

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de la resina de *Copaifera paupera* (copaiba) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans* Arequipa 2013

Tesis Presentado por la Bachiller:

ARENAS CAMAC, Ysabel Lorena

**Para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico**

Asesor:

Dr. José Villanueva salas Ph.D

AREQUIPA-PERU

2013

ÍNDICE

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	10
CAPÍTULO I	11
MARCO TEORICO	11
1.1. COPAIFERA PAUPERA. (COPAIBA)	11
1.1.1. Generalidades	11
1.1.2. Descripción botánica	11
1.1.3. Clasificación taxonómica:	12
1.1.4. Nombres vulgares	13
1.1.5. Distribución geográfica	13
1.1.6. Composición química	14
1.1.7. Parte utilizada	14
1.1.8. Antecedentes terapéuticos medicinales	14
1.1.9. Marcha fitoquímica:	15
1.2. BACTERIAS	15
1.2.1. Bacterias Gram positivas	16
1.2.1.1 <i>Staphylococcus aureus.</i>	17
1.2.1.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	20
1.2.2. Bacterias Gram negativas	22
1.2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	23
1.2.2.2 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	25
1.2.3. <i>Cándida albicans.</i>	29
CAPÍTULO II	31
MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. LUGAR DE REALIZACIÓN	31
2.2. MATERIALES	31
2.2.1. Material biológico:	31
2.2.1.1 <i>Copaifera paupera</i> (copaiba)	31
2.2.1.2 Cepas utilizadas	32
2.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO, EQUIPO Y REACTIVOS	32
2.2.2.1 Material de vidrio	32
2.2.2.2 Equipo de laboratorio	33

2.2.2.3	Otros	33
2.2.2.4	Reactivos	34
2.2.2.5	Medios de cultivo	35
2.2.3.	MÉTODOS	35
2.2.3.1	Obtención, identificación de la resina extraída	35
2.2.3.2	Procesamiento de las cepas en estudio	36
2.2.3.3	Determinación de la sensibilidad de la resina de <i>Copaifera paupera</i> . (copaiba)	51
2.2.3.4	Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro	53
2.2.3.5	Análisis Fitoquímico en Cromatografía de Capa Fina (CCF)	56
2.2.3.6	Análisis estadístico	59
CAPÍTULO III		62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		62
3.1.	RENDIMIENTO DE LA RESINA EXTRAÍDA	62
3.2.	CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RESINA <i>Copaifera paupera</i> (copaiba)	63
3.3.	Determinación de la sensibilidad de la resina de <i>Copaifera paupera</i> (copaiba) en las diferentes cepas estudiadas	64
3.4.	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO CON EL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>copaifera paupera</i> (copaiba) EN LAS DIFERENTES CEPAS ESTUDIADAS	66
3.4.1.	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la resina de <i>Copaifera paupera</i> (copaiba) frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	66
3.4.2.	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico <i>Copaifera paupera</i> (copaiba) frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i>	67
3.4.3.	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con el extracto etanólico de <i>Copaifera paupera</i> (copaiba) frente a <i>Escherichia coli</i> .	68
3.4.4.	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la resina de <i>Copaifera paupera</i> (copaiba) frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	69
3.4.5.	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con el extracto etanólico de <i>copaifera paupera</i> (copaiba) frente a <i>Cándida albicans</i>	71
3.5.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA <i>Copaifera paupera</i> (copaiba) FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Cándida albicans</i> .	72
3.5.1.	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	72
3.5.2.	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	73
3.5.3.	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a <i>Escherichia coli</i> .	74
3.5.4.	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	75
3.5.5.	Determinación de la Concentración Bactericida y Fungicida Mínima (CBM) frente a <i>Cándida albicans</i> .	77
3.6.	ANALISIS ESTADISTICO DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) y la CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) EN LAS DISTINTAS CEPAS ESTUDIADAS	78

CONCLUSIONES	88
SUGERENCIAS	89
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	90
ANEXOS	94



RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto antimicrobiano de la resina *Copaifera paupera* (copaiba) sobre el crecimiento *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y el efecto antimicótico sobre *Cándida albicans*.

En primer lugar se recolectó la droga de especímenes de *Copaifera paupera* (copaiba) que crecen en el Distrito de Callería Pucalpa, Provincia Coronel Portillo en el Departamento de Ucayali, la resina pura se preparó un coprecipitado soluble en agua con polivinil pirrolidona (PVP). Este método proporcionó un rendimiento del 63.3%.

Para la determinación del efecto antimicrobiano y antimicótico se utilizaron cepas provenientes del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad Católica de Santa María, “Hospital Goyeneche”, “Hospital Sandrita Pérez” (Majes-Pedregal) en número de 4, 3, y 3 respectivamente; haciendo un total de 10 cepas de cada tipo bacteriano y de *Cándida albicans*. Todas estas cepas fueron sometidas a la identificación bioquímica correspondientes para todos los microorganismos estudiados.

La determinación del efecto antimicrobiano y antimicótico se inició con la determinación de la sensibilidad de cada microorganismo a la resina de *Copaifera*

paupera (copaiba) mediante el método de excavación placa-cultivo, con la sensibilidad hallada se procedió a determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de dilución tubo con una concentración final de 6 mg/ml para *Staphylococcus aureus*; 6 mg/ml para *Staphylococcus epidermidis*; 9mg/ml para *Escherichia coli*; 90mg/ml para *Pseudomona aeruginosa* y 3 mg/ml para *Cándida albicans*, posteriormente se determinó la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se cultivó en placa, hallándose una concentración final de 7 mg/ml para *Staphylococcus aureus*; 8 mg/ml para *Staphylococcus epidermidis*; 10 mg/ml para *Escherichia coli*; 100 mg/ml para *Pseudomona aeruginosa* y 3 mg/ml para *Cándida albicans*.

Según el análisis estadístico y de varianza realizado a los halos de inhibición de las Concentraciones Bactericidas Mínimas, se puede concluir que solo las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* muestran una CBM significativa a un nivel del 0.05, ya que ambas son estadísticamente similares entre sí; y distintas de los halos de *Escherichia coli* y *Cándida albicans*.

Finalmente la resina fue sometida a un análisis fitoquímico preliminar mediante cromatografía en capa fina, mediante este método se observó la presencia de terpenos.

ABSTRACT

In the present investigation we determined the antimicrobial effect paupera *Copaifera* resin (copaiba) on growth *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and antifungal effect on *Candida albicans*.

First collected specimens Drug *paupera Copaifera* (copaiba) growing Callería Pucalpa District, Province Coronel Portillo en the Department of Ucayali, the pure resin is prepare a coprecipitado soluble in water with *polyvinylpyrrolidone* (PVP). This method gives a yield of 63.3%.

To determine the antimicrobial and antifungal strains were used from the Clinical Analysis Laboratory of the Catholic University Santa Maria, "Goyeneche Hospital", "Hospital Sandrita Pérez" (Majes-Pedregal). In number of 4, 3, and 3 respectively, making a total of 10 strains of each type of bacteria and *Candida albicans*. All these strains were subjected to identification procedures biochemistry corresponding positive results for all types of microorganisms.

Determining the antimicrobial and antifungal effect was started with the determination of the sensitivity of each microorganism *paupera Copaifera* resin (Copal) by the method of excavation-culture plate, with the sensitivity found proceeded to determine the Minimum Inhibitory Concentration (CIM) by tube dilution method with a concentration of 6 mg / ml for *Staphylococcus aureus*, 6 mg / ml for *Staphylococcus epidermidis*, 9 mg / ml for *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and 90mg/ml to 3 mg / ml for *Candida albicans*, subsequently determined Minimum Bactericidal Concentration (CBM) was plated, being a concentration of 7 mg / ml for *Staphylococcus aureus*, 8 mg / ml for *Staphylococcus*

epidermidis, 10 mg / ml for *Escherichia coli* to 100mg/ml *Pseudomonas aeruginosa*, and 3 mg / ml for *Candida albicans*.

According to statistical analysis of variance and can conclude that the CBM alone copaiba show antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains to a level of 0.05.

Finally the resin was subjected to a preliminary analysis by photochemical thin layer chromatography, by this method showed the presence of terpenes.



INTRODUCCIÓN

En los últimos años la medicina natural está tomando un mayor auge, debido a que el estudio de las plantas medicinales se está intensificando con el deseo de descubrir y crear nuevos antibióticos y terapias alternativas a las ya existentes, basándose en el uso tradicional que le dan los pobladores a diversas plantas.

En el cuerpo humano hay aproximadamente diez veces tantas células bacterianas como células humanas, con una gran cantidad de bacterias en la mayor parte de nuestro organismo. A pesar de que el efecto protector del sistema inmune hace que la gran mayoría de estas bacterias sea inofensiva o beneficiosa, algunas bacterias patógenas pueden causar enfermedades e infecciones. En los últimos años hay una mayor resistencia de los microorganismos a antibióticos ocasionando que el arsenal terapéutico que tenemos cada vez sea menos efectivo.

La planta *Copaifera paupera* (copaiba) es utilizada actualmente por los pobladores como un gran cicatrizante, desintoxicante y desinflamante natural, es por eso que con el deseo de saber él porque se le atribuye estas cualidades terapéuticas realizamos el presente trabajo de investigación; además porque hoy en día las infecciones son enfermedades muy comunes, por el cual se probó sus efectos frente a los principales agentes patógenos de las infecciones, entre ellos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*. Y a la vez contribuir en datos científicos sobre esta planta ya que se le usa empíricamente pero no se sabe si tendrá o no efecto frente a algún microorganismo específico.

OBJETIVOS

1. Determinar el efecto antimicrobiano in vitro de la resina de *Copaifera Paupera* (Copaiba), frente al crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y antimicótico frente a las cepas de *Cándida albicans*.
 - Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de la *Copaifera Paupera* (Copaiba) frente a estos cinco microorganismos.
 - Concentración Bactericida Mínima (CBM) de la *Copaifera Paupera* (Copaiba) frente a estos cinco microorganismos.
2. Realizar un coprecipitado soluble en agua de la resina pura de la *Copaifera Paupera* (Copaiba)
3. Realizar un análisis fitoquímico preliminar de la resina de la *Copaifera Paupera* (Copaiba) para establecer su composición química

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

1.1. *COPAIFERA PAUPERA*. (COPAIBA)

1.1.1.GENERALIDADES

La *Copaifera paupera* (copaiba) pertenece a la familia *Fabaceae*. Hay 35 especies de *Copaifera*, entre estas, *C. jacquinii*, *C. nitida*, *C. paupera*, *C. sellowii*, *C. officinalis*, que se encuentran principalmente en zonas tropicales de América del Sur. (Especialmente en Brasil, Argentina, Bolivia, Guyana, Colombia, Perú y Venezuela).^{(41) (39)}

1.1.2.DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Se trata de un árbol frondoso perenne, perteneciente a la familia de las Fabáceas (Leguminosas), caracterizado por presentar una altura entre 20-30 metros; corteza colorada oscura con surcos profundos longitudinales; hojas alternas, pinnatífidas, con 3-5 folíolos, elípticas y oval-lanceoladas, de hasta 13cm de longitud; flores blancas (algunas con pequeños tintes rosados) agrupadas en ramos con 5-16 unidades en cada uno, dispuestos en espiga terminal. El fruto es una drupa ovoidal y pedunculada, con una semilla en su interior.



Figura N°1: Árbol de *Copaifera paupera* (copaiba)
Fuente: <http://rainforest-database.com/plants/copaiba.htm>

1.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

La *Copaifera paupera*. (Copaiba) presenta las siguientes clasificaciones taxonómicas de acuerdo al sistema de A Cronquist 1981:

REINO:	Plantae
PHYLUM:	Magnoliophyta
CLASE:	Rosopsida
ORDEN:	Fabales
FAMILIA:	Fabaceae
GENERO:	Copaifera
ESPECIE:	officinalis, langsdorffii, reticulata
NOMBRE CIENTIFICO:	<i>Copaifera paupera</i>



Figura N°2: *Copaiifera paupera* (copaiba)

Fuente: <http://rainforest-database.com/plants/copaiba.htm>

1.1.4. NOMBRES VULGARES

Perú: “copaiba”, “palo de aceite”, “árbol de aceite”; Colombia: “palo de aceite”, “currucay”, “jurukay”, “msalamo”, “cabima”; Venezuela: “Copaiba”, “calenibo”, “calimbo”; Bolivia: “copaiba”, “beni”. Brasil: “Copaiba”, “matisihuati”, “copaibí”. Shipibo-conibo: “bonshish matiasiasi”, “namboman tsacati”. V. Conibo: “bunxis”, “copal”, “jatobamirim”⁽³⁸⁾

1.1.5. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Esta planta crece en climas tropicales secos y húmedos y se encuentra en la Amazonía Peruana en los Departamentos de Ucayali (Tahuania- Atalaya), Madre de Dios, Loreto y abundantemente, en el bajo Huallaga.

La *Copaiifera paupera* crece en climas tropicales, secos y húmedos, con precipitación pluvial de 1 700 a 3 300 mm y temperatura promedio anual de 22 a 26°C. Suelo: Generalmente areno-arcilloso, prospera en suelos con bajo nivel de materia orgánica.⁽³⁹⁾

1.1.6.COMPOSICIÓN QUÍMICA

El aceite de copaiba contiene alrededor de 24 hidrocarburos sesquiterpénicos y varios diterpenos, ácidos resínicos como el elácico y copaíbico; aceites esenciales, trementina, ácido copaífero, B-eariofileno, E-cubeno, acubebeno, a-humuleno, E-humuleno y D-candieno, ácido resinólico. (Más del 50% de la resina puede ser sesquiterpenos), diterpenos, y ácidos terpénicos. Estos productos químicos incluyen cariofileno, calamenene y copalic, coipaiferic, coipaiferolic, hardwickic, y los ácidos kaurenoico. Varios de estos productos químicos son nuevos sólo se encuentran en copaiba. ⁽⁴¹⁾

1.1.7. PARTE UTILIZADA

La resina, se extrae del árbol haciendo agujeros en el tronco a intervalos, sellándose el orificio posteriormente. Se pueden extraer hasta 50cc en tres horas. Pudiendo rendir cada árbol cerca de 55 litros. Pasado un tiempo, se puede retirar el tapón del agujero y volver a recolectar la resina. Presenta olor muy aromático, sabor amargo y sensación urente.

1.1.8. ANTECEDENTES TERAPÉUTICOS MEDICINALES

En la actualidad, su uso etnomedicinal es múltiple y variado siendo empleado su resina como un gran cicatrizante, desintoxicante y desinflamante natural que las etnias de la selva amazónica utilizan en casos de psoriasis y gastritis con asombrosos resultados. El aceite de Copaiba es reconocido como un extraordinario protector del sistema digestivo que favorece y estimula su mejor funcionamiento. ⁽⁴¹⁾

Para su consumo se debe tomar de cinco a diez gotas diluidas en medio vaso con agua, de una a tres veces al día. Además, se sabe de su gran poder desinflamante y que resulta ideal para mantener las articulaciones y vías respiratorias en excelente estado, libres de problemas de salud.

Y su aplicación directamente sobre la piel para realizar masajes, ya sea en forma pura o mezclado con aceites esenciales, contribuye a activar la circulación sanguínea, resultando una gran ayuda en casos de várices.⁽⁴⁰⁾

1.1.9. MARCHA FITOQUÍMICA:

Llamado también tamizado fitoquímico o “Screening fitoquímico”, es una de las etapas de la investigación fitoquímica, que ayuda a la microquímica para evidenciar estos grupos de compuestos mediante la formación de precipitados, coloraciones, etc.

Es el proceso por el cual se va a identificar de manera cualitativa la presencia de determinados grupos de constituyentes químicos de la planta llamados metabolitos secundarios.^(3,23)

1.2. BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0.5 y 5 μ m, por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices.

Las bacterias son procariotas, generalmente poseen una pared celular compuestas de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.^(8,10)

Existen 4 morfologías para las bacterias, células esféricas o cocos, en forma de bastones, espiraladas y en forma de coma llamadas vibriones.

Además de su tamaño, forma y disposición celular otro criterio de diferenciación de las bacterias se basa sobre sus características con la tinción Gram con esta técnica la mayor parte de las bacterias pueden ser clasificadas como Gram positivas o Gram negativas.

El componente rígido de la pared celular de todas las bacterias, está constituido por peptidoglicano o mureina. El peptidoglicano se encuentra en todas las especies de bacterias excepto en los ureoplasmas y micoplasmas ya que carecen de pared celular.^(8,10)

1.2.1. Bacterias Gram positivas

Se denominan bacterias Gram positivas a aquellas bacterias que se tiñen de violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular. La envoltura celular de las bacterias Gram positivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano, que rodea a la anterior.

La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico; la capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener colorante violeta durante la tinción de Gram (ver figura N°6).⁽¹⁵⁾

En las siguientes características están presentes generalmente en una bacteria Gram positiva:⁽¹⁹⁾

- **Membrana citoplasmática:** Es una fina estructura que rodea completamente a la célula; la estructura general es una capa lipídica, los fosfolípidos poseen tanto unidades altamente hidrofílicas (ácidos grasos) como unidades hidrofóbicas (glicerol).
- **Capa gruesa de peptidoglicano:** Está constituido por N-Acetil murámico y N-Acetil glucosamida unidos por compuestos peptídicos es el responsable de que

la capa este muy polarizada y que la bacteria tenga una gruesa superficie hidrofílica.

- **Ácidos teicoicos y lipoteicoicos:** Los ácidos teicoicos son polisacáridos ácidos que contienen glicerol fosfato o residuos de ribitol, que estabilizan la pared celular. Los ácidos lipoteicoicos son aquellos ácidos teicoicos que están unidos a los lípidos de la membrana.

