

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA.



APLICACION DEL METODO MITSCHER EN LA DETERMINACION DE LA
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN PRESERVANTE NATURAL
PATENTADO SOBRE ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y
Candida albicans.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

ZOILA NOHEMI ARGUETA CAÑAS.

MIRNA VERENICE VASQUEZ RIVERA.

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA.

DICIEMBRE DE 2009

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ.

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ.

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO.

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DIAZ.

COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION.

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo.

ASESORA DE AREA DE MICROBIOLOGÍA.

MSc. Coralia de los Angeles González de Díaz.

**ASESORA DE AREA DE GESTION AMBIENTAL: TOXICOLOGIA Y QUIMICA
LEGAL.**

Licda. María Luisa Ortiz de López.

DOCENTES DIRECTORAS.

Licda. Rina Antonieta Toledo Mendoza.

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios todo poderoso, por guiarnos, darnos luz en nuestro camino y permitir culminar con éxito nuestro trabajo de graduación.

A la Universidad de El Salvador, por el privilegio de permitirnos estar en las aulas de clases, en especial a la Facultad de Química y Farmacia. A los docentes que con esmero nos transmitieron sus conocimientos de gran importancia con los que hemos salido adelante.

A nuestras docentes directoras Msc. María Evelin de Ramos y Licda. Rina Antonieta Toledo, quienes desde un inicio confiaron en nosotras, compartiendo sus conocimientos, brindándonos su apoyo, amistad y por estar presentes cuando más las necesitamos.

Agradecimientos especiales al Laboratorio de microbiología del Centro de Investigación y desarrollo para la Salud, por confiar en nosotros y permitirnos realizar la parte práctica de nuestro trabajo de graduación.

A nuestras asesoras de área MSc. Coralia de Díaz, Licda. María Luisa de López y en especial a la Licda. Odette Rauda por su apoyo, accesibilidad, confianza y preocupación hacia nosotras. Mil gracias.

Agradecemos también a Licda. Cecilia Monterrosa, Any Herrera Baires, Licda. Aida Rosales, Lic. Salvador Castillo, Carolina Iran Anaya y a todas las personas, familiares y amigos que de una u otra manera nos brindaron su apoyo incondicional.

Zoila y Verence.

DEDICATORIA

A Dios padre todopoderoso por ser la luz y mi guía en el camino, por darme fortaleza en los momentos difíciles, por ser siempre mi consuelo y estar conmigo en cada momento de mi vida.

A mis padres María Auxiliadora Cañas de Argueta (Q.E.P.D.) y José Poliberto Argueta (Q.E.P.D.) porque desde donde están son mi ejemplo y mi inspiración.

A mi hermano William Alberto por ser un ejemplo para mí, por darme su apoyo incondicional y por estar siempre que lo necesito.

A mi abuela Zoila Esperanza Argueta por todo su amor, comprensión, por todos sus consejos y apoyo que me brinda a diario.

A mis tías Haydee Argueta, Edis Cañas y Conchy Cañas por su apoyo y sus consejos, por todas sus palabras de aliento.

A mis primos por estar pendientes siempre de mí.

A mi amiga y compañera de tesis Verenice Vásquez por tenerme paciencia y por ser una buena amiga y compañera de trabajo, pero sobre todo gracias por no abandonarme.

A mi amiga Cecilia Monterrosa que más que una amiga, es una madre para mí gracias por sus consejos y ayuda que me brinda.

A mis amigas: Any Herrera, Sonia Herrera y Carolina Anaya.

Y a todas aquellas personas que de una forma u otra me dieron su apoyo gracias.

Zoila Argueta

DEDICATORIA

A DIOS todo poderoso, por darme una segunda oportunidad, por que sin la ayuda de él éste sueño y ningún otro seria posible, él es quien sabe por qué y para qué pasan las cosas. En especial gracias por darme a la mejor madre del mundo, a ella , Blanca Lidia Rivera dedico este trabajo, gracias por brindarme su amor, apoyo, comprensión y estar a mi lado en este camino que resultó con tantos tropiezos.

A mi abuelita Rosa Rivera, gracias por confiar en mí, darme su amor y ser la mejor abuela.

Se lo dedico también a mi hija Blanca Rosa, gracias hija linda por comprender cuando no pude estar contigo.

A mis queridos hermanos Saúl Armando y Herberth Alonso, por su apoyo incondicional y comprensión.

A mis tíos Alfonso y Williams (Q.E.P.D) por su apoyo, ayuda y confianza.

A mis amigos y amigas Saraí, Cecilia Monterrosa, tía Sonia, María José García, Lorena, Lupi, Ana Guadalupe, Sonia y Rodrigo, por sus buenos deseos y por estar presentes cuando más lo necesitaba, en especial a mi amiga y compañera de tesis Nohemí , gracias por aguantarme y no abandonarme, por sufrir conmigo, por confiar en mi.

A todas las personas que de una u otra manera me ayudaron y estuvieron conmigo... GRACIAS!!!

Verenice Vásquez.

INDICE.

	Pág.
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción.	xix
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo general	
2.2 Objetivos específicos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	24
3.1 Generalidades de los Preservantes.	24
3.2 Generalidades de Aceites esenciales.	26
3.3 Monografía del producto.	28
3.3.1 Descripción	28
3.3.2 Propiedades físicas	29
3.3.3 Beneficios	29
3.4 Monografía de la canela.	30
3.4.1 Origen y distribución	30
3.4.2 Descripción botánica	30

3.4.3	Recolección	31
3.4.4	Preparación de la canela	31
3.4.5	Actividad biológica	31
3.4.6	Composición química	32
3.4.7	Usos y aplicaciones	32
3.4.8	Precauciones y toxicidad	33
3.5	Monografía de curry.	34
3.5.1	Origen y distribución	34
3.5.2	Descripción botánica	34
3.5.3	Actividad biológica	35
3.5.4	Composición química	35
3.5.5	Usos y aplicaciones	36
3.6	Monografía de los microorganismos de ensayo	37
3.6.1	<i>Staphylococcus aureus.</i>	37
3.6.2	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	38
3.6.3	<i>Candida albicans.</i>	39
3.7	Fundamento teórico de la actividad antimicrobiana	41
3.7.1	Método de Mitscher	41
3.7.2	Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).	41
3.7.3	Concentración Mínima Bactericida (CBM).	42
Capítulo IV		
4.0	Diseño Metodológico	44

4.1	Tipo de estudio	44
4.1.1	Experimental	44
4.1.2	Prospectivo	44
4.2	Investigación bibliográfica	44
4.3	Investigación de Campo, universo y muestra	44
4.3.1	Universo	44
4.3.2	Muestra	45
4.4	Métodos e instrumentos de recolección de datos	45
4.5	Parte experimental	45
Capítulo V		
5.0	Resultados	62
Capítulo VI		
6.0	Conclusiones	79
Capítulo VII		
7.0	Recomendaciones	83
Bibliografía		
Glosario		
Anexos		

INDICE DE ANEXOS.

ANEXO N°

1. Material, equipo y reactivos.
2. Preparación del medio y reactivos.
3. Disolvente de extracto
4. Resumen de resultados de CIM y CMB para preservante natural y control positivo.
5. Esquema de preparación de diluciones del control positivo de sulfato de gentamicina
6. Esquema de preparación del control negativo
7. Esquema de preparación de suspensión de microorganismos.
8. Plantillas para inoculación de microorganismos.
9. Preparación de las diluciones del preservante natural, control positivo y control negativo.
10. Preparación de microorganismos de prueba.
11. Inoculación de microorganismos.
12. Información del estándar de trabajo de gentamicina proporcionada por el proveedor.

INDICE DE TABLA

TABLA Nº	Pág.
1. Codificación para recolección de datos de las diluciones de muestra (Primer ensayo).	56
2. Codificación para recolección de datos de las diluciones de muestra (Segundo ensayo).	57
3. Codificación para recolección de datos de las diluciones del estándar para microorganismo de prueba: <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Pseudomona aeruginosa</i> y <i>Candida albicans</i>.	57
4. Codificación para recolección de datos del control negativo.	57
5. Resultado de la prueba de identificación de características microbiológicas para microorganismos de prueba. (Tinción de Gram).	63
6. pH de las diluciones del preservante natural a diferentes concentraciones.	63
7. Resultados del preservante natural a concentraciones de 5000 y 4000 ppm sobre: <i>Staphylococcus aureus</i> , y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	64
8. Resultados del preservante natural a la concentración de 3000 ppm sobre: <i>Staphylococcus aureus</i> , y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	65
9. Resultados del preservante natural desde la concentración de 2500 ppm hasta 25 ppm sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	66
10. Resultados del preservante natural desde la concentración de 5000 ppm hasta 2000 ppm sobre <i>Candida albicans</i> .	67
11. Resultados del preservante natural desde la concentración de 1000 ppm hasta 25 ppm sobre <i>Candida albicans</i> .	68

12. Resultados del control positivo de Sulfato de Gentamicina a la concentración de 5000 ppm y 4000 ppm sobre ***Candida albicans***. 70
13. Resultados del control positivo de Sulfato de Gentamicina desde la concentración de 3000 ppm hasta 25 ppm sobre ***Candida albicans*** 71
14. Resultados del control positivo de Sulfato de Gentamicina desde la concentración de 100 ppm hasta 25 ppm sobre ***Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*** 72
15. Resultados del control negativo de Dimetilsulfoxido contra ***Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*** 73
16. Control negativo de Dimetilsulfoxido contra ***Candida albicans*** 74
17. Resumen de resultados de CIM y CMB para preservante natural y Control positivo. 76

INDICE DE FIGURAS.

FIGURA Nº	Pág.
1. Corteza de canela	30
2. Flor de curry	34
3. Identificación de parte superior e inferior de placa petri.	59
4. Inoculación de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	59
5. Inoculación de <i>Candida albicans</i> .	59
6. Preservante natural a 5000 ppm contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	64
7. Imágenes A y B correspondiente al preservante natural a 3000 ppm contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	65
8. Preservante natural a 250 ppm contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	67
9. Preservante natural en placa "a" 2000 ppm contra <i>Candida albicans</i>	68
10. Preservante natural a 50 ppm en la placa "t" contra <i>Candida albicans</i> .	69
11. Control positivo en placa Sc19 a 5000 ppm contra <i>Candida albicans</i>	70
12. Control positivo en placa S9 a concentraciones de 50 ppm contra <i>Candida albicans</i> .	72
13. Control positivo en placa S13 a concentración de 25 ppm contra <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i> .	73

14. Control negativo de Dimetilsulfoxido en placa N3 contra ***Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa*** 74
15. Control negativo de Dimetilsulfoxido en placa N4 contra ***Candida albicans*** 75

ABREVIATURAS.

U.E.S: Universidad de El Salvador.

CYTED: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

DMSO: Dimetilsulfoxido.

TSA: Agar Tripticasa Soya

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo para la Salud.

CIM: Concentración Mínima Inhibitoria.

CBM: Concentración Mínima Bacteriana.

F.D.A: Food and Drugs Administration.

ppm: partes por millón.

mg: miligramos.

g: gramos

mL: mililitros

m: metros.

mm: milímetros.

%: por ciento.

°C: grados centígrados.

pH: potencial de hidrógenos.

etc: etcétera.

µm: micrómetro.

µL: microlitro.

A.C: Antes de Cristo.

Nº: número.

RESUMEN.

En la presente investigación se determinó la actividad antimicrobiana de un preservante natural patentado de nombre comercial Salynaturals CCL. Sobre las bacterias ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Candida albicans***, cepas de origen silvestre (recolectadas en hospital). La razón de la investigación es orientada por el auge que existe hoy en día en la producción de medicamentos naturales donde se buscan alternativas para preservar y poder presentar un formulado totalmente natural.

Los resultados fueron obtenidos mediante la aplicación del Método Mitscher (Dilución en agar), para lo cual se realizaron diluciones del preservante natural para llegar a concentraciones que iban desde: 5000 ppm hasta 25 ppm, y así mismo fueron realizadas para el control positivo de Sulfato de Gentamicina, en el análisis de ***Candida albicans***.

En el análisis de ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** con el control positivo de Sulfato de Gentamicina solo se necesitó las concentraciones de 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm.

Del análisis realizado se obtuvieron los siguientes resultados: para el preservante natural la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la concentración Mínima Bactericida (CBM) para ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** fue de 4000 ppm y 5000 ppm respectivamente, diferente al control positivo que fue a 25 ppm y 50 ppm respectivamente.

En el caso de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la concentración Mínima Bactericida (CBM) del preservante natural para *Candida albicans* fue de 2000 ppm y 2500 ppm respectivamente. Siempre para *Candida albicans* la CIM y CMB del control positivo fue de 4000 ppm y 5000 ppm.

El preservante natural resultó poseer acción antifúngica, debido a que éste inhibió a concentraciones más bajas a *Candida albicans* (levadura) de las bacterias experimentadas, caso contrario con *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* que se necesitaron concentraciones mayores del preservante natural para inhibir y matar a las dos bacterias, sin embargo las concentraciones utilizadas están dentro del rango de porcentaje permitido para el uso de preservantes (hasta 0.5 % para el uso en cosméticos).

El análisis se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud.

Por lo tanto de acuerdo al estudio realizado es necesario desarrollar nuevas técnicas de análisis que nos proporcionen datos confiables y que nos permitan trabajar con rapidez un gran número de muestras, tal es el caso del Método Mitscher.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION.

La forma de preservar un producto ya sean alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos, etc. Es mediante el uso de preservantes, que generalmente son de naturaleza sintética, tal es el caso del metilparaben y propilparaben, que son los más utilizados debido a su rango amplio de pH y baja toxicidad, pero debido al uso prolongado de los preservantes antes mencionados, los microorganismos han creado resistencia a la acción que estos ejercen.

Por esta razón se ve la necesidad de buscar otros productos que puedan contrarrestar el crecimiento de estos microorganismos patógenos comunes en el ambiente.

En la actualidad el mercado nos ofrece alternativas novedosos, y de origen natural, tal es el caso del preservante orgánico proveniente de la India de nombre comercial: SALINATURALS CCL, el cual está constituido químicamente en su mayor parte por los aceites esenciales extraídos de las especies: ***Cinnamomun zeylanicum*** (canela) y ***Murraya koenigii*** (curry), que poseen acción antibacteriana y se le ha realizado los respectivos estudios en el país de origen, para obtener la patente y ser comercializado.

Con el presente trabajo se pretende demostrar la actividad antimicrobiana que éste preservante natural posee contra las bacterias ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y contra la levadura ***Candida albicans*** que son las más comunes en el ambiente; y así tener la garantía de que al ser utilizado en

la fabricación de diferentes productos éste va a inhibir a los microorganismos que lo ataquen y a su vez tengan un tiempo de vida media adecuado.

Esta actividad antimicrobiana se determinó mediante el método de Mitscher, en el cual se utilizaron cepas silvestres de las antes mencionadas bacterias y levadura, provenientes de un hospital, que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Del preservante se realizaron diluciones en agar Trypticase Soya (TSA) a concentraciones conocidas: 5000 ppm, 4000 ppm, 3000 ppm, 2500 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm; cada concentración se realizó por triplicado para cada microorganismo. Los microorganismos de estudio en cada placa se rayaron por cuadruplicado.

CAPITULO II

OBJETIVOS.

