

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA**



**EFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Caesalpinia spinosa* ("TARA") SOBRE
CEPA DE *Candida albicans* ATCC 90028.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO CIRUJANO**

AUTOR:

Christian Hernando Benites Gómez

ASESORA:

Dra. Elva Mejía Delgado

TRUJILLO - PERU

2015

JURADO

Dr. Marco Antonio Zárate Arce

PRESIDENTE

Dra. Jose Gonzalez Cabeza

SECRETARIO

Dra. Martha Arquño Huerta

VOCAL

ASESOR

Dra Elva Mejía Delgado

ASESORA

DEDICATORIA

*A Dios por haberme dado la vida, salud y sabiduría.
Por que nunca se alejó de mi lado durante los
momentos mas dificiles me ayudó a salir siempre
vencedor. Por llenar mi sendero de personas buenas
y sinceras.*

*A mi madre, quien con su infinito amor siempre guio
mi camino, porque es un ejemplo a seguir para todos
quienes la rodearon, por enseñarme el significado de
el amor verdadero y el sacrificio que en algun
momento todos debemos hacer para seguir el camino
correcto.*

*A mi padre, por ser mi mentor y amigo, quien pese
a todas las dificultades siempre estuvo pendiente de
mi bienestar, de que sea una persona de bien y de
provecho para quienes me rodean, por inculcar en
mi el deseo de salir adelante y de ser mejor cada día
que pasa, por enseñarme a levantarme de cada
tropiezo y que cada uno solo nos vuelve mas fuertes.*

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Dra. Elva Mejía por su desinteresado apoyo y por dedicarme parte de su preciado tiempo en la realización de este trabajo.

A mis padres por apoyarme sin dudar desde el inicio de este arduo y empinado camino para cumplir mi sueño de ser médico.

A mis hermanos que son mi motor y me dan la fuerza de superarme a diario y ser mejor cada día.

A mis abuelos por su constantes consejos que me ayudaron a no desfallecer en este arduo camino y lograr mis objetivos.

A mis maestros universitarios por consolidaren mí la base de conocimientos y actitudes para mi vida como profesional.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	1

ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
III. RESULTADOS.....	22
IV. DISCUSIÓN.....	32
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. RECOMENDACIONES.....	34
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
ANEXOS.....	39

RESUMEN

Objetivo: Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* de cuatro concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

Material y Métodos: Se llevó a cabo un estudio de tipocomparativo, longitudinal, prospectivo, experimental. La población estaba conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Candida albicans*, aplicándoseles el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) observando su efecto antibacteriano para dichas cepas.

Resultados: En el presente trabajo se observó que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) tuvo efecto inhibitorio *in vitro* frente a *Candida albicans*, al utilizar las diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%), y este efecto se incrementa en relación directamente proporcional a las concentraciones utilizadas en el estudio, dando como CMI el 50%. Con respecto a los halos de inhibición, al medirlos según escala de Durafford, se logró obtener una sensibilidad media (++) en las concentraciones de 75% y 100% y una sensibilidad límite en las concentraciones de 25% y 50%.

Conclusiones: En el presente trabajo se demuestra que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) presenta efecto inhibitorio *in vitro* frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, siendo la CMI del 50%.

Palabras Clave: *Caesalpinia spinosa*, *Candida albicans*, concentración mínima inhibitoria, unidades formadoras de colonias, halo de inhibición.

ABSTRACT

Objective: Comparing the antimicrobial effect in vitro of four concentrations of the ethanol extract of *Caesalpinia spinosa* against *Candida albicans* ATCC 90028.

Methods: Was conducted a comparative, longitudinal, prospective, experimental investigation. The study population was conformed by all inoculated with strains of *Candida albicans* plates. And generally apply the ethanol extract of *Caesalpinia spinosa* (tara) observing its antibacterial effect for these strains.

Results: In this study it was observed that the ethanol extract of *Caesalpinia spinosa* (tara) had inhibitory effect in vitro against *Candida albicans*, using different concentrations (25%, 50%, 75% and 100%), and this effect increases directly proportional to the concentrations used in the study ratio, leading to 50% CMI. With respect to inhibition halos, when measured according Durafford scale, was achieved to obtain a mean sensitivity (++) in concentrations of 75% and 100 % and a sensitivity limit in the concentrations of 25% and 50 %

Conclusions: In the present work demonstrates that the ethanol extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) has inhibitory effect in vitro against strains of *Candida albicans* ATCC 90028, with the CMI 50%

Keywords: *Caesalpinia spinosa*, *Candida albicans*, minimum inhibitory concentration, colony forming units, halo of inhibition.

I. INTRODUCCIÓN

La humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, la incidencia de los productos de origen vegetal en la terapéutica ha variado a lo largo de los tiempos, de acuerdo con los avances del conocimiento científico tanto sobre estos productos como sobre las demás herramientas terapéuticas. (1)

De las 250.000 especies de plantas con flores en el mundo, más de 20.000, casi el 10% del total se clasifican como hiervas. Hiervas escogidas por la gente de la naturaleza han sido un factor esencial en la atención de salud en todo el mundo a través del tiempo y en todas las culturas. Hoy en día, alrededor del 80% de la población del mundo confían sobre medicamentos tradicionales a base de plantas, para cuidar su salud primaria. (2)

La *Caesalpinia spinosa* (tara), pertenece a la familia *Caesalpiniaceae* (Fabaceae, subfam. Caesalpinioideae), de distribución pantropical en bosques, sábanas y semidesiertos, e incluye alrededor de 150 especies, de las que 40 están presentes en Sudamérica. (3)

En Perú, *C. spinosa* (tara) está distribuida a lo largo de toda la costa, desde Piura hasta Tacna, y en la sierra en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huanuco, Huancavelica, Junín y Pasco. (4)

Caesalpinia spinosa (Molina) *Kuntze* es un arbusto o árbol siempre verde, con espinas en tallo y ramas, de 3-5 m de altura, y es conocido con una gran diversidad de nombres vernaculares: tara, algarroba, huarango, guaranga, tanino, taya y caranca. (5)

La tara tiene diversos usos tradicionales, la infusión de las vainas maduras se utiliza para la amigdalitis en forma de gárgaras, la infusión de las hojas se utiliza para la estomatitis, la cocción de las ramas tiernas se usa como abortivo, igualmente se prepara una bebida que se toma como depurativo del colesterol. En general es también muy utilizada para el tratamiento de infecciones vaginales y micóticas,

paradolores abdominales y diarreas, para el reumatismo y resfriado, para curar úlceras, como cicatrizante, entre otros. (6)

Un problema latente de salud pública actual es la candidiasis, la cual es una micosis causada por levaduras oportunistas del género *Candida*; debido, sobre todo, al aumento de pacientes inmunodeprimidos por diabetes o VIH-SIDA, esto aunado al manejo incontrolable de medicamentos que puede ser causa de una respuesta inadecuada y, por ende, de las complicaciones originadas. (7)

Las especies de *Candida* son la causa más común de infecciones fúngicas invasivas en seres humanos, provocando infecciones que van desde trastornos mucocutáneos que no hacen peligrar la vida hasta enfermedades invasivas que pueden afectar a cualquier órgano. (8)

Candida albicans es una levadura comensal que reside en las membranas mucosas de las cavidades oral y vaginal, así como en el tracto gastrointestinal de los humanos. Normalmente es inofensiva en el hospedero sano, pero su patogenicidad se manifiesta en el hospedero inmunocomprometido. Aunque la invasión inicial depende de los mecanismos inmunes del hospedero, *C. albicans* posee características intrínsecas que promueven su habilidad de causar enfermedad. Entre sus factores de virulencia se incluyen las adhesinas, la conversión morfo genética del microorganismo de la fase levaduriforme a la fase filamentosa, la secreción de enzimas como proteasas y fosfolipasas y la inmunomodulación de los mecanismos de defensa del hospedero.(9)

Antecedentes:

Los cambios y adaptaciones microbianas han generado el fenómeno de resistencia a los antibióticos, lo cual es un problema de salud a nivel mundial. Las cepas patógenas resistentes han surgido principalmente en los hospitales a consecuencia de varios factores como son el amplio uso de los antimicrobianos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, y la eliminación de la mitad de la droga que no

se alcanza a metabolizar en su totalidad, las altas posibilidades de transmisión o contagio y el estado inmunocomprometido de los pacientes que los hacen susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas. Existen otros dos elementos que favorecen el surgimiento de este fenómeno: el uso inadecuado de antibióticos y la adaptación de los microorganismos a los diferentes ambientes (10).