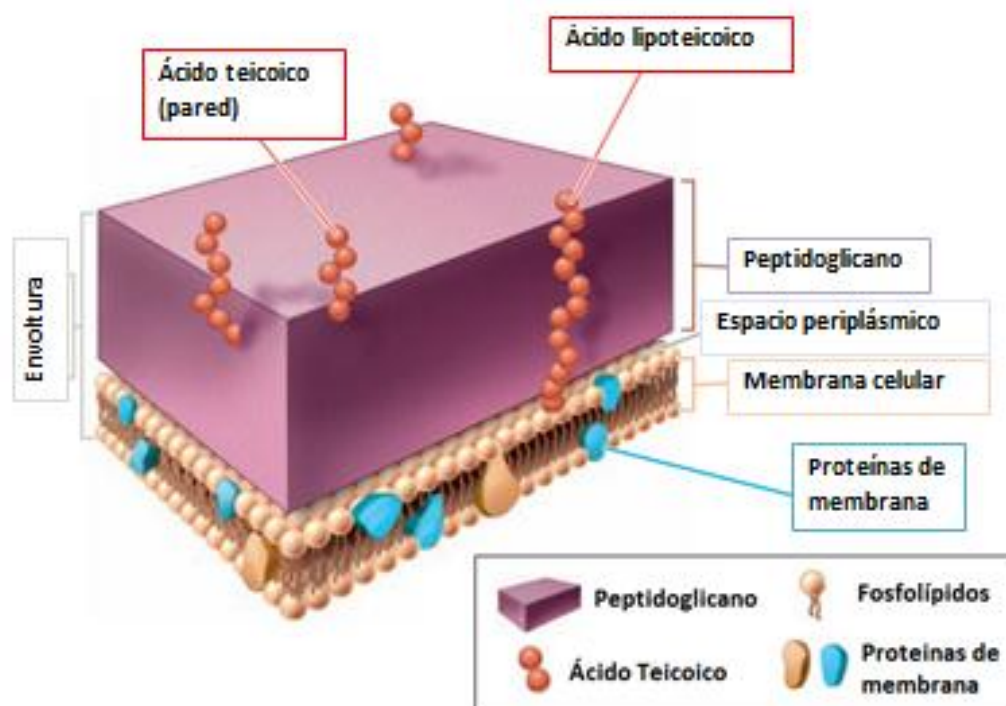


Figura N°6 Pared celular de bacteria Gram positiva

1.2.1.1 *Staphylococcus aureus*.

a. Morfología

Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos cuyo diámetro varía de 0.8 a 1.0 μ m. En cultivo sólidos, se desarrollan formando racimos, sin embargo, en medios líquidos forman a menudo cadenas cortas. ⁽¹⁸⁾

Las colonias de *Staphylococcus* son circulares de 2 a 8mm de diámetro, convexas, desde traslucidas a opacas grises blanquecinas, amarillas. ⁽¹²⁾

b. Enzimas

Staphylococcus aureus, produce varias enzimas que pueden contribuir a su virulencia. ⁽⁸⁾

- **Catalasa:** La producción de catalasa por parte de estos microorganismos puede actuar para inactivar el peróxido de hidrogeno y los radicales libres tóxicos formados por el sistema mieloperoxidasa dentro de la células fagocitas después de la ingestión de estos microorganismos.
- **Coagulasa:** Tanto la coagulasa libre como la unida (también denominada factor de agregación) pueden recubrir las células bacterianas con fibrina y tonarlas resistentes a la opzonización y la fagocitosis.
- **Fibrinolisin:(Estafiloquinasa)** Estas pueden degradar coágulos de fibrina y permitir la diseminación de la infección a los tejidos contiguos.
- **Hialuronidasa:** Hidroliza la matriz intercelular de mucopolisacáridos en los tejidos y por lo tanto puede actuar diseminado los microorganismos a zonas adyacentes.
- **Lipasa:** Las cuales son activas sobre una variedad de sustratos incluyendo plasma, grasas y aceites que se acumulan en la superficie del cuerpo, lo cual explica la intensa colonización del *Staphylococcus* por las áreas sebáceas de mayor actividad.
- **Nucleasas:** La elaboración de una nucleasa resistente al calor parece estar asociada con cepas *Staphylococcus aureus*. Se halla en la célula o en la superficie de ella.

- **β -Lactamasas.** La producción de estas enzimas pueden ser inducibles es decir se producen solo en presencia de antibióticos β -Lactámicos o constitutiva es decir se producen continuamente y hace que estos microorganismos sean resistentes a la penicilina y la ampicilina
- **Otros:** los estudios inmunológicos y de especificidad indican que *Staphylococcus aureus* producen por lo menos tres tipos diferentes.

c. Toxinas:

- ✓ **Toxinas citolíticas:** Existen varias toxinas.⁽²⁰⁾
 - **Alfa hemolisina:** Es una proteína que puede producir lisis de los eritrocitos y lesionar las plaquetas.
 - **Beta hemolisina:** Esta degrada la hemolisina y es toxica para muchas clases de células, incluso los eritrocitos.
 - **Leucosidinas:** Toxina que puede matar a los leucocitos expuestos de muchos animales.
- ✓ **Enterotoxinas:** Hay por lo menos seis toxinas solubles designadas de la A-F producidas por el *Staphylococcus aureus*, estas son termoestables resistentes a ebullición por 30 minutos y a la acción de la enzima intestinales; son causas importantes del envenenamiento con alimentos.
- ✓ **Toxina exfoliativa o epidermolítica:** Esta toxina está constituida por lo menos dos proteínas que producen la descamación generalizada del síndrome estafilocócico de piel escaldada.

d. Patogenicidad.

Staphylococcus aureus interviene en la mayor parte de los procesos supurados de heridas en el hombre. Puede localizarse en cualquiera de los

tejidos corporales, por lo que es el germen que con más frecuencia produce piemía. En el hombre es uno de los agentes etiológicos de osteomielitis, sinusitis, tonsilitis, forúnculos, mastoiditis, endocarditis y queratitis ulcerativa. Como agente secundario interviene en la angina séptica, escarlatina, tuberculosis y neumonía.

La adquisición puede ser exógena o endógena. Es un agente de gran relevancia intrahospitalaria, donde ha adquirido resistencia a la Oxacilina. La contaminación intrahospitalaria se lleva a cabo a través de las manos del personal a cargo ⁽²⁰⁾

1.2.1.2 *Staphylococcus epidermidis*

a. Morfología

Son cocos Gram positivos, que se encuentran aislados, en parejas, tétradas, o en forma de racimo de uvas. Son inmóviles. No delicados capaces de respiración aerobia y anaerobia. Son resistentes a la acción del calor (resisten 50°C durante 30 minutos) y a la acción de las sales biliares, cloruro de sodio 9%.⁽¹⁴⁾

b. Identificación en el laboratorio

Colonias blancas en agar sangre. Catalasa positivo, coagulasa negativo; no fermenta el manitol anaeróbicamente.

c. Enfermedades

Patógeno oportunista asociado con sepsis relacionada con dispositivo, por ejemplo, sepsis relacionada con catéter; endocarditis de válvulas protésicas; infección de articulaciones artificiales; infección de herida postoperatoria;

infecciones de cortocircuitos; infección del tacto urinario; osteomielitis de la herida esternal.

d. Transmision

Hábitat normal: piel. Diseminación por contacto con uno mismo, con otros pacientes o con el personal del hospital. Casi todas las infecciones adquiridas en el hospital, pero pueden ser endógenas. Sobrevive a la desecación.

e. Tratamiento

Resistencia a los antibióticos; frecuentemente múltiple (incluyendo penicilina y meticilina); susceptible a novobiocina (5 ug); característica útil para distinguir entre *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*.

Prevención de la infección: cuidado del catéter.

No hay vacuna disponible.

CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LOS STAPHYLOCOCUS

CARACTERISTICAS	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>
Tamaño de la colonia (grande)	+	-
Pigmento de la colonia	+	-
Producción de ácido por la fermentación del manitol	+	-
Coagulasa	+	-
Hemólisis	+	-
Desoxirribonucleasa	+	-

1.2.2. Bacterias Gram negativas

En microbiología, se denomina bacterias Gram negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular. Las bacterias Gram negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram positivas presentan solo una membrana lipídica y la pared fina, no retiene el colorante primario durante la tinción de Gram. En la parte externa de la capa de peptidoglicano se halla la membrana externa, la cual es exclusiva de las bacterias Gram negativas. La membrana externa dispone también de proteínas llamadas porinas que actúan como canales de entrada y salida de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular. (Ver fig. 7)

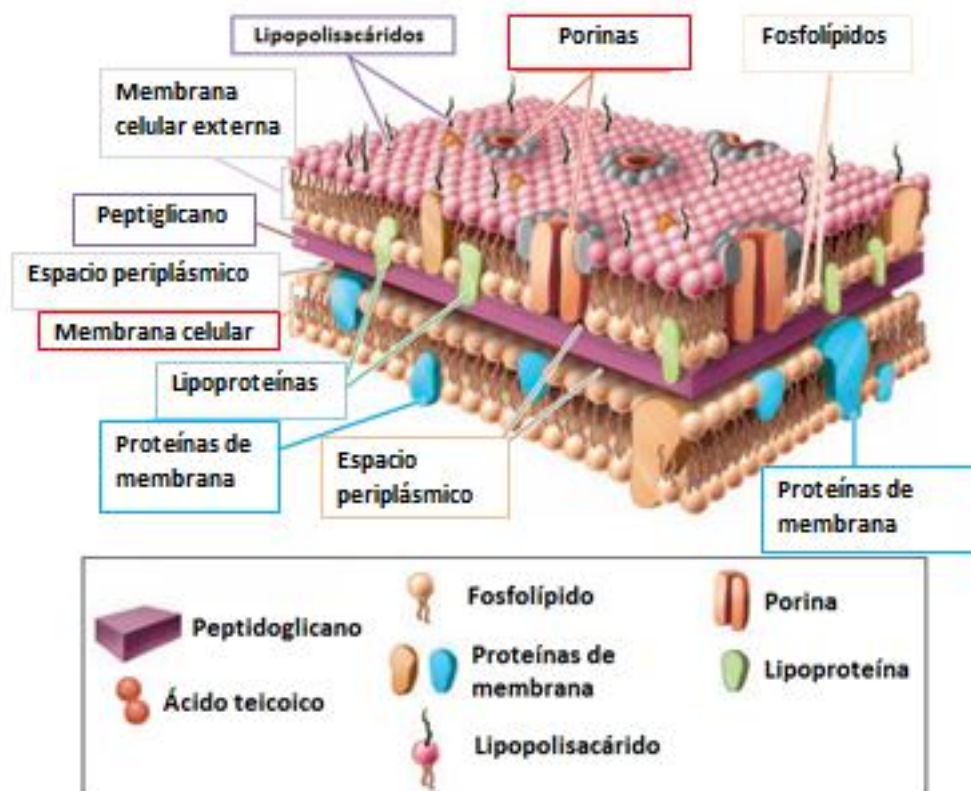


Figura N°7 Estructura de la pared celular de la bacteria Gram Negativas

Si presentan flagelos, estos tienen cuatro anillos de apoyo en lugar de los dos de las bacterias Gram positivas porque tiene dos membranas. ⁽¹⁹⁾

1.2.2.1 *Escherichia coli*

a. Morfología

Es un bacilo Gram negativo, presenta movilidad por sus flagelos peritricos, anaerobio facultativo, no forma esporas, y no dedicado, capaz de tolerar la bilis. Crece a 37°C en medios de gran simplicidad, por lo que son poco exigentes en sus necesidades nutritivas y realmente resistentes a los agentes externos; forma colonias redondas, convexas y lisas con bordes definidos. ⁽¹⁹⁾

b. Patogenicidad

Escherichia coli, causa diversas infecciones en el ser humano, las más frecuentes son las urinarias, pero pueden causar también infecciones de las vías biliares, peritonitis, neumonía, meningitis neonatal y gastroenteritis. También puede producir abscesos en cualquier localización a nivel del tejido celular subcutáneo secundarios a las infecciones de las heridas operatorias ⁽¹¹⁾

Es la patógena más habitual de las infecciones urinarias colibacilares. Desde las vías urinarias *Escherichia coli* puede originar bacteriemias con posible aparición de metástasis sépticas aunque la puerta de entrada más frecuente es la urinaria. ⁽¹⁹⁾

El efecto en pacientes hospitalarios con enfermedades graves *Escherichia coli* forma parte de la flora faríngea ya sea por instrumentación o espontáneamente, puede alcanzar los alveolos originando una neumonía específica.

Se distingue ocho cepas según su poder patógeno, también se les puede llamar virotipos: ⁽²⁵⁾

- ***Escherichia coli enteropatogénica (ECEP)***

Es el agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vía de desarrollo. ECEP interacciona con las células epiteliales produciendo una lesión histopatológica característica conocida como “adherencia/desnutrición” o lesión A/E (attaching and effacing).

- ***Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)***

Se adhiere a la mucosa del intestino delgado, no la invade, y elabora toxinas que producen diarrea. No hay cambios histológicos en las células de la mucosa y muy poca inflamación. Produce diarrea no sanguinolenta en niños y adultos, sobre todo en países en vías de desarrollo, aunque los desarrollados también se van afectados.⁽¹⁵⁾

- ***Escherichia coli enteroinvasiva (ECEI)***

Es inmóvil no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis.

- ***Escherichia coli enterohemorrágica o verotoxigenica (ECEH)***

Produce vero toxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágicas, luego síndrome hemolítico ureico (lo anterior más infecciones del riñón, posible entrada en coma y muerte) y por último, purpura trombocitopénica trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central).

- ***Escherichia coli enteroagregativa (ECEA)***

La capacidad de las cepas de *Escherichia coli enteroagregativa* (ECEA) para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano y la producción de una o más de las toxinas descritas, pudiendo explicar la persistencia de las diarreas por ellas producidas.⁽¹⁵⁾

- ***Escherichia coli* adherencia difusa (ECAD)**

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o mal nutridos. No se ha demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad ni en adultos.

c. Tratamiento

El tratamiento de las gastroenteritis por *Escherichia coli*, se basa en la hidratación, en cuanto a la profilaxis la doxiciclina, tetraciclina es útil. En las infecciones urinarias bajas sin sepsis como cistitis o bacteriemia asintomática basta la administración de cotrimoxazol.

Las sulfonamidas y los antisépticos urinarios como la nitrofurantóina (100mg cada 6 horas), el ácido nalidíxico (0.5 a 1g cada 6 horas), o el norfloxacino que es una quinolona con cierta penetración tisular son suficientes; la duración del tratamiento convencional es de 5 días.

Por lo contrario en las infecciones que se acompaña con fiebre y alteraciones del estado general (todas las cuales cursan en un momento u otro de su evolución con bacteriemia) y por definición, en la sepsias o bacteriemia con dicho patógeno hay que administrar antibióticos de preferencias bactericidas.⁽⁴⁾

1.2.2.2 *Pseudomona aeruginosa*

a. Morfología

Bacilos Gram negativos de 4-3 μm de grosor. Pueden estar rodeados por una capa de naturaleza polisacárido, llamada limo.

La mayoría de las células presenten un flagelo polar, pero algunas pueden tener 2 a 3. Las cepas clínicas recién aisladas poseen fimbrias, que actúan como adhesinas o pilis sexuales.⁽⁸⁾

Se produce una capa de mucus extracelular, similar a una cápsula. Esta capa se denomina glicocalix o sustancia mucoide y está compuesta por alginato, y un polímero aniónico. La estructura y la composición de la pared celular de *Pseudomona aeruginosa* se asemejan a los microorganismos Gran negativos de la familia *Enterobacteriaceae*. El lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de la *Pseudomona aeruginosa* está compuesto por polisacáridos centrales que son comunes a todas las cepas y polisacáridos de cadena lateral que son específicos de cepa.⁽⁸⁾

b. Patogenicidad

Tiene como hábitat el agua. Produce enfermedades por sus propiedades invasivas y toxigénicas, ya que puede producir una exotoxina termolábil. Es muy resistente a los antibióticos. Presentan una gran susceptibilidad a las infecciones por este microorganismos los lactantes y prematuros, pacientes quemados, y los que han sufrido intervenciones quirúrgicas o diagnósticas. La *Pseudomona aeruginosa* causa infecciones de heridas (donde origina una pus verde-azuloso de donde proviene su nombre común bacilo piocianina), meningitis, septicemia, infecciones urinarias, neumonía, otitis, conjuntivitis, etc.⁽¹⁶⁾

c. Estructura antigénica

El lipopolisacárido de *Pseudomona aeruginosa*, consta del polisacárido O (antígeno somático), unido por el oligosacárido del centro común al lípido A. En su composición destaca un alto contenido en fosforo, y la presencia en la cadena lateral O de fucos amina, quinovosamina y en determinados serotipos, bacilosamina.

Además de los antígenos O, la mayor parte de las cepas de *Pseudomona aeruginosa* si no todas, poseen un antígeno poliaglutinable (PA). La capa de moco de la *Pseudomona aeruginosa* también es inmunogénica y puede

desempeñar un papel en la protección del microorganismo contra la fagocitosis.

(20)

d. **Enzimas y Toxinas**

La personalidad patogénica refleja las características de una bacteria que la capacitan para causar una enfermedad infecciosa, en la *Pseudomonas aeruginosa* corresponden a la exotoxina A y la elastasa.

Si recordamos que un patógeno oportunista debe cumplir cuatro etapas:

1. Acceder al huésped; 2. Encontrar un nicho; 3. Evitar los mecanismos defensivos y 4. Infectar establemente al huésped, es evidente que el bacilo piocianina tiene dos defectos de personalidad que afecta a las etapas 1,2 y 3. Pese a estas limitaciones, una vez que *Pseudomonas aeruginosa* logra desarrollar su oportunismo, dispone de un arsenal de estructuras celulares y productos extracelulares que contribuye a su virulencia. De este modo las potentes toxinas y las enzimas destructoras dañan los tejidos del huésped y destruyen sus mecanismos defensivos.⁽²⁶⁾

- **Endotoxina**

La lisis de la *Peudomonas* da lugar a la liberación de la endotoxina, y de su mediador biológico, el lípido A. La endotoxina de las *Peudomonas* interviene tanto en el establecimiento de la infección, como en los síndromes asociados al cuadro de septicemia. En cuanto al antígeno O, es crítico para la virulencia sistémica porque crea una barrera que impide la lisis de la bacteria por el complemento.⁽²⁰⁾

- **citotoxina**

Es una proteína formadora de poros. Su organismo diana son las membranas de la mayoría de las células eucarióticas, causa lesiones micro vasculares pulmones, e induce la síntesis de mediadores, contribuyendo al desarrollo del DRA que se asocia a la sepsis.

- **Hemolisinas**

Las dos hemolisinas que produce el bacilo pirocánico actúan sinérgicamente, escindiendo lípidos y lecitinas. De modo análogo a las proteasas pueden contribuir por su citotoxicidad a la invasión tisular. La fosfolipasa C también puede contribuir a la invasividad del microorganismo por medio de la destrucción del surfactante pulmonar y el ataque a los tejidos pulmonares para producir atelectasia y necrosis. ⁽²⁰⁾

- **Exotoxina A**

Es la más tóxica, bloquea la síntesis proteica; necrosis tisular, citotóxica invasividad, leucocitosis, induce la formación de ácido anti-toxina A tiene actividad de ADP-ribosil transferasa, la cual inactiva al factor de elongación de las células eucarióticas, lo que conduce a la detención de la síntesis proteica y a la muerte celular. Se une con receptores en la superficie celular y luego ingresa en las fosas recubiertas en las células, conocidas como vesículas endocíticas. Estas vesículas se acidifican con rapidez y exponen los residuos hidrófobos que probablemente ayuden a las toxinas a insertarse en las membranas. Desde este sitio las toxinas ingresan en el citoplasma como fragmentos con actividad enzimática que inactivan al EF-2. El organismo blanco de la exotoxina A es el hígado. Es sintetizada de forma intracelular.