2.0 OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Aplicar el Método Mitscher en la determinación de la actividad antimicrobiana de un preservante natural patentado sobre ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Candida albicans***.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 2.2.1 Preparar las diluciones del preservante natural a concentraciones conocidas.
- 2.2.2 Realizar un control positivo de Sulfato de Gentamicina a concentraciones conocidas.
- 2.2.3 Conocer la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la Concentración Mínima Bactericida (CBM) que presenta el preservante natural.
- 2.2.4 Comparar si la acción mínima inhibitoria y mínima bactericida del preservante natural es similar al efecto ejercido por el control positivo de Sulfato de Gentamicina contra las bacterias ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Candida albicans***.

CAPITULO III

MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO.

3.1 Generalidades de los Preservantes.

Los preservantes o conservadores antimicrobianos son sustancias que se añaden a las formas farmacéuticas no estériles para protegerlas del crecimiento microbiano o de los microorganismos que se introducen de modo inadvertido durante o después del proceso de manufactura.

Los antimicrobianos no deben utilizarse como sustituto de las buenas practicas de manufactura o para reducir las poblaciones microbianas viables de un producto no estéril, ni para controlar la biocarga previa a la esterilización de formulaciones multidosis durante la manufactura. (15)

Usos:

Los productos como las emulsiones, suspensiones, soluciones oftálmicas requieren una adición de antimicrobiano ya que la fase acuosa favorece el crecimiento de los microorganismos.

Características del preservante ideal:

- Eficaz a concentraciones bajas contra una amplia variedad de organismos.
- De naturaleza química estable en condiciones normales de uso y un intervalo amplio de pH y temperatura.
- Compatible con un gran numero de principios activos y agentes auxiliares.
- Libre de olor, sabor o picor.

- No tóxico, ni irritante tanto en el empleo interno como externo a la concentración requerida.
- Costo razonable.
- No reactivo (no se adsorbe, penetra o interactúa) con los envases o las tapas.

Cuadro N° 1: Conservadores antimicrobianos incluidos en la USP 25

Acetato fenilmercurico	Butilparaben	Propilparaben
Acido benzoico	Cloruro de benzalconio	Propionato de sodio
Acido bencílico	Etilparaben	Sorbato de sodio
Benzoato de potasio	Metilparaben	Timol

Microorganismos que contaminan los productos farmacéuticos:

Es imposible hacer una lista que incluya todos los gérmenes que pueden contaminar los productos farmacéuticos, en determinadas circunstancias cualquier microorganismo puede desarrollarse en ellos; es por esto que cabe mencionar que los microorganismos que contaminan con más frecuencias los productos farmacéuticos en condiciones ordinarias de manipulación y almacenaje; estos son: ***Pseudomona aeruginosa***, ***Streptococcus pyogenes***, levaduras, hongos y mohos, etc.

Para elegir acertadamente el conservador adecuado para un producto determinado, se necesita un buen conocimiento de los microorganismos que

producen el deterioro de este con mayor frecuencia; así por ejemplo ***Pseudomona aeruginosa*** que a menudo contamina los colirios puede dar lugar a la formación de cataratas, en consecuencia el conservador que se use en la preparación oftálmica debe ser efectivo contra este microorganismo; en las emulsiones, mucilagos y pomadas emulsionadas los agentes que producen el deterioro con mas frecuencia son los mohos y las levaduras; por lo tanto los conservadores que se utilizan para estos productos deben poseer enérgicas propiedades fungicidas.⁽¹²⁾

3.2 Generalidades de Aceites esenciales.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética, de alimentos y farmacéutica. Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden tener la siguiente naturaleza química:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)
- Monoterpenos.
- Sesquiterpenos.
- Fenilpropanos.⁽²⁰⁾

Ampliamente distribuidos entre las especies: coníferas (pino, abeto), mirtáceas (**eucaliptus**), rutáceas (**citrus spp**), umbelíferas (anís, hinojo), labiadas (menta), compuestas (manzanilla).

Pueden estar en diferentes órganos: raíz, rizoma (jenjibre), leño (alcanfor), hoja (eucaliptus), fruto (anís), flores (lavanda, tomillo, espliego) (21, 24)

Métodos de extracción.

- **Destilación por arrastre de vapor:** Los destiladores constan de cestillos perforados para que pase el agua. El vapor de agua lleva los aceites esenciales, separándose posteriormente por decantación.

- **Por disolución (enfleurage):** Los aceites son solubles en grasas y alcoholes de alto porcentaje. Sobre una capa de vidrio se coloca una fina película de grasa y sobre ella los pétalos de flores extendidas. La esencia pasa a la grasa, así hasta saturación de la grasa. Posteriormente con alcohol de 70°, se extrae el aceite esencial. (24)

El contenido de aceites esenciales es variable: 0.1 a 2%, existiendo algunas excepciones como por ejemplo: badiana china 5 %, clavo de olor con más de 15 %.(21)

Propiedades físicas y organolépticas.

A pesar de la constitución química heterogénea, presentan ciertas propiedades en común: olor intenso, generalmente líquidos a temperatura ambiente, su volatilidad los diferencia de los aceites fijos (lípidos) , son arrastrables por el vapor de agua, generalmente incoloros o amarillo pálido recién obtenidas,

fácilmente alterables o sensibles a la oxidación (no se enrancian como los lípidos) y tienen tendencia a polimerizarse dando lugar a la formación de productos resinosos, especialmente aquellas que contienen alcoholes terpenicos insaturados (autooxidación), variando su olor, color y viscosidad.⁽²¹⁾

Propiedades farmacológicas.

- Antisépticos
- Irritantes
- Digestivos
- Antiespasmódicos
- Sedantes

Se han hecho estudios frente a distintas bacterias (*Thymus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*). Los más activos son los aceites con fenoles. Se ha demostrado su actividad frente a hongos productores de micosis (*Candida albicans*), en este caso también la presencia de fenoles aumenta su actividad. ⁽²⁴⁾

3.3 MONOGRAFIA DEL PRODUCTO.

Nombre: Salinaturals CCL.

Fabricado por: Salicylates and Chemicals, India.

3.3.1 Descripción: Salinaturals CCL es un producto patentado, para ser utilizado como preservante natural obtenido por buenas practicas de manufactura por los laboratorios Salicylates and Chemicals y aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA).

Dentro de su composición química se encuentran las especies: ***Murraya koenigii*** (curry) y ***Cinnamomun zeylanicum*** (canela), cultivadas en la india en 100 acres de terrenos.

3.3.2 Propiedades físicas:

Apariencia: líquida.

Color: amarillo pálido.

Gravedad específica: 0.93 ± 0.01

3.3.3 Beneficios:

- Posee un amplio rango como preservante en formulaciones para el cuidado personal y aplicaciones cosméticas.
- Posee actividad en bacterias Gram positivas y Gram negativa.
- No es tóxico y presenta seguridad en su uso por provenir de plantas medicinales.
- Es dispersable en agua y compatible a diversos rangos de formulación de productos como: Shampoos, gel de baño, espumas para baño, cremas, lociones, emulsiones, etc.
- Puede ser utilizado en rangos de pH de 3-7.
- Tolera temperaturas superiores a los 60°C.
- Está especialmente recomendado para formulación de productos naturales aun con proteínas y sistemas aniónicos. (26)

3.4 MONOGRAFÍA DE LA CANELA.

Nombre científico: *Cinnamomum zeylanicum*

Nombre común: Canela, Árbol de la canela, Canelero de Ceilán, Canelo, Canelera.



Familia: Lauraceae (Lauráceas).

Figura N°1: Corteza de canela

La canela es una de las especias conocidas desde tiempos antiguos y en china se le empleaba ya en el año 2500 A.C.

Los árabes la utilizan mucho para aromatizar carnes, ya que la canela contiene un aceite esencial rico en fenol que inhibe las bacterias responsables de la putrefacción de la carne.

3.4.1 Origen y distribución.

Es originaria de Ceilán (Sri Lanka). Además de Sri Lanka, también se cultiva en Brasil, Birmania, India, Indonesia, Indias occidentales e Islas del océano Pacífico. El mayor productor sigue siendo Sri Lanka seguido de las Islas Seychelles. Se cultiva en países cálidos cuyos inviernos no sean fríos. (7, 19)

3.4.2 Descripción botánica.

La canela es un árbol perenne de la familia de las lauráceas de hasta 15 m. de altura, aunque las formas cultivadas no suelen superar los 10 mt. Ramas muy aromáticas con doble corteza. Hojas ovadas de hasta 18 cm de longitud, con tres nervios bien marcados, coriáceas, acuminadas con el borde liso y muy fragante. Haz rojizo cuando son jóvenes, pasando a verde brillante y con envés verde pálido en la madurez. Flores de olor desagradable en panículas, de color

blanco o rojo, hermafroditas. Frutos negros o pardo azulados, en baya, de 1 cm de diámetro, muy picante. (7, 8, 19)

3.4.3 Recolección.

Se recoge durante las estaciones de lluvia, en Sri Lanka ocurre entre mayo y junio, y en octubre y noviembre, la primera cosecha produce una corteza más gruesa e inferior. La calidad aumenta en podas sucesivas y la corteza más fina procede de los brotes más delgados del centro de la planta, las cañas se juntan y se ponen a la sombra para evitar que el sol directo las perjudique. Los brotes se podan de continuo, cerca del suelo, lo que hace que el canelo parezca un arbusto bajo, denso y de finas y frondosas ramas. (19)

3.4.4 Preparación de la canela.

La especia es la corteza interna que se extrae pelando y frotando las ramas y que una vez desprendida, es a su vez separada y vuelta a pelar. Las cortezas se enrollan una dentro de otra hasta formar una barra de aproximadamente un metro de largo que se seca y blanquea antes de su comercialización. La corteza se corta en tiras largas y se deja fermentar. Pasadas 24 horas, se separa la capa exterior más rugosa de la corteza y se deja secar la capa interna. Durante el proceso de secado, ésta se enrolla hasta formar las conocidas ramas de canela. (19)

3.4.5 Actividad biológica.

Se evaluó la actividad antimicrobiana in vitro de una mezcla de dos aceites esenciales y timol frente a *Paenibacillus larvae*, agente causal de la

enfermedad Loque americana, que afecta a las abejas. Los aceites esenciales utilizados fueron canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), con el agregado de timol, componente mayoritario del tomillo. Los parámetros medidos fueron la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo Muller-Hinton, mediante dilución seriada, y la concentración bactericida mínima (CBM) en agar MYPGP. ⁽⁶⁾

3.4.6 Composición química.

- Ácidos: ascórbico, palmítico p-cumérico (corteza).
- El aceite esencial contiene: Terpenos entre los que están. alfa-pineno, alfa-terpineno, alfa-ylangeno, cariofileno, limoneno, linalol (corteza) y compuesto en su mayoría por cinamaldehido, benzalhehido (Planta), eugenol, farnesol, gamma-terpineol, geraniol, isoeugeneol, cariofileno (corteza).
- Furfural (corteza), alcanfor (corteza), fibra (corteza), taninos (planta), mucílagos (corteza), sacarosa, vainilla, cumarinas (Corteza).
- Minerales como: boro, calcio, cinc , cloro, cobre, cobalto, cromo, estroncio, fósforo, hierro, manganeso, níquel, plomo, potasio, sodio, yodo.
- Vitaminas: Vitamina C, niacina, tiamina. ^(11, 23)

3.4.7 Usos y aplicaciones.

- **Aparato digestivo** : posee propiedades carminativas, antiulcéricas, estomacales y antivomitivas.
- **Enfermedades respiratorias:** por poseer propiedades antibacterianas, expectorantes y antiinflamatorias.

- **Enfermedades del aparato circulatorio:** propiedades antiagregantes, antiescleróticas y antitrombóticas, las cuales favorecen la circulación sanguínea.
- **Uso Externo:** externamente, se utiliza principalmente como antiséptico en el tratamiento de enfermedades relacionadas con bacterias y hongos. (23)

3.4.8 Precauciones y toxicidad

El uso de preparados de canela esta contraindicado en mujeres embarazadas o lactantes. Su uso estimula los movimientos del útero por lo que podría provocar abortos. Posee propiedades anticonceptivas.

La corteza de canela, tomada en exceso o en uso prolongado, resulta tóxica y puede originar ardor bucal, úlceras o inflamaciones en la boca. En dosis terapéuticas (2 - 4 g diarios) puede producir problemas estomacales, como diarrea, gastritis, o reacciones alérgicas en algunas personas.

El aceite esencial de corteza de canelo no debe utilizarse en uso externo o interno. En uso externo sobre la piel puede producir dermatitis o incluso quemaduras. (23)

3.5 MONOGRAFÍA DE CURRY.

Nombre científico: *Murraya koenigii L. Spreng.*

Sinónimo: *Bergera koenigii L. Roxb.*

Familia: Rutaceae.



Figura N°2: Flor de Curry

3.5.1 Origen y distribución

Murraya koenigii L Spreng. Se encuentra comúnmente en el exterior de los Himalayas, a partir de la Ravi hacia el Este, ascendiendo a 5000 pies, en Assam, Chittagong, Alta y Baja Birmania. También se encuentra en los bosques siempre verdes y de la India peninsular. Casi todas las partes de esta planta tienen un fuerte olor característico. (13)

3.5.2 Descripción botánica.

La difusión de un pequeño arbusto de unos 2.5 metros de altura, tallo principal, de color verde oscuro a marrón el grosor del tallo principal es de 16 cm. Hojas, estipuladas, bipinnadas, compuesto de 30 cm de largo, después de haber venación reticulada, folletos, lanceoladas, 4,9 cm de largo, 1.8 cm de ancho, teniendo 0.5 cm de largo en pecíolo.

Flores, bisexuales, de color blanco, en forma de embudo, dulcemente perfumadas, completa, regular, actinomorfas, el promedio del diámetro de una flor que se abre 1.12 cm; corola de color blanco, con 5 pétalos, lanceoladas; longitud, 5 mm; con 10 estambres, dispuestas en círculos de cinco cada uno.

Frutas, redonda a oblongas, de 1.4 a 1.6 cm de largo, 1.0 a 1.2 cm de diámetro, peso 880 mg; el fruto maduro es de color negro con una superficie muy brillante, el número de frutos por racimo varían de 32 a 80. Semillas 11 mm de largo, 8 mm de diámetro, color verde, peso 445 mg.

La floración comienza a partir de mediados de abril y termina a mediados de mayo. (13)

3.5.3 Actividad biológica.

Un nuevo dimerico alcaloide carbazol, fue aislado del extracto de *Murraya koenigii* junto con seis conocidos alcaloides. Sus estructuras se determinaron sobre la base de Hidrogeno y Carbono con Resonancia magnética espectroscópica y de espectrometría de masas de datos. Propiedades antioxidantes, de 12 alcaloides carbazol aislados de las hojas de *M. koenigii* se evaluaron sobre la base de la estabilidad del índice de petróleo, junto con su capacidad de barrido de gases radicales contra 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl radical. (17)

3.5.4 Composición química.

La pulpa de la fruta contiene 64.9% de humedad. El contenido de sólidos solubles totales de los jugos de frutas es 16.8%. La pulpa contiene 9.76% de azúcares totales, 9.58% de azúcares reductores, 0.17% no azúcares reductores y casi insignificante cantidad de taninos y acidez. El contenido de vitamina C de la fruta, es 13.35 mg por 100 g de pasta. Contiene alcaloides.

El contenido mineral de la parte comestible de la fruta, representada por sus cenizas, es 2.162%. Del mismo modo, 100 g de porción comestible de la fruta contiene, proteínas, 1.97 g; fósforo, 0.082 g, potasio, 0.811 g, calcio, 0.166 g, magnesio, 0.216 g, y el hierro, 0.007 g. ⁽¹³⁾

3.5.5 Usos y aplicaciones

Las hojas, la corteza y las raíces de **Murraya koenigii (L.) Spreng.** puede ser utilizado como un tónico. La corteza y las raíces se utilizan como un estimulante. También se utilizan externamente para curar las erupciones y las picaduras de animales venenosos. Las hojas verdes se exponen a ser consumidas, crudas para curar la disentería, y la infusión de las hojas de lavado detiene vómitos.