La flora peruana es muy rica en especies a la que la medicina tradicional atribuye eficaces propiedades terapéuticas, las que sin embargo aun no son investigadas, como es el caso de la *Caesalpinia spinosa* (*C. spinosa*) “Tara” perteneciente a la familia *Fabaceae*. La tara es una planta oriunda del Perú utilizada desde la época prehispánica en la medicina tradicional y en años recientes en la industria peletera o en la producción de goma de tara. (2,3)

En investigaciones realizadas se ha encontrado que los taninos y flavonoides son metabolitos, encontrados en el estudio fitoquímico del extracto de *C. spinosa*, que se encuentran en diferentes partes de la planta. Estos son solubles en agua, etanol, acetona y otros disolventes orgánicos. Tienen acción farmacológica como antihemorrágico local, antidiarreico, antihepatóxica y antibacteriano. (3)

En los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ancash, Lambayeque, Amazonas, Ayacucho, Apurímac y Huánuco existen plantaciones silvestres del árbol comúnmente llamado “tara”, cuyos frutos cuando están maduros pueden contener entre 30 a 60 % de taninos, de los cuales, mediante síntesis, se puede obtener ácido tánico, ácido gálico, ácido elágico, proteínas, carbohidratos, etc., los mismos que sirven como base para la elaboración de otros productos usados en la industria farmacéutica, alimentaria, peletera, etc (4).

Añanca (2009), en su investigación con el extracto acuoso de vainas de *C. spinosa* en concentraciones que corresponden a 17,5, 16,25, 15, 13,75, 12,5, 11,25, 10, 8,75, 7,5, 6,25 µg/mL, determinó el efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. (5)

En un estudio realizado por **Sampaio (2009)**, determinó la actividad antimicrobiana del extracto de la *C. ferrea Martius* contra los microorganismos patógenos orales

más comunes (*Candida albicans*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S.oralis* y *Lactobacillus casei*). (6)

Escobar (2008) determinó que el extracto alcohólico de la *C. spinosa* (Molina) *Kuntze* a diferentes concentraciones posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Corynebacterium diphtheriae*. (4)

Así mismo, **De la Cruz (2006)**, determino el efecto del extracto hidroalcoholico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) *Kuntze* “Tara” sobre la viabilidad de *Streptococcus β hemolitico*. Encontrándose que la actividad antibacteriana del extracto de *Caesalpinia spinosa* frente a *Streptococcus β hemolitico* aumenta a medida que se eleva (25% a 100%) la concentración del extracto. (7)

Ferreira, J. (2005) estudió un extracto hexánico a base de *Caesalpinia spinosa* para comprobar su actividad antifúngica como una alternativa del control de la enfermedad de fusariosis en diversos cultivos así como las manchas de Phoma en las hojas de las plantaciones de café. Los autores consideran que podría ser una alternativa ya que los extractos inhibieron el crecimiento micelial en el rango de 3,95% a 32,20% para el *Phoma tarda* y de 7,29% a 33,83% para el *Fusarium solani*. (8)

Kloucek, P. (2005) realizó un ensayo antibacteriano sobre extractos etanólicos al 80% de nueve plantas obtenidos por maceración durante 5 días, una de las muestras ensayadas fue la *C. spinosa* (vainas); se utilizaron cinco cepas Gram positivas y tres Gram negativas usando el método de microdilución del caldo de cultivo. Los resultados son poco relevantes para la muestra mencionada a excepción del ensayo contra *Enterococcus faecalis* en el que se observó una CIM de 0,5 ug/ml, mientras que para *Bacillus cereus* fue de 8 ug/ml y de 16 ug/ml para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacteroides fragilis*. (9)

Justificación:

La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples, debido a que poseen más de un principio activo que actúan inhibiendo el crecimiento de microorganismos generando así un gran interés por parte de los investigadores en estudiar las sustancias naturales que posean propiedades antimicrobianas, no sólo porque en el Perú existe una gran variedad de productos naturales tal como *Caesalpinia spinosa* (tara) que es de fácil acceso a la población, también debido a que actualmente los microorganismos patógenos están siendo resistentes a los antibióticos de uso común dentro de estos microorganismos se encuentra *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*; por eso se dirige los estudios a utilizar productos naturales como métodos alternativos. Por otro lado es relevante mencionar el aumento de pacientes inmunocomprometidos a los cuales los antibióticos les afecta., en tal sentido se plantea evaluar el efecto antifungico in vitro del fruto de *Caesalpinia spinosa* sobre la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.

1. Formulación del problema científico:

¿Cuál es el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Candida albicans* ATCC 90028?

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Comparar el efecto inhibitorio *in vitro* de cuatro concentraciones del extracto etanólico del fruto de *Caesalpinia spinosa* frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

2.2. Objetivos específicos:

- Determinar la concentración inhibitoria mínima de cuatro concentraciones del extracto etanólico del fruto de *Caesalpinia spinosa* frente a *Candida albicans* ATCC 90028.

- Determinar la susceptibilidad de *Candida albicans* ATCC 90028 frente a cuatro concentraciones del extracto etanólico del fruto de *Caesalpinia spinosa*.

3. Hipótesis

Hipótesis nula (H₀):

No existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico del fruto de *Caesalpinia spinosa* sobre *Candida albicans*.

Hipótesis alterna (H_a):

Existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico del fruto de *Caesalpinia spinosa* sobre *Candida albicans*, y el efecto es proporcional a la concentración utilizada.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población Diana o Universo:

La población estuvo conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Candida*.

2. Poblaciones de Estudio:

La población estuvo conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Candida*.

3. Muestra:

3.1. Unidad de Análisis

Estuvo constituido por la placa de Petri que contiene el medio de cultivo correspondiente del microorganismo y el extracto etanólico del fruto de *Caesalpinia spinosa* (tara).

3.2. Unidad de Muestreo

Estuvo constituido por las unidades formadoras de colonias de *Candida albicans* producto del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara).

3.3. Tamaño muestral:

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 (p1.q1 + p2.q2)}{(p1 - p2)^2}$$

Donde:

n = Número de elementos necesarios en cada uno de los dos grupos

p1 = Proporción estimada con el atributo del grupo 1

p2 = Proporción estimada con el atributo del grupo 2

q1 = 1 - p1

q2 = 1 - p2

p2 - p1 = Mínimo nivel de diferencia que desea detectar entre los dos grupos (En estudio y contraste)

Z α = Desviación normal para error alfa. Para 0,05 y dos colas Z α = 1.96

Z β = Desviación normal para error beta. Para 0,2 y una cola Z β = 0.84

Reemplazando valores:

p1 = 0,80

p2 = 0,28

q1 = 0,20

q2 = 0,72

$$Z\alpha = 1,96$$

$$Z\beta = 0,84$$

$$n = \frac{(1,96 + 0,84)^2 ((0,80)(0,20) + (0,28)(0,72))}{(0,28 - 0,80)^2}$$

$$n = 10$$

La muestra estará conformada por 10 aplicaciones (repeticiones) de cada concentración y de los controles, haciendo un total de 100 aplicaciones (repeticiones) para el microorganismo, distribuidas de la siguiente manera:

- Para determinar la susceptibilidad:
 - Caesalpinia spinosa* al 25%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Caesalpinia spinosa* al 50%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Caesalpinia spinosa* al 75%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Caesalpinia spinosa* al 100%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Control (Fluconazol): 10 aplicaciones (repeticiones)

- Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM):
 - Caesalpinia spinosa* al 25%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Caesalpinia spinosa* al 50%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Caesalpinia spinosa* al 75%: 10 aplicaciones (repeticiones)

Caesalpinia spinosa al 100%: 10 aplicaciones (repeticiones)

Control (Fluconazol): 10 aplicaciones (repeticiones)

4. Diseño de Estudio

Preparación extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa*

Concentración extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa*
Volumen: 22,5ml