- **Elastasa**

Esta enzima puede ser responsable de las lesiones cutáneas hemorrágicas que se ven en algunos pacientes, también desempeña un papel importante en las infecciones comunes aumenta los efectos de la exotoxina A en las infecciones pulmonares.

- **Exoenzima S**

Es una segunda ADP- ribosil transferasa y el blanco de la exoenzima S no es el factor de elongación sino más bien una o más proteínas en las células eucarióticas; está situada en la superficie de la bacteria y actúa como una

adhesina para los glicoesfingolípidos. Produce necrosis pulmonar, invasividad, y diseminación hemática.

e. Tratamiento

Pseudomona aeruginosa incluyen aminoglucósidos, quinolonas cefalosporinas, uredopenicilinas, carbapenem, polimixinas y monobactamos.

Estos antibióticos deben aplicarse siempre por inyección con la excepción de las fluoroquinolonas. ⁽²⁾

1.2.3. *Cándida albicans*.

a. Morfología

Cándida albicans se encuentra como endosaprófito del tubo digestivo de mamíferos y aves. En seres humanos son comensales de la cavidad bucal, tubo digestivo y mucoso vaginal.

Cándida es una levadura con capacidad para producir filamentos. Fase de la levadura está relacionada con la fase micelial la cual se relaciona con la forma parasitaria e invasora. ⁽²³⁾

b. Transmisión

Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, generalmente las infecciones que origina son asociadas a situaciones favorecidas por el huésped, por lo que es considerado un microorganismo patógeno oportunista.

Las alteraciones del balance entre el comensal y el huésped como ocurre en el paciente inmunodeprimido, puede disparar la infección.

c. Tratamiento

El ketoconazol produce una notable disminución en las infecciones sistémicas, especialmente la candidiasis cutánea.

La anfotericina B por vía intravenosa, es el tratamiento eficaz aceptado para las candidiasis profundas, este se puede dar combinando con flucitocina bucal para potenciar su efecto.



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR DE REALIZACIÓN

La parte experimental del trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material biológico:

2.2.1.1 *Copaifera paupera* (copaiba)

El proceso recolección de la resina de *Copaifera paupera* (copaiba) recolectada en el mes de Julio y Agosto se realizó en el Departamento de Ucayali, Provincia Coronel Portillo, Distrito Calleria Pucallpa.

Luego de ser recolectada se procederá a realizar su almacenamiento.

2.2.1.2 Cepas utilizadas

Las cepas aisladas en estudio *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*. Fueron adquiridas del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad Católica Santa María, “Hospital Goyeneche”, “Hospital Sandrita Pérez” (Majes-Pedregal).

2.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO, EQUIPO Y REACTIVOS

2.2.2.1 Material de vidrio

- Baguetas
- Cubeta de vidrio para cromatografía
- Laminas cubre objetos
- Laminas porta objetos
- Matraz Erlenmeyer de 100mL y 250mL
- Pipeta Pasteur
- Pipetas de 0.1mL, 1mL, 2mL, 5mL,10mL
- Placas Petri 60 x 15 mm y 100 x 15 mm
- Probetas de 50mL y 100mL
- Tubos de ensayo de 13x100 mm
- Vaso de precipitado 50mL, 100mL y 250mL

2.2.2.2 EQUIPO DE LABORATORIO

- Autoclave (Sturdy SA-MA)
- Balanza (Modelo A-160 Pioner)
- Baño María (Masson)
- Cocina eléctrica
- Estufa (H.W.Kessel S.A)
- Horno de esterilización (Memmert 854)
- Lámpara de luz ultravioleta
- Mechero Bunsen
- Microscopio binocular con objetivos de inmersión (Star Zeiss)
- Refrigeradora (Philips)

2.2.2.3 OTROS

- Algodón
- Asa de kolle
- Barbijo
- Campo estéril
- Capilares
- Espátula
- Gasa
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes quirúrgicos
- Micro pipeta

- Papel filtro
- Pizeta
- Papel kraft
- Pinzas metálicas
- Pita “pábilo”

2.2.2.4 REACTIVOS

- Acetato de etilo
- Ácido acético
- Ácido sulfúrico al 5%.
- Agua destilada
- Cloruro férrico al 5%
- Etanol 96 %
- Peróxido de hidrogeno
- Polivinil pirrolidona (PVP)
- Reactivo de kovacs
- Tolueno
- Vainillina al 1%
- Liebermann-Burchard
- Anhídrido acético

Batería para coloración Gram

- Cristal violeta

- Lugol
- Alcohol acetona
- Safranina

2.2.2.5 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mac Conkey
- Agar citrato de Simmons
- Agar Saboraud
- Agar Müller-Hinton
- Agar Manitol salado
- Agar Lisina Hierro (LIA)
- Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)
- Caldo peptonado
- Caldo Rojo de metilo – Voges proskauer (MR-VP)

2.2.3. MÉTODOS

2.2.3.1 Obtención, identificación de la resina extraída

2.2.3.1.1 Recolección

La especie en estudio de la resina extraída de la *Copaifera paupera* (copaiba) fue extraída en el mes de Julio y Agosto en el Departamento de Ucayali, Provincia Coronel Portillo, Distrito Calleria Pucallpa en el año

2012. Se identifica la planta y se saca la resina pura en un frasco para su almacenamiento.

2.2.3.1.2 Solubilización de coprecipitado soluble en agua con (PVP) a partir del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba)

Método: solubilización por coprecipitación.

Fundamento: Se basa en la unión entre las moléculas de una droga poco o nada soluble en agua y un polímero hidrosoluble.

La unión droga-polímero se realiza a nivel molecular y es necesario que previamente ambas sustancias se encuentren dispersas a este nivel en un disolvente común.

Procedimiento: Se pesa 3 g de la resina extraída y se disolvió en un beaker con 20 mL de etanol en otro beaker se coloca 1g de povidona con 20 mL etanol, ambos beaker fueron agitados con una bageta hasta la disolución completa y obtención de la soluciones homogéneas, luego se mezclan ambas soluciones.

Se llevó esta solución a baño maría para evaporar el solvente, hasta conseguir un peso constante. Se pulverizó el residuo obtenido y se dispuso en un frasco de color ámbar para su posterior uso.

El precipitado obtenido se empleó en los ensayos microbiológicos para cada una de las bacterias.

2.2.3.2 Procesamiento de las cepas en estudio

El presente trabajo de investigación se desarrolló utilizando bacterias patógenas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*.

2.2.3.2.1 Identificación de *Staphylococcus aureus*.

Obtenidas las bacterias patógenas se procedió a verificar las cepas a través de diferentes pruebas microbiológicas específicas para dicho microorganismo.

2.2.3.2.1.1 Tinción Gram (Ver Anexo 1)

Procedimiento: ⁽²⁾

- Colocar una gota de suero fisiológico y una colonia de la bacteria, disgregue suavemente sobre una lámina porta objeto limpia.
- Dejar secar a temperatura ambiente o pasando por la llama suavemente para obtener la fijación de frotis, con la finalidad que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal violeta.
- Luego de un minuto de exposición al cristal violeta, lavar bien con agua de caño.
- Cubrir el preparado con Iodo de Gram durante un minuto. Lavar con agua de caño.
- Sostener el portaobjeto entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con el decolorante alcohol-acetona hasta no arrastrar más colorante violeta. Se requiere unos 30 segundos.
- Cubrir la superficie con la safranina durante un minuto. Lavar con agua de caño.
- Secar al aire, a temperatura ambiente.
- Observar al microscopio con objetivo de (100x) y con aceite de Inmersión.

Se observa al microscopio cocos Gram positivos, se encuentran aislada en racimos, pares o cadenas (ver fig.8)

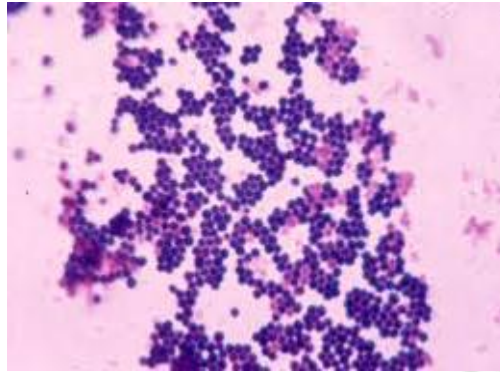


Figura N° 8 Cocos Gram positivos a 100x.

2.2.3.2.1.2 Prueba de catalasa

Procedimiento:

- Con una Asa de kolle en punta colocar en el centro de la lámina porta objeto la colonia a investigar.
- Posteriormente agregar 1 a 2 gotas de peróxido de hidrógeno.
- Suspender el organismo y observar si hay la aparición de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno.

La prueba es positiva cuando hay una rápida aparición de burbuja de gas o efervescencia. (Ver fig.N°9)



Figura N° 9 Prueba de la catalasa para *Staphylococcus aureus*

2.2.3.2.1.3 Prueba de coagulasa

Material: plasma humano

Procedimiento:

- Con el asa de kolle en punta colocar en el centro de la lámina una colonia a investigar.
- Agregar 1 o 2 gotas de plasma.
- Suspender el organismo e inclinar el portaobjeto hacia uno y otro lado y observar si hay la aparición de grumos.

Hay aglutinación en el portaobjeto nos indica que la aparición de grumos es positiva (ver fig. N°10).



Figura N°10 Prueba de la coagulasa para *Staphylococcus aureus*

2.2.3.2.1.4 Agar Manitol Salado (Ver Anexo 4)

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado mediante estría en placa.
- Se deja en la estufa 37C° por 24 horas.

Manitol positivo fermentador, se produce cambios de coloración del medio amarillo por la producción de ácido.

En el caso de la bacteria estudiada nos dio Manitol Positivo (ver fig.N°11)



Figura N°11 *Staphylococcus aureus* en Agar Manitol Salado

Cuadro N°2

Resultados esperados para *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en forma de racimos
Prueba de catalasa	Positivo
Prueba de coagulasa	Positivo
Manitol Salado	Fermentación

Fuente: Elaboración propia

2.2.3.2.2 Identificación de *Staphylococcus epidermidis*

2.2.3.2.2.1 Prueba de catalasa

Procedimiento:

- Con una Asa de kolle en punta colocar en el centro de la lámina porta objeto la colonia a investigar.
- Posteriormente agregar 1 a 2 gotas de peróxido de hidrógeno.
- Suspender el organismo y observar si hay la aparición de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno.

La prueba es positiva cuando hay una rápida aparición de burbuja de gas o efervescencia. (Ver fig.N°12)

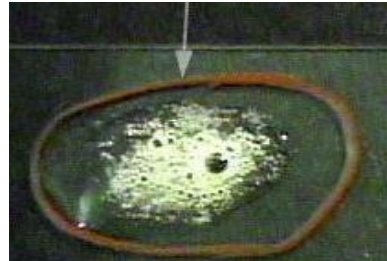


Figura N°12 Prueba de la catalasa para *Staphylococcus epidermidis*

2.2.3.2.2.2 Prueba de coagulasa en portaobjeto (Ver Anexo 3)

Material: plasma humano

Procedimiento:

- Con el asa de kolle en punta colocar en el centro de la placa una colonia a investigar.
- Agregar 1 o 2 gotas de plasma.
- Suspender el organismo e inclinar el portaobjeto hacia uno y otro lado y observar si hay la aparición de grumos.
- No hay presencia de grumos o aglutinación en esta prueba, la reacción es negativa

No hay aglutinación en el portaobjeto nos indica que la reacción es negativa (ver fig. N°13).



Figura N°13 Prueba de la coagulasa para *Staphylococcus epidermidis*

2.2.3.2.2.3 Agar Manitol Salado (Ver Anexo 4)

Procedimiento similar igual a *Staphylococcus aureus*, salvo que en este caso es manitol negativo no fermentador, permaneciendo el medio de color rojo (ver figura N°14).



Figura N°14 *Staphylococcus epidermidis* en Agar Manitol Salado

Cuadro N°3

Resultados esperados para *Staphylococcus epidermidis*

<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Coloración Gram	Cocos Gram positivos en forma de racimos
Prueba de catalasa	Positivo
Prueba de coagulasa	Negativo
Manitol salado	Negativo

Fuente: elaboración propia

2.2.3.2.3 Identificación de *Escherichia coli*

En el medio Mac Conkey fue elegido para la conservación y selectividad de la *Escherichia coli*.

Picar una colonia aislada con la aguja de kolle, sembrar en los medios de diferenciación bioquímica, TSI, LIA, SIM caldo MRVP, Agar Citrato de Simmons. Incubar los tubos a 37C° durante 24 horas. Luego se procederá a interpretar y a realizar la respectiva identificación bioquímica. ^(25,15)

2.2.3.2.3.1 Agar Mac Conkey (Ver Anexo 5)

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida del Laboratorio análisis clínicos de la universidad Católica de Santa María – Arequipa. En Agar Mac Conkey en placa y se siembra en el método de estrías.
- Se deja en la estufa a 37C° por 24 horas.
- Las colonias se perciben de color rosado que indican que la bacteria *Escherichia coli* es fermentadora de lactosa (ver fig. 15).
- Produce ácido debido a que degrada la lactosa ocasionando el viraje del indicador rojo neutro a un color rosáceo. ⁽¹⁵⁾



Figura N°15 *Escherichia coli* en Agar Mac Conkey

2.2.3.2.3.2 Triple Azúcar Hierro (TSI) (Ver Anexo 6)

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* en Agar TSI (pico-fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se deja en la estufa a 37C° por 24 horas.

La degradación de los tres hidratos de carbono va a producir un pH ácido ocasionando el viraje del indicador rojo fenol a amarillo.

- A/A + - : Lactosa (+)
Sacarosa (+)
Glucosa (+)
Co₂ (+)
H₂S (-)



Figura N°16 *Escherichia coli* en TSI (A/A+-)

2.2.3.2.3.3 Agar Lisina Hierro (LIA) (Ver Anexo 7)

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida en agar LIA (pico-fondo) mediante el método de siembra 3 veces picadura y 1 estría.
- Se deja en la estufa a 37C° por 24 horas

En el caso de *Escherichia coli* encontramos que en el presente medio nos debe dar K/K-; Al producir la descarboxilación de la Lisina

produciéndose cadaverina el indicador purpura de bromocresol va a retornar a su color purpura lo que indica como Lisina positiva.

- K/K - : Lisina (+)
Descarboxilación (+)
Desaminación (-)
H₂S (-)



2.2.3.2.3.4 Caldo Peptonado (INDOL) (Ver Anexo 11)

Procedimiento:

- Se carga al asa de kolle con la muestra de *Escherichia coli* obtenida y se le inocular al Caldo Peptonado.
- Se deja en la estufa 37C° por 24 horas.
- Luego de la incubación se agrega una gota del reactivo de Kovacs.

La aparición de un anillo de color rojo nos dio INDOL positivo para todas (ver fig.17)

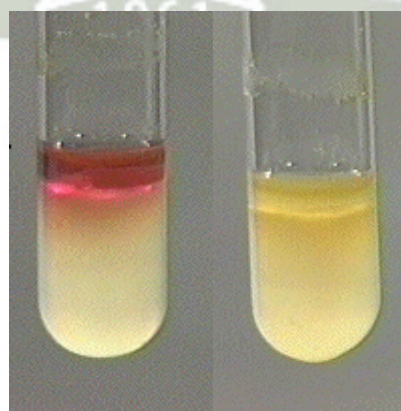


Figura N°17 Prueba de Indol para *Escherichia coli*

a. **Prueba de Rojo de Metilo-Voges–Proskauer (RM-VP)** (Ver Anexo 8)

Procedimiento:

- Inocular el caldo RM-VP e inocular por 24 horas a 37C°.
- Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1 mL de Caldo para Voges- Proskauer.
- En el Caldo restante revelar rojo de metilo, agregando 4 o 8 gotas del indicador Rojo de Metilo.
- Para la prueba del Voges- Proskauer se agrega 10 gotas de α -naftol al 5% y una gota de KOH al 5%.
- Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 min.

La prueba Voges- Proskauer es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetona. Que para nuestro caso fue negativo presentando una coloración amarilla (ver fig.18)

La prueba de Rojo de Metilo es positiva si se observa un color rojo estable, esto indica que la producción de ácido es suficientemente fuerte para producir el viraje del indicador, lo que significa que el microorganismo fermentó la glucosa para la vía de ácido-mixta.

Dándonos en nuestro caso rojo de metilo positivo (ver fig.18)

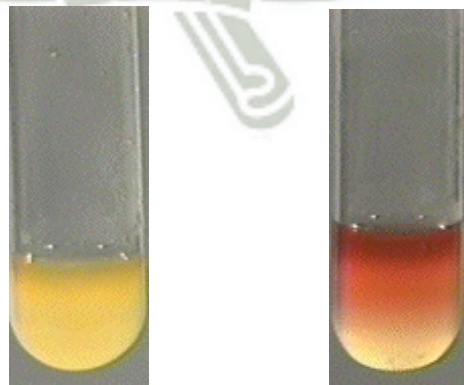


Figura N°18 VP (-) y RM (+) para *Escherichia coli*

2.2.3.2.3.5 Agar Citrato de Simmons (Ver Anexo 9)

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida en Agar Citrato de Simmons mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se deja en la estufa 37C° por 24 horas.

La prueba es positivo (+) cuando el medio cambia de un color verde a un color azul, por alcalinización del medio lo cual produjo un viraje del indicador azul de bromo timol.

En el caso de las cepas estudiadas nos dio Citrato de Simmons Negativo (ver fig. 19)



Figura N°19 *Escherichia coli* en Agar Citrato de Simmons

CUADRO N° 4

Resultados esperados para las cepas de *Escherichia coli*

<i>Escherichia coli</i>	
Coloración Gram	Bacilos Gram negativo
Agar Mac Monkey	Colonias rojas, Fermentadoras de la Lactosa
Triple Azúcar Hierro (TSI)	A/A+-
Agar Lisina Hierro (LIA)	K/K-
Caldo Peptonado (INDOL)	Positivo
Prueba de Rojo de Metilo	RM(+)
Voges- Proskauer	VP(-)
Agar Citrato de Simmons	Negativo

Fuente: elaboración propia

2.2.3.2.4 *Pseudomona aeruginosa*

2.2.3.2.4.1 Prueba de la oxidasa

Procedimiento:

- Se realiza en un trocito de papel filtro, de forma que colocamos una gota del reactivo de Oxidasa en el papel.
- Se toma una muestra de colonia de *Pseudomona aeruginosa* con el asa de siembra, que frotaremos sobre el papel.
- El resultado será positivo produce una reacción de color violeta-morado a los 30 segundos.

2.2.3.2.4.2 Agar Mac Conkey (Ver Anexo 5)

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Pseudomona aeruginosa* en Agar Mac Conkey en placa y se siembra en estría simple.
- Se deja en la estufa a 37C° por 24 horas.

La *Pseudomona aeruginosa* no fermenta lactosa (ver fig.20)



Figura N°20 *Pseudomona aeruginosa* en Agar Mac Conkey.