El examen químico de este aceite esencial mostró una fuerte actividad antifúngica y antibacteriana.

*Las ramas de **Murraya koenigii L. Spreng.*** Son muy populares para la limpieza de los dientes. Esta planta es muy ornamental debido a sus hojas compuestas. Por consiguiente, puede ser utilizado como una cobertura y como un arbusto ornamental. ⁽¹³⁾

3.6 MONOGRAFIA DE LOS MICROORGANISMOS DE ENSAYO.

Staphylococcus aureus.

Los estafilococos son células esféricas grampositivas que suelen estar distribuidas en grupos irregulares a manera de racimo de uvas. Crecen con mucha facilidad en muchos tipos de medios, y son activos desde el punto de vista metabólico, pero fermentan los carbohidratos y producen pigmentos que varían desde el color blanco hasta el amarillo intenso.

El ***Staphylococcus aureus*** es un microorganismo positivo a la coagulasa y patógeno de gran importancia para el ser humano, y es el causante de muchas infecciones graves.

Descripción: Microorganismos típicos: Los estafilococos son células esféricas de cerca de 1µm de diámetro distribuidas en grupos irregulares.

Cultivo: Los estafilococos crecen con facilidad en la mayor parte de los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias o microaerofilas. Crecen con mayor rapidez a 37°C, pero forman mejor el pigmento a la temperatura ambiental (20 - 25° C). Las colonias desarrolladas en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes.

Patología.

El prototipo de la lesión estafilocócica es el furúnculo o cualquier otro absceso localizado. Los grupos de ***S. aureus*** establecidos en un folículo piloso, producen necrosis tisular (factor dermonecrótico). Se produce coagulasa que coagula a la fibrina alrededor de la lesión y dentro de los linfáticos, y da por

resultado formación de una pared que limita el proceso y queda reforzada por la acumulación de células inflamatorias y, más tarde, tejido fibroso. (9, 14, 27)

Pseudomona aeruginosa.

La Pseudomona es un bacilo gram negativo móvil, que pertenece a la familia Pseudomonadaceae. ***P. aeruginosa*** es primariamente un patógeno hospitalario y causa enfermedad en forma frecuente a huéspedes normales.

Los factores que contribuyen a la patogénesis y virulencia incluyen la capacidad de adherencia, producción de toxinas y producción de glycocalix.

Descripción: Microorganismos típicos: ***P. aeruginosa*** es motil y tiene forma de bastoncillo, mide aproximadamente 0.6 x 2 µm. es una bacteria gram negativa y se encuentra de manera aislada, en parejas y, ocasionalmente, en cadenas cortas.

Cultivo: ***P. aeruginosa*** es un aerobio obligado que crece con facilidad en muchos tipos de medios de cultivo, y produce en ocasiones un olor dulzón o de uvas. Algunas cepas hemolisan la sangre. Forma colonias redondas lisas con color verdoso fluorescente.

Patología.

Las infecciones comunes producidas por Pseudomonas incluyen bacteriemias particularmente importantes en huéspedes inmunocomprometidos, otitis externa y media, infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario, e infecciones de herida en pacientes quemados. También puede causar infecciones del sitio quirúrgico y han sido responsables de epidemias del sitio quirúrgico.

Otras infecciones como osteomielitis, artritis, infecciones de piel, infecciones gastrointestinales, del sistema nervioso central –generalmente seguidas de una cirugía- endocarditis, abscesos han implicado a la *Pseudomonas*.

P. aeruginosa es patógena solo cuando se introduce en zonas desprovistas de defensas normales. (9)

Candida albicans.

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la Candidiasis, se encuentran actualmente clasificados taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Hongo

División: *Deuteromycota*

Clase: *Blastomycetes*

Familia: *Cryptococcaceae*

Género: *Candida*

Especies: ***albicans*** (como la más frecuente y virulenta) y otras especies.

. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular.

- **Descripción:** ***C. albicans*** suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y Pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las

cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación.

- **Cultivo:** Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. Las colonias muy pequeñas aparecen en un lapso de 24 a 36 horas en Agar Sabouraud y miden de 1,5 a 2 m.m. de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias son típicamente blancas por completo, pero adquieren un color crema o requemado al continuar envejeciendo.

- **Patología:** Los microorganismos del Género *Candida* son oportunistas que se encuentran como comensales en cavidad bucal, intestino, vagina, secreción bronquial y piel del hombre y de ciertos animales. En la cavidad bucal la colonización es significativamente distinta de sitio a sitio. (9, 18)

3.7 FUNDAMENTO TEÓRICO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA. (2, 4, 5)

3.7.1 Metodo de Mitscher.

La actividad antimicrobiana se cuantifica in Vitro para determinar la susceptibilidad o la resistencia de un microorganismo determinado a diferentes concentraciones de un extracto.

El Metodo consiste en colocar diferentes concentraciones del extracto en cajas de petri conteniendo agar tripticasa soya, en los cuales se procede a marcar con una línea el sitio donde será rallado cada uno de los microorganismos de prueba y luego con una asa de Henle estéril se toma una asada de la suspensión de cada microorganismo en turno. El asa con el microorganismo entonces es rayada en un patrón radial de cada caja de petri siguiendo una plantilla. Una vez inoculada se incuban y luego se examina cada una de las placas y se determina si hubo o no actividad antimicrobiana por la presencia o no de colonias. (4, 14).

3.7.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

La concentración mínima inhibitoria es la actividad que muestra el extracto puesto a prueba en el laboratorio y es expresada como la concentración mas baja a la cual el extracto inhibe la multiplicación de microorganismos, la cual se expresa como CIM. (4, 14, 22)

3.7.3 Concentración Mínima Bactericida (CBM).

Es la capacidad de un extracto para matar a los microorganismos, la cual se expresa como CBM. (5,14)

3.7.4 Preparación de la suspensión de microorganismo

Los microorganismos a emplearse para la detección de la actividad antimicrobiana debe ser en la medida de lo posible estándar, perteneciente a colecciones confiables o bien, ser cepas comerciales internacionalmente reconocidas para estos fines, como las provistas por la colección americana de cultivos tipo (ATCC).

En el caso de bacterias aisladas de material clínico e identificado por los procedimientos estándar, deben ser cepas recientes.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO.

4.0 DISEÑO METODOLOGICO.

4.1 Tipo de estudio: experimental y prospectivo.

4.1.1 Experimental: se realizó el análisis microbiológico a un preservante natural, para determinar la actividad antimicrobiana que éste ejerce frente a microorganismos, de los cuales se seleccionaron tres tipos de los más comunes: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*. . Todo esto se realizó en el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

4.1.2 Prospectivo: con dicho estudio se obtuvieron resultados adaptados a la realidad de nuestro país, para así poder ofrecer una alternativa de preservante natural a laboratorios farmacéuticos, demostrando con los datos la efectividad de éste.

4.2 Investigación bibliográfica: se realizó la investigación bibliográfica en las bibliotecas:

- Central de la Universidad de El Salvador (UES)
- Facultad de Química y Farmacia. Dr. Benjamín Orozco (UES)
- Biblioteca Online (EBSCO HOT). (UES)
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer.

Sitios en Internet para buscar información relacionada con el tema.

4.3 Investigación de Campo, universo y muestra.

4.3.1 Universo: Todos los preservantes de la empresa Salicylates and Chemical

4.3.2 Muestra: Muestreo dirigido puntual al preservante natural patentado (SALINATURALS CCL).

4.4 Métodos e instrumentos de recolección de datos: se utilizaron Cuadros y fotografías.

4.5 PARTE EXPERIMENTAL.

Determinación de actividad antimicrobiana.

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el Método Mitscher (Método de dilución en agar). Utilizando los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*.

Preparación de las diluciones del preservante natural para ensayo.

Concentración 5000 ppm.

Para preparar la concentración de 5000 µg/mL se pesan 150.0 mg de preservante y se disuelven con 3.0 mL de Dimetilsulfoxido (DMSO) obteniendo una concentración de 50.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de Agar estéril Trypticase Soya (TSA) fundido, obteniendo una concentración final de 5000.0 µg/mL, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°4).

Concentración 4000 ppm.

Para preparar la concentración de 4000.0 µg/mL se pesan 120.0 mg de preservante y se disuelven con 3.0 mL de DMSO obteniendo una concentración de 40.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 4000.0 µg/mL, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°4).

Concentración 3000 ppm.

Para preparar la concentración de 3000.0 µg/mL se pesan 90.0 mg de preservante y se disuelven con 3.0 mL de DMSO obteniendo una concentración de 30.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 3000.0 µg/mL, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°4).

Concentración 2500 ppm.

Para preparar la concentración de 2500.0 µg/mL se pesan 75.0 mg de preservante y se disuelven con 3.0 mL de DMSO obteniendo una concentración de 25.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta

volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 2500.0 $\mu\text{g/mL}$, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°4).

Concentración 2000 ppm.

Para preparar la concentración de 2000.0 $\mu\text{g/mL}$ se pesan 60.0 mg de preservante y se disuelven con 3.0 mL de DMSO obteniendo una concentración de 20.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 2000 $\mu\text{g/mL}$, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 4).

Concentración 1000 ppm.

Para la preparación de la concentración de 1000.0 $\mu\text{g/mL}$ se pesan 30.0 mg del preservante y se disuelven con 3.0 mL de DMSO, obteniendo una concentración de 10.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 1000.0 $\mu\text{g/mL}$, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri

estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 4).

Concentración 500 ppm.

Para la preparación de la concentración de 500.0 µg/mL se pesan 30.0 mg del preservante y se disuelven con 6.0 mL de DMSO, obteniendo una concentración de 5.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 500 µg/mL, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 4).

Concentración 250 ppm.

Para la preparación de la concentración de 250.0 µg/mL se pesan 15.0 mg del preservante y se disuelven con 6.0 mL de DMSO, obteniendo una concentración de 2.5 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 250.0 µg/mL, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 4).

Concentración 100 ppm.

Para la preparación de la concentración de 100.0 $\mu\text{g/mL}$ se pesan 6.0 mg del preservante y se disuelven con 6.0 mL de DMSO, obteniendo una concentración de 1.0 mg/mL, de esta dilución se toma una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 100.0 $\mu\text{g/mL}$, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 4).

Concentración 50 ppm.

Para la preparación de la concentración de 50.0 $\mu\text{g/mL}$, se toma con pipeta volumétrica una alícuota de 0.5 mL de la solución de concentración 1.0 mg/mL (ver preparación 100 ppm. Anexo 4, pag.3) se transfieren a un tubo de ensayo que contenga 9.5 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 50.0 $\mu\text{g/mL}$, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 4).

Concentración 25 ppm.

Para la preparación de la concentración de 25.0 $\mu\text{g/mL}$, se toma con micropipeta una alícuota de 250.0 μL de la solución de concentración 1.0 mg/mL (ver preparación 100 ppm. Anexo 4, pág. 3) se

transfieren a un tubo de ensayo que contenga 9.75 mL de agar estéril TSA fundido obteniendo una concentración final de 25.0 µg/mL, se agita para homogenizar y se vierte en una placa de petri estéril para dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 4).

Colocar todas estas placas en incubadora a 37°C por 24 horas para detectar cualquier contaminación presente en la placa.

Preparación del control positivo de Sulfato de Gentamicina.

Concentración de 5000 ppm.

Pesar exactamente 500.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua destilada estéril obteniendo una concentración de 50.0 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica. Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 5000.0 µg/mL agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 5).

Concentración de 4000 ppm.

Pesar exactamente 400.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua destilada estéril obteniendo una concentración de 40.0 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica.

Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 4000.0 $\mu\text{g/mL}$ agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Concentración de 3000 ppm.

Pesar exactamente 300.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua destilada estéril obteniendo una concentración de 30.0 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica. Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 3000.0 $\mu\text{g/mL}$ agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Concentración de 2000 ppm.

Pesar exactamente 200.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua destilada estéril obteniendo una concentración de 20.0 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica. Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 2000.0 $\mu\text{g/mL}$ agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Concentración de 1000 ppm.

Pesar exactamente 100.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua destilada estéril obteniendo una concentración de 10.0 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica. Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 1000.0 $\mu\text{g/mL}$ agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N° 5).

Concentración de 500 ppm.

Pesar exactamente 50.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua destilada estéril obteniendo una concentración de 5.0 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica. Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 500.0 $\mu\text{g/mL}$ agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Concentración de 250 ppm.

Pesar exactamente 25.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua

destilada estéril obteniendo una concentración de 2.5 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica. Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 250.0 µg/mL agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Concentración de 100 ppm.

Pesar exactamente 10.0 mg de estándar de Sulfato de Gentamicina en balanza analítica, transferirlo a un balón volumétrico de 10.0 mL, disolverlo con agua destilada estéril obteniendo una concentración de 1.0 mg/mL. De la solución anterior tomar una alícuota de 1.0 mL con pipeta volumétrica. Transferirlo a un tubo de ensayo que contenga 9.0 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 100.0 µg/mL agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Concentración de 50 ppm.

Tomar una alícuota de 0.5 mL con pipeta volumétrica de la dilución de 1 mg/mL Transferir a un tubo de ensayo que contenga 9.5 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 50.0 µg/mL agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Concentración de 25 ppm.

Tomar una alícuota de 250.0 μL con micropipeta de la dilución de 1.0 mg/mL. Transferir a un tubo de ensayo que contenga 9.75 mL de agar estéril TSA fundido, obteniendo una concentración final de 25.0 $\mu\text{g/mL}$ agitar para homogenizar y verter la solución en una placa petri estéril y dejar solidificar. Rotular las placas con la concentración correspondiente. (Ver anexo N°5).

Colocar todas estas placas en incubadora a 37°C por 24 horas para detectar cualquier contaminación presente en la placa.

Preparación del control negativo.

Como control negativo se lleva una placa que contiene 9.0 mL de agar TSA más 1.0 mL de DMSO, en este se realiza el rayado igual al resto de las placas con el fin de determinar si el rayado de los microorganismos ha sido realizado correctamente y si el DMSO no inhibe el crecimiento de ellos.

Colocar todas estas placas en incubadora a 37°C por 24 horas para detectar cualquier contaminación presente en la placa. Rotular las placas con la identificación correspondiente. (Ver anexo N°6).

Preparación de la suspensión de microorganismos.

Sembrar los microorganismos de ensayo: ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Candida albicans***, en tubos con agar TSA inclinado y resembrar las bacterias cada semana hasta realizar el ensayo con el objeto de mantener un cultivo puro y abundante. Se inoculan dos tubos para cada microorganismo por si alguno exhibe un crecimiento pobre, este se

descarta. Se incuban a 37°C por 24 horas. Luego se pasan a refrigeración, hasta ser utilizado.

Se realiza la tinción de Gram con el objeto de corroborar la identificación de las bacterias previo al ensayo.

De los cultivos anteriores, se preparan las suspensiones de cada microorganismo en solución salina al 0.9%, utilizando como patrón de turbidez el tubo de Macfarlán con una densidad celular de 1.5×10^{-8} células por mililitro (Ver anexo N°7).

Inoculación de microorganismos.

La inoculación de los microorganismos se realiza de la siguiente manera:

En cada placa se coloca por debajo la plantilla radial para inocular los microorganismos ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa***.

