico; metil 2 α , 3 β -dihidroxi-11 oxo-olean-12-en-28-oate, metilacetiloleanolate, metilacetilursolate, metil 3 β -hidroxiolean-9(11)-12-dien-28-oate, metil 3 β -hidroxiolean-11-oxo-olean-12-en-28-oate, metil 2 α -metoxi-3 β -hidroxiolean-12-en-28-oate.
<i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.	“Botón blanco”	<i>Rubiaceae</i>	Partes aéreas	Alcaloides indólicos: borrerina, borreverina, isoborreverina.
<i>Barosma betulina</i> (Berg.) Bartl.	“Buchú redondo”	<i>Rutaceae</i>	Hoja	(-) isomentona, (+) mentona, (-) pulegona; diosfenoles.
<i>Zanthoxylum coco</i> Gillies ex Hook. & Arn.	“Coco”	<i>Rutaceae</i>	Partes aéreas	Alcaloides: cheleritrina, berberina, fagarina II.
<i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.	“Cuentrillo”	<i>Rutaceae</i>	Corteza de tallo y raíz	Alcaloide isoquinolínico: zantoxilina, tembetarina, magnoflowersina, candicina; Alcaloide quinolínico: skimmianina; Triterpeno: lupeol; Lignano: sesamina.
<i>Salix humboldtiana</i> Willd.	“Sauce colorado”	<i>Salicaceae</i>	Partes aéreas	Flavonoides, cumarinas, taninos.

<i>Dodonaea viscosa</i> Jacq.	“Chamisa”	<i>Sapindaceae</i>	Hoja	Aliarina, ácido dodónico, ácido hautriwaico, dodonósidos A y B, viscosol, estigmasterol, isorhamnetina, penduletina, quercetina, doviscogenina.
<i>Paullinia pinnata</i> L.	“Isipo”	<i>Sapindaceae</i>	Partes aéreas	Flavona: Diosmetina-7-O-(2"-O-β-D-apiofuranosil-6"-acetil-β-D-glucopiranósido).
<i>Capsicum baccatum</i> L. var. <i>baccatum</i>	“Ají del campo”	<i>Solanaceae</i>	Fruto	Alcaloides: capsaicina, dihidrocapsaicina.
<i>Fabiana imbricata</i> Ruiz & Pav.	“Palo piche”	<i>Solanaceae</i>	Hoja, tallo	Ácido oleanólico, rutina, ácido clorogénico, escopoletina.
<i>Jaborosa caulescens</i> var. <i>bipinnatifida</i> (Dunal) Reiche	“Yerba sapo”	<i>Solanaceae</i>	Partes aéreas	Witanólidos.
<i>Nicandra physalodes</i> (L.) Gaertn.	“Farolito”	<i>Solanaceae</i>	Planta entera	Alcaloides pirrolidínicos: higrina, cuscohigrina, higrolina, norhigrina; Alcaloide tropánico: calistegina B ₁ ; ecdiesteroides; witanólidos.
<i>Nicotiana glauca</i> Graham	“Palán-palán”	<i>Solanaceae</i>	Hoja, tallo, fruto	Esteroles: colesterol, campesterol, estigmasterol, β-sitosterol.
<i>Physalis viscosa</i> L.	“Carambú”	<i>Solanaceae</i>	Planta entera	Witanólidos; éster acetilados de sacarosa.
<i>Salpichroa organifolia</i> (Lam.) Baill.	“Huevito de gallo”	<i>Solanaceae</i>	Planta entera	Witanólidos; higrina; cuscohigrina.
<i>Solanum americanum</i> Mill.	“Hierba mora”	<i>Solanaceae</i>	Hoja	Alcaloides esteroidales: solasonina, solasodina.
<i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.	“Espina colorada”	<i>Solanaceae</i>	Hoja, espina	Witanólidos: cilistepóxido, cilistadiol.
<i>Vassobia breviflora</i> (Sendtn.) Hunz.	“Calchal de gallina”	<i>Solanaceae</i>	Hoja, tallo	Jaborosalactonas A, B, D.