CUADRO N° 5

Resultados esperados para las cepas de *Pseudomona aeruginosa*

<i>Pseudomona aeruginosa</i>	
Coloración Gram	Bacilos Gram negativo
Agar Mac Conkey	Colonias azul verdoso y olor a uvas no fermenta lactosa
Prueba de la Oxidasa	Positivo

Fuente: elaboración propia

2.2.3.2.5 Identificación de *Cándida albicans*

Las cepas patógenas de *Cándida albicans* obtenidas del Laboratorio de Análisis Clínico de la Universidad Católica Santa María, “Hospital Goyeneche”, “Hospital Sandrita Pérez” (Majes-Pedregal).

Para posteriormente realizar las respectivas pruebas de identificación.

2.2.3.2.5.1 Tinción Gram. (Ver Anexo 1)

Se observan levaduras Gram positivas, que se evidencia por la coloración violeta (ver fig.21)



Figura N°21 Tinción Gram para *Cándida albicans* a 40x.

2.2.3.2.5.2 Examen directo:

Procedimiento:

Se coloca una asa de colonia más aislada y se coloca sobre una portaobjetos, al cual se le agrega dos gotas de KOH al 10%, posteriormente se le coloca un cubreobjetos en la parte superior, para poder observarlo al microscopio. Se empieza observando a 10x hasta llegar a 40x.

Se observa levaduras y pseudohifas presentes (ver fig. 22)

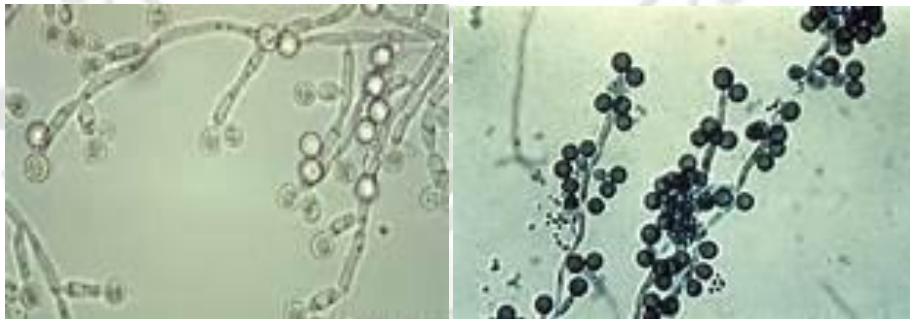


Figura N°22 Examen directo con KOH al 10%, presencia de pseudohifas para *Cándida albicans* a 100x.

2.2.3.2.5.3 Agar Sabouraud: (Ver Anexo 10)

Procedimiento:

Las cepas obtenidas de *Cándida albicans* se replicaron en tubos que contenían agar sabouraud (pico y fondo). Estas sirvieron como medio de transporte y almacenamiento de dichas cepas. Se toma una asada de la cepa en estudio y se procede a sembrarla en tubo con agar sabouraud por el método de estría.

Las levaduras crecen rápidamente y en 24 horas a 37C° se obtiene colonias lisas, blandas, brillantes, de color blanco o ligeramente beige, con el tiempo se hacen plegadas, rugosas o membranosas (ver fig.23)



Figura N°23 Colonias de *Cándida albicans* en Agar Sabouraud

CUADRO N°6

Resultados esperados para cepas de *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>	
Tinción de Gram	Levaduras Gram positiva
Examen directo	Presencias de levaduras y pseudohifas
Agar Sabouraud	Crecimiento de colonias lisas, ligeramente beige

Fuente: elaboración propia

2.2.3.3 Determinación de la sensibilidad de la resina de *Copaifera paupera*. (copaiba)

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (Caldo o Agar).

Método: Excavación -placa –cultivo

Fundamento:

Se basa en que la sustancia a investigar es depositada en el hoyo el cual toma contacto con la superficie del agar, de tal manera que difunde hacia el medio circundante, a medida que aumenta la distancia al hoyo hay una reducción logarítmica de la concentración de la sustancia hasta alcanzar un punto en que el desarrollo bacteriano en la superficie del agar ya no es más inhibido. La actividad de la sustancia se evalúa midiendo el halo de inhibición formado.

Preparación del inóculo

Para el caso de preparación del inóculo se utilizó el mismo procedimiento para las diferentes cepas estudiadas:

- Se toma de 4 a 5 colonias de las bacterias y/o hongos en estudio.
- Tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y transferirla a un tubo que contenga 4 a 5 mL caldo peptonado
- La turbidez del inóculo con caldo peptonado equivalente al tubo 0.5 de la Escala de Mac Farland la que equivale a 10^8 UFC/mL.
- Finalmente se sumerge un hisopo estéril a los inóculos

Preparación del medio de cultivo

- Se prepara la cantidad necesaria de Agar Müller Hinton y se plaquea cerca del mechero para evitar posibles contaminaciones y garantizar que el medio se mantenga estéril.
- Una vez que el medio adquiere la consistencia adecuada se retiran los hisopos de los inóculos y se procede a sembrar las placas de manera homogénea realizando un estriado de manera horizontal de derecha a

izquierda, en forma vertical de arriba hacia abajo y en sentido de las agujas de reloj teniendo la precaución de no dejar algún espacio sin suspensión.

Dilución de la resina

- Se coloca a cada tubo 0.9 mL. de agua con (PVP)
- Al tubo N°1 se añade 0.1 mL. de la resina se mezcla y se retira 0.1mL para luego añadir al tubo N°2.
- Del tubo N°2 se retira 0.1 mL y se añade al tubo N°3.
- Del tubo N°3 se retira 0.1 mL y se añade al tubo N°4
- Del tubo N°4 se retira 0.1 mL y se añade al tubo N°5
- Del tubo N°6 solo tenía agua con (PVP) que es nuestro control negativo

Preparación

- Se perfora la zona central del medio haciendo uso de una pipeta Pasteur estéril de 5mm de diámetro.
- Posteriormente se coloca 100µl de la resina en las placas previamente sembradas.
- Incubar por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37C°.
- Luego se observa en que concentración se produce el halo para posteriormente determine la dilución.
- Finalmente, se mide los diámetros de los halos de inhibición formados alrededor de cada hoyo, utilizando un escalímetro o regla y se expresa los resultados en milímetros.

2.2.3.4 Determinación de la actividad antimicrobiana in vitro

Para determinar la actividad antimicrobiana in vitro, se procedió de la siguiente manera.

2.2.3.4.1 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Es definida como la menor concentración del antibiótico que inhibe el desarrollo *in vitro* de los microorganismos.

Método: dilución en tubo.

Fundamento:

La prueba por dilución en caldo consiste en atacar el microorganismo de interés con agentes antimicrobianos en un medio líquido (caldo de cultivo). Cada agente antimicrobiano se prueba en rango de concentraciones, el rango de concentraciones es probada para cada antimicrobiano.

Se determina cual es el tubo que no se aprecia turbidez por lo tanto nos dará la Concentración Mínima de la sustancia que se requiere para no producir el desarrollo de microorganismo, pero puede darse el caso que el extracto a investigar imposibilite la correcta visualización del crecimiento microbiano por lo que se procede a sembrar en placa.

Preparación del inóculo:

Para el caso de preparación del inóculo se utiliza el mismo procedimiento para las diferentes cepas estudiadas.

- Seleccionar 4 o 5 colonias de la bacteria y/o hongo en estudio.
- Tocar la superficie de cada colonia con una asa de siembra y transferir a un tubo que contenga 4 a 5 ml de caldo peptonado (ver anexo 11) para el caso de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*.

- Ajustar la turbidez del inóculo con Caldo Peptonado hasta obtener la turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland la que equivale a 10^8 UFC/mL (Ver Anexo 13) para realizar este paso correctamente se debe usar luz apropiada y colocar los tubos contra un fondo con líneas negras como contraste.
- La suspensión preparada para cada bacteria contendrá aproximadamente 10^6 UFC/mL.

Preparación de las diluciones:

- Preparación del inóculo
- Una vez elegido el extracto que mostró mayor porcentaje de rendimiento, se procedió a realizar las diluciones, según el microorganismo en estudio teniendo así para:
 - *Staphylococcus aureus*, una dilución de 20 mg/mL.
 - *Staphylococcus epidermidis*, una dilución de 20 mg/mL.
 - *Escherichia coli*, una dilución de 20 mg/mL.
 - *Pseudomona aeruginosa* una dilución de 200 mg/mL y
 - *Cándida albicans*. Una dilución de 10 mg/mL.
- A cada tubo se le agrega 1000 μ l de inóculo, turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland la que equivale 10^6 UFC/mL.
- Se agrega Caldo Peptonado a cada tubo.
- Luego se procedió a incubar por 24 horas para exponer a los microorganismos en estudio con el extracto.

2.2.3.4.2 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Sembrar en las placas que contengan el medio Agar Müller-Hinton (Ver Anexo 12) para las diluciones preparadas el día anterior para poder observar si hay o no crecimiento bacteriano.

2.2.3.5 Análisis Fitoquímico en Cromatografía de Capa Fina (CCF)

La cromatografía es un proceso fisicoquímico que va a permitir la separación de los componentes o sustancias integrantes de una mezcla en movimiento por absorción de estos sobre una superficie estacionaria móvil. ⁽²⁴⁾

La cromatografía en capa fina o más comúnmente llamado TLC (Thin Layer Chromatography), es una técnica cromatografía utilizada para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla. ⁽²⁴⁾

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a una fase móvil (normalmente, un disolvente) y a una fase estacionaria (llamada capa fina, que puede ser papel o gel de sílice). Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación. Lográndose eluir primero a los componentes con mayor afinidad por la fase móvil y posteriormente eluirán a los componentes con mayor afinidad por la fase estacionaria. ^(20,24)

2.2.3.5.1 Preparación de fase móvil

Mezclar en la cuba de cromatografía los solventes elegidos en las proporciones indicadas (para la preparación identificación). Tapar la cuba y dejar en reposo.

2.2.3.5.2 Preparación de la placa Cromatografía

La fase estacionaria (F.E.) empleada consistió en cromatofolios de silica gel con base de aluminio, cortadas en un tamaño 10x5cm, se trazó una línea a 1 cm del borde inferior; al que se aplicó el extracto etanólico a una concentración de 1 mg/mL y se aplicaron sobre la línea en banda con capilares, se dejó una distancia de 1 cm entre cada extracto.

Dejar secar y posteriormente colocar la placa en cuba con la fase móvil.

2.2.3.5.3 Desarrollo cromatográfico

Luego se colocaron en una cámara que se preparó 30 minutos antes para obtener una buena saturación del medio; se utilizó 5ml de fase móvil (F.M.) cubriendo el fondo hasta 0.3 cm de altura, se desarrolló el cromatograma hasta que la fase móvil llegó a 1cm del extremo superior de la placa, para luego retirarlas y dejarlas secar durante 30 minutos y se observó a luz 254nm, delimitando las zonas donde se pudieron visualizar los componentes de extracto.

2.2.3.5.4 Revelado

Pulverizar la placa con sus respectivos reveladores y someterla a 100C° durante 5 minutos.

2.2.3.5.5 Interpretación

Identificación del compuesto en general: terpenos, flavonoides y taninos

2.2.3.5.5.1 Identificación de componentes:

a) Identificación general

- **Fase móvil:** acetato de etilo: metanol: agua (70:20:10)

- **Reactivos reveladores**
 - Sol. A: ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto
 - Sol B: vanillina al 1% en etanol absoluto.
 - Anhídrido acético 10ml
 - Ácido sulfúrico cc. 10 gotas
 - cloruro férrico al 5% en agua.
 - cloruro de aluminio al 5%
- **Fase Estacionaria:** placa de silica gel con marcador de fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm.
- **Revelador:** luz UV 254 nm

2.2.3.5.5.2 IDENTIFICACIÓN DE TERPENOS.

- **Fase móvil:** tolueno. Acetato de etilo (90:10)
- **Reactivos reveladores:**
 - Sol. A: ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto
 - Sol B: vanillina al 1% en etanol absoluto.
- **Revelador: Liebermann-Burchard**
 - Anhídrido acético 5ml
 - Ácido sulfúrico (cc) 5ml
- **Revelador:** luz UV 254 nm

2.2.3.5.5.3 IDENTIFICACIÓN DE TANINOS

- **Fase móvil:** Metanol: agua (90:10)
- **Reactivos reveladores:** cloruro férrico al 5% en agua.

2.2.3.5.4 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES

- **Fase móvil:** acetato de etilo: acético: ácido fórmico : agua (100:10:11:22)
- **Reactivos reveladores :**cloruro de aluminio al 5%
- **Revelador:** luz UV 254 nm

2.2.3.5.6 Factor de referencia (Rf)

Es un número que permite identificar sustancias considerando las distancias recorridas en un cromatograma y con un método cromatográfico dado. Cada sustancia tiene un Rf único y específico, por medio del cual se les identifica.

$$R_f = \frac{\text{Distancia de la sustancia al origen}}{\text{Distancia del diluyente al origen}}$$

2.2.3.6 Análisis estadístico

Para ordenamiento, interpretaciones y análisis estadístico de los datos en estudio se utilizó el software Statgraphics y Excel, para lo cual se utilizaron los siguientes instrumentos estadísticos.

2.2.3.6.1 Medida de Tendencia Central:

2.2.3.6.1.1 Promedio (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

Dónde:

$\sum xi$: Sumatoria de cada observación

N: Número total de observaciones

2.2.3.6.2 Media de dispersión:

2.2.3.6.2.1 Desviación estándar (DS)

$$Ds = \sqrt{\frac{\sum xi - (\sum xi)^2}{n - 1}}$$

2.2.3.6.3 ANOVA (Análisis de Varianza)

Este es una prueba de significancia, la cual tiene como objetivo demostrar estadísticamente si el efecto hallado al aplicar los tratamientos es debido a los mismos o a causas fuera de los tratamientos.

F de V	SC	GL	CM	FC
Entre grupos				
Dentro de los grupos				
Total				

Dónde:

F de V: fuentes de variabilidad

GL: grados de libertad

SC: suma de cuadros

CM: cuadrado medio

FC: prueba F

- La significancia altamente significativa en :

$P > 0.01$ = diferencia altamente significativa

$P > 0.05$ = diferencia significativa

$P < 0.05$ = diferencia no significativa

2.2.3.6.4 Prueba de especificidad: Test de Tukey

Prueba de especificidad, se aplica una vez obteniendo los resultados del análisis de varianza ANOVA, es decir si en el análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativos a los diferentes tratamientos, se procederá a averiguar estadísticamente cuál de ellos fue más eficiente más específico, de no hallarse significancia en la prueba de ANOVA no será necesario realizar el test de Tukey

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se estudió el efecto antimicrobiano de la planta *Copaifera paupera* (copaiba).

3.1. RENDIMIENTO DE LA RESINA EXTRAÍDA

Luego de la recolección y coprecipitación de la resina de copaiba se halló el rendimiento conforme la siguiente expresión:

$$\text{Rendimiento} = \frac{P_{\text{vaso mas coprecipitado}} - P_{\text{vaso vacío}}}{P_{\text{vaso mas muestra}} - P_{\text{vaso vacío}}} \times 100$$

PVC: Peso del vaso + coprecipitado

PVV: Peso del vaso vacío

PVM: Peso del vaso + muestra

De este modo se halló un rendimiento de 63.3%

3.2. CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA RESINA *Copaifera paupera* (copaiba)

En esta prueba se empleó en la determinación de los principales constituyentes químicos presentes en dicha planta, hay que tener en cuenta que la cromatografía realizada fue sin presencia de estándares, solo se observó la corrida cromatográfica.

Para la identificación general se utilizó como fase móvil acetato de etilo: metanol: agua (70:20:10) Teniendo como reveladores Sol. A: ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto; Sol B: vanillina al 1% en etanol absoluto.

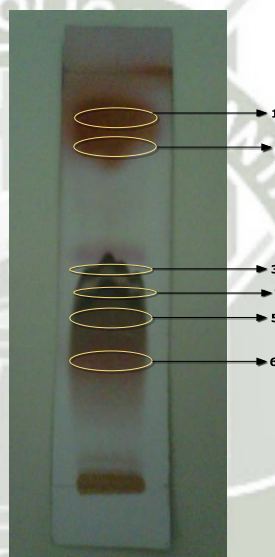


Figura N°23 Cromatografico para la resina de copaiba

Resina de *Copaifera paupera* (copaiba)

Fuente: Elaboración propia

Fase móvil: Acetato de etilo: metanol: agua (70:20:10)

Reactivos reveladores:

- Sol. A: ácido sulfúrico al 5% en etanol absoluto;
- Sol B: vanillina al 1% en etanol absoluto.

Liebermann-Burchard:

- Anhídrido acético 5ml
- Ácido sulfúrico (cc) 5ml

Fase Estacionaria: Placa de silica gel con marcadores de fluorescencia a una longitud de onda de 254 nm.

Revelador: Luz UV. 254 nm.

CUADRO N° 3.1**RESULTADOS OBSERVADOS PARA LA CROMATOGRAFÍA DE CAPA
FINA CON LA RESINA DE *Copaifera paupera* (copaiba)**

OBSERVACION	COLOR	Rf	INTERPRETACION
1	Naranja	0.96	Terpeno
2	Naranja	0.93	Terpeno
3	Verde	0.62	Terpeno
4	Verde	0.58	Terpeno
5	Marrón	0.48	Sesquiterpenos
6	Naranja	0.41	terpenos

Fuente: elaboración propia

3.3. Determinación de la sensibilidad de la resina de *Copaifera paupera* (copaiba) en las diferentes cepas estudiadas

Para la determinación de la sensibilidad de las distintas cepas bacterianas (*Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*) y fúngica (*Candida albicans*) a la resina de *Copaifera paupera* (copaiba) se procedió por

triplicado conforme al método descrito y al cuadro de concentraciones del capítulo anterior. Los resultados se muestran a continuación:

CUADRO N° 3.2

Sensibilidad de las distintas cepas de microorganismos a la resina de *Copaifera paupera* (copaiba)

CARACTERISTICA	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6
Agua + (PPV30) (ml)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	1
Resina copaiba (g)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-
Concentración (%)	10	1	0.1	0.01	0.001	-
MICROORGANISMO	Sensibilidad					
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	+	+	+	+	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

⊕: Tubo con crecimiento bacteriano

⊖: Tubo sin crecimiento bacteriano

En el cuadro Nro 3.2 observamos que para todas las cepas se observó inhibición de crecimiento bacteriano y antimicótico a una concentración del 10%, es decir 0.1g o 100mg de resina por ml de solución. Por lo que esta concentración será el punto de partida para hallar la Concentración Inhibitoria Mínima.

3.4. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO con el extracto etanólico de *copaifera paupera* (copaiba) EN LAS DIFERENTES CEPAS ESTUDIADAS

Para la determinación del efecto antimicrobiano se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*. Que fueron reidentificadas para mayor seguridad ya que estas fueron facilitadas y/o por los Laboratorios de Análisis Clínicos de: Universidad Católica Santa María, “Hospital Goyeneche”, “Hospital Sandrita Pérez” (Majes-Pedregal).