La plantilla permite dividir cada placa en dos partes iguales.

A cada placa se le marca la orilla con una flecha hacia arriba para identificar la posición de ***Staphylococcus aureus***. Es decir que en la parte superior siempre estará el ***Staphylococcus aureus*** y en la parte inferior de la placa se inocula ***Pseudomona aeruginosa***. Se inoculan en una sola placa, llevando para cada uno el rayado por cuatro líneas y el ensayo será por triplicado. (Ver anexo N°8).

En el caso de ***Candida albicans*** se trabaja de la manera siguiente:

Para obtener el ensayo por triplicado se utilizan dos placas. Una placa se divide en dos partes iguales, inoculando en la parte superior e inferior ***Candida albicans*** en cuatro rayas, para obtener de ésta forma dos ensayos y el tercero

se realiza en otra placa utilizando la plantilla que contiene solo cuatro rayas para inocular un solo microorganismo. (Ver anexo N°8).

La inoculación de los microorganismos debe realizarse con mucho cuidado evitando la inoculación cercana a la línea divisoria de la placa, así como también al borde interno de ésta. Todo esto para evitar las contaminaciones entre los microorganismos ya que puede afectar los resultados del ensayo.

Además un mismo investigador debe realizar la labor de rayado para un microorganismo dado, con el fin de que los resultados sean comparables.

Identificación de las placas.

Tabla N°1: Codificación para recolección de datos de las diluciones de muestra (Primer ensayo).

Concentración	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)			<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			<i>Candida albicans</i>		
2000 ppm	A	B	C	A	B	C	a	a´	b
1000 ppm	D	E	F	D	E	F	d	d´	e
500 ppm	G	H	I	G	H	I	g	g´	h
250 ppm	J	K	L	J	K	L	j	j´	k´
100 ppm	M	N	O	M	N	O	m	m´	n
50 ppm	P	Q	R	P	Q	R	p	p´	q
25 ppm	S	T	U	S	T	U	s	s´	t

Tabla N°2: Codificación para recolección de datos de las diluciones de muestra (Segundo ensayo).

Concentración	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)			<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			<i>Candida albicans</i>		
5000 ppm	1	2	3	1	2	3	4	4'	5
4000 ppm	6	7	8	6	7	8	9	9'	10
3000 ppm	11	12	13	11	12	13	14	14'	15
2500 ppm	16	17	18	16	17	18	19	19'	20

Tabla N°3: Codificación para recolección de datos de las diluciones del estándar para microorganismo de prueba: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*.

concentración	<i>Candida albicans</i> .								
5000 ppm	SC ₁₉			SC ₂₀			SC ₂₁		
4000 ppm	SC ₁₆			SC ₁₇			SC ₁₈		
3000 ppm	SC ₁			SC ₂			SC ₃		
2000 ppm	SC ₄			SC ₅			SC ₆		
1000 ppm	SC ₇			SC ₈			SC ₉		
500 ppm	SC ₁₀			SC ₁₁			SC ₁₂		
250 ppm	SC ₁₃			SC ₁₄			SC ₁₅		
Concentración	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)			<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			<i>Candida albicans</i>		
St 100 ppm	S ₁	S ₂	S ₃	S ₁	S ₃	S ₃	S ₄	S _{4'}	S ₅
St 50 ppm	S ₆	S ₇	S ₈	S ₆	S ₇	S ₈	S ₉	S _{9'}	S ₁₀
St 25 ppm	S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃	S ₁₁	S ₁₂	S ₁₃	S ₁₄	S _{14'}	S ₁₅

TABLA N° 4: Codificación para recolección de datos del control negativo.

Concentración	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)			<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			<i>Candida albicans</i>		
Negativo	N ₁	N ₂	N ₃	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N _{4'}	N ₅

Luego identificar las placas con la codificación correspondiente cuidando que cada una de ellas lleve el código en el centro de la base de la placa. (Ver tabla N°1, 2, 3 y 4)

Cuando ya están rayadas todas las placas con sus respectivos microorganismos se incuban a una temperatura de 35°C - 37°C por 48 horas. Las placas se colocan en posición invertida para evitar que las gotas de agua condensadas caigan sobre los microorganismos y así no favorecer su crecimiento.

Previo a la realización de los análisis microbiológicos se efectuaron las diluciones respectivas tanto del preservante natural como del control positivo, aunque inicialmente las diluciones propuestas para la investigación iban de 2000 ppm, 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm y 25 ppm, y durante el desarrollo de la parte experimental se obtuvieron resultados con los cuales no se podía determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), tanto para el preservante natural como para el control positivo de Sulfato de Gentamicina, por lo cual se tuvieron que realizar otras diluciones al preservante de 2500, 3000, 4000, y 5000 ppm y al control positivo solo para ***Candida albicans*** desde 5000 ppm, 4000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm 500 ppm y 250 ppm. Inclusive en la codificación de placas, se puede observar que son diferentes a la del primer ensayo.

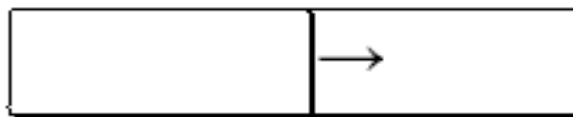


FIGURA N°3: Identificación de parte superior e inferior de placa petri.

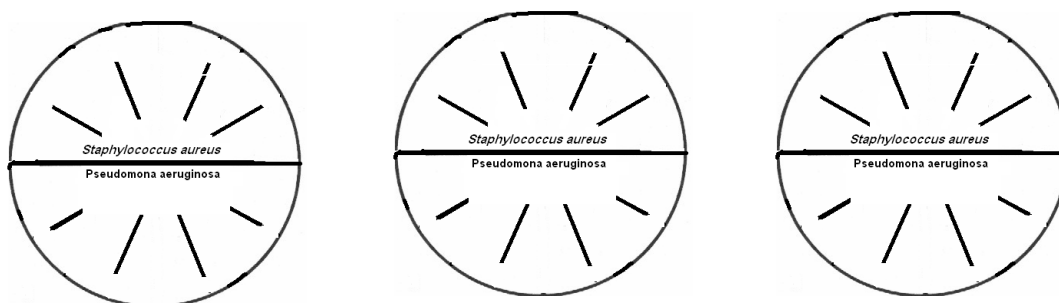


FIGURA N°4: Inoculación de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

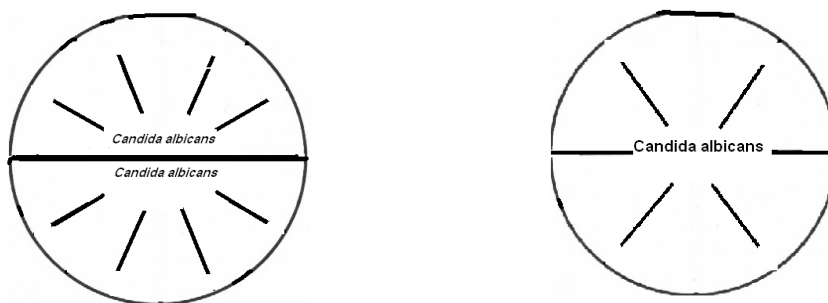


FIGURA N°5: Inoculación de *Candida albicans*.

Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

La concentración mínima inhibitoria es la actividad que muestra el extracto puesto a prueba en el laboratorio y es expresada como la concentración más

baja a la cual el extracto inhibe la multiplicación de microorganismos, la cual se expresa como CIM. (4, 14, 22)

Concentración Mínima Bactericida (CBM).

Es la capacidad de un extracto para matar a los microorganismos, la cual se expresa como CBM. (5, 14)

Las placas se observaran luego de 48 horas de incubación. Las placas de control deben tener la apariencia esperada: crecimiento microbiano en todas las líneas en la placa de control negativo y la potencia apropiada en las placas de control positivo de Sulfato de Gentamicina.

Hay actividad antibacteriana cuando no hay crecimiento visible en las líneas rayadas de las placas. Si el microorganismo es morfológicamente alterado o si no crece bien, se registra como actividad parcial.

CAPITULO V
RESULTADOS

5.0 RESULTADOS.

Las concentraciones del preservante natural y control positivo se trabajaron en los siguientes rangos:

Preservante Natural: 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1000, 500, 250,100, 50 y 25 ppm. A estas concentraciones se trabajaron todos los microorganismos.

Control Positivo de Sulfato de Gentamicina: Para el análisis de ***Candida albicans*** se usaron las concentraciones de 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1000, 500, 250,100, 50 y 25 ppm, y para el análisis de ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** solo se trabajó con concentraciones de 100, 50 y 25 ppm.

Para términos de interpretación de resultados en los diferentes cuadros se utilizo la siguiente simbología:

(+) crecimiento de bacteria.

(-) no crecimiento de bacteria.

(↑) rayado de microorganismo en mitad superior de caja de petri para ***Staphylococcus aureus***.

(↓) rayado de microorganismo en mitad inferior de caja petri para ***Pseudomona aeruginosa***.

TABLA Nº 5: Resultado de la prueba de identificación de características microbiológicas para microorganismos de prueba. (Tinción de Gram).

MICROORGANISMO.	MORFOLOGIA PRESENTADA
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacterias con forma de cocos, unidos en racimos gram positivos
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacterias en forma de bastoncillos unidas en cadena, gram negativa
<i>Candida albicans</i>	Levadura gran positiva de forma oblonga, algunas en estado de gemación

En esta tabla se presentan los resultados obtenidos de las características microbiológicas de los microorganismos de prueba mediante la tinción de Gram. Con estos resultados se comprueba que los microorganismos patógenos proporcionados por el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, que serian sometidos a éste estudio, son los destinados a usar en el ensayo y que no presentan contaminación con otros microorganismos.

TABLA No 6: pH de las diluciones del preservante natural a diferentes concentraciones.

CONCENTRACION ppm	pH DE LA SOLUCION
5000	7
4000	7
3000	7
2000	7
1000	7
500	7
250	7
100	7
50	7
25	7

En la tabla anterior se presenta los resultados de pH de las diluciones realizadas a diferentes concentraciones de la muestra (preservante natural), en las cuales se observa que no hay cambio de éste entre ninguna de las soluciones, demostrando estar entre el rango de trabajo de pH para el preservante natural, el cual es de 3 a 7.

TABLA N°7: Resultados del preservante natural a concentraciones de 5000 y 4000 ppm sobre: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*.

5000 ppm								
PLACA	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)				<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4000 ppm								
PLACA	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)				<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-



FIGURA N°6: Preservante natural a 5000 ppm placa “1” contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

En la tabla anterior correspondiente a las concentraciones de 5000 y 4000 ppm del preservante natural, muestra que ningún microorganismo creció tal como se observa en la figura N° 6

TABLA N°8: Resultados del preservante natural a la concentración de 3000 ppm sobre: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*.

PLACA	3000 ppm							
	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)				<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	-	-	-	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	-	-	-	-



A



B

FIGURA N°7: Imágenes A y B correspondiente al preservante natural a 3000 ppm contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Respectivamente.

La tabla correspondiente a la concentración de 3000 ppm del preservante natural, muestra que el *Staphylococcus aureus* creció en 2 placas: 11 y 13 y no creció en la placa 12, para *Pseudomona aeruginosa* de igual manera creció en dos placas 11 y 12 y no creció en la placa 13 por lo cual no hubo reproducibilidad de resultados por triplicado para ambas bacterias. Debido a estos resultados al mostrar el crecimiento en más de una placa a 3000 ppm ya

TABLA N° 9: Continuación.

25 ppm								
PLACA	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)				<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			
S	+	+	+	+	+	+	+	+
T	+	+	+	+	+	+	+	+
U	+	+	+	+	+	+	+	+

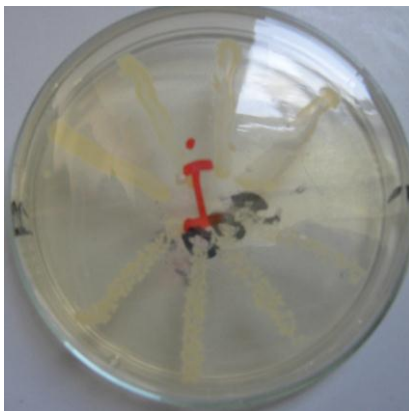


FIGURA N°8: Preservante natural a 250 ppm placa “J” contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

La tabla corresponde a la concentración de 2500 a 25 ppm del preservante natural y muestra el crecimiento que hubo en todas las placas para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* (ver figura n°8).

TABLA N°10: Resultados del preservante natural desde la concentración de 5000 ppm hasta 2000 ppm sobre *Candida albicans*.

5000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
4	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
5	-	-	-	-
4000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
9	-	-	-	-
9'	-	-	-	-
10	-	-	-	-
3000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
14	-	-	-	-
14'	-	-	-	-
15	-	-	-	-

TABLA Nº 10: Continuación.

2500 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
19	-	-	-	-
19'	-	-	-	-
20	-	-	-	-
2000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
a	-	-	-	-
a'	-	-	-	-
b	-	-	-	-

**FIGURA Nº 9:** Preservante natural en placa “a” 2000 ppm contra *Candida albicans*.

La tabla corresponde a las concentraciones de 5000 a 2000 ppm del preservante natural donde se observa que ninguna de las placas hubo crecimiento de *Candida albicans* tal como se puede observa en la figura Nº9.

TABLA Nº11: Resultados del preservante natural desde la concentración de 1000 ppm hasta 25 ppm sobre *Candida albicans*.

1000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
d	+	+	+	+
d'	+	+	+	+
e	+	+	+	+
500 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
g	+	+	+	+
g'	+	+	+	+
h	+	+	+	+

TABLA N° 11: Continuación.

250 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
j	+	+	+	+
j'	+	+	+	+
k	+	+	+	+
100 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
m	+	+	+	+
m'	+	+	+	+
n	+	+	+	+
50 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
p	+	+	+	+
p'	+	+	+	+
q	+	+	+	+
25 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
s	+	+	+	+
s'	+	+	+	+
t	+	+	+	+

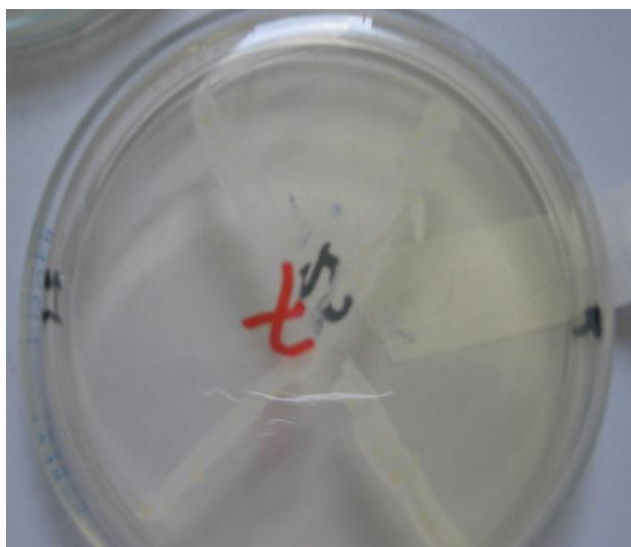


FIGURA N°10: Preservante natural a 50 ppm en la placa “t” contra *Candida albicans*.

La tabla corresponde a las concentraciones de 1000 a 25 ppm del preservante natural la cual muestra el crecimiento de *Candida albicans* en todas las placas como se puede observar en la figura N°10. Debido a esto se determina la

Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) a 2000 ppm y la Concentración Mínima Bactericida (CBM) a 2500 ppm.

TABLA N°12: Resultados del control positivo de Sulfato de Gentamicina a la concentración de 5000 ppm y 4000 ppm sobre *Candida albicans*.