Caesalpinia spinosa al 100%
V.*Caesalpinia spinosa*: 10ml
V. etanol: 0ml
Concentración: 1000mg/mL



Caesalpinia spinosa al 75%
V.*Caesalpinia spinosa*: 7.5 ml
V. etanol: 2.5 ml
Concentración: 750mg/mL

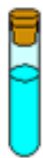


Caesalpinia spinosa al 50%
V.*Caesalpinia spinosa*: 5 ml
V. etanol: 5 ml
Concentración: 500mg/mL



Caesalpinia spinosa al 25%
V.*Caesalpinia spinosa*: 2.5 ml
V. etanol: 7.5ml
Concentración: 250 mg/mL

EFFECTO DEL *Caesalpinia spinosa*
SOBRE *Candida albicans*



MUESTRA



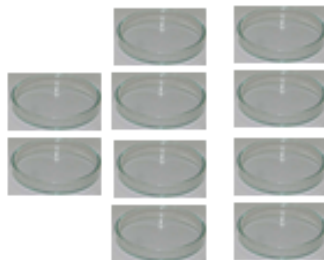
CEPAS JÓVENES



Cepa de *Candida albicans*

Colonias jóvenes de Cepa *Candida albicans*

Solución salina 0.5 de
Mc Farland 1.5×10^8
UFC/ml



Cajas Petri
con Agar

Sabou
raud

SIEMBRA

Operacionalización de Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUA L	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO VARIABLE	DE ESCALA S DE MEDICI ÓN
DEPENDIENTE: EFECTO FUNGICIDA	Evita desarrollo de un microorganismo, llámese <i>Candida albicans</i> .	(Indicadores) EFECTO FUNGICIDA: Se medirá mediante mm a través de los halos de inhibición antimicrobiana. CONCENTRACI ÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM): Se medirá el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), mediante el uso del contador de colonias	CUANTITATIVA Mediante escala de Durafford. UFC: bact/mL	DE RAZÓN ORDINA L
INDEPENDIENTE	La <i>Caesalpinia spinosa</i> perteneciente a la familia	NOMINAL	CUALITATIVA	ORDINA L

<p><i>Caesalpinia spinosa</i></p>	<p>Fabaceae es una planta oriunda del Perú utilizada desde la época prehispánica en la medicina tradicional y en años recientes en la industria peletera o en la producción de goma de tara. Gracias a la presencia de taninos y flavonoides encontrados en el estudio fitoquímico del extracto de <i>C. spinosa</i>, han desarrollado aplicaciones medicinales.</p>	<p>Se medirá mediante su aplicación en diversas concentraciones: 25%, 50%, 75% y 100%</p>		
-----------------------------------	--	---	--	--

5. Procedimientos:

A) De la aprobación del proyecto:

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación fue la obtención del permiso para la ejecución mediante la aprobación del proyecto por el Comité Permanente de Investigación Científica de la Escuela de Medicina de la

Universidad Privada Antenor Orrego con la correspondiente Resolución Decanal.

B) De la autorización para la ejecución:

Una vez aprobado el proyecto se prosiguió a solicitar el permiso para poder trabajar en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego.

C) De la obtención de la tara:

Se recolectó 1 Kg del fruto de *Caesalpinia spinosa* del jardín botánico de Plantas Medicinales “Rosa Elena De los Ríos Martínez” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, situado a 34 m.s.n.m. en el distrito de Trujillo, departamento de La Libertad.

La recolección de la especie se realizó por el método convencional o clásico de herborización, para lo cual se seleccionó el material en el campo, a horas de la mañana, verificando que esté en buenas condiciones. (19)

D) Identificación y determinación taxonómica de la especie

Un ejemplar completo de la planta se llevó al Herbario Antenor Orrego de la Universidad Privada Antenor Orrego para su identificación y posterior verificación taxonómica según el sistema filogenético de la especie.

E) Preparación de la muestra

– **Selección de la muestra:** El material recolectado fue transportado al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

de la Universidad Nacional de Trujillo, en donde se eliminó las sustancias extrañas presentes en el material vegetal.

- **Lavado del fruto de *C. spinosa*:** Luego de la separación de las sustancias extrañas, se prosiguió a lavar la muestra con agua destilada y desinfectada con hipoclorito de sodio.
- **Secado:** Una vez desinfectada, la muestra, fue secada en estufaa 40°C. por 3 días.
- **Molienda:** Se prosiguió a separar las semillas de las cáscara de *Caesalpinia spinosa* y, sólo se pulverizará la vaina con ayuda de un mortero.
- **Tamizaje:** Se pasó la muestra molida por un set de tamices para homogenizar el tamaño de partículas, y luego fue colocada en frascos de vidrio de color ámbar para su posterior utilización. (20)

F) Obtención del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara):

Del material pulverizado y tamizado, se pesó 50 gr. de polvo de las vainas de *C. spinosa*. Este se colocó en un frasco de vidrio de color ámbar y se le agregó 200 ml de alcohol de 70°, y se dejó macerar por 1 semana, agitando todos los días. Al 4^{to} día se agregó 100 ml más de alcohol de 70° y se siguió agitando hasta completar la semana.

El producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatmann N° 41, un segundo filtrado será realizado con papel filtro Whatmann N° 2 y por último se realizó un tercer filtrado con papel Whatmann N° 1. Luego se concentró en rotavapor y se llevó a la estufa a 40 °C hasta sequedad.

A partir de la masa de extracto seco de *Caesalpinia spinosa*(tara) se preparó las concentraciones de 25%, 50% 75% y 100%, las cuáles fueron guardadas en frascos de color ámbar estériles y conservadas en refrigeración hasta el momento de su utilización en el ensayo antibacteriano. (20)

G) Obtención de la cepa:

En este estudio se utilizó un cultivo puro estandarizado de *Candida albicans* ATCC 90028 la cual se mantiene en el cepario del laboratorio de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

H) Preparación del inóculo:

Obtenida la cepa, ésta se cultivó en tubos de ensayo cerrados herméticamente conteniendo el medio agar Sabouraud para *Candida albicans* ATCC 90028.

Se incubaron 37°C con el fin de obtener colonias jóvenes. Luego de 24 horas se prepararon las cepas empleando solución salina, se diluyeron en solución salina estéril, hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0,5 de la escala de Mac Farland que corresponde a 10⁸ hongos/mL. Los tubos fueron girados entre las manos durante 30 segundos antes de proceder al sembrado para distribuir los microorganismos adecuadamente.

I) Prueba del efecto antifúngico: Para determinar la susceptibilidad de *Candida albicans* se utilizó el método de difusión de discos de

Kirby y Bauer, preparando cuatro concentraciones de *Caesalpinia spinosa* (tara). Una vez preparadas las concentraciones se embebieron los discos de papel filtro estéril con las concentraciones preparadas y el grupo control con fluconazol por 1 hora.

Un hisopo estéril fue embebido con la cepa preparada y a una distancia de 10 cm de la llama del mechero se prosiguió al sembrado en camada en placas petri conteniendo Agar Sabouraud para las cepas de *Candida albicans*, se sembraron uniformemente sobre toda la superficie del agar, girando cada placa 30 grados 10 veces aproximadamente.

Luego con una aguja estéril se prosiguió a colocar sobre el cultivo de *Candida albicans* en las placas petri previamente preparados los discos de papel filtro estéril embebidos por 1 hora con las concentraciones preparadas de *C. spinosa* y el grupo control con fluconazol; las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 10 minutos.

Posteriormente, las placas se voltearon de posición y se incubaron, a una temperatura de 37° C durante 24 horas.

Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

La lectura se llevó a cabo a las 24 horas mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuó tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans*. Finalmente se evaluaron los resultados mediante la escala de Durafford:

Escala de Durafford: Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio *in vitro*, según diámetro de inhibición.

Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.

Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.

Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

I.2) Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM):

Para determinar la concentración inhibitoria mínima del *Caesalpinia spinosa*(tara) se realizó los siguientes pasos: Se prepararon diluciones en tubos de ensayo conteniendo solución salina más las concentraciones de *Caesalpinia spinosa* (tara) 25%, 50%, 75% y 100%.

Después del proceso de dilución se colocaron en tubos de 13 x 100 ml, 0.8 mL de cada concentraciones más un inóculo de 0.2 ml de los cultivos con la cepa preparada. También se prepararon los grupos control con 0.8 mL de fluconazol y 0.2 mL de la cepa y un control con el cultivo de la cepa sin tratamiento (1 mL).