<i>Guazuma ulmifolia</i> Lam. var. <i>ulmifolia</i>	“Marmelero”	<i>Solanaceae</i>	Tallo	Flavonoide: epi- catequina.
<i>Luehea divaricata</i> Mart.	“Sota caballo”	<i>Tiliaceae</i>	Hoja, tallo	Flavonoide: epi- catequina; ácido torméntico de 3 β - <i>p</i> -hidroxibenzoil, ácido maslínico, vitexina, glucopiranosilitsos-terol.
<i>Acantholippia deserticola</i> (Phil.) Moldenke	“Rica-rica”	<i>Verbenaceae</i>	Partes aéreas	Monoterpenos hidrocarbonados: α -tuyona, β -tuyona, sabinene; Alcoholes monoterpénicos: terpinen-4-ol; Fenol: carvacrol; Sesquiterpeno hidrocarbonado: α -curcumeno; Aldehído cumínico: isopropil benzaldehído; Triterpenoides: β -amirina.
<i>Acantholippia seriphioides</i> (A. Gray) Moldenke	“Tomillo”	<i>Verbenaceae</i>	Planta entera	Timol, <i>p</i> -cimeno, carvacrol, γ -terpineno, citral, geranial.
<i>Aloysia citriodora</i> Palau	“Cedrón”	<i>Verbenaceae</i>	Hoja	Neral, geranial, nerol, geraniol, bicicloesquifelandreno, espatulenol, nerolidol, β -bourboneno, <i>trans</i> - β -cariofileno, limoneno, acetato de geranilo, β -pineno, acetato de nerilo, α -tuyona, <i>cis</i> -carveol, carvona, 1,8-cineol, cariofileno óxido, linalol.
<i>Aloysia gratissima</i> (Gillies & Hook. ex Hook.) Tronc. var. <i>gratissima</i>	“Arrayán”	<i>Verbenaceae</i>	Partes aéreas	Biciclogermacreno, canfeno, caadinol, cariofileno óxido, limoneno óxido, acetato de crisantemo, α y β -cariofileno, β -elemeno, viridiflorol, linalol, α - y β -tuyona, (<i>E</i>)-nerolidol, germacreno D, eucaliptol, citral, pulegona, sabineno, α - y β -pineno, limoneno, acetato de terpinelo, eugenol, mirceno, γ -terpinen-1-al, <i>trans</i> -pinocarveol, <i>cis</i> -pinocarveol, γ - y δ -elemeno, acetato de geranilo, β -cubebeno, espatulenol, globulol, α -humuleno, aloaromadendren, γ -gurjuneno, cubebol, elemol, germacreno B, guaíol, bisabolol, α -amirina, ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico, rutina.

<i>Aloysia polystachya</i> (Griseb.) Moldenke	“Té de burro”	Verbenaceae	Partes aéreas	α - y β -pineno, α - y β -tuyona, sabineno, carvona, carvacrol, eucarvona, canfeno, <i>p</i> -cimeno, mirceno, α -terpineol, pulegona, β -cariofileno, α -humuleno, γ - y δ -cadineno, espatunelol.
<i>Lantana cámara</i> L.	“Bandera española”	Verbenaceae	Partes aéreas	Davanona, β -cariofileno, sabineno, γ -cadineno, linalol, α -humuleno.
<i>Lippia integrifolia</i> (Griseb.) Hieron.	“Poleo”	Verbenaceae	Hoja	(-) piperitona, (+) limoneno, 1,8-cineol, cariofileno, sabineno, linalol, acetato de bornilo, α - y β -pineno, <i>p</i> -cimeno, α -terpineol, acetato de linalilo, acetato de citronelilo, carvona, borneol, α -muuroleno, citronelol, geranial, neral, β -elemeno, γ -cadineno, cariofileno óxido, α - y β -cubebeno, mircenona.
<i>Stachytarpheta caryennensis</i> (Rich.) Vahl	“Té criollo”	Verbenaceae	Planta entera	Iridoides monoterpénicos, fenilpropanoides glicosidados (Verbascósido, isoverbascósido, martinósido).
<i>Cissus verticillata</i> (L.) Nicolson & C. E. Jarvis	“Uva-brava”	Vitaceae	Planta entera	Biciclogermacreno, estilbeno, kaemferol 3-O-ramnósido, quercetina 3-O-ramnósido, flavonas, flavononas, flavonoles, leucoantocianidin- <i>as</i> , saponinas.
<i>Larrea cuneifolia</i> Cav.	“Jarilla macho”	Zigophyllaceae	Planta entera	Asparagina; flavona; 4'-5-7-trihidroxi-3-3'-dimetoxi (Flavonol); α -agarofurano (Sesquiterpeno).
<i>Larrea divaricata</i> Cav.	“Jarilla hembra”	Zigophyllaceae	Hoja	Larreagenina A; ácido nor-dihidroguaiarético.

- BARBOZA, G.; CANTERO, J. J.; NUÑEZ, C.; PACCIARONI, A. ARIZA ESPINAR L. 2009. *Museo Botánico - KURTZIANA. Volumen especial: Plantas Medicinales*. Córdoba. Argentina;Tomo 34 (1-2): 7-365.
- MANDRILE, E. L. *Farmacognosia - Plantas medicinales que se dispensan en Argentina*. Tomo I, 2003, 1^{ra} edición, Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.
- MANDRILE, E. L. *Farmacognosia - Plantas medicinales que se dispensan en Argentina*. Tomo II, 2006, 1^{ra} edición, Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, Argentina.