5000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
SC ₁₉	-	-	-	-
SC ₂₀	-	-	-	-
SC ₂₁	-	-	-	-
4000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
SC ₁₆	-	-	-	-
SC ₁₇	-	-	-	-
SC ₁₈	-	-	-	-



FIGURA N°11: Control positivo en placa Sc19 a 5000 ppm contra *Candida albicans*.

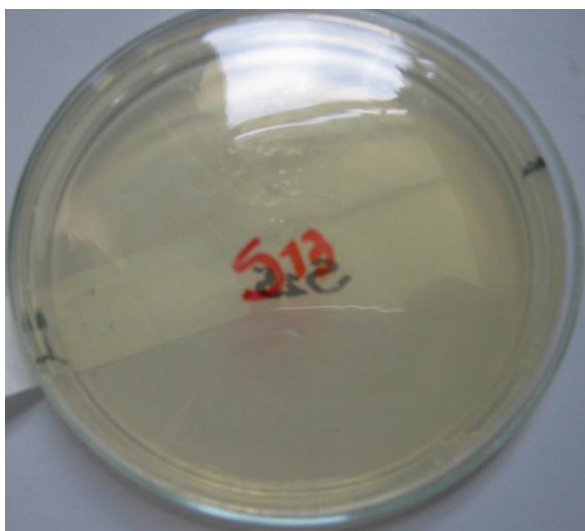
La tabla corresponde a las concentraciones de 5000 y 4000 ppm del control positivo de Sulfato de Gentamicina la cual muestra la inhibición que este ejerce sobre *Candida albicans* al no haber crecimiento en ninguna de las placas como se puede observar en la figura N°11.

TABLA N°13: Resultados del control positivo de Sulfato de Gentamicina desde la concentración de 3000 ppm hasta 25 ppm sobre ***Candida albicans***

3000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
Sc ₁	+	+	+	+
Sc ₂	+	+	+	+
Sc ₃	+	+	+	+
2000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
Sc ₄	+	+	+	+
Sc ₅	+	+	+	+
Sc ₆	+	+	+	+
1000 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
Sc ₇	+	+	+	+
Sc ₈	+	+	+	+
Sc ₉	+	+	+	+
500 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
Sc ₁₀	+	+	+	+
Sc ₁₁	+	+	+	+
Sc ₁₂	+	+	+	+
250 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
Sc ₁₃	+	+	+	+
Sc ₁₄	+	+	+	+
Sc ₁₅	+	+	+	+
100 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
S ₄	+	+	+	+
S ₄	+	+	+	+
S ₅	+	+	+	+
50 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
S ₉	+	+	+	+
S ₉	+	+	+	+
S ₁₀	+	+	+	+
25 ppm				
PLACA	<i>Candida albicans</i>			
S ₁₄	+	+	+	+
S ₁₄	+	+	+	+
S ₁₅	+	+	+	+

TABLA N° 14: Continuación.

PLACA	25 ppm							
	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)				<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			
S ₁₁	-	-	-	-	-	-	-	-
S ₁₂	-	-	-	-	-	-	-	-
S ₁₃	-	-	-	-	-	-	-	-

**FIGURA N°13:** Control positivo en placa "S13" a concentración de 25 ppm contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

La tabla corresponde a las concentraciones de 100 a 25 ppm del control positivo de Sulfato de Gentamicina, muestra la inhibición que este ejerce sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, como se puede observar en la figura N°13, por lo tanto la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) para ambas bacterias se determino a 25 ppm y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se determino a 50 ppm para las dos bacterias.

TABLA N°15: Resultados del control negativo de Dimetilsulfoxido contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureuginosa*

PLACA	DMSO							
	<i>Staphylococcus aureus</i> (↑)				<i>Pseudomona aeruginosa</i> (↓)			
N ₁	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₂	+	+	+	+	+	+	+	+
N ₃	+	+	+	+	+	+	+	+

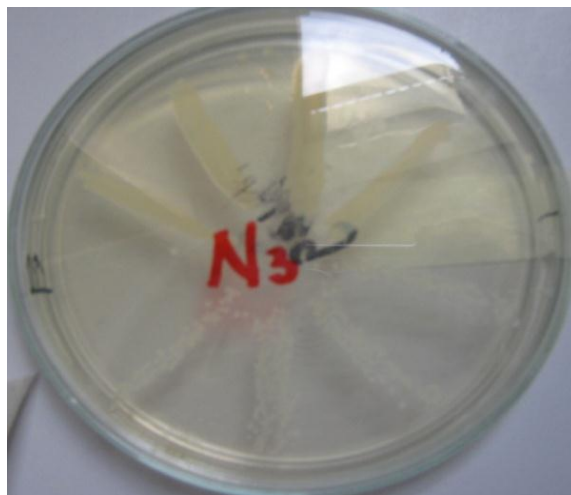


FIGURA N°14: Control negativo de Dimetilsulfoxido en placa “N3” contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*

La tabla correspondiente al control negativo (medio TSA + DMSO) se observa que el Dimetilsulfoxido (DMSO) no ejerció ninguna actividad inhibitoria en los microorganismos de prueba *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, por lo cual se comprueba que los resultados obtenidos para el preservante natural y el control positivo es producto de su propia actividad inhibitoria y que el DMSO solo sirvió como disolvente sin hacer ningún tipo de acción inhibitoria (ver figura N°14).

TABLA N°16: Control negativo de Dimetilsulfoxido contra *Candida albicans*.

PLACA	DMSO			
	<i>Candida albicans</i>			
N ₄	+	+	+	+
N ₄ '	+	+	+	+
N ₅	+	+	+	+



FIGURA N° 15: Control negativo de Dimetilsulfoxido en placa “N4” contra *Candida albicans*

La tabla correspondiente al control negativo (medio TSA + DMSO) muestra que el Dimetilsulfoxido no ejerció inhibición contra *Candida albicans*, por lo cual se comprueba que los resultados obtenidos de el preservante natural y el control positivo es propia de su actividad inhibitoria, comprobando así que el DMSO solo sirvió como disolvente y no ejerció ningún tipo de acción inhibitoria (ver figura N°15).

TABLA Nº 17: Resumen de resultados de CIM y CMB para preservante natural y Control positivo

Control positivo Gentamicina		Concentraciones analizadas	Preservante Natural	
CBM	CIM		CIM	CBM
<i>Candida albicans</i>		5000 ppm		<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i>
	<i>Candida albicans</i>	4000 ppm	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i>	
		3000 ppm		
		2500 ppm		<i>Candida albicans</i>
		2000 ppm	<i>Candida albicans</i>	
		1000 ppm		
		500 ppm		
		250 ppm		
		100 ppm		
<i>Staphylococcus aureus.</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i>		50 ppm		
	<i>Staphylococcus aureus.</i> <i>Pseudomona aeruginosa</i>	25 ppm		

Lectura tomada a 48 horas.

En la tabla se muestra el resumen de los resultados de Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Mínima Bactericida (CMB), donde se observa claramente que el control positivo actuó a concentraciones bajas produciendo inhibición del crecimiento de los microorganismos ***Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*** a la concentración de 25 ppm (CIM) y 50 ppm (CBM), no así con ***Candida albicans*** que se ocuparon concentraciones altas para poder inhibirla la cual fue a 4000 ppm (CIM) y a 5000 ppm (CBM).

Por otro lado, también queda claro el por qué se aumentó las concentraciones para los ensayos tanto del preservante natural como para el control positivo de Sulfato de Gentamicina, pues de lo contrario no se podía encontrar la CIM y CMB correspondientes.

Según los resultados el preservante natural presentó mayor actividad contra ***Candida albicans***, ya que actuó a menor concentración (2000 ppm), dando así una mejor actividad antifúngica, determinando la CIM a 2000 ppm y la CBM a 2500 ppm. Y para ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** se necesitaron concentraciones más altas (4000 ppm) para inhibirla, determinando para ambas el CIM a 4000 ppm y el CBM a 5000 ppm. Sin embargo el preservante natural siempre actuó a concentraciones permitidas para preservar productos como geles, champús, cremas, etc.

No olvidar que estos resultados se obtuvieron sobre microorganismos de colección de hospital o salvajes, los cuales presentan más resistencia a preservantes convencionales, determinando el preservante natural como una opción ante los preservantes sintéticos.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES.

- 1- El pH de las diluciones realizadas del preservante natural a diferentes concentraciones resulto ser de 7. Esto significa que el preservante se encontraba en su rango de acción requerido, tal como lo indica la información del producto.
- 2- A las concentraciones propuestas anteriormente (2000 - 25 ppm) del preservante natural, no se pudo definir la Concentración Mínima Bactericida (CBM) y la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) sobre los microorganismos de prueba: ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Candida albicans***. Por lo tanto se tuvieron que realizar ensayos a concentraciones de 5000, 4000, 3000 y 2500 ppm.
- 3- El control positivo de Sulfato de Gentamicina no presento actividad antimicrobiana contra ***Candida albicans*** a las concentraciones propuestas (100 - 25 ppm), por lo cual se realizaron otros ensayos a concentraciones que iba desde 5000, 4000, 3000, 2000, 1000, 500 y 250 ppm. Para poder definir la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la Concentración Mínima Bactericida (CBM).
- 4- La Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del preservante natural para ***Candida albicans*** resulto ser a 2000 ppm y para ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** a 4000 ppm.
- 5- La Concentración Mínima Bactericida del preservante natural para ***Candida albicans*** fue a 2500 ppm debido a que en esta concentración

ya no hay crecimiento bacteriano ni la que lo antecede y para ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** fue a 5000 ppm.

- 6- La Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) del control positivo para ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** resulto ser 25 ppm debido a que en ninguna concentración hubo crecimiento y para ***Candida albicans*** a 4000 ppm por que a esta concentración fue que no mostro crecimiento.
- 7- La Concentración Mínima Bactericida (CBM) del control positivo de Sulfato de Gentamicina para ***Staphylococcus aureus*** y ***Pseudomona aeruginosa*** fue a 50 ppm y para ***Candida albicans*** a 5000 ppm.
- 8- En las placas del control negativo que contiene el solvente Dimetilsulfoxido mas medio de cultivo se produjo crecimiento de todos los microorganismos de prueba ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Candida albicans***, lo que confirma que el dimetilsulfoxido (DMSO) no interfirió sobre los resultados obtenidos.
- 9- Se comprobó la actividad antimicrobiana presentada por el preservante natural la cual es debida a los aceites esenciales de las plantas ***Murraya koenigii*** (curry) y ***Cinnamomun zeylanicum*** (canela) que contiene el producto, descritas en la monografía.
- 10-Aunque el ensayo se hizo con cepas hospitalarias (cepas resistentes) y no cepas ATCC, los resultados fueron comparables con el control positivo de Sulfato de Gentamicina

- 11- El Método Mitscher es de fácil aplicación, se puede trabajar concentraciones muy pequeñas y procesar a la vez un gran número de muestras y proporciona resultados en corto tiempo.
- 12- Para inhibir las bacterias de prueba se necesitó concentraciones altas del preservante natural, sin embargo este actuó dentro de los rangos en los cuales se puede utilizar un preservante para proteger productos como: geles, champús, cremas, etc. Productos para los cuales según la monografía del preservante natural este protege del crecimiento bacteriano.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES.

7.0 RECOMENDACIONES.

- 1- Se sugiere el uso del preservante natural en aquellos casos en que los productos se vean atacados por ***Staphylococcus aureus***, ***Pseudomona aeruginosa*** y ***Candida albicans***, los cuales son resistentes a preservantes sintéticos. Y así presentar como una alternativa el preservante natural.
- 2- Realizar ensayos previos de formulaciones debido a que el preservante natural posee un olor característico el cual viene a ser un correctivo de olor inmerso en el producto. .
- 3- Realizar análisis microbiológicos de extractos o aceites esenciales se utilice el Dimetilsulfoxido (DMSO) como disolvente, debido a que en los resultados obtenidos se comprobó que este no ejerce ninguna actividad inhibitoria.
- 4- Incluir el Método Mitscher para la determinación de la actividad antimicrobiana dentro de los programas de estudio de la cátedra de microbiología en la carrera de Licenciatura en Química y Farmacia, por ser un método fácil, rápido, reproducible, permite procesar gran número de muestras a la vez y produce datos valiosos.
- 5- Realizar determinaciones antimicrobianas con otras bacterias utilizando el preservante natural.

BIBLIOGRAFIA.

1. Ajay, KM. 2009. Actividad inhibitoria del extracto de una especie de planta de la india cinnamomun zeylanicum contra ***Alternaria solani*** and ***Curvularia lunata***. (en línea) India, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* Department of Biochemistry, University of Allahabad, Allahabad. Consultado el 21 de mayo del 2009. Disponible en: <http://www.ann-clinmicrob.com/content/8/1/9>
2. Alvarado Ramírez, R. y otros. 2003. Investigación de la actividad antimicrobiana de 25 extractos de especies vegetales utilizados por la población materno-infantil. Trabajo de graduación para optar al título de Licenciado en Química y Farmacia, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador.
3. Álvarez, ME. 2005. Efecto antibacteriano in vitro de *Austroeupatorium inulaefolium* H.B.K. (Salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* H.B.K. (Clavo de laguna). *Biosalud*, Volumen 14, Enero -Diciembre, 2005. pg. 46 – 55 Consultado 1 de junio. 2009. Disponible en: http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%204_6.pdf
4. Berrios Vides, S. 2001. Determinación por el Método Mitscher de la actividad antimicrobiana de 15 aceites esenciales extraídos de la flora salvadoreña. Trabajo de graduación para optar al título de Licenciado en Química y Farmacia, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador.

5. Campos Sosa, H.A. y otros, 1999, Determinación de actividad antimicrobiana de extracto de veintiséis especies de la flora salvadoreña según método Mitscher, Trabajo de graduación para optar al título de Licenciado en Química y Farmacia, San Salvador, El Salvador, Universidad de El Salvador
6. Fuselli, S. C2000. Inhibición de **Paenibacillus larvae** empleando una mezcla de aceites esenciales y timol En colaboración con: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350, (7600) Mar del Plata, Argentina.
7. Gerrero de Mena. M. 1999. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña, 1ª Edición, El Salvador San Salvador, Editorial universitaria.
8. Izco, J. 2004. Botánica, 2ª ed. España, Madrid, Mc Graw- Hill Interamericana.
9. Jawetz, M. y otros 1992. Microbiología Medica, 14ª ed., México D.F. Editorial el manual Moderno, S.A de C.V.
10. Kuklinski. C. 2000, Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural., Barcelona. Edición Omega S.A.
11. CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo), Manual de Técnicas de Investigación del CYTED, Química Farmacéutica, proyecto x – 1, Búsqueda de principios Bioactivos en Plantas de la Región, Marzo de 1995

12. Pareja B. y otros. 1967. Farmacotecnia, Campodonico ediciones S.A., Perú.
13. Parmar, C. y otros. 1982. *Murraya koenigii*. *Murraya koenigii*. p. 45–48. In: Wild Fruits. En: frutas silvestres. Kalyani Publishers, New Delhi, India. Consultado 21 mayo.2009 Disponible en: www.cyrus.com_curry
14. Rico Martínez, GA.1997. Actividad antimicrobiana de cinco plantas de la familia compositae nativas de Guatemala, informe final de tesis para optar al título de Químico Biólogo Facultad de Ciencias Química y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala. Consultado 23 mayo 2005. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_1873.pdf
15. Thompson J. 2006. *Practica Contemporanea en Farmacia*, 2ª edición, editorial Mc.Graw-Hill Interamericana, México.
16. Williams, JR. 2005. Remington. *The science and practice of pharmacy* 21 edition Lippincott williams & Wilkins
17. Yukari, T. C 2000. Comparación de las propiedades antioxidantes de los alcaloides de carbazol provenientes de las hojas de *Murraya koenigii*. Departamento de Economía. Química de Alimentos, Escuela de Graduados de Ciencias de la Vida Humana, Osaka City University, Sumiyoshi, Osaka, Japón; Consultado 1 de junio 2009. Disponible en: http://translate.google.com/sv/translate?hl=es&sl=en&u=http://cat.inist.fr/%3FaModele%3DafficheN%26cpsidt%3D15201174&ei=8bs_SvSnN9WLtgfDrbWqBA&sa=X&oi=translate&resnum=1&ct=result&prev=/search%3Fq%3Dac

tividad%2Bbiologica%2Bde%2Bcurry%252B%2Bmurraya%2Bkoenigii%26hl
%3Des%26lr%3D%26sa%3DG .