Todos los tubos se llevaron a incubación a 37° C por un lapso de 24 horas.

La determinación de la CIM, se realizó luego de 24 horas empleando Agar Sabouraud para *Candida albicans* tomando 0,1 ml de cada uno de los tubos y dispersándolo en toda la placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando el asa de Driglasky.

Después del sembrado todos los cultivos fueron llevados a incubación a 37°C por 48 horas.

Todos los ensayos fueron realizados bajo condiciones asépticas y se efectuarán 10 repeticiones por concentración. Después de las 48 horas se realizó el conteo de las colonias en

cada una de las placas. La concentración inhibitoria fue aquella en la que se inhibió completamente el desarrollo de los gérmenes.

J) Controles:

Se utilizó como controles discos de Fluconazol para *Candida albicans* ATCC 90028 y se procesaron de la misma manera que las muestras experimentales.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM):

El control será solución salina más el cultivo de *Candida albicans* ATCC 90028.

5.5. Instrumento de Recolección de Datos

Los datos obtenidos fueron registrados en una Ficha (ANEXO N°1 y N°2).

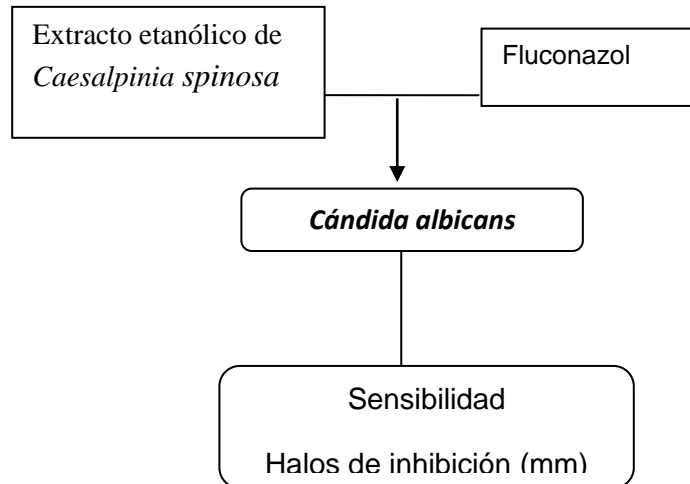
6. Recolección y Análisis de Datos

El procesamiento de la información fue automático y se utilizó una computadora Pentium IV con Windows SEVEN y el Paquete estadístico SPSS 18.0

- **Estadística descriptiva:** Para analizar la información se construirán tablas de distribución de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y su desviación estándar.
- **Estadística analítica:** Para determinar el efecto in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Candida*, se utilizó un análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado para el efecto fungicida analizado por el halo de inhibición, luego se hizo una prueba de comparaciones múltiples: Prueba Duncan, ambas con un nivel de significancia del 5%.

Todos estos datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del paquete estadístico SPSS- 18.0.

Estadígrafo propio del estudio:



7. Aspectos éticos:

El proyecto de investigación se presentó para consideración, comentario, consejo y aprobación a los comités designados por la Facultad de Medicina de la UPAO.

Al realizar la investigación se tuvo en cuenta principios de bioseguridad, prestando atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente. Declaración de Helsinki. (21)

III.RESULTADOS

Basado en los resultados del presente trabajo de investigación in vitro para evaluar el efecto de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 se realizaron las siguientes tablas y gráficos:

Tabla N° 1

Efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 a través de la susceptibilidad de halos de inhibición.

Indicador del diámetro del halo(mm)	<i>Concentración de extracto de Caesalpinia spinosa</i>			
	25%	50%	75%	100%
- Media	8.60	10.90	14.60	17.75
- Desviación estándar	0.52	0.84	1.33	2.45
<i>Prueba F</i>	F=108.82	p=0.000	p<0.01	
<i>Prueba de Duncan entre grupos</i> ⁺	a	b	c	d

+; Comparación entre parejas de grupos con la misma letra no difieren estadísticamente (p>0.05)

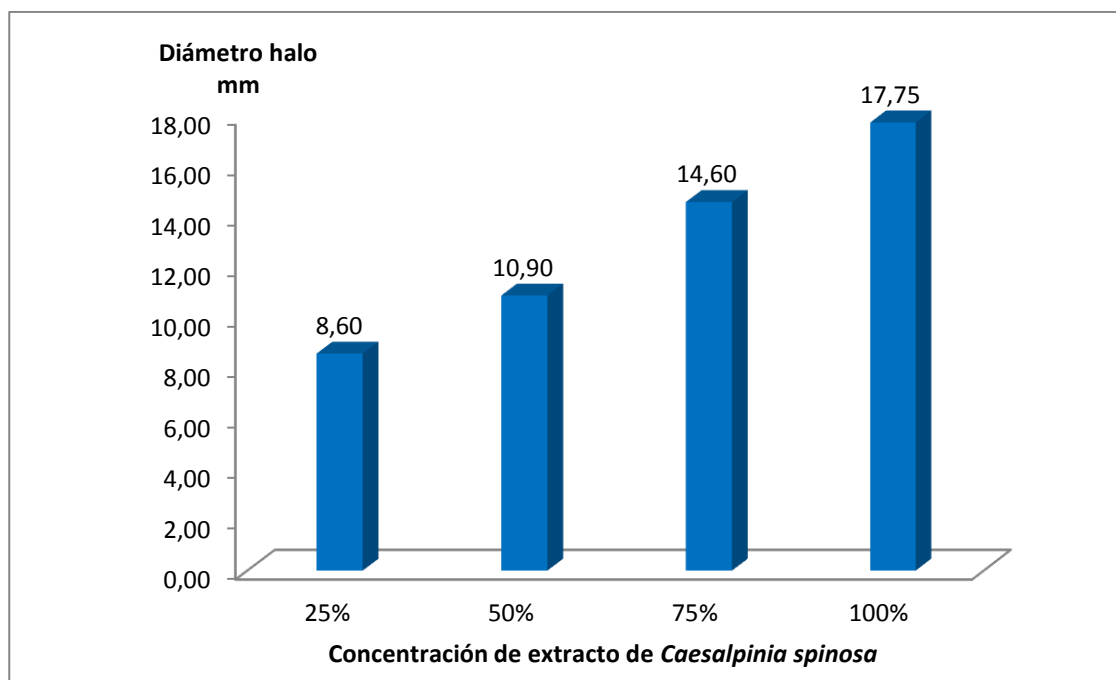


Figura 1.- Efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 a través de la susceptibilidad de halos de inhibición.

En la **tabla 1** se evalúa el efecto de las diferentes concentraciones sobre la cepa mediante la susceptibilidad en el diámetro del halo de inhibición. Con una concentración de extracto al 25% se obtiene una media y una desviación estándar del diámetro en 8.60 mm y 0.52 mm respectivamente, con el 50% se reporta 10.20 mm y 0.84, con el 75% una media y desviación estándar de 14.60 mm y 1.33 respectivamente; mientras que para el 100% se obtiene 17.75 mm y 2.45, con una tendencia creciente al aumentar la concentración. Al someterse los datos a la prueba F del análisis de varianza que compara las medias de cada grupo de estudio se obtiene un valor $F= 108.82$, con una diferencia altamente significativa ($p<0.01$), es decir al menos una de las concentraciones produce efecto medio diferente.

Para complementar el análisis se aplica la prueba de Duncan que compara los promedios por parejas de grupos o tratamientos. La prueba de Duncan nos indica que existe diferencia significativa ($p<0.05$) al comparar cualquier pareja de tratamiento, lo que

permite señalar que todos tienen efectos diferentes en cuanto a la susceptibilidad en el diámetro del halo de inhibición.

Tabla N° 1A

Comparación del efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028; respecto al control, a través de la susceptibilidad en el diámetro del halo de inhibición.

Indicador del diámetro del halo(mm)	<i>Concentración de extracto de Caesalpinia spinosa</i>				Control
	25%	50%	75%	100%	
Media	8.60	10.20	14.60	17.75	42.60
Comparación: Respecto al control*	A	b	c	d	e

+: Comparación entre parejas de grupos con la misma letra no difieren estadísticamente ($p > 0.05$)

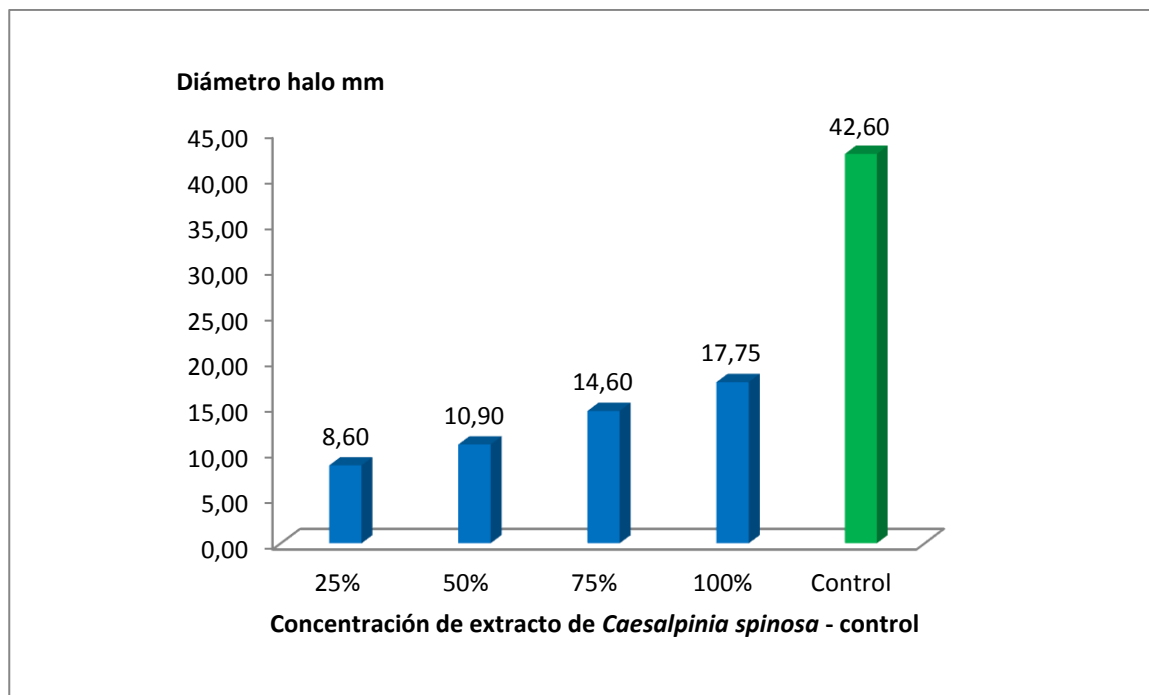


Figura 1A.- Efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028; respecto al control, a través de la susceptibilidad en el diámetro del halo de inhibición.

En la **tabla 1A** se aprecia las concentraciones del extracto sobre la susceptibilidad en el diámetro del halo, considerando también el efecto del grupo control. El grupo control (Fluconazol) presenta un valor medio del diámetro del halo de 42.60 mm, valor que se diferencia con cualquiera de los grupos de estudio. El fluconazol tiene mayor efecto sobre la susceptibilidad del halo respecto a las concentraciones en estudio.

FOTOS:

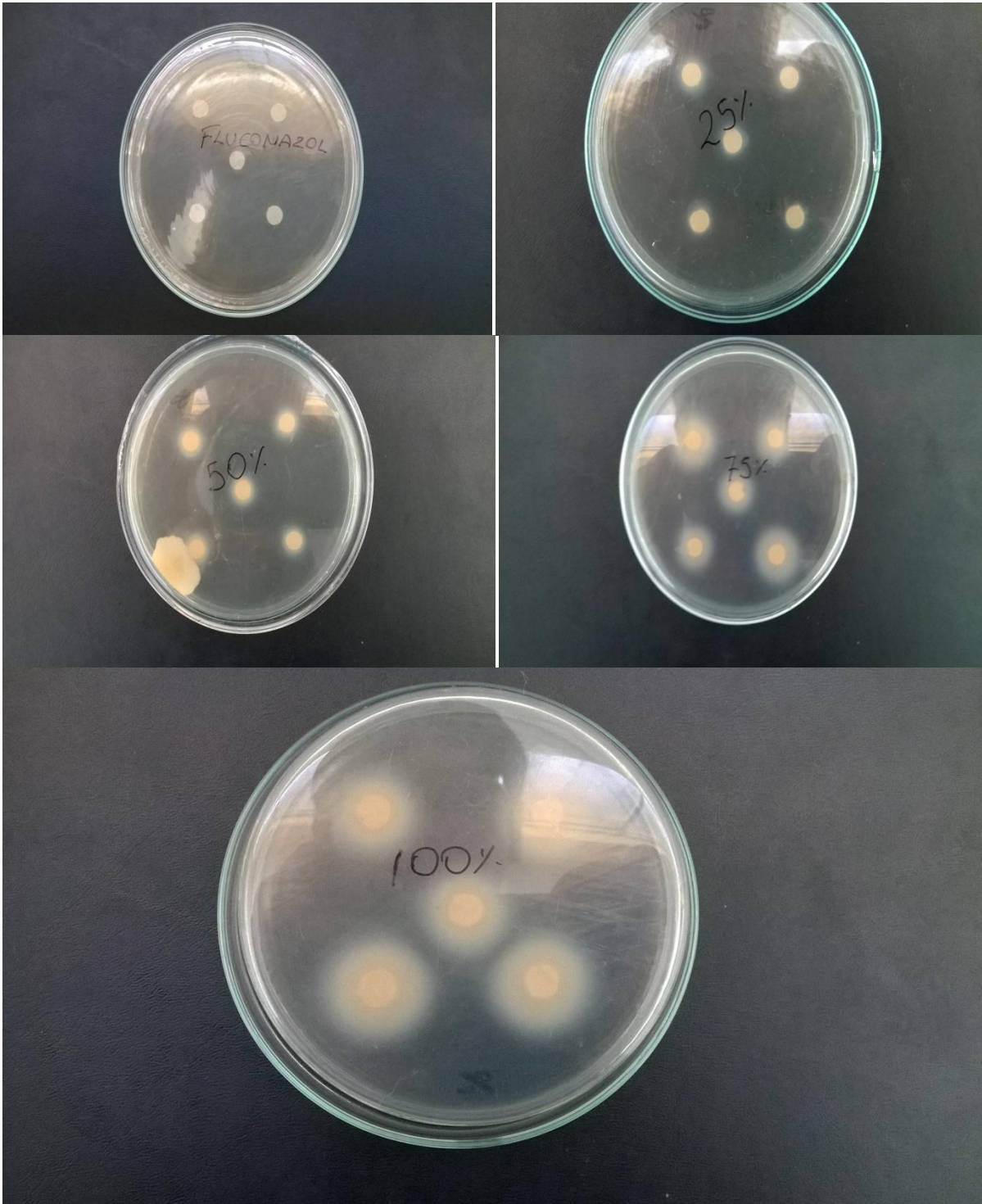


Tabla N° 2

Efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 a través de la concentración inhibitoria mínima (UFC).

Indicador UFC	<i>Concentración de extracto de Caesalpinia spinosa</i>			
	25%	50%	75%	100%
Media	1.60	0.00	0.00	0.00
Desviación estándar	1.35	0.00	0.00	0.00
<i>Prueba F</i>	F=14.05	p=0.000	p<0.01	
<i>Prueba de Duncan entre grupos⁺</i>	a	b	b	b

+: Comparación entre parejas de grupos con la misma letra no difieren estadísticamente ($p>0.05$)

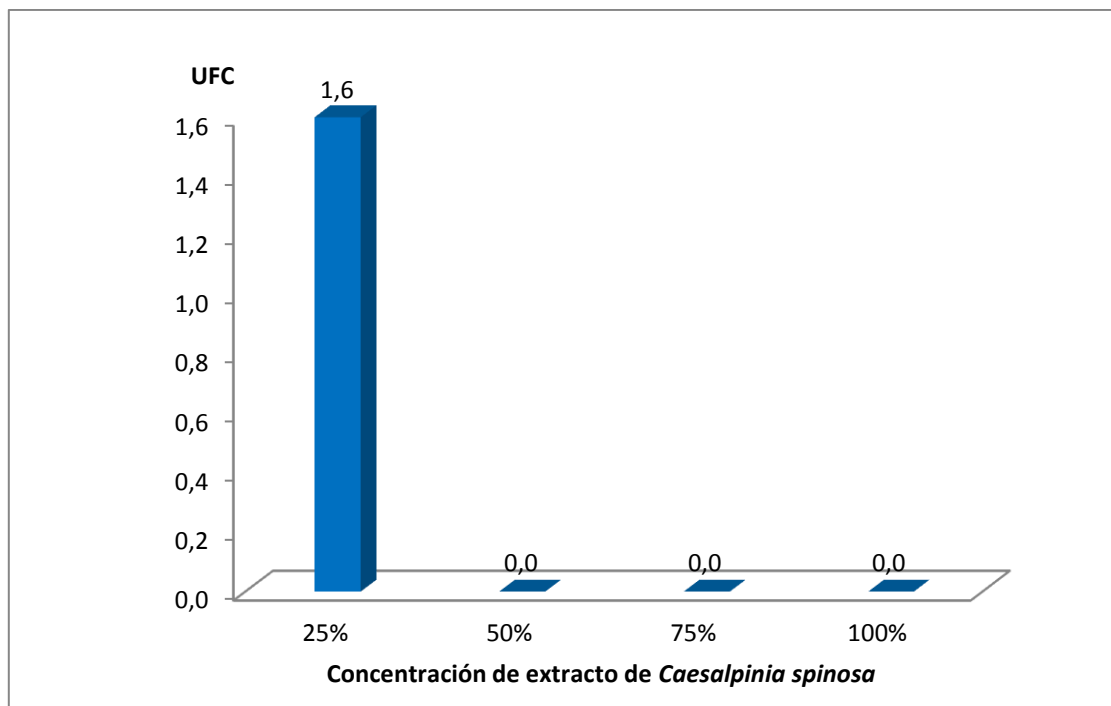


Figura 2.- Efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 a través de la concentración inhibitoria mínima (UFC).

En cuanto al efecto de las diferentes concentraciones del extracto sobre la *Candida albicans* ATCC 90028 evaluado en el número de UFC (unidades formadoras de colonias), se puede distinguir en la **tabla 2** que en el 50%, 75% y 100% no se observaron UFC, con una erradicación de las mismas. La prueba F del análisis de varianza $F=14.05$ declara una diferencia estadística altamente significativa ($p<0.01$), es decir al menos una de las concentraciones tiene efecto medio diferente. La prueba de Duncan nos dice que las concentraciones del extracto al 25% tienen efecto diferente respecto a las otras concentraciones. No existe diferencia entre las concentraciones al 50%, 75% y 100%, ya que se obtiene la erradicación de las UFC.

Tabla N° 2A

Comparación del efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028; respecto al control, a través de la concentración inhibitoria mínima (UFC).

Indicador del diámetro del halo(mm)	<i>Concentración de extracto de Caesalpinia spinosa</i>				<i>Control</i>
	25%	50%	75%	100%	
Media	1.60	0.00	0.00	0.00	0.80
Comparación: Respecto al control*	a	b	b	b	c

+: Comparación entre parejas de grupos con la misma letra no difieren estadísticamente ($p > 0.05$).

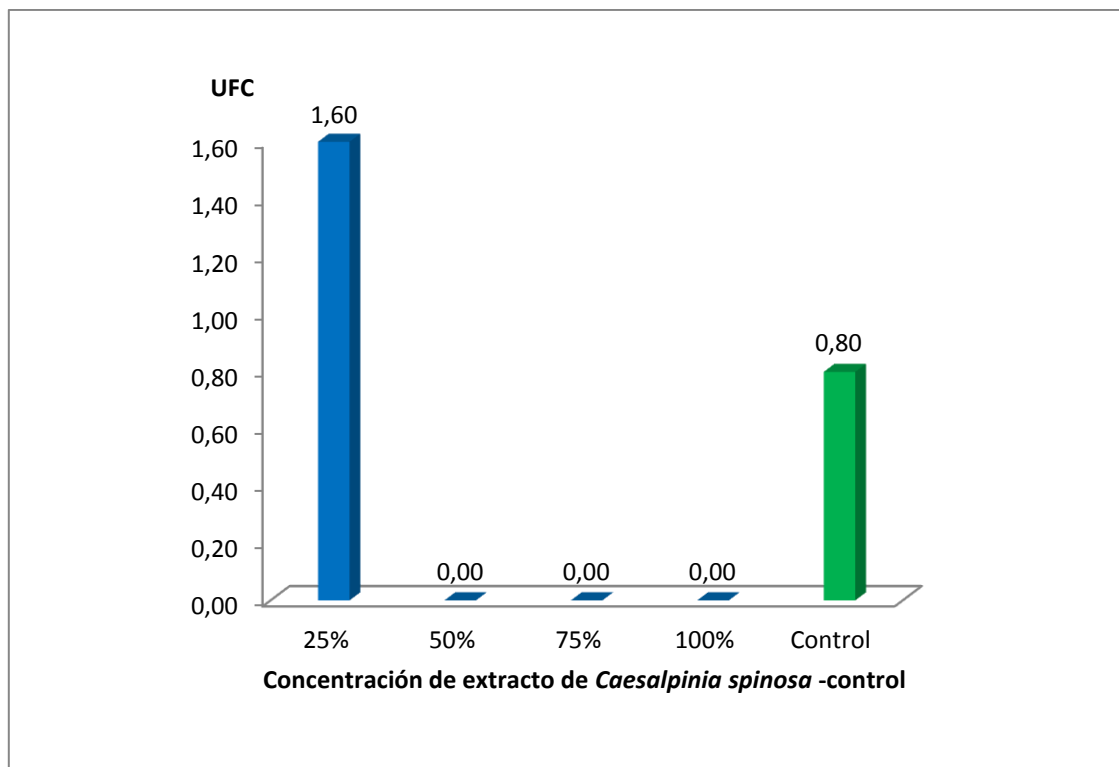
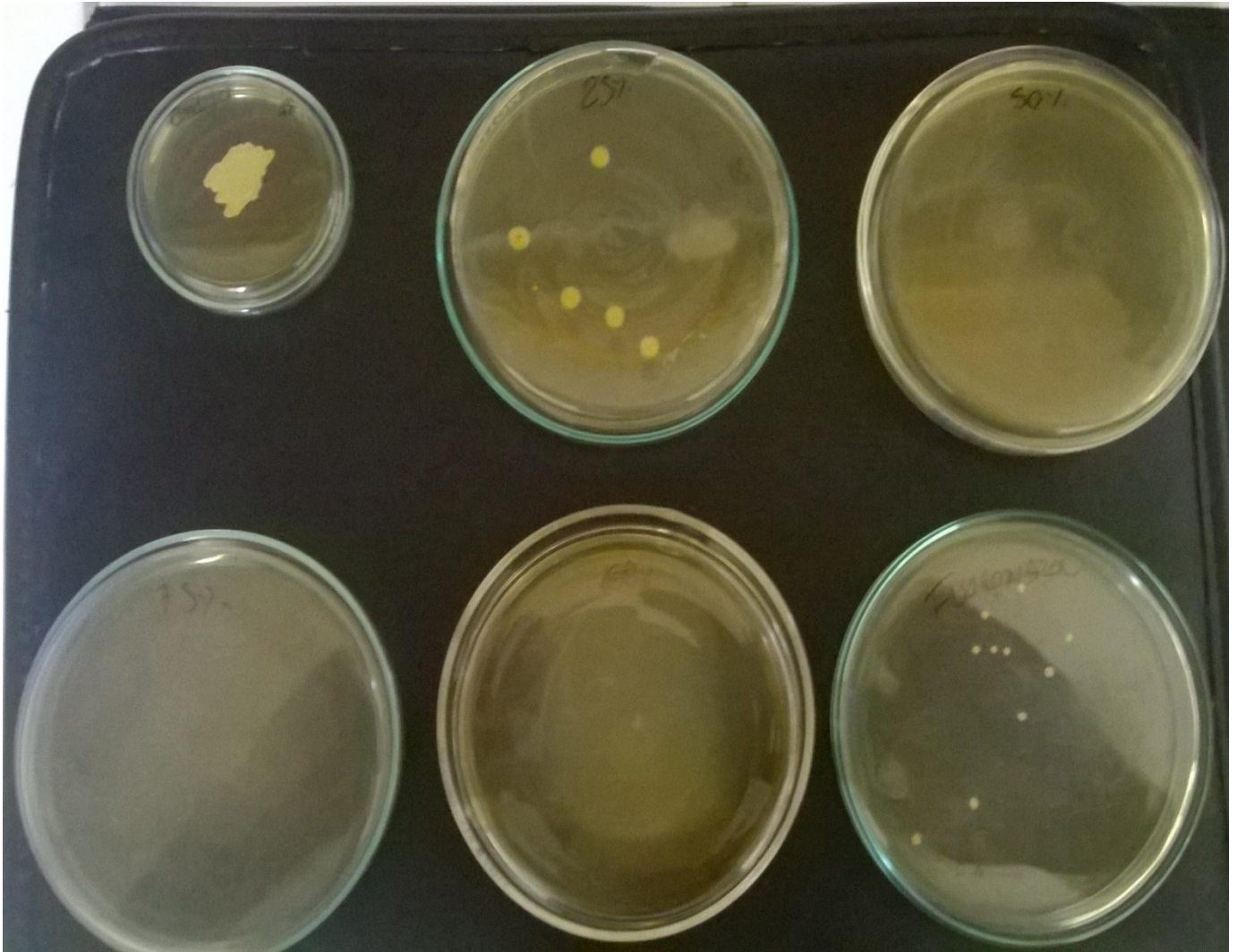


Figura 2A.- Efecto inhibitorio in vitro de concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 90028; respecto al control, respecto al control, a través de la concentración inhibitoria mínima (UFC).

En la **tabla 2A**, en los que se refiere a la comparación entre grupos incluyendo al grupo control (Fluconazol), la prueba Duncan nos indica que existe diferencia estadística entre el control con las concentración al 25%, también existe diferencia entre el efecto medio del grupo control con el grupo al 50%, al 75% y al 100% de concentración. De acuerdo al resultado de esta tabla, el grupo control es mejor que la concentración al 25% pero en promedio mayor de UFC respecto a las otras concentraciones.

FOTOS:



IV. DISCUSIÓN

Desde hace unos años, el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante. Esto se debe a una serie de factores, entre los cuales debemos destacar el conocimiento preciso de su composición química, y el hecho de que en la actualidad dicha utilización se fundamenta en numerosos ensayos farmacológicos in vivo como in vitro, así como en ensayos químicos. De esta forma, el uso de las especies vegetales medicinales que se ha venido haciendo en forma empírica y basada en la tradición tiene hoy una base científica. (22)

En el presente estudio de tipo experimental, demostró el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosaa* cuatro diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% frente a cepas de *Candida albicans*, presentando una CMI en la concentración al 50% ya que no se logro evidenciar UFC a partir de dicha concentración para adelante. Estos resultados contrastan con los obtenidos por **Sampaio, F (2009)**, el cual utilizo extracto etanólico de *Caesalpinia ferrea Martius* contra los microorganismos patógenos orales más comunes, entre ellos *Candida albicans*, obteniendo una concentración mínima inhibitoria a una concentración al 25%. Dichos resultados pueden diferir posiblemente a factores intrínsecos y externos tales como la variedad vegetal, el tipo de suelo, la temperatura ambiental, su cultivo, su cosecha y el método de extracción, los cuales pueden afectar la composición química.(15)

Con respecto a los halo de inhibición, se logró obtener una media de 8.6 mm al 25%, 10.2 al 50%, 14.6 mm al 75% y al 100% una media de 17.75 mm, obteniéndose al medir según escala de Durafford una sensibilidad límite con la concentración al 25% y 50% y una sensibilidad media (++) al 75% y 100%; como se puede observar dicha sensibilidad se obtiene de forma ascendente según las concentraciones administradas. Estos resultados difieren con los obtenidos por **Huarino, A (2011)**, el cual en dicho trabajo utiliza el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a la flora salival mixta, utilizando concentraciones al 6.25%, 12.5%, 25%, 50% y 75%; obteniendo al medir según escala de Durafford una concentración al 50% como sensibilidad media y al 75% como sumamente sensible. Dichos resultados contrastan con los obtenidos ya que en dicho trabajo se utiliza

el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* en diferentes tipos de cepas que se encuentran en la flora salival mixta, a diferencia del nuestro que solo utilizamos en una única cepa de *Candida albicans*, teniendo mayor efecto fungicida que bacteriano. (20)

Los estudios hasta ahora realizados demuestran que la “taya” contiene taninos, flavonoides, y gomas, de allí su uso terapéutico en medicina popular. (23) La vaina representa el 62% del posee la mayor concentración de taninos que oscila entre 40% y 60%. Las vainas de *Caesalpinia spinosa* contienen hasta 25 % de ácido gálico, que es uno de los mayores constituyentes de los taninos. (24)

Probablemente los taninos serían los fitoconstituyentes con mayor propiedad antibacteriana, al precipitar las proteínas (enzimas), implicadas en las diversas rutas microbianas. (24)

Lock de Ugaz, (25) en su investigación demuestra que los fenoles y flavonoides, constituyentes también de *Caesalpinia spinosa*, tienen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, y antifúngicas, cuya acción provoca lesiones en la membrana citoplasmática, ocasionando una disfunción en la composición interna de las células.

Los resultados obtenidos con el presente trabajo de investigación indican el efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* frente cepas de *Candida albicans*, es así que el presente estudio abre nuevas posibilidades en el campo de la investigación clínica como farmacológica, constituyendo así una alternativa natural, eficiente y de bajo costo.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) presenta efecto inhibitorio *in vitro* frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 90028.
2. El efecto inhibitorio varía al utilizar el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* a diferentes concentraciones, y este efecto se incrementa en relación directamente proporcional a las concentraciones utilizadas en el estudio.
3. La concentración inhibitoria mínima *in vitro* fue de 50 % para el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a las cepas de *Candida albicans* utilizadas en el presente estudio.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar otros estudios para ampliar el espectro de actividad antifúngica del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) en concentraciones menores.
- Se recomienda aislar los principios activos causantes de la actividad antifúngica de la *Caesalpinia spinosa* (Tara).
- Se recomienda realizar pruebas *in vivo* para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *Caesalpinia spinosa*, así como la dosis terapéutica y la concentración óptima para ser utilizado como medicamento.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Salvador C., Eduardo D., Arnaldo L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. Lat. Am. J. Pharm. Marzo 2008; 22 (3): 265-78.
2. Víctor Benavides, Guadalupe D'Arrigo, José Pino. EffectsofaqueousextractofOriganumvulgare L. (Lamiaceae) onthepreimplantational mouse embryos. Revista peruana de biologia Diciembre 2010; 17(3): 381 – 384. URL: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
3. Ulibarri, E. A. 1996. Sinopsis de Caesalpinia y Hoffmannseggia (Leguminosae - Caesalpinioideae) de Sudamérica. Darwiniana 34:329.
4. Brako, L.; Zarucchi, J.L. 1993. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 45: i–xl, 1–1286.
5. Nicolas D., José R., Grischa B., Asunción C., María I., Maximilian W. *Factsheet: Datos botánicos de Tara* [en línea]. Lima: Billy Víctor Odiaga Franco, 2009. [Consulta: setiembre del 2009]. Disponible en: <http://perubiodiverso.pe/assets/Hoja-Bot%C3%A1nica-Tara-20091.pdf>
6. Cabello Isabel. Monografía para el cultivo de la tara Caesalpinia Spinosa (Molina) Kuntze [en línea]. Lima: Perúbiodiverso, 2009. Disponible en: <http://perubiodiverso.pe/assets/Monograf%C3%ADa-del-cultivo-de-la-tara1.pdf>
7. Gutiérrez-Martínez MJ, Araiza-Santibáñez J, Hernández MA, Chávez-Mayol JM, Rodríguez-Piñeyro OM, Bonifaz A. Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de Candida aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. DermatolRevMex 2012; 56(2):93-101.

8. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *ClinInfectDis*2005; 41:1455–60.
9. Panizo M. M, Reviákina V. *Candidaalbicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [revista en la Internet]. 2001 Jul [citado 2013 Oct 17]; 21(2):38-45. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es.
10. Braunwald E., Fauci A., Hauser S., *Principios de Medicina Interna*. 16° Ed. Edit Mc Graw Hill Interamericana. 2006.
11. Agapito T, Sung I. *Plantas Medicinales*. 7.a ed. Lima- Perú: Isabel. 2000: 53.
12. Kuklinski C. *Farmacognasia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. 1.a ed. Barcelona: Omega. 2000:112-114.
13. Escobar BL. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpiniaspinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacteriumdiphtheriae*. *Rev. Med. Vallejana*. 2008; 5(1):28-37.
14. Añanca E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpiniaspinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis bachiller. Fac. Farmacia y Bioquímica: UnivNac Jorge Basadre Grohmann. Tacna. 2009.
15. Sampaio C. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpiniaferrea* Martius fruit against oral pathogens. *J. of Ethnopharmacology*. 2009; 124(2):289-294.
16. De La Cruz M. Efecto del extracto hidroalcoholico de *Caesalpiniaspinosa*(Molina) Kuntze “taya” sobre la viabilidad de *Streptococcusβ* hemolítico. (TesisMaestral). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2006

17. Ferreira, J., Cardoso, M., Estevao de Souza, P. Inhibitory Effect of *Caesalpiniaspinosa* Leaflets Crude Extract of *Fusariumsolani* and *Phomatarda*. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 2005, 27/2: 185-188.
18. Kloucek, P., Polezny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., Kokoska, L. Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Calleria District. *J. of Ethnopharm.* 2005, 99:309- 312.
19. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana: Universidad de la Habana; 2000
20. Huarino M. 2011. Efecto antibacteriano de *Caesalpiniaspinosa* (tara) sobre flora salival. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
21. Manzini J. Declaración de Helsinki: Principios Éticos para la Investigación Médica Sobre Sujetos Humanos. *acta bioeth.* [online]. 2000, vol.6, n.2 [citado 2013-10-24], pp. 321-334. Disponible en:
<http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1726-569x2000000200010&lng=es&nrm=iso>. issn 1726-569x.
<http://dx.doi.org/10.4067/s1726-569x2000000200010>.
22. Araujo J. , Ramsés A.. Actividad Antimicrobiana de Plantas. *Rev. Perú.* [revista en línea] 2008 [fecha de acceso 20 de noviembre 2010]; 6(1): 6-7.
URL Disponible en: http://www.ucsur.edu.pe/documentos/cientifica_06.pdf
23. De la Cruz LP. Aprovechamiento Integral y Racional De La Tara. *Rev. Inst. investig. Fac. minas metal cienc. geogr.* [revista en línea] 2004 [fecha de acceso 17 de enero del 2010]; 7 (14): 64-73.
URL Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/iigeo/v7n14/a09v7n14.pdf>

24. López C, Garró V, Yrei V, Gallardo T. Acción antimicrobiana *Caesalpineatintoria* (Molina) kuntze o Tara, de diferentes regiones del Perú. *Rev. Ciencia e Investigación* [revista en línea] 1998 [fecha de acceso 5 de enero del 2010]; 1(1).URL Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v01_n1/acciona.htm
- 25 Lock de Ugaz, O. *Investigación Fotoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. 2º ed. Perú: Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.

Anexo Nro. 01

Ficha de Recolección de datos

Determinación del Efecto fungicida

Repeticiones	Halos de inhibición por concentración de extracto etanólico en (%) y por controles (mm)				
	Fluconazol	25	50	75	100
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Anexo Nro. 02
 Ficha de Recolección de datos

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Repeticiones	Unidades formadoras de colonias (UFC) por concentración de extracto etanólico en (%) y por controles					
	Fluconazol	25	50	75	100	Cultivo sin tratar
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

Anexo Nro. 03

FOTOS



1.- OBTENCIÓN DE LA TARA



2.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



2.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



3.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caesalpinia spinosa* (tara)



3.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caesalpinia spinosa* (tara)



3.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caesalpinia spinosa* (tara)



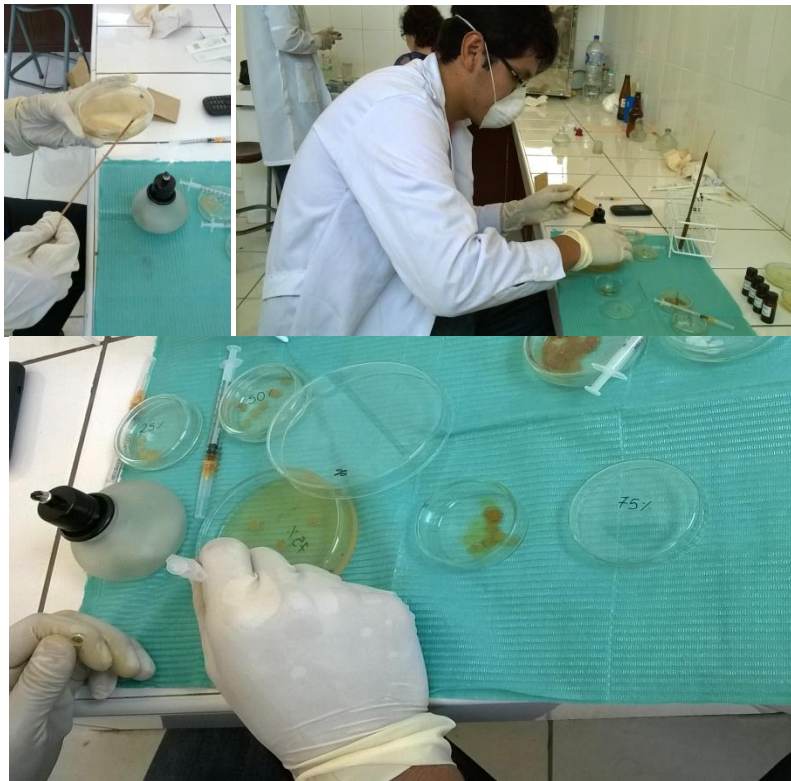
4.- OBTENCIÓN DE LA CEPA



5.- PREPARACIÓN DEL INÓCULO



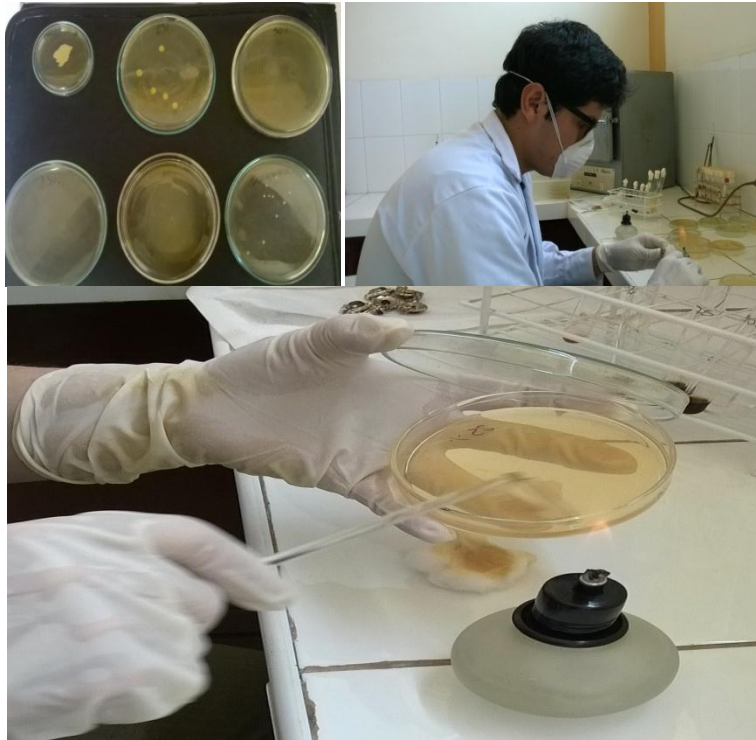
6.- PRUEBA DEL EFECTO ANTIMICROBIANO



6.- PRUEBA DEL EFECTO ANTIMICROBIANO



6.- PRUEBA DEL EFECTO ANTIMICROBIANO



7.- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)