Para esta evaluación se empleó el método de dilución en tubo para poder observar la inhibición que va a presentar cada dilución, de esta forma se trabaja con cinco microorganismos de diferentes procedencias, para todos ellos se realizó diluciones conforme al siguiente cuadro:

3.4.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) frente a *Staphylococcus aureus*

Se trabajó con diez cepas de diferente procedencia de *Staphylococcus aureus*, empleando misma concentraciones para las diez cepas. Se utilizó la concentración a 20 mg/mL obteniendo los siguientes resultados que se muestra en el cuadro N°3.3

Se trabajó con el blanco de (PVP) para demostrar que este no era el responsable de crecimiento bacteriano, además se sembró el inóculo equivalente al tubo 0.5 de la escala de Mac Farland equivalente a 10^6 UFC/mL en el mismo medio de cultivo en las que fueron sembradas las diluciones para comprobar que el inóculo con los microorganismos estaban en optimo condiciones de crecimiento y a la vez que el medio de cultivo era adecuado para su desarrollo.

CUADRO N° 3.3

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 20mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2

Incubar a 37 °C por 24 horas

Observación de turbidez

S.aureus-1 - 5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
S.aureus-6 - 10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

+: Tubo con crecimiento bacteriano

-: Tubo sin crecimiento bacteriano

Al observar los tubos con las diluciones del extracto de resina *Copaifera paupera* (copaiba) presentó una (CIM) de 6 mg/mL como se encuentra en el cuadro N°3.3

3.4.2. Determinación de la concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) frente a *Staphylococcus epidermidis*

Para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con el extracto etanólico de la *Copaifera paupera* (copaiba) se hizo diluciones de 20 mg/mL frente a diez cepas de diferentes procedencias obteniendo los siguientes resultados que se muestra en el cuadro N°3.4

CUADRO N° 3.4

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA
(CIM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A
*Staphylococcus epidermidis***

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 20mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
Cc. Final(mg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2

Incubar a 37 °C por 24 horas

Observación de turbidez

S.epidermidis-1-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
S.epidermidis-6-10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

+: Tubo con crecimiento bacteriano

-: Tubo sin crecimiento bacteriano

Al observar los tubos con las diluciones del extracto de resina *Copaifera paupera* (copaiba) presentó una (CIM) de 6 mg/ml como se encuentra en el cuadro N°3.4

3.4.3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con el extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) frente a *Escherichia coli*.

Para la determinación la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con el extracto de resina *Copaifera paupera* (Copaiba) se hizo diluciones de 20 mg/mL frente a diez cepas diferentes procedencias de *Escherichia coli*, para observar su crecimiento en 24 horas.

CUADRO N° 3.5

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A *Escherichia coli*

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 20mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
Cc. Final(mg/mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2

Incubar a 37 °C por 24 horas

Observación de turbidez

E.coli -1-5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
E.coli -6-10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

⊕: Tubo con crecimiento bacteriano

⊖ : Tubo sin crecimiento bacteriano

Al observar los tubos con las diluciones del extracto etanólico *copaifera paupera* (copaiba) presentó una (CIM) de 9 mg/mL como se encuentra en el cuadro N°3.5

3.4.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) frente a *Pseudomona aeruginosa*.

Dicha evaluación preliminar se realizó por el medio de dilución en tubo para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con el extracto etanólico de *copaifera paupera* (copaiba) a concentración de 200 mg/mL

frente a diez cepas de diferente procedencia de *Pseudomona aeruginosa.*, fueron observadas en 24 horas de incubación.

CUADRO N° 3.6

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) del extracto etanólico de *Copaipera paupera* (copaiba) FRENTE A *Pseudomona aeruginosa.*

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 200mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/mL)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	2

Incubar a 37° por 24 horas

Observación de turbidez

P. aeruginosa -1-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
P. aeruginosa -6-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

+: Tubo con crecimiento bacteriano

-: Tubo sin crecimiento bacteriano

Al observar los tubos con las diluciones del extracto etanólico de *copaipera paupera* (copaiba) presento una (CIM) de 90 mg/mL, como se encuentra en el cuadro N°3.6

3.4.5. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) con el extracto etanólico de *copaïpera paupera* (copaiba) frente a *Cándida albicans*

Se trabajó con cepas de *Cándida albicans*, empleando las mismas concentraciones de 10 mg/ml obteniendo los siguientes resultados que se muestra en el cuadro siguiente.

CUADRO N° 3.7

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) del extracto etanólico de *Copaïfera paupera* (copaiba) FRENTE A *Candida albicans*

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 10mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0
Caldo (ml)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/ml)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	2

Incubar a 37° por 24 horas

Observación de turbidez

C. albicans-1-6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
C. albicans -7	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
C. albicans -8	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
C. albicans -9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
C. albicans -10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

⊕: Tubo con crecimiento bacteriano

- : Tubo sin crecimiento bacteriano

Al observar los tubos con las diluciones del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) a concentración de 2.5 mg/mL en la *C. albicans* 7 y *C. albicans* 9 presentó una (CIM) de 3 mg/mL, como se encuentra en el cuadro N°3.7

3.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans*.

La determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se realizó mediante el método de dilución en tubo respectivamente utilizando como medio de cultivo Caldo Peptonado, pasadas las 24 horas de incubación las diluciones fueron sembradas en placas con Agar Muller Hinton para obtener su crecimiento. La (CBM) determinada para las cepas patógenas las cuales fueron obtenidas del Laboratorio de análisis clínicos de la Universidad Católica de Santa María, “Hospital Goyeneche” (Arequipa) “Hospital Sandrita Pérez” (Majes-Pedregal). A pesar de que estas cepas estén aisladas e identificadas al momento de ser obtenidas para mayor seguridad se decidió realizarles las respectivas pruebas de re identificación.

3.5.1. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a *Staphylococcus aureus*.

Luego de obtener la resina *Copaifera paupera* (copaiba) se procedió a determinar la Concentración Bactericida Mínima para las diez *Staphylococcus aureus* con una concentración de 20mg/mL.

CUADRO N° 3.8

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA
(CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A
*Staphylococcus aureus***

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 20mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10⁶(mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2

Incubar a 37°C por 24 horas

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
<i>S. aureus</i> -1-5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i> -6-10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

⊕: Tubo con crecimiento bacteriano

⊖: Tubo sin crecimiento bacteriano

En la tabla podemos observar el crecimiento en la placa dando como (CBM) 7 mg/mL para la bacteria en ensayo. Como se observa en el cuadro N°3.8

**3.5.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a
Staphylococcus epidermidis.**

Luego de obtener la resina *Copaifera paupera* (copaiba) se procedió a determinar la (CBM) para las diez *Staphylococcus epidermidis* de diferente procedencia.

CUADRO N° 3.9

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A *Staphylococcus epidermidis*

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 20mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2

Incubar a 37°C por 24 horas

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
S.epidermidis-1-5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
S.epidermidis-6-10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

+: Tubo con crecimiento bacteriano

- : Tubo sin crecimiento bacteriano

En la tabla podemos observar el crecimiento en la placa dando como (CBM) 8 mg/mL para la bacteria en ensayo. Como se observa en el cuadro N°3.9

3.5.3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a *Escherichia coli*.

Luego de obtener la resina *Copaifera paupera* (copaiba) se procedió a determinar la (CBM) para las diez *Escherichia coli* de diferente procedencia.

CUADRO N° 3.10

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA
(CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A
Escherichia coli

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 20mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/ml)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	2

Incubar a 37°C por 24 horas

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
E.coli -1-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.coli -6-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

+: Tubo con crecimiento bacteriano

- : Tubo sin crecimiento bacteriano

Podemos observar el crecimiento dando como (CBM) 10 mg/mL para la bacteria en ensayo. Como se observa en el cuadro N°3.10

3.5.4. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) frente a
Pseudomona aeruginosa.

Luego de obtener la resina *Copaifera paupera* (copaiba) se procedió a determinar la (CBM) para las diez *Pseudomona aeruginosa* de diferente procedencia.

CUADRO N° 3.11

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA
(CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A
*Pseudomona aeruginosa***

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 200mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/mL)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	2

Incubar a 37° por 24 horas

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
P. aeruginosa -1-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P. aeruginosa -6-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

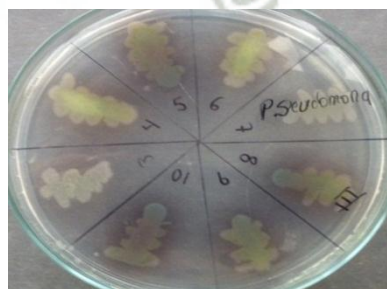
Fuente: Elaboración propia

Dónde:

⊕: Tubo con crecimiento bacteriano

⊖ : Tubo sin crecimiento bacteriano

Podemos observar el crecimiento (CBM) 100 mg/mL para la bacteria en ensayo.
Como se observa en el cuadro N°3.11



Fuente: Elaboración propia

3.5.5. Determinación de la Concentración Bactericida y Fungicida Mínima (CBM) frente a *Cándida albicans*.

Luego de obtener la resina *Copaifera paupera* (copaiba) se procedió a determinar la (CBM) para las diez *Cándida albicans* de diferente procedencia.

CUADRO N° 3.12

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (copaiba) FRENTE A *Cándida albicans*

Características	TUBOS										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
Sol 10mg/mL	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0
Caldo (mL)	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0.6
Inoculo 10 ⁶ (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vol. Final (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.4
C. Final(mg/mL)	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	2

Incubar a 37° por 24 horas

Placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	B
C. albicans-1-5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
C. albicans -6-10	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

- ⊕: Tubo con crecimiento bacteriano
- : Tubo sin crecimiento bacteriano

Podemos observar el crecimiento dando como (CBM) 3mg/mL para la bacteria en ensayo. Como se observa en el cuadro N°3.12

3.6. ANALISIS ESTADISTICO DE LAS CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) EN LAS DISTINTAS CEPAS ESTUDIADAS

CUADRO N° 3.13

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

Concentración	N	Media	Mediana	D.S.	Mínimo	Máximo
Concentración Inhibitoria Mínima	10	12,100	12,500	1,7920	8,0	14,0
Concentración Bactericida Mínima	10	17,400	17,500	1,5776	14,0	19,0
Total	20	14,750	14,000	3,1768	8,0	19,0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro se presentan los estadísticos de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, se aprecia que el promedio de la CIM es de 12,1 mm, y una mediana de 12,5 por su parte el promedio de la CBM es de 17,4 y una mediana de 17,5 aparentemente la media de esta última medida es mayor respecto a la primera.

Con la finalidad de observar si existen diferencias significativas de la CIM y la CBM de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, se realizó un análisis de varianza, para ver las diferencias significativas entre ambas medidas.

Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro, en el mismo se aprecia que a un nivel crítico de $\alpha= 0,05$; existen diferencias significativas entre la CIM y CBM, ya que el nivel de significancia es igual a 0,000 siendo este menor al nivel crítico permitido para el presente estudio.

CUADRO N° 3.14

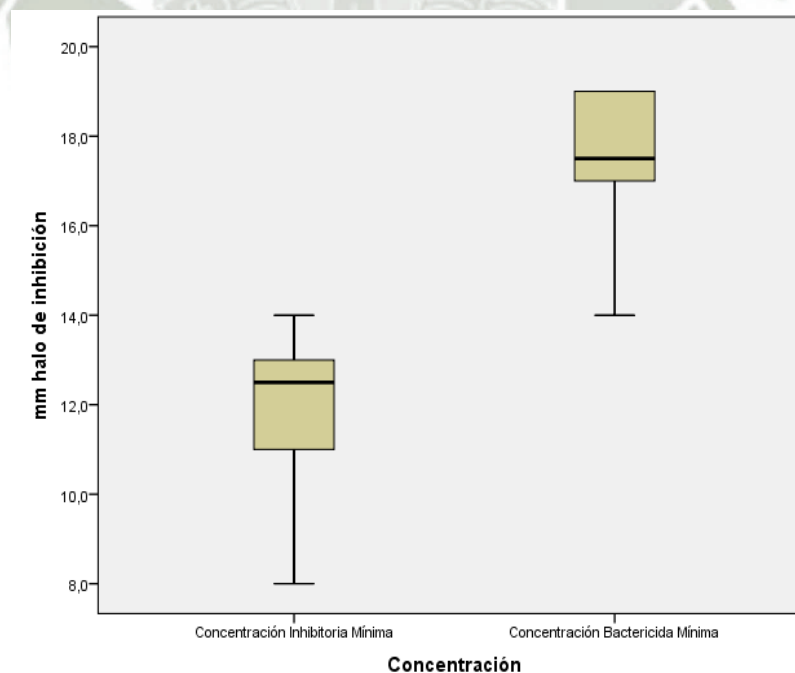
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Staphylococcus aureus*

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	140,450	1	140,450	49,281	,000
Intra-grupos	51,300	18	2,850		
Total	191,750	19			

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 1

DIAGRAMA DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Staphylococcus aureus*



CUADRO N° 3.15

ESTADÍSTICOS PARA LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Staphylococcus epidermidis*

Concentración	N	Media	Mediana	D.S.	Mínimo	Máximo
Concentración Inhibitoria Mínima	10	13,500	14,000	2,4608	8,0	16,0
Concentración Bactericida Mínima	10	18,500	19,000	1,8409	15,0	21,0
Total	20	16,000	16,000	3,3245	8,0	21,0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro se presentan los estadísticos descriptivos para los halos de inhibición de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*, se aprecia que el promedio de la CIM es de 13,5 mm, y una mediana de 14 mm; por su parte el promedio de la CBM es de 18,5 y una mediana de 19 mm; aparentemente la media del halo de esta última medida es mayor respecto a la primera.

Con la finalidad de observar si existen diferencias significativas entre los halos de inhibición de la CIM y la CBM de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*, se realizó un análisis de varianza, para ver las diferencias significativas entre ambas medidas.

Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro, en el mismo se aprecia que a un nivel crítico de $\alpha = 0,05$; existen diferencias significativas entre la CIM y CBM, ya que el nivel de significancia es igual a 0,000 siendo este menor al nivel crítico permitido para el presente estudio.

CUADRO N° 3.16

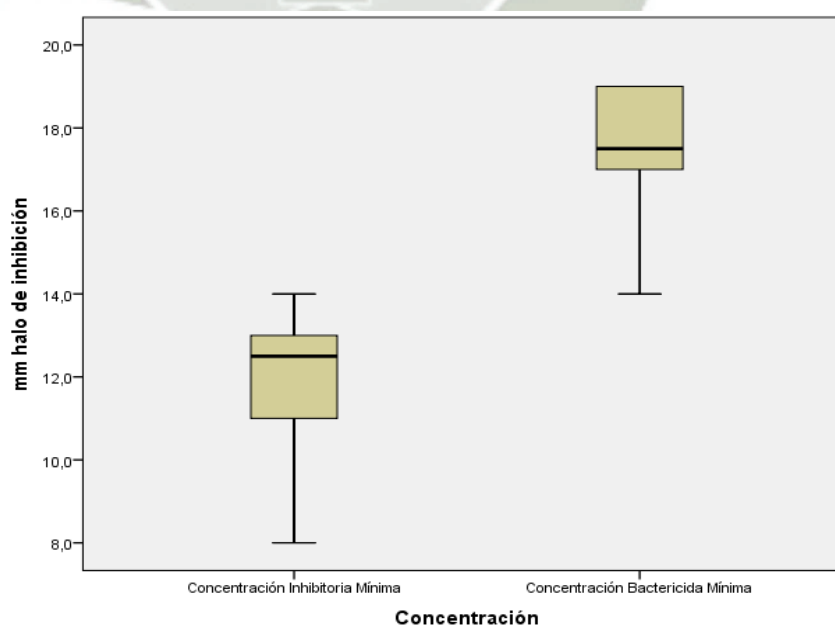
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Staphylococcus epidermidis*

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	125,000	1	125,000	26,471	,000
Intra-grupos	85,000	18	4,722		
Total	210,000	19			

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 2

DIAGRAMA PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Staphylococcus epidermidis*



CUADRO N° 3.17

**ESTADÍSTICOS DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)
Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto
etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Escherichia coli***

Concentración	N	Media	Mediana	Desv. típ.	Varianza	Mínimo	Máximo
CIM	10	12,600	13,000	1,8379	3,378	9,0	15,0
CBM	10	14,600	14,500	1,5055	2,267	12,0	17,0
Total	20	13,600	14,000	1,9304	3,726	9,0	17,0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro se presentan los estadísticos descriptivos para los halos de inhibición de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Escherichia coli*, se aprecia que el promedio de la CIM es de 12,6 mm, y una mediana de 13 por su parte el promedio de la CBM es de 14,6 y una mediana de 14,5 aparentemente la media del halo de esta última medida es mayor respecto a la primera.

Con la finalidad de observar si existen diferencias significativas entre los halos de inhibición de la CIM y la CBM de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Escherichia coli*, se realizó un análisis de varianza, para ver las diferencias significativas entre ambas medidas.

Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro, en el mismo se aprecia que a un nivel crítico de $\alpha = 0,05$; el valor del nivel de significancia es igual a 0,016 siendo este menor al nivel crítico permitido para el presente estudio, por lo que existen diferencias entre la CIM y la CBM.

CUADRO N° 3.18

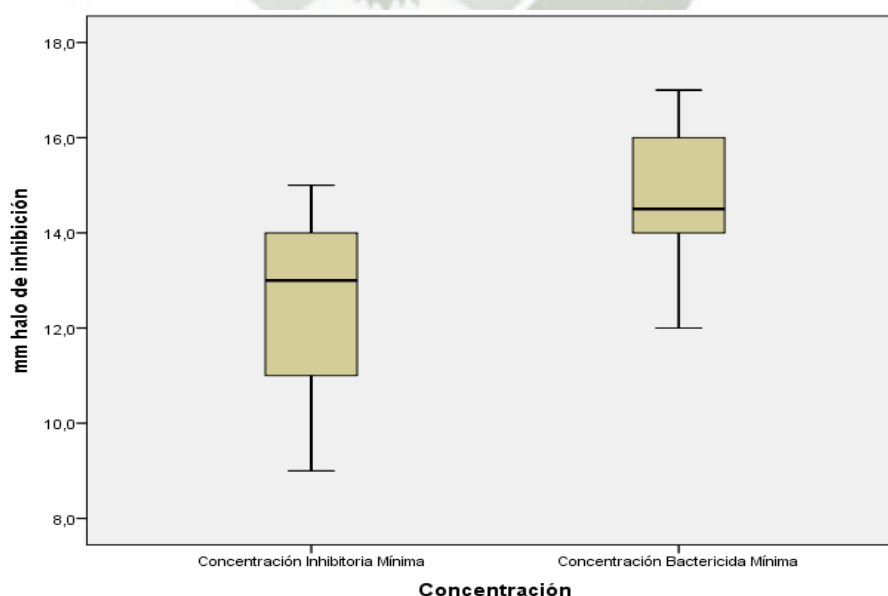
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Escherichia coli*

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	20,000	1	20,000	7,087	0,016
Intra-grupos	50,800	18	2,822		
Total	70,800	19			

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 3

DIAGRAMA PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Escherichia coli*



CUADRO N° 3.19

**ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS PARA LA CONCENTRACIÓN
INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA
MÍNIMA (CBM del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA)
FRENTE A *Pseudomona aeruginosa***

Concentración	N	Media	Mediana	Desv. típ.	Varianza	Mínimo	Máximo
CIM	10	7,200	6,500	1,9322	3,733	5,0	10,0
CBM	10	8,000	8,500	2,5386	6,444	4,0	12,0
Total	20	7,600	7,500	2,2337	4,989	4,0	12,0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro se presentan los estadísticos descriptivos para los halos de inhibición de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Pseudomona aeruginosa*, se aprecia que el promedio de la CIM es de 7,2 mm, y una mediana de 6,5; por su parte el promedio de la CBM es de 8,0 y una mediana de 8,5; aparentemente la media del halo de esta última medida es mayor respecto a la primera.

Con la finalidad de observar si existen diferencias significativas entre los halos de inhibición de la CIM y la CBM de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Pseudomona aeruginosa*, se realizó un análisis de varianza, para ver las diferencias significativas entre ambas medidas.

Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro, en el mismo se aprecia que a un nivel crítico de $\alpha = 0,05$; el valor del nivel de significancia es igual a 0,438 siendo este mayor al nivel crítico permitido para el presente estudio, por lo que no existen diferencias entre la CIM y la CBM. Y si se consideran los tamaños promedio descritos para dichas concentraciones, podemos afirmar que la resina no tendría un efecto antibacteriano sobre cepas de *Pseudomona aeruginosa*.

CUADRO N° 3.20

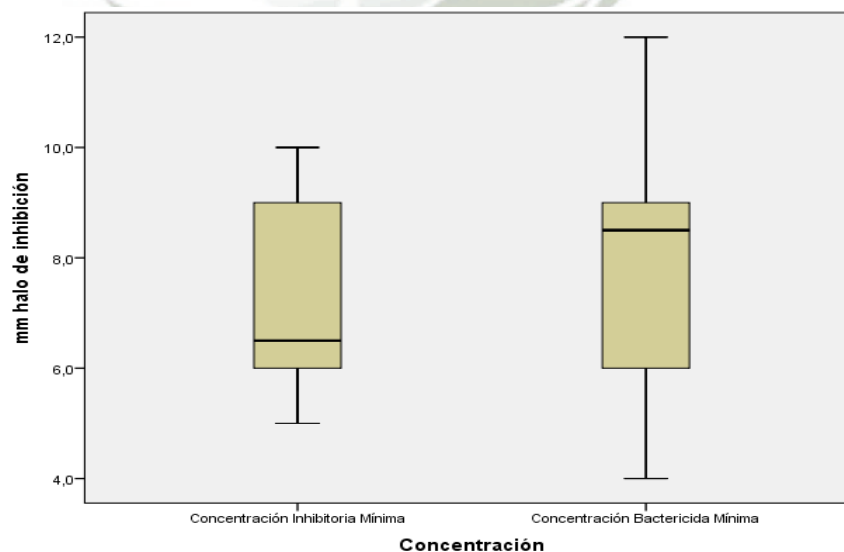
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Pseudomona aeruginosa*

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3,200	1	3,200	0,629	0,438
Intra-grupos	91,600	18	5,089		
Total	94,800	19			

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 4

DIAGRAMA PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Pseudomona aeruginosa*



CUADRO N° 3.21

**ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS PARA LA CONCENTRACIÓN
INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA
MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA)
FRENTA A *Cándida albicans***

Concentración	N	Media	Mediana	Desv. típ.	Varianza	Mínimo	Máximo
CIM	10	15,000	15,000	1,4907	2,222	13,0	17,0
CBM	10	15,000	15,000	2,4495	6,000	10,0	18,0
Total	20	15,000	15,000	1,9735	3,895	10,0	18,0

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro se presentan los estadísticos descriptivos para los halos de inhibición de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima de la resina de *Copaifera paupera* frente a 10 cepas de *Cándida albicans*, se aprecia que el promedio de la CIM es de 15 mm, y una mediana de 15; por su parte el promedio de la CBM es de 15,0 y una mediana de 15 mm; aparentemente la media del halo de esta última medida es mayor respecto a la primera.

Con la finalidad de observar si existen diferencias significativas entre los halos de inhibición de la CIM y la CBM de la resina de *Copaifera paupera* frente a cepas de *Cándida albicans*, se realizó un análisis de varianza, para ver las diferencias significativas entre ambas medidas.

Los resultados de este análisis se presentan en el cuadro, en el mismo se aprecia que a un nivel crítico de $\alpha = 0,05$; el valor del nivel de significancia es igual a 1,000 siendo este mayor al nivel crítico permitido para el presente estudio, por lo que no existen diferencias entre la CIM y la CBM.

CUADRO N° 3.22

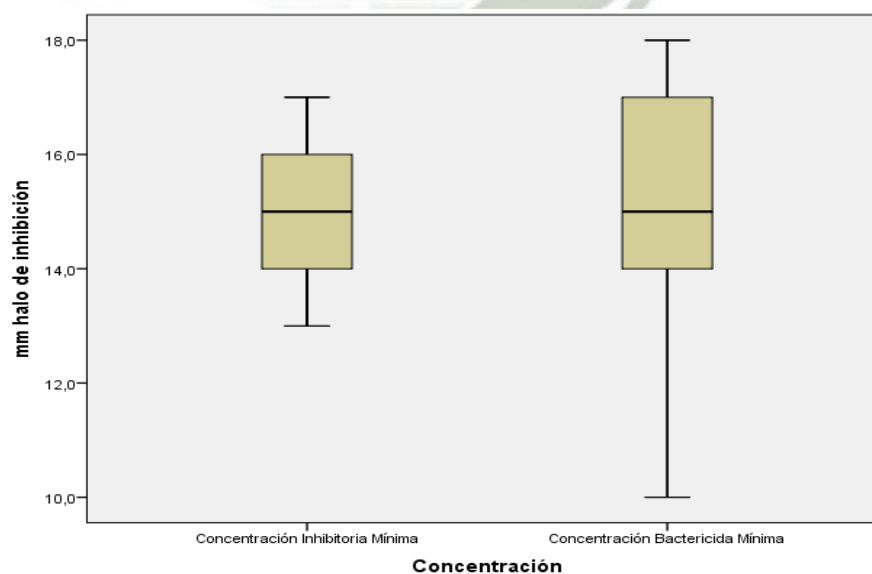
ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Candida albicans*

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	,000	1	,000	,000	1,000
Intra-grupos	74,000	18	4,111		
Total	74,000	19			

Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO N° 5

DIAGRAMA PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) del extracto etanólico de *Copaifera paupera* (COPAIBA) FRENTE A *Candida albicans*



CONCLUSIONES

1. Se determinó el efecto antimicrobiano in vitro de la resina de *Copaifera Paupera* (Copaiba), frente al crecimiento de los microorganismos en estudio los siguientes resultados:
 - (CIM) por el método de dilución en tubo y se halló una concentración de 6 mg/ml para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; 9mg/ml para *Escherichia coli*; 90mg/ml para *Pseudomona aeruginosa* y 3 mg/ml para *Cándida albicans*
 - (CBM) y se halló una concentración de 7 mg/ml para *Staphylococcus aureus*; 8 mg/ml para *Staphylococcus epidermidis*; 10 mg/ml para *Escherichia coli*; 100 mg/ml para *Pseudomona aeruginosa* y 3 mg/ml para *Cándida albicans*
2. Se realizó un coprecipitado soluble en agua utilizando la povidona que nos dió un rendimiento de 63.3%
3. Se Realizó un análisis fotoquímico preliminar de la resina de la *Copaifera Paipera* (Copaiba) para establecer su composición química y se encontró: terpenos, y sesquiterpenos.

SUGERENCIAS

1. Evaluar el efecto antibacteriano de la resina de *Copaifera paupera* (copaiba) frente a otros tipos bacterianos.
2. Evaluar el efecto antibacteriano *in vivo* de la resina de *Copaifera paupera* (copaiba) en animales de experimentación.
3. Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* e *in vivo* de una forma farmacéutica que contenga resina de *Copaifera paupera* (copaiba).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBERT Pahissa Libro: Infecciones producidas por Staphylococcus aureus, Edición Marge Medica Books, 2009.
2. BAILEY & SCOTT. Diagnostico Microbiológico. Edit. Panamericana 2004.
3. BRUNETON, Jean. *Elementos de fotoquímica y farmacognosia*. Editorial Acribia España, 2001
4. CRISTAL JULIET, Evaluation of Staphylococcus spp in vitro Susceptibility. 2002.
5. COYLE Marie. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Departments of Laboratory Medicine and Microbiology. University of Washington.
6. DIEZ Oscar, Batista Ninive et col. Diagnostico microbiológico de las infecciones del tracto respiratorio superior. 2007. *Enfer Infecc Microbiol Clin*; 25(6): 387-93.
7. DOUGLAS A. Skoog, Stanley R. Crouch y F. James Holler Libro: Principio de Análisis Instrumental, Edición Cengage Learning, 2008.
8. ELMER Koneman y Stephen Allen Libro: Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color, Edición Médica Panamericana, 2008.
9. FARRERAS, Rozmam. Medicina Interna. 14 ed. Edit. Harcourt Brace. España 2001.
10. FERNANDO Dalet y Gerardo del Río Libro: Infecciones Urinarias; Edición Medica Panamericana, 1997.
11. FURNANI G. Tala de botánica Sistemática. Centro Universitario para la Tutela y la Gestión del Ambiente y del Aro-Ecosistema Universidad de Catania Departamento de Botánica Catania:2004
12. GARCIA Rodríguez, José Ángel; PICAZO Juan, Microbiología Medica General .Tomo 1, Editorial Brace de España S.A 1998.
13. GERARD J. Tortora, Berdell R. Funke y Christine L. Case Libro: Introducción a la Microbiología, 9na Edición Medica Panamericana, 2007.

14. HILA Cano, Anthony Angelio; Lazo Fuentes Fanny Kerelia. Determinación del efecto antimicrobiano de la Ambrosia Peruviana L, “Altamisa” In vitro frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes* y *Klebsiella pnellmoniae*. Arequipa 2006.
15. JAVE Márquez Mercedes *Microbiología Farmacéutica 1 Cocos Gram Positivos, Staphylococcus y Micrococcus Arequipa, Perú, 2009*
16. JAWETZ, E. *Microbiología Medica*. 15ava Edición. Editorial el Manual Moderno S.A. México 1995.
17. KONEMAN, Elmer W; y colaboradores. *Diagnostico Quinta Edición* .Editorial Medica Panamericana. pag. 780-799. Argentina 1999
18. KUKLINSHI. Claudia. *Farmacología. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Edición omega S.A España. 2003.
19. MENDO Rubio M. *Lecciones de Microbiología y Medios de cultivo*. IV Edición. Servicios Gráficos y Afines RpM. Lima 1995
20. MILLA Cavera, Magaly Elizabeth. *El Efecto antimicrobiano In Vitro del Zingiber officinale Roscoe ((l)engibre) frente a Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa, provenientes del HNCASE Es salud Arequipa2007*.
21. MIRANDA López, José Manuel *Revista: Tratamientos antimicrobianos en medicina veterinaria: efectos sobre la micro biota intestinal de pollos y su repercusión en carnes de producción convencional y ecológica*, Publicación de la Universidad Santiago de Compostela
22. MOSTACERO Leon José, MELLA Coico Freddy, GAMARRA Torres Oscar, “*Taxonomía de las Fanorogamicas útiles del Perú*” Editorial Normas Legales S.A.C. Trujillo, Perú, 2002.
23. LOCK DE UGAZ, O. *Investigación Fotoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Lima 1988.
24. PERALTA Lopez, Katisa Consuelo. *Efecto antimicrobiano In Vitro de la Canlendula officinales sobre Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa y Cándida albicans Arequipa 2005*.

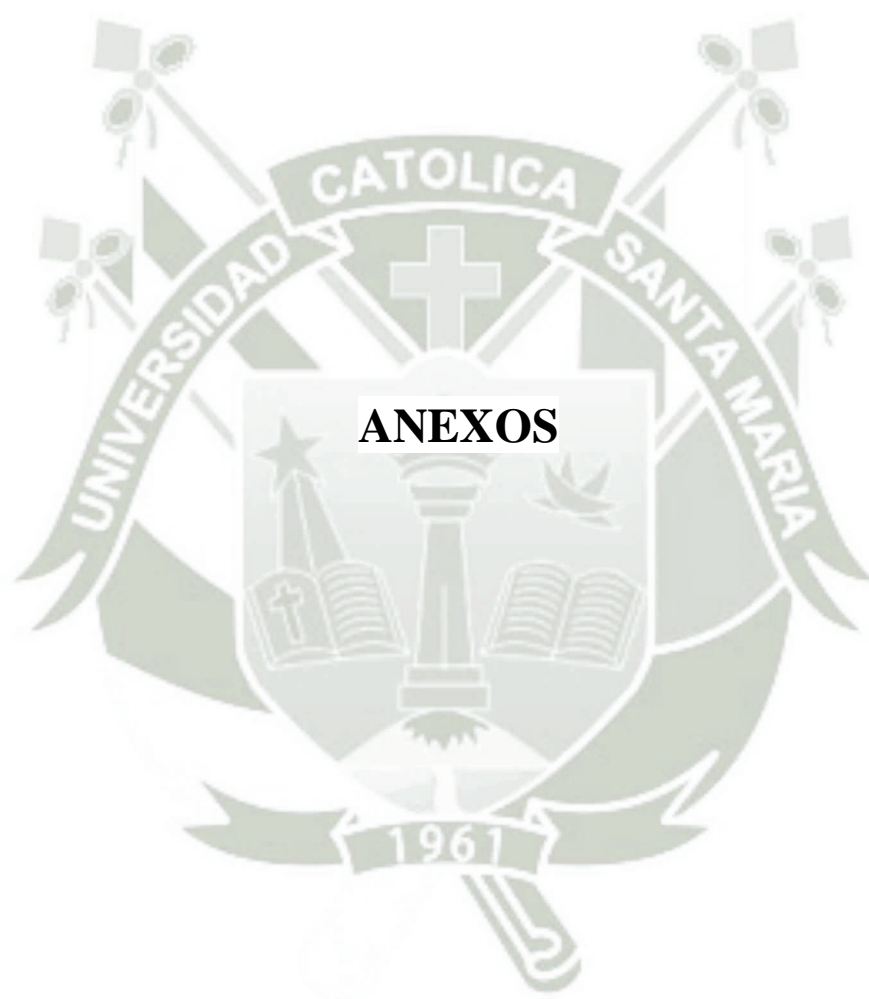
25. PRESCOTI, LANSING M. Microbiología V, Edición, editorial Me Graw Hill 2002.
26. PUMAROLA A, Rodríguez Torres A, GARCIA Rodríguez A. “Microbiología y parasitología Medica” 2da edición. Editorial MASSON S.A.1999.
27. RANULFO Gutiérrez, Willman Madani. Efecto in vitro del Eucaliptos globulus labill (eucalipto) sobre Staphylococcus aureus Echerichica coli, Klebsiella Pneumoniae, Proteus vulgaris y Peudomona auriginosa”.
28. REMINGTON, Gennara Alfonso. Farmacia 20ava edición, 2 Tomo 11 Buenos Aires, Argentina, Editorial Medica Panamericana S.A. 2000
29. ROMERO Caballero Romero Libro: Microbiología y Parasitología Humana, Edición Medica Panamericana, 2007.
30. RUBINSSON Kenneth A. Analysis instrumental. Editorial Pretinse Hall 2001, España.
31. STREINER Y NORMAN. “Bioestadística” ISBN. Editorial Harcourt Brace. España 1998
32. TORTORA Gerard, FUNKE Berdell. Y CASE Christine. Introducción a la microbiología. 9na Edición. Editorial Medica Panamericana 2007
33. VELOZ DE RETO, Rebeca. Guía Moderna de Medicina Natural. Primera edición Editorial Asdimor, 1992
34. VILA JATO José Luis. Tecnología Farmacéutica, y operaciones básicas. Volumen IIEditorial Sintesis. S.A.
35. VIRRUETA Gómez Cecilia Marcia; ZEGARRA Manrique Yesenia Giuliana. Determinación del efecto antimicótico in vitro Piper Elongatum “Matico “frente a la cepa Cándida albicans, *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* Arequipa 2008.
36. *Copaifera paupera*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología.

ARTICULO

37. MADIGAN M; Martinko J (editors).(2005). Brock Biology of Microorganisms, Decimo primera edición, Prentice Hall. ISBN 0 131443291
<http://www.raintree.com/reports/matico-tech-report.pdf>.
38. VELASCO Arturo, PEREZ Alonso y BURZACO Aranzaco (1992). Estudio mediante cromatografía en capa fina de algunas planta: *Mentha pulegium* L.y *Mentha cervina* L. Universidad complutense Madrid.
<http://revistas.ucm.es/index.php/BOCM/article/view/BOCM9292110079A>

INTERNET

39. <http://www.Staphylococcus-aureus.blogspot.com/2006/patogenia> 07. htrn
40. <http://rainforest-database.com/plants/copaiba.htm>
41. <http://www.yinyangperu.com/plants/copaiba.htm>
42. <http://rainforest-database.com/plants/copaiba.htm>



ANEXO N° 1

COLORACIÓN DE GRAM

FUNDAMENTO:

El cristal violeta sirve como colorante primario, que se une a la Pared celular bacteriana con una solución débil de yodo que sirve como mordiente para La unión del colorante. Algunas bacterias debido a la naturaleza química de sus paredes Celulares, tienen la capacidad de retener el cristal violeta, incluso luego de un tratamiento con un decolorante orgánico, como una mezcla de alcohol etílico y acetona.

Las Bacterias que retienen el colorante, se ven violetas o azul y se denominan Gram positivas. Algunas bacterias pierden la coloración primaria cuando son tratadas con el decolorante, debido al alto contenido de lípidos de su pared celular. Estas bacterias decoloradas toman el colorante de contraste, la safranina y se ven rojas cuando se observan al microscopio denominándose Gram negativos.

PREPARACIÓN:

1. Fije el frotis y déjelo secar. Vierta sobre el portaobjetos colorante cristal violeta, dejar reposar un minuto. Enjuagar con agua abundante.
2. Bañar con solución de Yodo, dejar reposar un minuto, enjuagar con agua abundante.
3. Bañar completamente con solución con Alcohol-Acetona y dejar reposar 30 Segundos.
4. Enjuagar con agua abundante.
5. Bañar con solución de Safranina, dejar 45 segundos, lavar con agua abundante.
6. Dejar secar el portaobjetos en el ambiente para luego observar al microscopio con Aceite de inmersión.

INTERPRETACIÓN: Las bacterias Gram positivas se observan de color violeta o azul y las Gran negativas de color rojo.

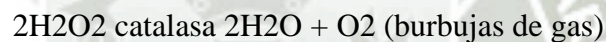
ANEXO N° 2

PRUEBA DE LA CATALASA

FUNDAMENTO:

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno. Es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto porque los cuatro átomos de hierro de su molécula están en el estado oxidado (Fe³⁺), en lugar del estado reducido (Fe²⁺). Excepto los estreptococos, la mayor parte de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa.

El peróxido de hidrógeno se forma como uno de los productos finales de oxidación del metabolismo aerobio de los hidratos de carbono. Si se permite que se acumule, resulta letal para las células bacterianas. La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno según la siguiente reacción:

**PREPARACIÓN:**

1. Con una aguja de inoculación, transferir parte del centro de una colonia a la superficie de un portaobjetos.
2. Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la formación de burbujas.

INTERPRETACIÓN:

La aparición rápida y sostenida de burbujas o efervescencia constituye una reacción positiva.

ANEXO N° 3

PRUEBA DE LA COAGULASA

FUNDAMENTO:

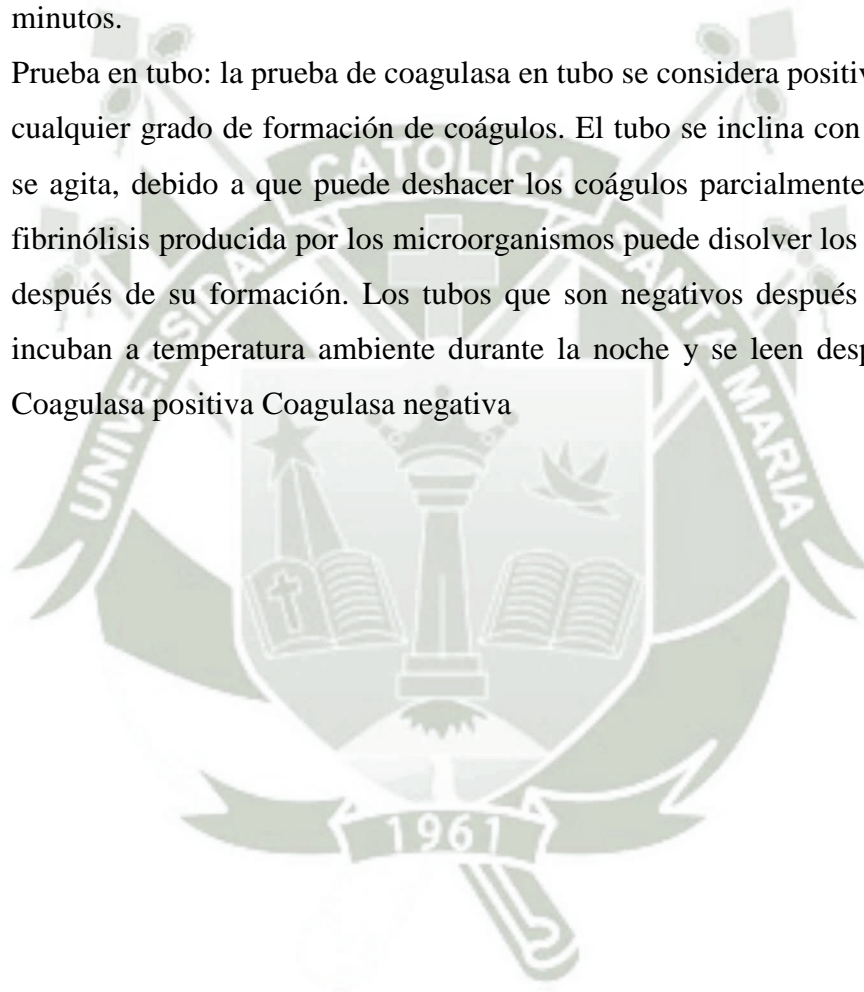
La coagulasa es una proteína de composición desconocida, que tiene actividad similar a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina, que da como resultado la formación de un coágulo visible en los sistemas apropiados. La coagulasa se presenta en dos formas, libre y unida; y cada una posee diferentes propiedades que requieren el uso de otras especies de estafilococos. Coagulasa unida (prueba en portaobjetos): Factor de agrupación, se encuentra unida a la pared celular bacteriana y no se encuentra en los filtrados de cultivos. Entre las células bacterianas se forma bandas de fibrina cuando se suspenden en plasma (fibrinógeno), las que hacen que se agrumen en grumos visibles. Coagulasa libre (prueba en tubo): La coagulasa libre es una sustancia similar a la trombina presente en filtrados de cultivos. Cuando en un tubo de ensayo se prepara una suspensión en plasma de microorganismos productores de coagulasa, se forma un coágulo visible como resultado de la reacción de la coagulasa con una sustancia del suero (factor de reacción con la coagulasa), para formar un complejo que a su vez reacciona con el fibrinógeno para producir el coágulo de fibrina.

PREPARACIÓN:

1. Prueba en portaobjetos (coagulasa unida): colocar dos gotas de agua o solución fisiológica estéril en un portaobjetos de vidrio. Emulsificar material de colonias del microorganismo a identificar. Colocar una gota de plasma, mezclar, colocar otra gota adelante y atrás, buscando aglutinación en la suspensión de prueba.
2. Prueba en tubo (coagulasa libre): emulsificar una pequeña cantidad de la colonia el microorganismo en un tubo que contenga 0.5ml de plasma para prueba de coagulasa. Incubar el tubo a 35°C durante 4 horas y observar si se forma un coágulo inclinando ligeramente el tubo.

INTERPRETACIÓN:

1. Prueba en portaobjetos: una reacción positiva debe detectarse dentro de los 10 a 15 segundos de mezclar el plasma con la suspensión por la visualización de un precipitado blanco y la aglutinación de los microorganismos de la suspensión. La prueba se considera negativa si no se observa aglutinación en el término de 2 minutos.
 2. Prueba en tubo: la prueba de coagulasa en tubo se considera positiva si se detecta cualquier grado de formación de coágulos. El tubo se inclina con suavidad y no se agita, debido a que puede deshacer los coágulos parcialmente formados. La fibrinólisis producida por los microorganismos puede disolver los coágulos poco después de su formación. Los tubos que son negativos después de 4 horas se incuban a temperatura ambiente durante la noche y se leen después de horas.
- Coagulasa positiva Coagulasa negativa



ANEXO N° 4

AGAR MANITOL SALADO

FUNDAMENTO:

Este medio contiene manitol 1%, CINa al 7.5%, rojo de fenol y peptonas. La alta concentración de sales inhibe el desarrollo de otros microorganismos y recupera selectivamente estafilococos. La degradación de manitol hasta ácido hace virar el indicador rojo de fenol a un color amarillo, siendo sinónimo de patogenicidad. El *Staphylococcus aureus* en contraste con el *Staphylococcus albus* tiene la capacidad de fermentar el manitol con producción de ácido.

COMPOSICIÓN:

- | | |
|---------------------|---------|
| • Extracto de Carne | 1g. |
| • Peptona | 10g. |
| • D-Manitol | 10g. |
| • Rojo de Fenol | 0.025g. |
| • Cloruro de sodio | 75g. |
| • Agar-agar | 12.5g. |
| • Agua destilada | 1 L. |

pH 7.4 ± 0.2 a 25°C

PREPARACIÓN: Disolver 108g/L, autoclavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aproximadamente 16-20ml, sembrar la colonia con un asa de Kolle e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

- Color amarillo: *Staphylococcus aureus*. Color rojo: *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus saprophyticus*.

ANEXO N° 5**AGAR MAC CONKEY****FUNDAMENTO:**

El agar Mac Conkey es un medio diferencial para la selección y recuperación de enterobacterias y bacilos Gram negativos entéricos relacionados. La presencia de sales biliares y el cristal violeta inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. La lactosa es el único hidrato de carbono. Las bacterias fermentadoras de lactosa forman colonias de diferentes tonos rojos debido al viraje del indicador rojo neutro (pH menor de 6.8) por la producción de ácidos mixtos. Las colonias no fermentadoras de lactosa aparecen incoloras o transparentes.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Peptona de Caseína 17g.
- Sales Biliares 1.5g.
- Lactosa 10g.
- Cloruro de Sodio 5g.
- Peptona de carne 3g.
- Rojo Neutro 0.03g.
- Agar-agar 12.5.
- Cristal Violeta 0.001g.

pH: 7.1 ± 0.2 a 25° C.

PREPARACIÓN:

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre 15 y 25° C. Disolver 48 g/L, autoclavar (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aprox. 16 - 20ml.

Sembrar el microorganismo en estudio por el método de agotamiento e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

Colonias lactosa positivas producen coloraciones rojizas, la bacteria degrada lactosa y produce ácido virando el indicador del medio (rojo neutro) a rojizo, *Escherichia coli*. El género *Enterobacter* son colonias rojas, *Klebsiella* da colonias rosadas, acidificando el medio. Las colonias lactosa negativo dan colonias incoloras o crema blanco y hasta producen un olor fuerte y fétido.



ANEXO N° 6

TSI (Triple Azúcar Hierro)

FUNDAMENTO:

Al ocurrir la degradación de cualquiera de los tres azúcares presentes, se forman ácidos que hacen virar el indicador rojo fenol a un color amarillo (inicialmente el color del medio es rojo). La degradación de la lactosa ocurre en la parte superior (pico de flauta), la sacarosa en la parte intermedia y la glucosa es fermentada en la parte profunda (fondo) y en condiciones anaeróbicas. El Tiosulfato es reducido a sulfuro de hidrógeno quien reacciona con la sal de hierro (citrato férrico amoniacal) para dar formación de sulfuro de hierro que es de color negro. La presencia de cavidades en el medio es debido a la formación de gas (CO₂) producto de la fermentación.

La lactosa, glucosa y sacarosa son hidratos de carbono fermentables. Tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido Sulfhídrico, este se reduce hasta sulfuro de hidrógeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico color negro. El rojo de fenol es indicador de pH y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico.

COMPOSICIÓN (g/L):

- | | |
|-----------------------------|---------|
| • Extracto de carne | 3g. |
| • Citrato Férrico Amoniacal | 0.5g. |
| • Extracto de Levadura | 3g. |
| • Cloruro de Sodio | 5g. |
| • Peptona de Caseína | 15g. |
| • Tiosulfato de Sodio | 0.5g. |
| • Peptona de carne | 5g. |
| • Rojo fenol | 0.024g. |
| • Lactosa | 10g. |

- Agar agar 12g.
- Sacarosa 10g.
- Glucosa 1 g.

pH 7.4 ± 0.2 a 25°C .

PREPARACIÓN:

Disolver 65 g/L, autoclavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en tubos de ensayo en forma pico de flauta (pico y fondo) tomar una colonia de cultivo puro, inocularla por punción y estría e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

La acidez se pone de manifiesto por su cambio al color amarillo y se simboliza con A. La alcalinidad se manifiesta por su cambio al grosella y se simboliza con K. K/A: “No fermentador de lactosa”. El microorganismo es capaz de utilizar la glucosa pero no la lactosa, por lo cual produce una pequeña cantidad de ácido y en el pico se produce la degradación de proteínas con liberación de aminas lo que da un color grosella en el pico.

A/A: “Fermenta glucosa y lactosa”. La degradación de glucosa, lactosa y sacarosa se manifiesta por el cambio total del medio a amarillo.

K/K: “No fermentadores de azúcares”. Son incapaces de producir ácido por no fermentar glucosa o lactosa y no hay cambio en el medio. Producción de gas. La presencia de gas se manifiesta por el resquebrajamiento del medio.

Producción de ácido sulfúrico de hierro. El hierro es indicador para poner en evidencia la producción de H_2S que se manifiesta por el color negro, según la cantidad se simboliza con uno, dos o tres signos positivos (+), y si no hay sulfuro de hierro se simboliza con el signo menos (-).

ANEXO N° 7

AGAR LISINA HIERRO (LIA)

FUNDAMENTO:

La Descarboxilasa es una enzima que es capaz de actuar sobre la porción carboxilo (COOH) de los aminoácidos (lisina) con formación de aminas de reacción alcalina, ésta reacción conocida como Descarboxilación produce CO₂ como producto secundario. La lisina al Descarboxilarse origina la cadaverina.

La peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de enzimas Descarboxilasa y Desaminasa. El purpura de bromocresol es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2 y de color violeta a pH mayor a 6.8, por Descarboxilación de la lisina se produce la amina cadaverina que alcaliniza al medio y este produce el viraje del indicador al color violeta. La Descarboxilación de la lisina tiene lugar en medio ácido por lo que es necesario que la glucosa sea previa fermentada.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Peptona 5g.
- Extracto de levadura 3g.
- Glucosa 1 g.
- Tiosulfato de Sodio 0.04g.
- L-Lisina 10g.
- Purpura de Bromocresol 0.02g.
- Agar agar 15g.
- Citrato de Amonio Férrico 0.5g.

pH 6.7 ± 0.2 a 25° C.

PREPARACIÓN:

Disolver 32 g/L, autoclavar (15 minutos por 121° C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en tubos de ensayo en forma pico de flauta, tomar una colonia pura e inocular 3 punciones y una estría, incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN: El desarrollo de un color amarillo en el fondo del tubo indica que el organismo es viable y que el pH del medio ha descendido lo suficiente para activar la enzima Descarboxilasa. El retorno del tubo que contiene el aminoácido a un color azul púrpura indica una reacción positiva debido a la formación aminas a partir de la reacción de Descarboxilación (se ha formado la cadaverina).

- **K/K:** Lisina positiva. El retorno de un color azul púrpura del tubo indica que contiene el aminoácido y es una reacción positiva por descarboxilación, formándose cadaverina.
- **K/A:** Lisina negativa. Los microorganismos que no producen lisina descarboxilasa, pero que son fermentadores de glucosa, producen un viraje en la totalidad del medio al color amarillo, pero a las 24 horas de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de peptonas y el fondo es amarillo.
- **R/A:** Desaminación de Lisina. La Desaminación es ocasionada por los microorganismos que poseen la enzima lisina Desaminasa, produciéndose una Desaminación oxidativa, consecuentemente la pérdida del grupo α -amino, para convertirse en un Cetoácido. Este Cetoácido da un color naranja en presencia de sales férricas y un color rojo al combinarse en el indicador Púrpura de Bromocresol. Se observa Pico rojizo/fondo amarillo y se simboliza R/A, se interpreta Desaminación positiva.
- Producción de ácido sulfhídrico: Prueba positiva con ennegrecimiento del medio especialmente en el límite del pico y fondo.



ANEXO N° 8

ROJO DE METILO-VOGES PROSKAUER (MR-VP)

FUNDAMENTO:

Rojo Metilo: Es un indicador de pH con un rango entre 6.0 (amarillo) y 4.4 (rojo). El rojo de metilo detecta los ácidos de un pH más bajo que el correspondiente a otros indicadores utilizados en medios de cultivo bacteriológicos. El microorganismo en estudio debe producir grandes cantidades de ácido a partir del sustrato de hidratos de carbono para provocar un cambio de color. RM: Vía de los ácidos mixtos

COMPOSICIÓN (g/L):

- Rojo de metilo 0.1g.
 - Etanol al 95% 300ml.
 - Agua destilada 200ml.
- pH 6.9 ± 0.2 a 25° C.

PREPARACIÓN:

Inocular el caldo MRVP con un cultivo puro del organismo en estudio. Incubar a 37°C por 24 horas, finalizado este periodo añadir 5 gotas del reactivo rojo de metilo.

Vía Glucolítica

Ácido pirúvico Glucosa Vía de ácidos mixtos Ácidos mixtos + CO₂ Rojo de Metilo (rojo)

pH 4.4 o menor Rojo de Metilo (amarillo) pH6.0

INTERPRETACIÓN:

El desarrollo de un color rojo estable en la superficie del medio indica la suficiente producción de ácido como para disminuir el pH a 4.4 y constituye una prueba positiva.

FUNDAMENTO:

Voges Proskauer: Esta prueba se basa en la conversión de acetil-metil-carbinol (acetoína) a través de la acción del hidróxido de potasio y el oxígeno atmosférico en diacetilo que se vierte en un complejo rojo bajo la acción catalítica del α -naftol. V.P.: Vía del butilenglicol (Acetoína)

COMPOSICIÓN (g/L):

- Polipeptona 7.0g.
 - Glucosa 5.0g.
 - Fosfato de Potasio 5.g.
- pH 6.9 ± 0.2 a 25°C .
- . α - Naftol: Hidroxido de potasio:
- α - Naftol 5g. Hidroxido de potasio 40g.
 - Alcohol etílico 100ml. Agua destilada 100ml.

PREPARACIÓN:

Inocular el caldo MRVP con un cultivo puro del organismo en estudio. Incubar a 37°C por 24 horas, finalizado este periodo añadir gotas de α - naftol e hidróxido de potasio al 40%, agitar el tubo para exponerlo al oxígeno y dejarlo en reposo por 10 minutos.

INTERPRETACIÓN:

Una prueba positiva es indicada por el desarrollo de color rojo a los 10 minutos de añadir los reactivos, lo que indica la presencia de diacetilo, el producto de oxidación de la acetoína. Prueba Rojo de Metilo Prueba Voges Proskauer

ANEXO N° 9**CITRATO DE SIMMONS****FUNDAMENTO**

La utilización de citrato como única fuente de carbono es una prueba útil en la identificación de enterobacterias. La utilización de citrato como única fuente de carbono se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la alcalinización del medio. Este aumento del pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7.6.

COMPOSICIÓN

Fosfato di ácido de amonio	1.0g
Fosfato dipotasico	1.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Citrato de sodio	2.0g
Sulfato de magnesio	0.2g
Agar agar	15.0g
Azul de bromotimol	0.08g
Agua destilada	1000.0ml

PREPARACIÓN

Pesar 25g del medio de cultivo y llevarlo a ebullición hasta que este traslucido, esterilizar en la autoclave por 45 min. Repartir en tubos de ensayo para su posterior uso

PROCEDIMIENTO:

Se inocular la superficie del agar inclinado con una sola estría en el pico. Utilizar un cultivo de 24 horas con un medio sólido y cuidando no arrastrar un medio de cultivo

ya que se pueden producir falsos positivos por crecimiento a partir del medio de cultivo del inóculo. Incubar a 35°C durante 48 horas.

INTERPRETACIÓN:

El ensayo es positivo cuando se observa crecimiento a lo largo de la estría, acompañado o no de un viraje del indicador al azul

pH neutro verde

pH ácido amarillo

pH básico azul.



ANEXO N° 10**AGAR SABOURAUD****FUNDAMENTO**

Es un medio recomendado para el cultivo de hongos y levaduras particularmente aquellos asociados a infecciones patológicas dermatológicas. El contenido de glucosa y el pH ácido facilitan el rápido desarrollo de los hongos y levaduras presentes en la muestra.

COMPOSICIÓN

Peptona 10g
Dextrosa 40g
Agar agar 16g
Agua destilada 1000ml

PREPARACIÓN

Pesar 66g del medio del cultivo y disolverlo en 1000ml de agua destilada. Autoclavar por 45 minutos, repartir el medio en placa o tubos según sea el caso y dejar enfriar.

INTERPRETACIÓN

A la temperatura ambiente, las colonias adquieren un tamaño regular y son blanquecinas.

ANEXO N°11**CALDO PEPTONADO (INDOL)****FUNDAMENTO**

El Indol es uno de los productos de degradación metabólico del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de Indol, ácido pirúvico y amoníaco. La producción de Indol es una Característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos. La prueba de indol está basada en la formación de un complejo rojo cuando el Indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo del reactivo de Kovacs. La producción de Indol es útil para diferenciar *Escheriachia coli* (positiva) de miembros de grupo *Klebsiella-Enterobacter*, (la mayoría negativos).

COMPOSICIÓN

Peptona	20.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Agua destilada	1000ml

PREPARACIÓN

Pesar 25g del medio deshidratado y suspenderlo en 1L de agua destilada, dejar reposar x 5 minutos, se mezcla hasta formar una suspensión uniforme, se calienta suavemente con agitación constante, se hierve durante 1 a 2 minutos hasta su disolución completa. Se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

ANEXO N° 12

POLIVINIL PIRROLIDONA (PVP)

• **Sinónimos**

E1201; Kollidon; Plasdone; poli [1-(2-oxo-1pirrolidinil) etileno]: polividona; polivinil pirrolidona; PVP; 1-vinil-2pirrolidona polímero

• **Nombre químico**

1-etinil-2-pirrolidona homopolímero

• **Formula Empírica y Pesos molecular**

Formula: $(C_6H_9NO)_n$ **P.M:** 2.500 – 3'000,000

El USP XXII (suplemento 9) describe a la Povidona como el polímero sintético consistiendo esencialmente de un grupo lineal 1-vinil-2-pirrolidona, el grado de polimerización resulta en polímeros de varios pesos moleculares. Es caracterizada por su viscosidad en soluciones acuosas, expresado como una variable K, del rango de 10 a 120.

El valor K es calculado usando la ecuación de Fikentscner siguiente:

$$\text{Log}_z = \frac{(75k^2)}{(1/1.5kc)} + k$$

Dónde:

z = es la viscosidad relativa de la solución de concentración c .

k = es igual al valor K multiplicado por 10^{-3} .

c = es la concentración en porcentaje w/v.

Alternativamente el valor k puede ser determinado por la siguiente ecuación:

$$K - \text{valor} = \frac{[30(\text{clog}_z + 1.5 \log_z)^2 + 1.5]}{0.15c/0.03c^2}$$

Donde z = es la viscosidad relativa de la concentración de la solución.

k = es igual al valor K multiplicado por 10^{-3} .

c = es la concentración en porcentaje w/v.

- **Categoría funcional**

Agente coprecipitante, recubridor de tabletas.

- **Aplicaciones en Formulaciones Farmacéuticas o Tecnología**

La povidona es usada en una variedad de formulaciones farmacéuticas es usada principalmente en formas de dosaje sólido. En la fabricación de tabletas, soluciones de povidona son usadas como ligamentos en procesos de granulación húmeda, la povidona es también añadida a preparados en polvo en la forma seca y en la formula granulada in situ por la adición de agua, alcohol o soluciones hidroalcohólicas. Las soluciones de povidona también pueden ser usadas como agentes de recubrimiento.

La povidona es también usada como agente suspensor, estabilizador o agente incrementador de viscosidad en número de suspensiones y soluciones tópicas y orales. La solubilidad de principios activos poco solubles puede ser mejorado usando povidona.

Grados especiales de pirrogen povidona libre están disponibles y son usadas en formulaciones parenterales.

- **Descripción**

La povidona es un fino, polvo blanco, inodoro o casi inodoro, polvo giroscópico. Povidonas con valores k iguales o menores de 30 son

manufacturadas para secado en spray y existen como esferas. La povidona k – 90 y superiores es manufacturada por tambores secadores y existen como platos.

- **Propiedades Típicas**

Acidez y alcalinidad

PH = 3.0 – 7.0 (5% w/v solución acuosa)

Densidad = 1,17 – 1.18 g/cm³.

- **Estabilidad y Condiciones de Almacenamiento**

La povidona se oscurece al ser calentada a 150°C, con una reducción en su solubilidad acuosa. Es estable en un corto ciclo de exposición al calor alrededor de 110 – 130 °C; la esterilización al vapor de una solución acuosa no altera sus propiedades.

Soluciones acuosas son susceptibles al crecimiento de hongos y consecuentemente requieren la adición de preservantes.

La povidona puede ser almacenada en condiciones ordinarias sin caer en descomposición o degradación. Sin embargo, desde que el polvo es higroscópico, debe ser guardado en un recipiente hermético en lugar fresco y seco.

- **Incompatibilidades**

La povidona es compatible en solución con un amplio rango de sales inorgánicas, resinas sintéticas y naturales y otros químicos. Ésta, forma aductos moleculares en combinación con sulfatazoles, silicato de sodio, ácido salicílico fenobarbital, tanina y otros componentes. La eficacia de algunos preservantes como el timerosal puede ser contrariamente afectada por la formación de complejos con povidona.

ANEXO N° 13

AGAR MÜELLER HINTON

FUNDAMENTO:

Es un medio recomendado para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismo exigentes.

COMPOSICIÓN (g/L):

- Infusión de Carne 2.0g.
- Hidrolizado de Caseína 17.5g.
- Almidón 1.5g.
- Agar-agar 13.0g.

pH: 7.4 ± 0.2 a 25°C .

PREPARACIÓN:

Utilizable hasta la fecha de caducidad cuando se almacena en lugar seco y perfectamente cerrado entre $+15$ y $+25^{\circ} \text{C}$. Disolver 34 g/L, auto clavar (15 minutos por 121°C). Enfriar ligeramente el medio y proceder a colocar en placas aprox. 16-20ml. Sembrar el microorganismo en estudio e incubar a 37°C por 24 horas.

INTERPRETACIÓN:

Se emplea este medio sólido para el crecimiento de muchos microorganismos.

ANEXO N° 14

CALDO PEPTONADO

FUNDAMENTO:

Es un medio altamente enriquecido que permite el crecimiento de la mayoría de bacterias

COMPOSICIÓN:

Peptona	20.0g
Cloruro de sodio	5.0g
Agua destilada	1000mL

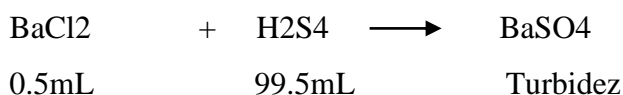
PREPARACIÓN:

Disolver los ingredientes a baño María. Auto clavar por 45 minutos.

ANEXO N° 15

ESCALA DE Mc. FARLAND

COMPOSICIÓN



PREPARACIÓN

Para preparar el estándar se agrega 0.5mL de BaCl₂ 0.048M a 99.5mL de H₂SO₄ 0.36N

CÁLCULOS

1. Para preparar 100ml de Cloruro de Bario 0.048M

$$\frac{0.048\text{mol}}{1000\text{ml}} \cdot \frac{(100\text{ml}) 208.3\text{g BaCl}_2}{1\text{mol}} = 0.99984\text{g Cl}_2\text{Ba en } 100\text{ml}$$

2. Para preparar 1000ml de Ácido sulfúrico 0.36N

$$\frac{0.36\text{Equ}}{1000\text{ml}} \cdot \frac{(1000\text{ml}) 98.08\text{g}/2}{1\text{Equ}} \cdot \frac{1\text{ml}}{1.84\text{g}} = 9.59478 \text{ ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ al } 96\%$$

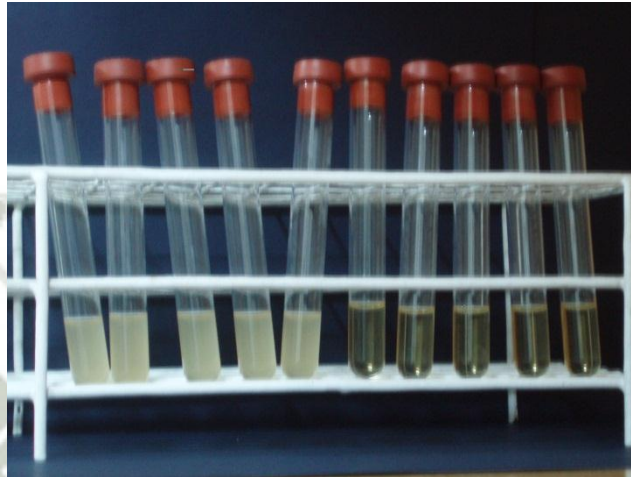
Para llevarlo al 100%

$$\begin{array}{rcl} 9.59478 & \text{-----} & 96\% \\ X & \text{-----} & 100\% \end{array}$$

X= 9.99ml de H₂SO₄ en 10000ml.

ANEXO N° 16

Fotos de concentración Mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus*



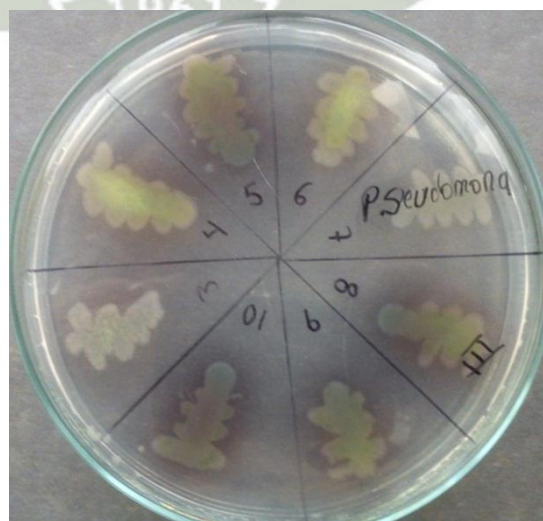
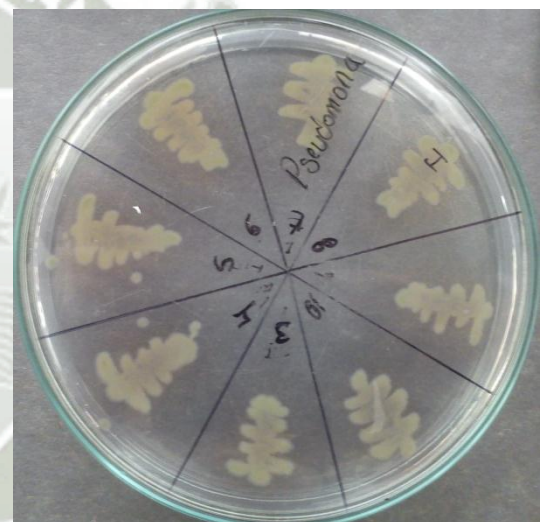
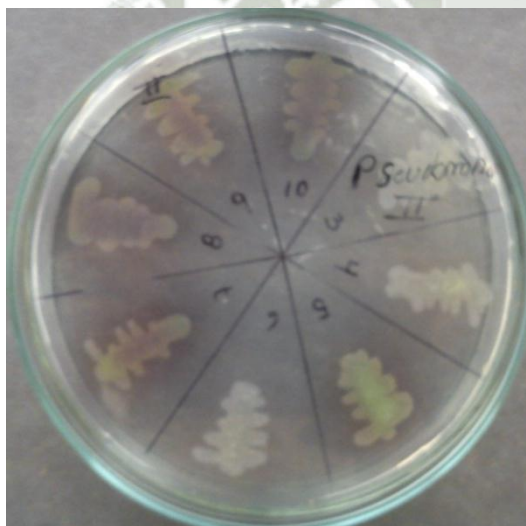
Fotos de concentración Mínima inhibitoria para *Staphylococcus epidermidis*



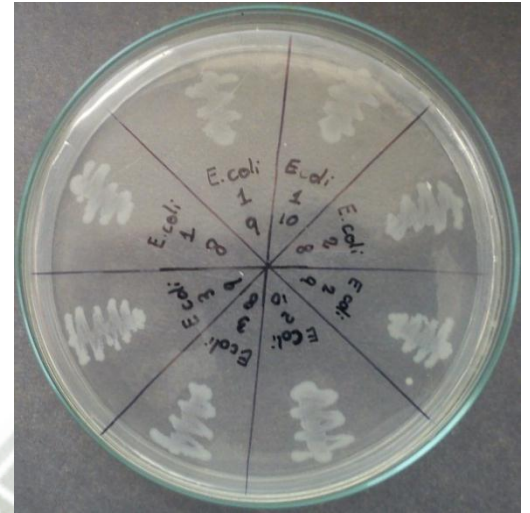
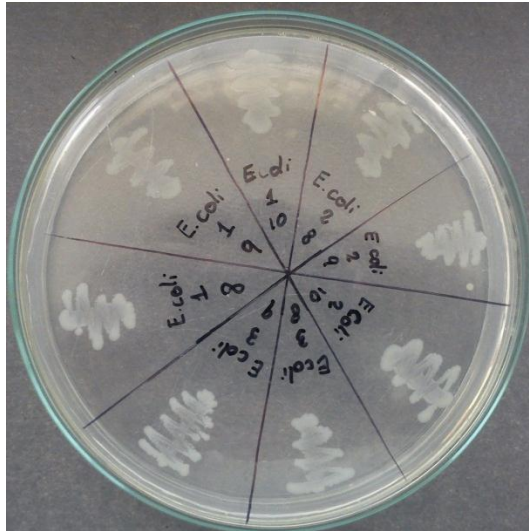
Fotos de concentración Mínima inhibitoria para *Pseudomona aeruginosa*



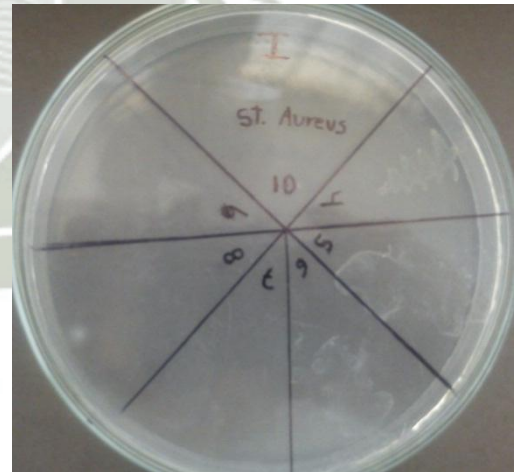
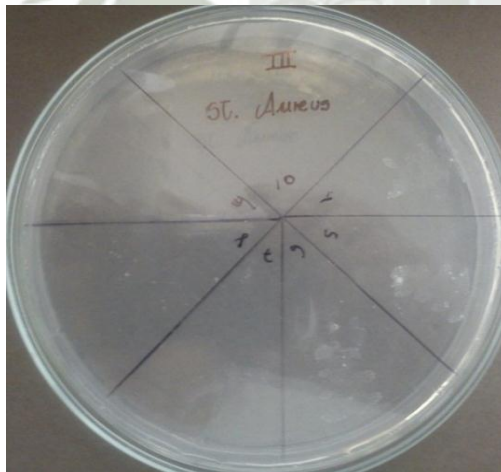
Fotos de concentración Bactericida Mínima para *Pseudomona aeruginosa*



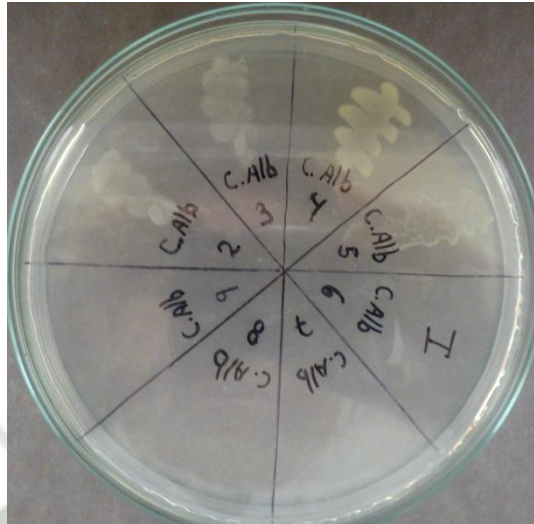
Fotos de concentración Bactericida Mínima para *Escherichia coli*



Fotos de concentración Bactericida Mínima para *Staphylococcus aureus*

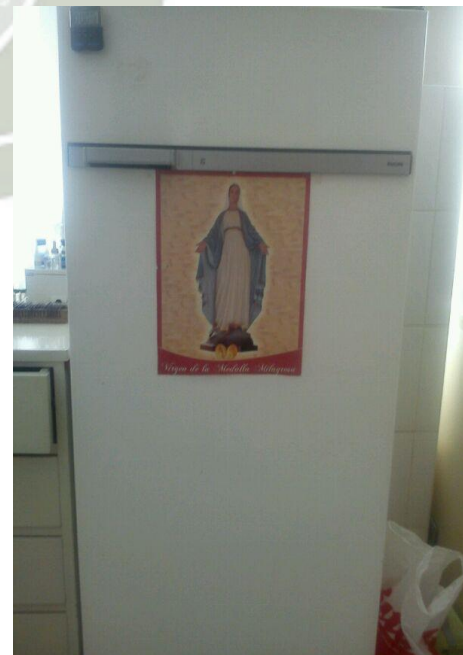


Fotos de Concentración Bactericida Mínima para *Cándida albicans*



ANEXO N° 17

EQUIPOS DE LABORATORIO





ANEXO N° 18

CONSTANCIA

El Biólogo: Juan Carlos Bernal Chipana, hace constar que: La Señorita Ysabel Lorena Arenas Camac, ha solicitado Clasificación taxonómica y la identificación de la planta llamada "*Copaifera paupera*". Para su trabajo titulado "Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de la resina de *Copaifera paupera* (copaiba) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Cándida albicans* Arequipa 2013".

Hace constar que la clasificación botánica de la Planta medicinal "Copaiba", es la siguiente:

Clasificación botánica de la "*Copaifera paupera*".

REINO: Plantae
PHYLUM: Magnoliophyta
CLASE: Rosopsida
ORDEN: Fabales
FAMILIA: Fabaceae
GENERO: *Copaifera*
ESPECIE: *officinalis, langsdorffii, reticulata*
NOMBRE CIENTIFICO: *Copaifera paupera*

Se expide la presente constancia para los fines que estime por conveniente.

Arequipa, 23 de Setiembre del 2013


Juan Carlos Bernal Chipana
BIÓLOGO
C.B.P. 6367

Biólogo. Juan Carlos Bernal Chipana