18. <http://www.monografias.com/trabajos903/candidiasis-bucal/candidiasis-bucal.shtml>. Algunas consideraciones sobre ***candida albicans*** como agente etiológico de candidiasis bucal. Consultado el 23 de mayo del 2009.
19. <http://www.amro.who.int/spanish/ad/thse/ev/05.pdf>. Capacidad inhibitoria mínima. Consultado el 23 de mayo Del 2009.
20. [florawww.eeb.uconn.edu](http://www.eeb.uconn.edu) . Consultado el 21 de mayo del 2009.
21. www.foodsafety.gov. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook .2009. Food and Drug Administration. US . Consultado el 21 de mayo del 2009.
22. <http://www.botanical-online.com/medicinalscanela.htm> . Consultado el 21 de mayo del 2009.
23. <http://www.elergonomista.com/fitoterapia/aceitesesenciales.htm>. Consultado el 21 de mayo del 2009.
24. <http://www.health-garden.com>. Consultado el 21 de mayo del 2009.
25. <http://mail.fq.edu.uy/~planta/pdf/FarmacognosiaPE80/bolilla4.pdf> . Consultado el 25 de mayo del 2009.
26. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmacuticas/apbot-farm2c/montesm02/20.html. Consultado el 25 de mayo del 2009
27. <http://www.preservativesindia.com/whysalicylates.htm> . Consultado el 25 de mayo del 2009.

28. www.textbookofbacteriology.net. *Staphylococcus aureus* y Staphylococicas Enfermedades. Libros de texto de bacteriología 2008 © Kenneth Todar, Ph.D. wisconsi USA. Consultado 21 de mayo 2009.
29. www.wikipedia.org/wiki/dimetil_sulfoxido. Consultado 25 de mayo de 2009.
30. www.realacademiadelalenguaespañola.com/diccionario. Consultada 15 de noviembre de 2009.
31. www.merck.corporation.com/reagent

ANEXOS.

ANEXO N° 1
MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

Materiales.

- Beaker de 5,10 y 50 mL
- Pipeta volumétrica de 0.5, 1, 5 y 10 mL
- Tubos de ensayo de 20 mL
- Placa petri con tapadera de vidrio
- Agitador de vidrio
- Porta objeto.
- Balón volumétrico de 10 mL
- Asa bacteriológica estéril
- Plantilla para rayado
- Gradilla.
- Gasa
- Guante
- Mascarilla
- algodón

Equipo.

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar.
- Balanza analítica
- Balanza semianalitica
- Incubadora.
- Baño María
- Estufa.
- Refrigerador.
- Hotplate.
- Microscopio.

Reactivos y Medios.

- Conservante natural SALINATURALS CCL
- Agar estéril Tripticasa Soya (TSA)
- Dimetilsulfoxido (DMSO)
- Sulfato de Gentamicina Estándar.
- Agua destilada estéril
- Cloruro de sodio (s); Solución de Cloruro Sodio 0.9%.
- Acido sulfúrico 1%
- Sulfato de bario 1%
- Cristal violeta (c.s).
- Lugol (I₂ al 1% + KI al 2% en agua destilada)
- Alcohol 75% - acetona 25%
- Safranina (rojo básico 2, colorante biológico).
- Aceite de inmersión.
- Cepas de microorganismos salvajes:

Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa y Candida albicans

ANEXO N° 2
PREPARACION DEL MEDIO Y REACTIVOS-

ANEXO N° 2

Preparación de los medios.

Agar tripticasa soya (TSA). ⁽³¹⁾

Se disuelven 40g de TSA en un litro de agua destilada. Esta cantidad es suficiente, aproximadamente para 100 cajas.

Se hierve el agua y se añade el agar, se calienta la suspensión hasta que se logre obtener una disolución clara. Luego esta disolución se transfiere a tubos con tapa (10 mL/tubo) y a erlenmeyer, y posteriormente se esterilizan en autoclave por 15 minutos a 121°C.

Preparación de la solución salina. ⁽⁵⁾

Se prepara solución salina al 0.85%, se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos. La solución salina se puede mantener a temperatura ambiente por varias semanas.

Preparación del Estándar de Mcfarland ⁽⁹⁾.

En un tubo estéril colocar 9.5 mL de ácido sulfúrico al 1.0 %; agregar 0.5 mL de cloruro de bario al 1.0 %, mezclar. La turbidez (precipitado blanco de sulfato de bario) corresponde a una densidad celular de 1.5×10^{-8} células por mililitro.

ANEXO N° 3

DISOLVENTE DEL EXTRACTO.

DIMETILSULFOXIDO ⁽²⁹⁾.

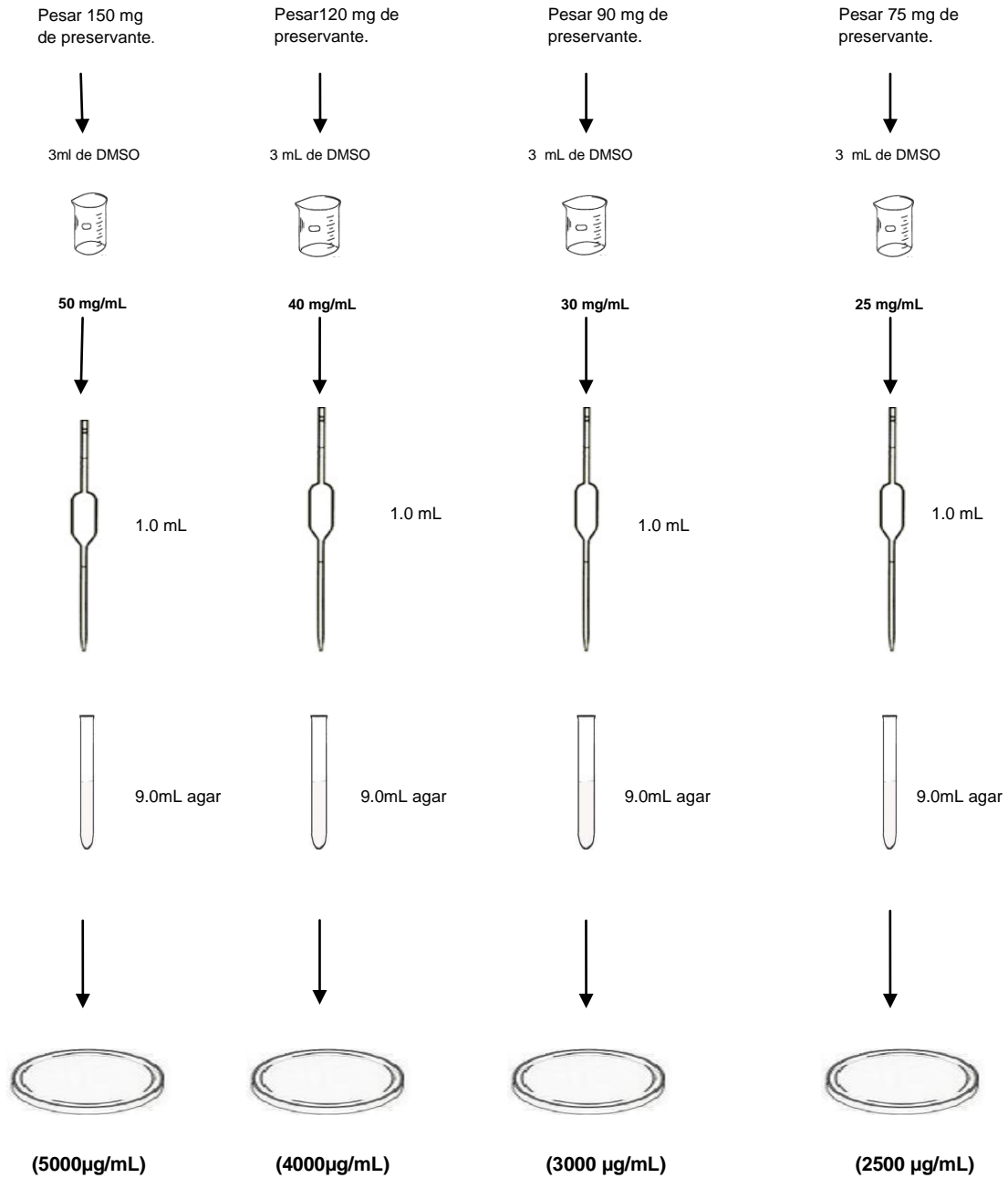
Origen: Es obtenido de la pulpa de la madera por medio de procesos industriales. Descubierta por Saytzeff en 1866, el dimetilsulfoxido se obtiene como subproducto durante el procesamiento de pulpa de madera para la fabricación de papel.

Descripción: Líquido claro, transparente, de olor característico y textura semiviscosa. El dimetil sulfoxido (dimetilsulfoxido, DMSO, CH₃SOCH₃) es un líquido orgánico sin color que contiene azufre, usado como solvente orgánico industrial a partir de 1940, como criopreservante a partir de 1961 y como un medicamento (reduce el dolor y la inflamación). Por su propiedad de atravesar rápidamente la epidermis y las membranas celulares, el DMSO sirve también como acarreador de drogas o venenos.

Usos: Se utiliza como agente solubilizante del extracto para facilitar su incorporación en agua.

Es un solvente aprotico y altamente dipolar. Por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos como alcoholes, cetonas, etc. Puede formar complejos en sistemas biológicos.

ANEXO Nº 4
ESQUEMA DE PREPARACION DE DILUCIONES DEL PRESERVANTE
NATURAL.



Incubar todas las placas a 37°C por 24 horas.

FIGURA N°16: Esquema para la obtención de las diluciones del preservante natural. (5000, 4000, 3000, 2500 ppm)⁽²¹⁾

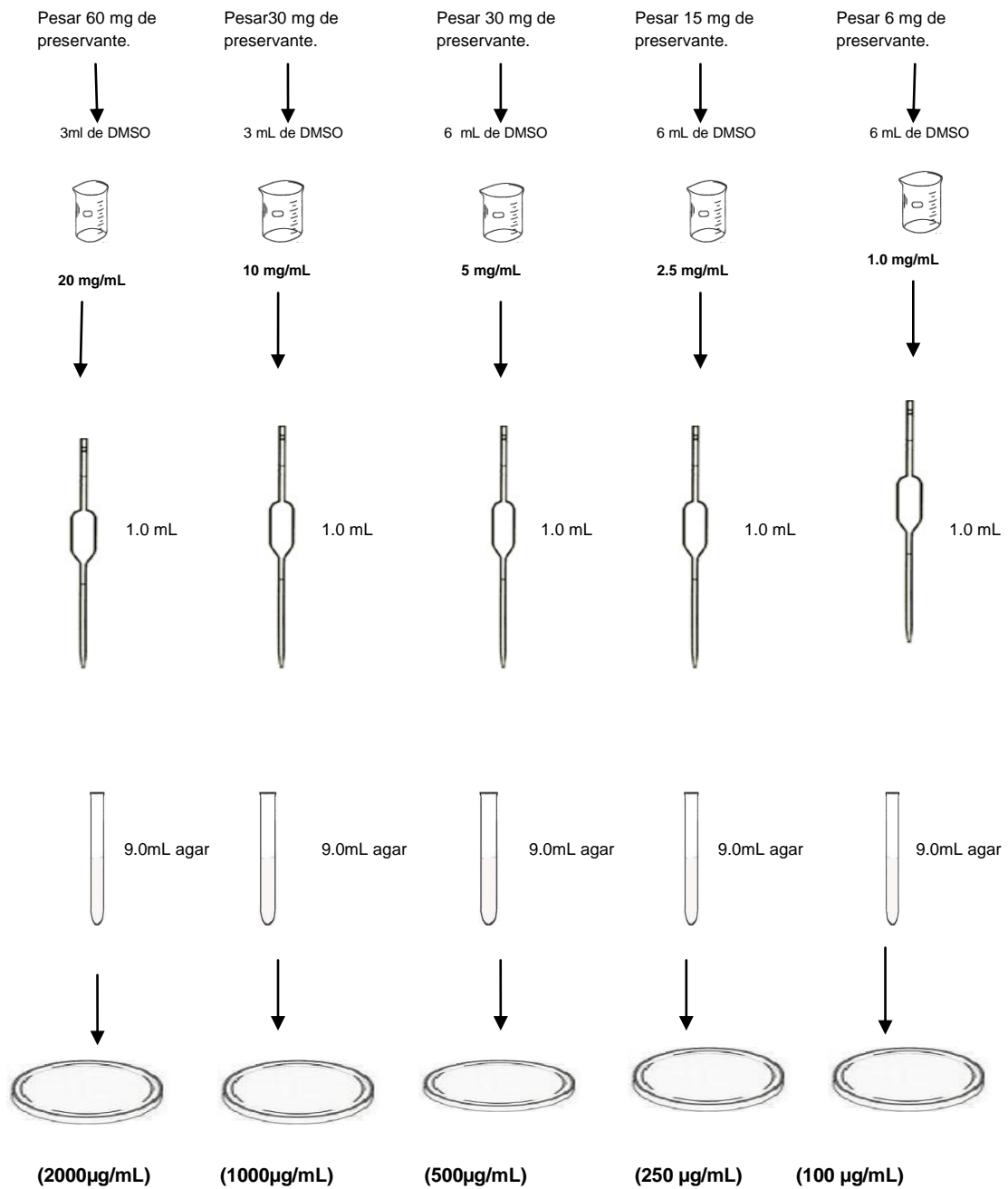


Figura N° 17: Esquema de preparación de muestras y placas para el ensayo. (2000, 1000, 500, 250, 100 ppm)

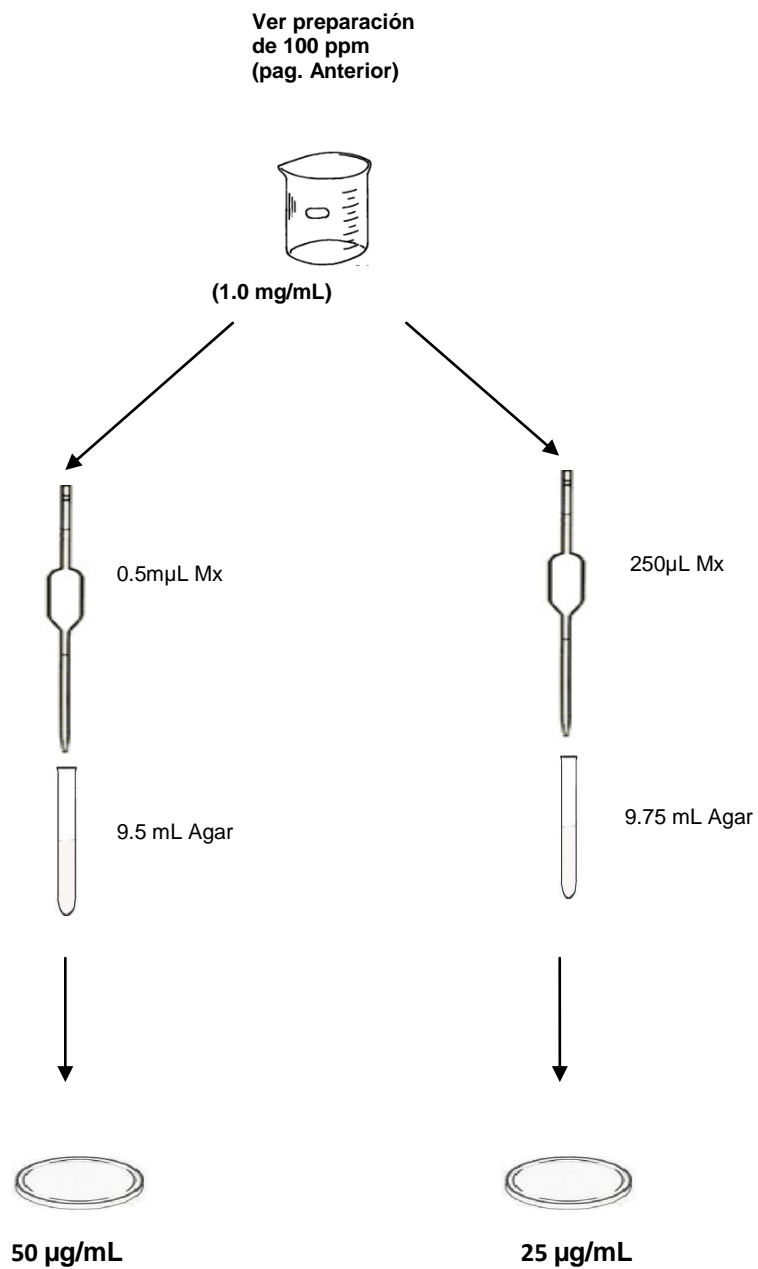
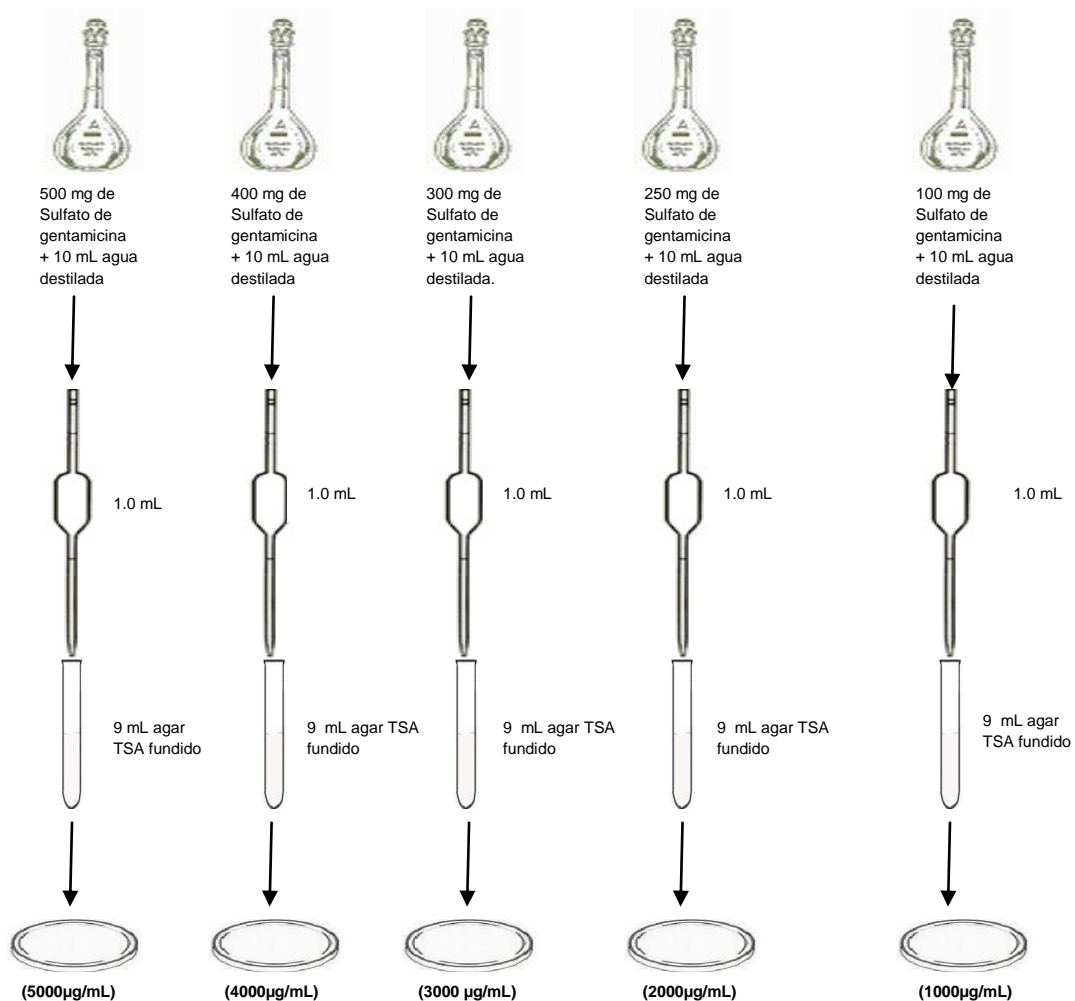


Figura N° 18: Esquema de preparación de muestras y placas para el ensayo (50 y 25 ppm)

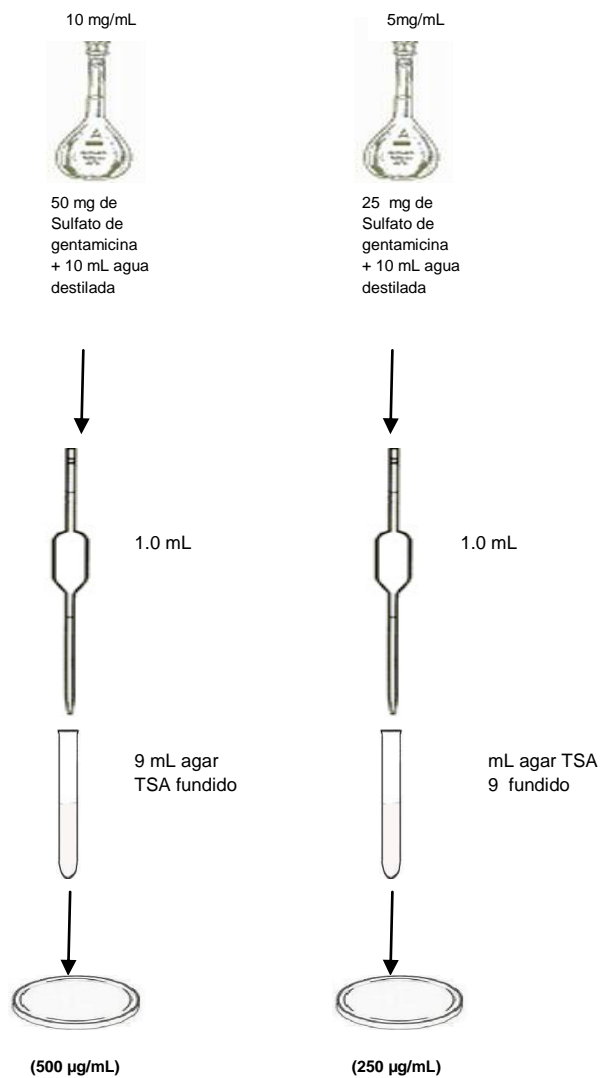
ANEXO Nº 5

**ESQUEMA DE PREPARACION DE DILUCIONES DEL CONTROL
POSITIVO DE SULFATO DE GENTAMICINA.**



Incubar todas las placas a 37°C por 24 horas.

FIGURA N° 19: Esquema para la obtención de las diluciones de control positivo de Sulfato de Gentamicina. (5000, 4000, 3000, 2000, 1000 ppm)⁽¹¹⁾



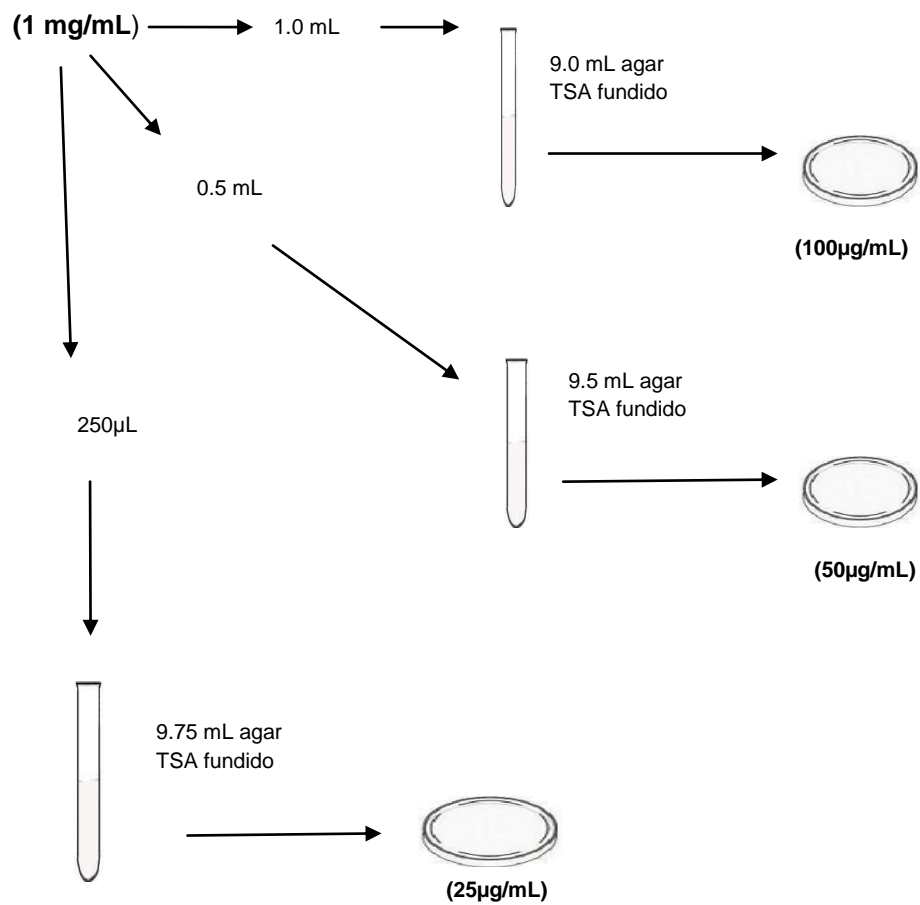
Incubar todas las placas a 37°C por 24 horas.

FIGURA Nº 20: Esquema para la obtención de las diluciones del control positivo de sulfato de Gentamicina. (500, 250 ppm)⁽¹¹⁾

10 mg de sulfato de Gentamicina.



10 mL agua destilada estéril. Agitar

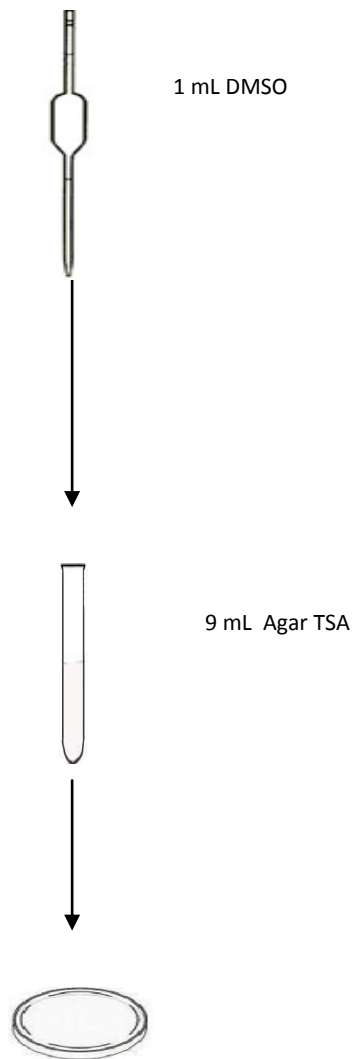


Incubar todas las placas a 37°C por 24 horas.

FIGURA Nº 21: Esquema para la obtención de las diluciones del control positivo de sulfato de Gentamicina. (100, 50 y 25 ppm)₍₂₁₎

ANEXO Nº 6

ESQUEMA DE PREPARACION DEL CONTROL NEGATIVO.



Incubar las placas a 37°C por 24 horas.

FIGURA Nº 22: Esquema de preparación de control negativo.

ANEXO Nº 7
ESQUEMA DE PREPARACION DE SUSPENSION DE
MICROORGANISMOS.

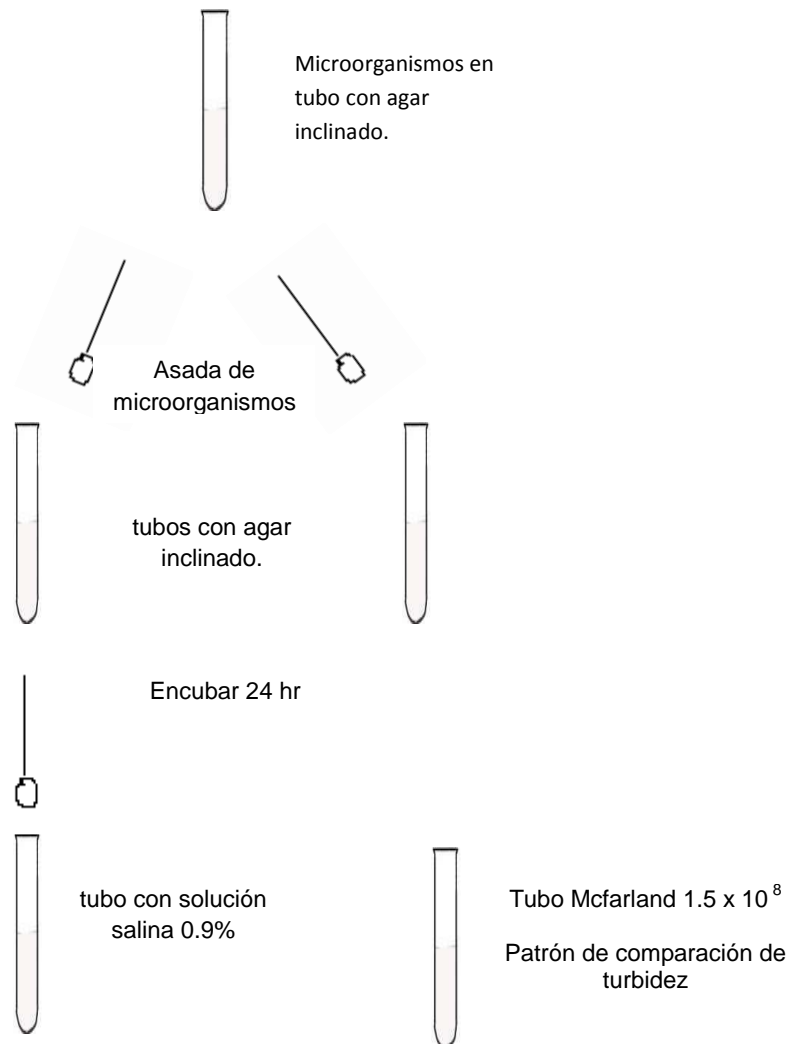


FIGURA N°23: Esquema de preparación de la suspensión de microorganismos.

ANEXO N° 8

PLANTILLAS PARA INOCULACION DE MICROORGANISMOS.

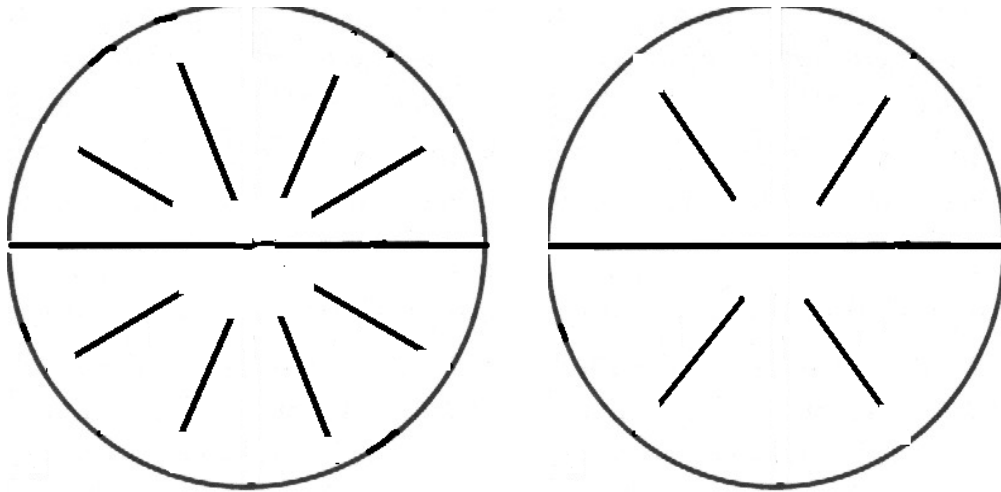


FIGURA N°24: Esquema de rayado de microorganismos.

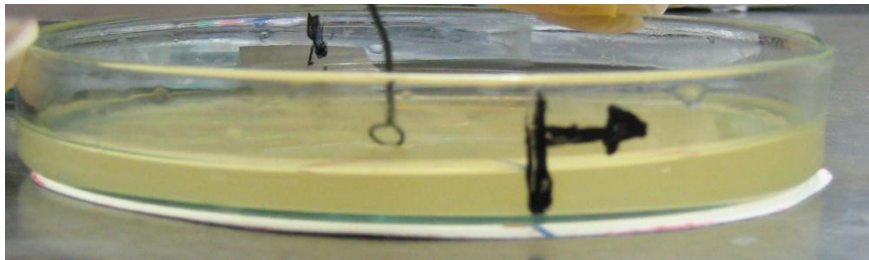


FIGURA N° 25: Identificación de parte superior de la placa.

ANEXO N° 9

**PREPARACION DE LAS DILUCIONES DEL PRESERVANTE
NATURAL, CONTROL POSITIVO Y CONTROL NEGATIVO.**

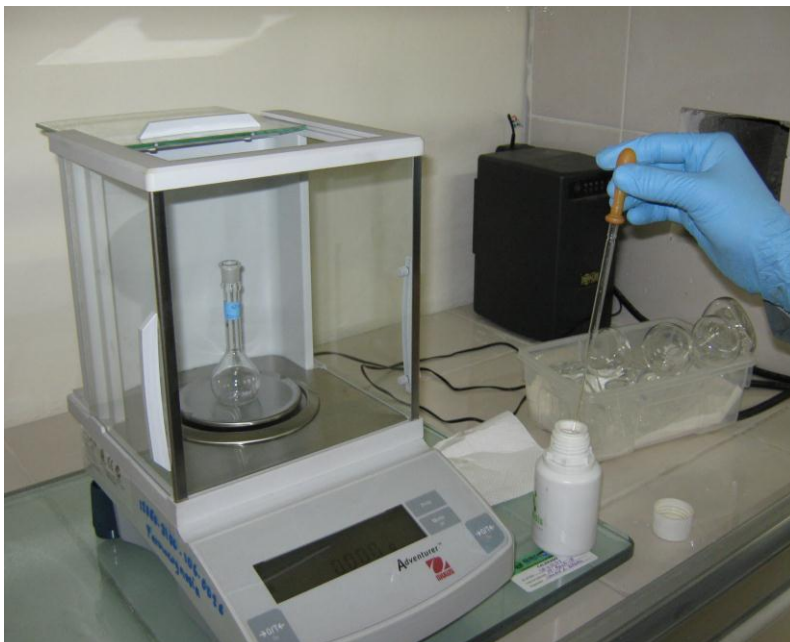


FIGURA Nº 26: Pesada del preservante



FIGURA Nº 27: Incorporación del solvente DMSO



FIGURA Nº 28: Solvente DMSO



FIGURA Nº 29: Identificación de placa



FIGURA Nº 30: Incorporación de preservante natural en agar



FIGURA Nº 31: Llenado de placa

ANEXO Nº 10
PREPARACION DE MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

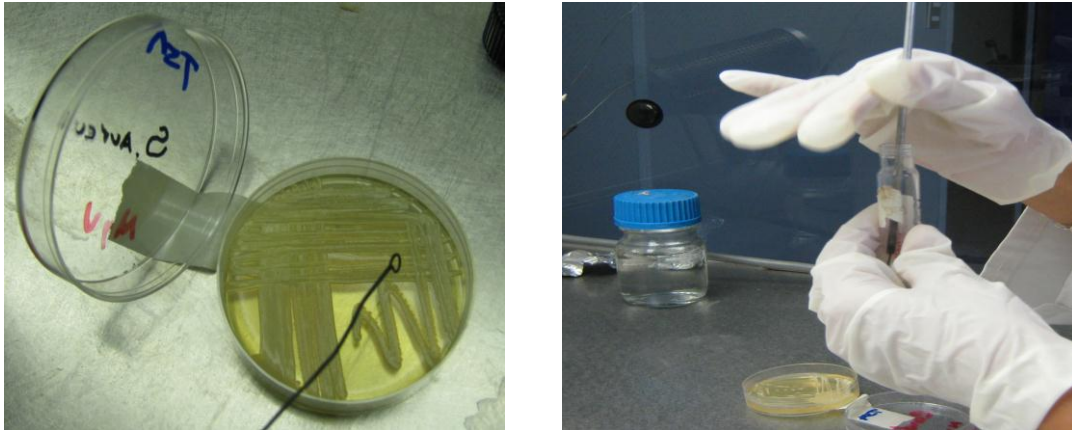


FIGURA Nº 32: Cultivo de microorganismo. **FIGURA Nº 33:** Preparación de microorganismos en SSN al 0.9%

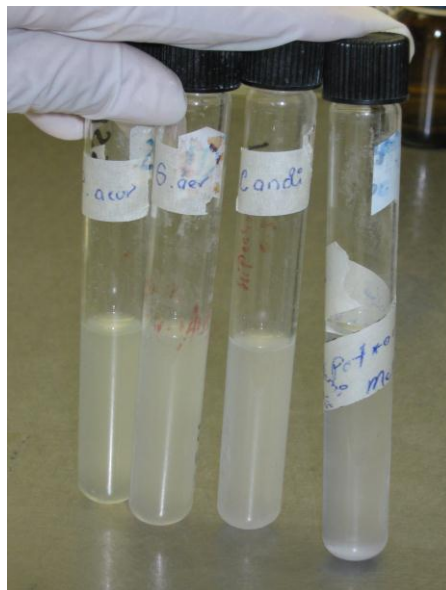


FIGURA Nº 34: Comparación de microorganismos en SSN al 0.9% con el tubo Macfarland.

ANEXO Nº 11
INOCULACION DE MICROORGANISMOS

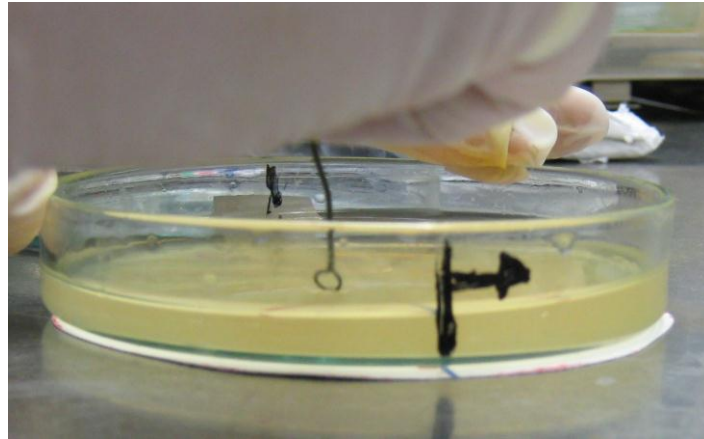


FIGURA N° 35: Marca de la flecha hacia arriba



FIGURA N° 36: Rayado del microorganismos

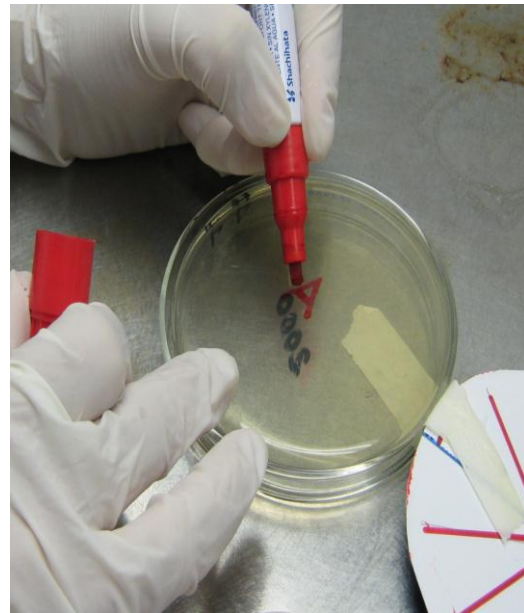


FIGURA N° 37: Identificación de placa.

Anexo N° 12:**Información del estándar de trabajo Sulfato de Gentamicina proporcionada por el proveedor.**

Numero de lote: 053080

Cantidad de Estándar: 2 gramos

Potencia: 680 mcg de Gentamicina en 1 miligramo de estándar.

Proveedor: HELSYNTH.

GLOSARIO ⁽³⁰⁾

- Absceso: acumulación de pus en los tejidos orgánicos.
- Actinomorfas: flor que queda dividida en dos partes simétricas por cualquier plano que pase por su eje y por la línea media de cada sépalo o pétalo.
- Acuminadas: hoja terminada en punta alargada y delgada
- Aguja: hoja en forma de agujas, típica de pinos, píceas etc.
- Alcaloides: cualquiera de los compuestos orgánicos nitrogenados, de carácter básico, que se extraen de ciertos vegetales y que tienen propiedades alcalinas
- Alcanos: los alcanos son hidrocarburos de cadena abierta que constituyen la serie homóloga de fórmula general C_nH_{2n+2} , donde n es un número entero. Tienen únicamente enlaces sencillos, por lo que se les denomina hidrocarburos saturados.
- Aldehídos: cada uno de los compuestos orgánicos que contienen un grupo carbonilo y que se obtienen deshidrogenando u oxidando un alcohol primario: los aldehídos se utilizan en la industria y en los laboratorios químicos por sus propiedades reductoras.
- Alícuota: que está comprendido un número de veces en un todo.
- Alifáticos: compuesto orgánico acíclico con estructura molecular en cadena abierta.

- Antiagregantes: que se opone a la formación de conglomerados de glóbulos rojos o de plaquetas sanguíneas en los vasos.
- Antiespasmódico: que sirve para calmar los espasmos o desórdenes nerviosos.
- Antifúngica: que se opone al desarrollo de los hongos. Término con el que se denomina a una familia de antibióticos (ver antibiótico), aislados de los Estreptomices, activos frente a los hongos en donde atacan la membrana
- Aprotico: inerte que no poseen propiedades acidas ni básicas.
- Bipinnadas: hoja doblemente pinnada, es decir, dividida en partes que a su vez se subdividen en otras partes (foliolos).
- Coníferas: Son los arboles portadores de piñas siendo la mayoría perennifolias y con agujas o acículas por hojas como cedro, pino, píceas o enebros
- Coriáceas: hoja muy áspera.se dice cuando los frutos u hojas presentan una textura o consistencia parecida al cuero.
- Decantación: la separación de las partículas sólidas contenidas en un líquido, o la separación de dos líquidos in mezclables entre sí en un solo líquido. La separación se realiza por gravedad o por traslado; puede ser con una centrífuga si se quiere ganar en rapidez.
- Destilar: separar mediante calor un líquido volátil de otros que lo son menos. Por medio del calor el líquido más volátil de la mezcla se

convierte en vapor, que luego se enfría para convertirse nuevamente en líquido.

- Dimérico: es una molécula compuesta por dos unidades similares o monómeros enlazados
- Estambres: órgano masculino de las flores, constituido por un filamento, cuyo extremo ensanchado recibe el nombre de antera .
- Esteres: son compuestos orgánicos en los cuales un grupo orgánico (simbolizado por R' en este artículo) reemplaza a un átomo de hidrógeno (o más de uno) en un ácido oxigenado.
- Extracto: sustancia que, en forma concentrada, se extrae de otra, de la cual conserva sus propiedades
- Gemación: es una división desigual, consistente en la formación de prominencias o yemas sobre el individuo progenitor, que al crecer y desarrollarse originan nuevos seres que pueden separarse del organismo parental o quedar unidos a él, iniciando así una colonia.
- Hemólisis: fenómeno de la desintegración de los eritrocitos (glóbulos rojos o hematíes). El eritrocito carece de núcleo y orgánulos, por lo que no puede repararse y muere
- Hermafrodita: dicese de los animales o plantas que reúnen los dos sexos en un mismo individuo. Bisexual.
- Heterogénea: aquel que está formado por dos o más fases
- Incubadora: Gestación artificial (incubadora).

- Inhibir: Abstenerse, no meterse en un asunto. (inhibir).
- Inmunocomprometidos: condición anormal en la cual la capacidad del organismo para combatir infecciones se encuentra reducida
- Inocular: Transmitir por medios artificiales una enfermedad contagiosa. (inocular).
- Labiadas: el término científico deriva de palabras griegas que en conjunto significan cáliz hinchado refiriéndose a la forma del mismo después de la floración
- Lanceoladas: Hoja cuyo aspecto es semejante a la punta de una lanza.
- Miscible: Dicho de sustancias: que pueden mezclarse en cualquier proporción y formar una fase homogénea
- Otitis: La Otitis es la inflamación de la capa mucosa que recubre el oído medio asociada a una secreción acumulada que suele producir dolor. Puede tener un origen infeccioso o derivarse de algún problema del sistema respiratorio
- Panículas: inflorescencia compuesta cuyas ramas, de longitud decreciente hacia el ápice, forman en conjunto una especie de pirámide.
- Pecíolo: m. bot. Pedúnculo o especie de rabito de la hoja mediante el cual se une al tallo.
- Picor: escozor, picazón.

- **Prospectivo:** Conjunto de análisis y estudios sobre las condiciones técnicas, científicas, económicas y sociales de la realidad futura con el fin de anticiparse a ello en el presente
- **Rizoma:** tallo subterráneo alargado, en posición horizontal u oblicua, contiene sustancias de reserva y emite raíces adventicias
- **Taninos:** compuestos polifenólicos de estructura química diversa que la propiedad de ser astringentes, es decir precipitan las proteínas y su capacidad de curtir la piel.
- **Tinción de gram:** es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la técnica en 1884. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color violeta y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa.