



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum  
(COPOAZU) FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS *S.*  
*pyogenes* Y *S. aureus***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**AUTORES:**

**Bach. BAEZ MAMANI, ALCIDA**

<https://orcid.org/0000-0002-2426-9755>

**Bach. HUMPIRI PARIZELA, ROXANA MARIBEL**

<https://orcid.org/0000-0001-8284-4757>

**ASESOR:**

**Mg. MONTANCHEZ MERCADO, ENRIQUE**

<https://orcid.org/0000-0003-0067-7778>

**LIMA – PERÚ**

**2022**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis es una parte de mi vida, y una meta cumplida, y con ella de muchos sueños y anhelos, por eso este trabajo va dedicado a DIOS por darme la vida, la fuerza y espíritu de superación, a mi esposo Marcial, sobre todo a mis padres Elías e Hilaria, también a todos mis hermanos por sus apoyos incondicionales.

Baez Mamani, Alcida

A Dios por darme la vida y estar siempre conmigo, guiándome en mí camino. A mi madre Eugenia Parizela Huanca quien con su amor, paciencia y esfuerzo me ha permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

Humpiri Parizela, Roxana Maribel

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por bendecirnos la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

A nuestros familiares quienes son nuestro motor y mayor inspiración, por su apoyo incondicional.

Agradecemos a nuestros docentes de la Carrera Farmacia y Bioquímica, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial, en memoria del Q.F. Carlos Ángel Murga Casas quien con su paciencia y enseñanza de sus valiosos conocimientos como docente hicieron que podamos crecer día a día como profesional.

Y por supuesto a la Universidad María Auxiliadora, por permitirnos concluir con una etapa de nuestras vidas, gracias por la paciencia, orientación y guiarnos en el desarrollo de esta investigación.

## Índice General

	<b>Páginas</b>
<b>Resumen</b>	vii
<b>Abstract</b>	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	09
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	20
2.2 Población, muestra y muestreo	20
2.3 Variables de investigación	21
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	22
2.5 Proceso de recolección de datos	22
2.6 Métodos de análisis estadístico	23
2.7 Aspectos éticos	23
<b>3. RESULTADOS</b>	24
<b>4. DISCUSIÓN</b>	31
4.1 Discusión de resultados	31
4.2 Conclusiones	35
4.3 Recomendaciones	35
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	36
<b>ANEXOS</b>	40

## Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados del ensayo de Ph	24
Tabla 2. Prueba de miscibilidad	24
Tabla 3. Resultados del ensayo fitoquímico	25
Tabla 4. Halos de inhibición de ensayo microbiológico en <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i>	26
Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico	27
Tabla 6. Prueba de normalidad por el test de Shapiro-Wilk	28
Tabla 7. Comparación de medias por el ANOVA.	29
Tabla 8. Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey	30

## Índice de Anexos

<b>Anexo A.</b> Operacionalización de la variable	40
<b>Anexo B.</b> Instrumento de recolección de datos	41
<b>Anexo C.</b> Certificación taxonómica	42
<b>Anexo D.</b> Evidencias fotográficas del trabajo de campo	44
<b>Anexo E.</b> Informe de laboratorio	53
<b>Anexo F.</b> ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> 25923	54
<b>Anexo G.</b> ATCC <i>Streptococcus pyogenes</i> 19615	55

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazu) frente a bacterias patógenas *S. pyogenes* y *S. aureus*.

**Métodos:** La muestra fue 1,814 Kg., se trabajó con las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% diluidas con N-Hexano y 150 ml de AE. Se utilizó el método de prensado en frío para la obtención del AE de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazu) y la técnica de difusión en disco para evaluar la actividad antibacteriana. La marcha fitoquímica se realizó en forma cualitativa.

**Resultado:** En la marcha fitoquímica se encontró alcaloides, lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas. Se evidencia que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo vancomicina con 22.44 mm frente a *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, el grupo experimental al 100% evidenció un halo inhibición medio de 9.02 mm, seguido de los aceites al 75, 50 y 25% con halos de inhibición medios de 8.24, 7.32 y 6.82 mm. Por otro lado, el ensayo frente a *Streptococcus pyogenes* evidenció que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo vancomicina con 22.87 mm frente a *Streptococcus pyogenes*. Sin embargo, el grupo experimental al 100% evidenció un halo inhibición medio de 8.21 mm, seguido de los aceites al 75, 50 y 25% con halos de inhibición medios de 7.52, 6.80y 6.45 mm.

**Conclusiones:** El aceite esencial de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú) presenta débil actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

**Palabras claves:** *Theobroma grandiflorum* (Copoazu), alcaloides, actividad antibacteriana.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the antimicrobial effect of the essential oil of *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazu) against pathogenic bacteria *S. pyogenes* and *S. aureus*.

**Methods:** The sample was 1,814 Kg., We worked with the concentrations of 25, 50, 75 and 100% diluted with N-Hexano and 150 ml of EA. The cold pressing method was used to obtain the EA of *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazu) and the disk diffusion technique to evaluate the antibacterial activity. The phytochemical run was carried out qualitatively.

**Result:** Alkaloids,  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated lactones were found in the phytochemical march. It is evidenced that the highest mean inhibition halo was obtained by the vancomycin group with 22.44 mm against *Staphylococcus aureus*. However, the 100% experimental group showed a mean inhibition halo of 9.02 mm, followed by the oils at 75, 50 and 25% with mean inhibition halos of 8.24, 7.32 and 6.82 mm. On the other hand, the test against *Streptococcus pyogenes* showed that the highest average inhibition halo was obtained by the vancomycin group with 22.87 mm against *Streptococcus pyogenes*. However, the experimental group at 100% showed a mean inhibition halo of 8.21 mm, followed by the oils at 75, 50 and 25% with mean inhibition halos of 7.52, 6.80 and 6.45 mm.

**Conclusions:** The essential oil of *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú) seeds shows weak antibacterial activity against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

**Key words:** *Theobroma grandiflorum* (Copoazu), alkaloids, antibacterial activity.



## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones graves causadas por bacterias que se han vuelto resistentes a los antibióticos de uso común se han convertido en un importante problema de salud pública en el siglo XXI. No solo son más graves y requieren tratamientos más largos y complejos, sino que también son significativamente más costosos de diagnosticar y tratar. La resistencia a los antibióticos, inicialmente un problema del entorno hospitalario asociado con un mayor número de infecciones adquiridas en el hospital, generalmente en pacientes críticamente enfermos e inmunosuprimidos, ahora se ha extendido a la comunidad causando infecciones graves difíciles de diagnosticar y tratar. Los mecanismos moleculares por los que las bacterias se han vuelto resistentes a los antibióticos son diversos y complejos. Las bacterias han desarrollado resistencia a todas las diferentes clases de antibióticos descubiertos hasta la fecha <sup>1</sup>.

El *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum de conocido popularmente con los nombres de: copoazú, cupuassu, cupuazú, cupu assu, copoasu, o cacao blanco, es originario de la región oriental de la selva sudamericana, en la selva nordeste de Brasil y en el sur de Venezuela, su ambiente natural es el frondaje húmedo del trópico en las zonas altas que no son inundables, con una temperatura promedio entre 22 a 27°C <sup>2</sup>. Se extrae de su semilla un 45% de manteca o grasa blanca, de agradable fragancia y es una variedad de cacao la cual es digestiva para el ser humano, la manteca o grasa del copoazu presenta propiedades emolientes y lubricantes para la piel. El copoazú contiene fitoesteroles (especialmente betasitosterol) los cuales son usados tópicamente para estimular el proceso de curación en la profilaxis de dermatitis <sup>3</sup>.

Según la Sociedad de Dermatología del Perú “La dermatitis atópica (DA), es una dermatosis inflamatoria crónica, recidivante y muy pruriginosa, se desarrolla con mayor frecuencia durante la primera infancia y la niñez y, en la mayoría de los casos, está asociada con antecedentes personales o familiares de atopía (asma, rinitis alérgica o eczema). Con frecuencia se asocia con anomalías en la función de barrera de la piel y desregulación inmune; tiene una distribución topográfica específica según la edad del paciente y se caracteriza por placas eritematosas y escamosas; aparecen por brote <sup>4</sup>. En más del 75% de los casos es autorresolutiva y mejora después de la pubertad. No obstante, hay casos que no consiguen esta mejoría o que en los primeros años de la vida alcanza niveles de severidad que afectan de forma importante la salud y el desarrollo social de los pacientes. Afecta al 20% de los niños y entre el 1-3 % de los adultos, produciendo un deterioro importante de la calidad de vida de los pacientes y sus familiares” <sup>5</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define la fitoterapia:” como la ciencia destinada al estudio de productos vegetales para las terapias de distintas enfermedades”. Esta enunciación se diferencia de la Fito medicina; la primera discurre por procesos de transformaciones de esta especie vegetal medicinal a productos terapéuticos, cuyo uso puede ser por vía bucal (extractos, zumos, tisanas, tinturas,) o por vía tópica (pomadas, ungüento) las cuales deberán continuar con ensayos clínicos basados en tres razones principales, calidad seguridad, y eficacia, mientras que la fitoterapia o medicina tradicional se basa en prácticas empíricas <sup>6</sup>.

Las bacterias más importantes como flora transitoria de la piel y por lo tanto, implicadas en infecciones cutáneas, son *S. aureus* y *S. pyogenes*. El género *Staphylococcus* se halla considerablemente distribuido en la naturaleza. Está presente en la flora normal de mucosas y la piel del ser humano. En el huésped se halla habitualmente en los fluidos sanguíneos, cavidad bucal, intestinos,

glándulas mamarias, tracto genitourinario y vías respiratorias. Cuando hay infecciones causadas por *S. Aureus* en la piel, se acompaña de cuadros de impétigo, celulitis <sup>7</sup>. El género *Streptococcus* es un grupo formado por diversos cocos grampositivos que normalmente se disponen en parejas o en cadenas (a diferencia de los racimos formados por *Staphylococcus*). La mayoría de las especies son anaerobios facultativos, y algunos crecen únicamente en una atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (crecimiento capnofílico) <sup>8</sup>. *S. pyogenes* es causante de diferentes enfermedades purulentas y no purulentas. Aunque esta bacteria es el agente etiológico más común en la faringitis bacteriana, su fama de estos, se debe a la mionecrosis grave que ocasionan <sup>9</sup>.

El trabajo estuvo enfocado en el estudio experimental de este recurso vegetal medicinal las cuales son organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa; estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, con lo cual aportaríamos al conocimiento científico sobre la existencia de una especie con propiedades antibacterianas y emolientes, la cual sea alternativa de prevención o tratamiento. Ya que es muy difícil combatir los microorganismos inflexibles a los antimicrobianos, por lo cual la especie vegetal se convirtiera en una elección efectiva y de bajo costo para la población.

El aceite esencial del *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (copoazú) es un triglicérido que contiene ácidos grasos saturados, e insaturados lo cual le da un punto de fusión bajo (30° C), se utiliza en la producción de cosméticos debido a estas propiedades. También pone tersa a la piel, y al mismo tiempo la suaviza restableciendo la hidratación natural y flexibilidad, especialmente en pieles secas y estropeadas, evitando las úlceras o heridas por

decúbito, siendo usados tópicamente en la terapéutica favoreciendo el proceso de sanación en la dermatitis <sup>10</sup>.

Los usos tradicionales de la especie vegetal que se conocen son:

1. Promover la salud cardiovascular mediante el aumento de los niveles de óxido nítrico (NO)
2. Como antioxidante para prevenir la oxidación y reacciones de formación de radicales libres debido a la presencia de polifenoles.
3. Destaca por sus cualidades nutricionales.
4. Tiene efectos medicinales debido a la versatilidad de copoazú para actuar contra el avance de la caries dental <sup>11</sup>.

El recurso vegetal en investigación *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (copoazú) presenta un elevado contenido de Fósforo, peptinas, Calcio y ácido Ascórbico (Vit. C), del fruto se aprovecha también la semilla, que contiene elevados porcentajes de lípidos y proteínas, con ellos se prepara la bebida conocida como chocolate de copoazú (cupulate) <sup>12</sup>. También en comparación con otras frutas del trópico, refiere bajos sólidos solubles, pero presenta un elevado porcentaje de grasas y proteínas, la pulpa del copoazú cuando se encuentra seca contiene 15% de almidón <sup>13</sup>.

Entre los antecedentes para el desarrollo del trabajo de investigación se dispone de los siguientes:

**Pardo, J., y Córdova, M., (2020).** Evaluaron el efecto antibacteriano in vitro del Extracto etanólico de *Lavatera arborea* L. sobre *S. aureus*. Los resultados evidenciaron que el extracto etanólico de *Lavatera arborea* L. (Malva) en sus diferentes concentraciones monitoreadas (100%, 75%, 50% y 25%) presentaron actividad antibacteriana sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* tipificada presentando un porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano de 50%, 58%, 66% y 80%

respectivamente. Conclusión: Se evidenció, que el extracto etanólico de las hojas de *Lavatera arborea* L. (Malva) presentó la mejor actividad antibacteriana a la concentración de 75%, en comparación a las demás concentraciones frente a *Staphylococcus aureus* mostrando una diferencia estadística significativa <sup>14</sup>.

**Santa, O., (2019)**, determinaron los componentes químicos y el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) y su utilización como gel en uso cutáneo. Los resultados evidenciaron la presencia de lactonas insaturadas, flavonoides, alcaloides, glucósidos y polifenoles, como los metabolitos secundarios principales; fue evidenciada la inhibición del crecimiento microbiano a la concentración de 50 mg/mL de extracto en estudio sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El gel dermatológico de *Sida rhombifolia* L., evidenció propiedades sensoriales facultando su aceptación. Conclusiones: Los componentes químicos aislados y la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Sida rhombifolia* L, justifican el uso tradicional en el tratamiento de infecciones por microorganismos dermatológicos Gram positivos y Gram negativos <sup>15</sup>.

**Poma, E., (2018)**, determinaron la acción antimicrobiana del extracto etanólico de cascara de cacao (*Theobroma cacao* L.) a diversas concentraciones en muestras de piezas dentales con caries. Los resultados demostraron que los halos de inhibición en las siguientes concentraciones: 5mg/ml = 9,4mm; 10mg/ml = 11,4mm; 15mg/ml = 16,6mm; 20mg/ml = 19,6mm; 25mg/ml = 20,2mm; 30mg/ml = 22,7mm. Conclusión: Se concluye que el extracto etanólico de cáscara de cacao

a diferentes concentraciones presenta efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de las bacterias presentes en la caries dental <sup>16</sup>.

**De Cabral, A., (2019)**, definieron el perfil fitoquímico por LC/MS y determinaron los metabolitos aislados de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) y su actividad antimicrobiana. Los resultados mostraron que la evaluación microbiológica de la actividad antifúngica del EEB y las respectivas fases fueron: hexano, cloroformo, acetoetilo e hidroalcohólico de *Sida planicaulis* en las cepas de *Candida tropicalis*, *Trichosporon inkin* LM-67, *Geotrichum* 57839 y *Rhodotorula spp.* Evidenciada resistencia a los hongos, en estas condiciones experimentales utilizadas, dado que no se obtuvieron halos de inhibición. La EEB y las fases no son capaces de inhibir el crecimiento de ninguna de las cepas evaluadas, Conclusión: Entre las muestras que se analizaron para determinar su actividad antimicrobiana, la sal de criptolepina mostró la CIM más prometedora contra las cepas *Candida albicans* LM-38, *Escherichia coli* LM-35, *Cryptococcus gatti* IHCQS-40113, *Cryptococcus neoformans* LM-49 y *Candida albicans* ATCC-60193 <sup>17</sup>.

**Delgado L. (2019)**, evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico bruto de *G. hirsutum* L. frente a *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados demostraron que el extracto en estudio presentaba CIM 50 para *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente, igual a 1024 µg / ml y mayor que 1024 µg / ml y CBM50 para *E. coli* fue mayor que 1024 µg / ml. Conclusión: en vista de los resultados obtenidos, se puede decir que el extracto tiene un efecto antibacteriano moderado contra las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* <sup>18</sup>.

**Carrera P., (2018)**, determinaron la actividad inhibitoria de extractos acuosos de la pulpa que recubre las semillas del cacao (*Theobroma cacao*) a diversas concentraciones frente a *Streptococcus mutans* tipificada. Los resultados manifiestan, que las concentraciones de 10%, 20%, 30%, 40% tienen capacidad inhibitoria leve sobre *Streptococcus mutans*, tanto como extracto acuoso como hidroalcohólico. Conclusión: El extracto acuoso de la pulpa que recubre las semillas del cacao posee un efecto inhibitorio leve sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, a un 40% de concentración observado durante el estudio in vitro <sup>19</sup>.

El estudio se justifica por el incremento en la utilización de recursos vegetales medicinales por parte de la población para el tratamiento de sus enfermedades, que motiva la necesidad de realizar investigaciones farmacológicas que contribuyan al conocimiento científico que esclarezcan el mecanismo de acción de estos productos vegetales, ya que es muy difícil combatir los microorganismos inflexibles a los antimicrobianos, a causa de las reacciones adversas de los antibióticos comerciales por lo cual la especie vegetal se convierte en una elección efectiva y de bajo costo. Dichas acciones antibacterianas se atribuyen a la acción de los metabolitos secundarios como los sesquiterpenolactonas que contienen dichos vegetales.

La investigación es importante porque genera información útil en la comprensión de la utilización de esta especie vegetal medicinal, por parte de los pobladores que viven en la región de Madre de Dios. Los conocimientos que se obtengan basados en la evidencia beneficiarán a los usuarios y contribuirán para nuevos estudios.

El objetivo general del estudio será evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazu) frente a bacterias patógenas *S. pyogenes* y *S. aureus*.

La hipótesis general del estudio se describe como:

El aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazu) presenta efecto antimicrobiano frente a bacterias patógenas *S. pyogenes* y *S. aureus*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS



## 2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El enfoque del estudio es cuantitativo y de diseño experimental porque se manipulará la variable independiente.

**Analítico:** El estudio es analítico porque establecerá relaciones de asociación o causalidad entre las variables.

**Explicativo:** El estudio es explicativo porque buscamos la interpretación del porque ocurre un fenómeno. Se evaluará la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazu) frente a bacterias patógenas *S. pyogenes* y *S. aureus*

**Deductivo:** El estudio deductivo es usado para sacar deducciones, conclusiones lógicas partiendo de una serie de premisas o principios, se va de lo general a lo específico.

**Prospectivo:** Los datos serán recolectados una vez iniciado el estudio.

**Longitudinal:** Es longitudinal porque la variable independiente será evaluada en momentos diferentes.

## 2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

La población está constituida por 1,814 kilogramos de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (copoazu), procedente del fundo Vergara, carretera al balneario de Chorrillos, km., 12, de la ciudad de Puerto Maldonado región de Madre de Dios.

Se llevó el recurso vegetal al laboratorio de Botánica de la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios, donde se realizó la certificación de la especie.

Se seleccionaron las semillas en buen estado y fueron lavadas con agua corriente y enjuagadas con agua destilada.

Se secaron bajo sombra durante ocho días sobre papel Kraft, luego fueron molidas en molinillo.

El aceite esencial se trabajó en el laboratorio biológico y análisis clínico Santa Rosa E.I.R.L., ciudad de Lima.

En cuanto a la unidad de análisis se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

### 2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

En el siguiente estudio se presentará como variable principal nuevas oportunidades de tratamiento, es una variable cuantitativa y su escala de medición es longitudinal.

**Variable independiente:** Aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú)

Definición conceptual: Concentración del aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú)

Definición operacional: Aceite esencial elaborado por la técnica de prensado en frío.

**Variable dependiente:** Efecto antimicrobiano frente a bacterias patógenas *S. pyogenes* y *S. aureus*.

Definición conceptual: El diámetro del halo de inhibición es el indicador de una cepa sensible

Definición operacional: La actividad antibacteriana se evaluó mediante la técnica de difusión en disco (Kirby Bauer).

## 1. TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ficha ad doc. De recolección de datos para la actividad farmacológica del aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú) y su efecto antimicrobiano frente a bacterias patógenas *S. pyogenes* y *S. aureus*.

## **2.5. PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

### **2.5.1 Análisis previo del aceite esencial**

El análisis previo se realizó en el laboratorio biológico y análisis clínico Santa Rosa E.I.R.L., ciudad de Lima. Se realizaron las siguientes pruebas:

1. Análisis de pH
2. Prueba de miscibilidad

#### **1. Marcha fitoquímica**

Permite identificar todos los compuestos que presentan los recursos vegetales, del aceite esencial de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú) según el método de Olga Lock <sup>20</sup>.

#### **2. Actividad antibacteriana método Kirby Bauer o antibiograma**

Se realizó en laboratorio biológico y análisis clínico Santa Rosa E.I.R.L., ciudad de Lima, por el método de difusión en agar (Kirby Bauer) el cual es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a drogas específicas.

## **2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Luego de la obtención de resultados de los análisis mencionados, se realizó las evaluaciones mediante estadística descriptiva utilizando el paquete informático Microsoft Excel versión 2016, y estadística inferencial usando el paquete estadístico SPSS versión 26.

## **2.7. ASPECTOS ÉTICOS**

En la presente investigación se tuvo las siguientes responsabilidades: <sup>21</sup>

1. El estudiante es responsable de educarse sobre los peligros de seguridad y salud, éticos y legales.
2. Implicaciones asociadas con su investigación en colaboración con sus asesores: Si surge un problema durante la permanencia en el laboratorio, el estudiante tiene la responsabilidad buscar la orientación adecuada del asesor siguiendo el protocolo institucional.
3. El investigador de pregrado debe asumir la responsabilidad y la propiedad intelectual de su proyecto. Todos los experimentos deben documentarse de forma rápida, adecuada y precisa.
4. Los cuadernos de laboratorio deben estar completos y todos los datos deben registrarse y registrarse correctamente.
5. Analizados los resultados deben comunicarse de forma eficaz mediante una redacción y una presentación adecuada.

### 3. RESULTADOS

En el presente apartado se muestran los resultados de los análisis realizados en la presente investigación.

#### 1. Análisis de pH

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis de pH de Aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú).

Tabla 1. Resultados del ensayo de pH

N°	ANALISIS	RESULTADO
1	pH	6.0

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de pH muestran 6.0 para el aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú).

#### 2. Prueba de miscibilidad

Tabla 2. Resultados del ensayo de miscibilidad

N°	SOLVENTE	RESULTADOS
1	Éter de petróleo	+++
2	Diclorometano	+++
3	Cloroformo	+++
4	Butanol	+
5	Etanol 96	-
6	Metanol	-
7	Agua destilada	-
8	Dimetilsulfoxido	++

-: Inmiscible; +: Poco miscible; ++: Medianamente miscible; +++: Muy miscible

Fuente: Elaboración propia

Los resultados del ensayo de miscibilidad mostrados en la tabla anterior muestran que el aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) fue muy miscible en disolventes orgánicos apolares como el éter de petróleo, diclorometano y cloroformo, así como medianamente miscible en dimetilsulfoxido y poca miscibilidad en solventes alcohólicos como el butanol.

### 3. Tamizaje fitoquímico

Tabla 3. Resultados del ensayo para determinar metabolitos secundarios

N°	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
1	Borntrager	Antraquinonas	-
2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	-
3	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	-
4	Dragendorff	Alcaloides	++
5	Mayer	Alcaloides	-
6	Wagner	Alcaloides	+++
7	Baljet	Lactonas $\alpha$ , $\beta$ -insaturadas	++
8	Gelatina	Taninos	-
9	Gelatina-sal	Taninos	-
10	NaOH 10%	Antocianinas	-
11	Espuma	Saponinas	-
12	Shinoda	Flavonoides	-

(-): Ausencia; (+): Mínima; (++) : Mediana (+++): Abundante presencia

**Fuente:** Elaboración propia

En la tabla 3 se observa que en las pruebas de Dragendorff, Wagner, y Baljet las identificaciones fueron positivas, hallándose lo siguiente: alcaloides, lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas. Cabe resaltar que no se logró identificar antraquinonas, compuestos fenólicos, terpenos y esteroides, taninos, antocianinas, azúcares reductores, saponinas, y flavonoides.

#### 4. Ensayo microbiológico

Tabla 4. Halos de inhibición de ensayo microbiológico en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	100%	75%	50%	25%	Vancomicina 30 ug	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9.05	8.27	7.34	6.82	22.47	6
	9.01	8.24	7.31	6.83	22.48	6
	9.04	8.26	7.33	6.82	22.39	6
	9.01	8.20	7.32	6.81	22.41	6
	9.03	8.24	7.31	6.82	22.48	6
<b>Promedio</b>	<b>9.02</b>	<b>8.24</b>	<b>7.32</b>	<b>6.82</b>	<b>22.44</b>	<b>6</b>
Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	100 %	75%	50%	25%	Vancomicina 30 ug	DMSO
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	8.21	7.55	6.69	6.39	22.86	6
	8.22	7.52	6.83	6.48	22.88	6
	8.23	7.50	6.80	6.46	22.86	6
	8.21	7.54	6.89	6.48	22.89	6
	8.22	7.53	6.81	6.48	22.88	6
<b>Promedio</b>	<b>8.21</b>	<b>7.52</b>	<b>6.80</b>	<b>6.45</b>	<b>22.87</b>	<b>6</b>

\*Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición.

En la tabla 4 se muestran los resultados del ensayo microbiológico in vitro. Esto hace evidencia que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo vancomicina con 22.44 mm frente a *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, el grupo experimental al 100% evidenció un halo inhibición medio de 9.02 mm, seguido de los aceites al 75, 50 y 25% con halos de inhibición medios de 8.24, 7.32 y 6.82 mm.

Por otro lado, el ensayo frente a *Streptococcus pyogenes* evidenció que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo vancomicina con 22.87 mm frente a *Streptococcus pyogenes*. Sin embargo, el grupo experimental al 100% evidenció un halo inhibición medio de 8.21 mm, seguido de los aceites al 75, 50 y 25% con halos de inhibición medios de 7.52, 6.80 y 6.45 mm.

Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico

<b>Estadísticos descriptivos</b>			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
N	Válido 95% de intervalo de confianza	30	30
	Perdidos	0	0
Media		9,9763	9,6470
Mediana		7,7700	7,1950
Moda		6,00	6,00
Desv. Desviación		5,75688	6,06068
Varianza		33,142	36,732
Asimetría		1,762	1,824
Error estándar de asimetría		,427	,427
Curtosis		1,411	1,533
Error estándar de curtosis		,833	,833
Rango		16,48	16,89
Mínimo		6,00	6,00
Máximo		22,48	22,89

En la tabla 5 se muestra la estadística descriptiva con 95% de intervalo de confianza para las medidas de tendencia central (media, mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar) correspondientemente.

Para determinar la docimasia de las hipótesis planteadas es indispensable saber si la distribución de los resultados del ensayo microbiológico in vitro es normal o no, para esto se usó la prueba estadística de Shapiro-Wilk ubicada en la tabla 6.



Tabla 6. Prueba de normalidad por el test de Shapiro-Wilk

<b>Pruebas de normalidad</b>				
	Grupo	Shapiro-Wilk		
		<b>Estadístico</b>	<b>gl</b>	<b>Sig.</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina	,804	5	<b>,087</b>
	Aceite 25%	,883	5	<b>,325</b>
	Aceite 50%	,902	5	<b>,421</b>
	Aceite 75%	,916	5	<b>,502</b>
	Aceite 100%	,894	5	<b>,377</b>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Vancomicina	,852	5	<b>,201</b>
	Aceite 25%	,687	5	<b>,007</b>
	Aceite 50%	,930	5	<b>,598</b>
	Aceite 75%	,979	5	<b>,928</b>
	Aceite 100%	,881	5	<b>,314</b>
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.				
a. Corrección de significación de <u>Lilliefors</u>				

La tabla 6 muestra que el valor de la significancia asintótica bilateral es mayor al 0.05 según el test de Shapiro-Wilk para los resultados del ensayo microbiológico in vitro. Esto es evidencia de que existe distribución normal en los resultados.

Ya que se evidenció distribución normal de los resultados, se ejecutó un estadístico inferencial para determinar diferencia de medias mediante el análisis de varianzas (ANOVA). La tabla 7 muestra un valor de significancia asintótica bilateral menor al 0.05 para los resultados del ensayo microbiológico in vitro con las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Esto

es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición medio de todos los grupos en el ensayo microbiológico según el estadístico ANOVA.

Tabla 7. Comparación de medias por el ANOVA.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Entre grupos	961,095	5	192,219	373240,752	,000
	Dentro de grupos	,012	24	,001		
	Total	961,107	29			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Entre grupos	1065,194	5	213,039	172268,499	,000
	Dentro de grupos	,030	24	,001		
	Total	1065,223	29			

Para determinar si existen diferencias entre los halos de inhibición medio entre los grupos mediante múltiples comparaciones se utilizó el estadístico de Tukey. La tabla 8 muestra que los valores de significancia asintótica bilateral son menores al 0.05 en las comparaciones entre los grupos al 25, 50, 75 y 100% frente al grupo control en el ensayo microbiológico con la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Esto es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales y el control. Pero se evidencia una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo vancomicina y los grupos experimentales que favorece al grupo vancomicina. Esto es evidencia de que los grupos experimentales 25, 50, 75 y 100% presentan efecto inhibitor del crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* menor al de la vancomicina.

Tabla 8. Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey

Comparaciones múltiples							
HSD Tukey							
Variable dependiente	(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
<i>Staphylococcus aureus</i>	Control	Vancomicina	-16,44600*	,01435	<b>,000</b>	-16,4904	-16,4016
		Aceite 25%	-,82000*	,01435	<b>,000</b>	-,8644	-,7756
		Aceite 50%	-1,32200*	,01435	<b>,000</b>	-1,3664	-1,2776
		Aceite 75%	-2,24200*	,01435	<b>,000</b>	-2,2864	-2,1976
		Aceite 100%	-3,02800*	,01435	<b>,000</b>	-3,0724	-2,9836
	Vancomicina	Control	16,44600*	,01435	<b>,000</b>	16,4016	16,4904
		Aceite 25%	15,62600*	,01435	<b>,000</b>	15,5816	15,6704
		Aceite 50%	15,12400*	,01435	<b>,000</b>	15,0796	15,1684
		Aceite 75%	14,20400*	,01435	<b>,000</b>	14,1596	14,2484
		Aceite 100%	13,41800*	,01435	<b>,000</b>	13,3736	13,4624
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Control	Vancomicina	-16,87400*	,02224	<b>,000</b>	-16,9428	-16,8052
		Aceite 25%	-,45800*	,02224	<b>,000</b>	-,5268	-,3892
		Aceite 50%	-,80400*	,02224	<b>,000</b>	-,8728	-,7352

		Aceite 75%	-1,52800*	,02224	<b>,000</b>	-1,5968	-1,4592
		Aceite 100%	-2,21800*	,02224	<b>,000</b>	-2,2868	-2,1492
	Vancomicina	Control	16,87400*	,02224	<b>,000</b>	16,8052	16,9428
		Aceite 25%	16,41600*	,02224	<b>,000</b>	16,3472	16,4848
		Aceite 50%	16,07000*	,02224	<b>,000</b>	16,0012	16,1388
		Aceite 75%	15,34600*	,02224	<b>,000</b>	15,2772	15,4148
		Aceite 100%	14,65600*	,02224	<b>,000</b>	14,5872	14,7248
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.							

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Discusión

En el presente estudio del aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú), se realizaron una variedad de ensayos para determinar la actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615; el primer ensayo fue la determinación de pH, con un valor de 6.0, de naturaleza ligeramente acida. El segundo en realizarse fue la prueba de miscibilidad, en la que fue muy miscible en disolventes orgánicos apolares como el éter de petróleo, diclorometano y cloroformo, así como medianamente miscible en dimetilsulfoxido y poca miscibilidad en solventes alcohólicos como el butanol; y en cuanto al ensayo de tamizaje fitoquímico fueron los alcaloides los principales metabolitos con mayor presencia, seguido de lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas con mínima presencia; empleando el método según Olga Lock.

Precisamente la mínima presencia de lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas quienes son los únicos metabolitos responsables de una acción antibacteriana pobre que no responde a las creencias de algunos usuarios que le atribuyen estas propiedades, Sprenger L., et al.<sup>22</sup> (2016) evaluaron el efecto antibacteriano in vitro de *Euterpe oleracea* mart. Y extractos hidroalcohólicos de *Theobroma Grandiflorum*, frente a cuatro microorganismos mediante el método de difusión en disco y el ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC). La actividad antimicrobiana mostró que la pulpa de açai y los extractos de semillas tenían inhibición significativa, respectivamente, sobre *Clostridium perfringens* (320 y 640 CIM), *Staphylococcus aureus* (80 y 320 CIM) y *Pseudomonas aeruginosa* (640 y 2560). Los extractos de copoazu no mostraron ningún efecto sobre todas las bacterias. De la misma manera estudios similares como el de Nunes V., et al<sup>23</sup> (2021) quienes determinaron la actividad antimicrobiana de aceites esenciales extraídos de frutos nativos de Buriti (*Mauricio flexuosa* Lineus) y Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) Los resultados obtenidos respecto a la posible actividad antimicrobiana de fructoburiti y cupuaçu frente a microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, no fueron muy satisfactorios, pero esto no implica que estos aceites no puedan presentar actividad antimicrobiana frente a otros microorganismos patógenos convirtiéndolos en agentes antimicrobianos, como una alternativa terapéutica prometedora, especialmente para la población más pobre.

El ensayo microbiológico *in vitro* para determinar el efecto antibacteriano de aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100% frente a cepas *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* presentó que el aceite al 100% evidenció un halo inhibición medio de 9.02 mm, seguido del 75, 50 y 25% con halos de inhibición medios de 8.24, 7.32 y 6.82 mm. Frente a *Staphylococcus aureus*. Además, se evidenció que los 4 grupos experimentales presentaron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) por las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey. Sin embargo, según la escala de Duraffourd esta cepa bacteriana es sensible solo a los aceites al 75 y 100%. Existen otras especies pertenecientes al mismo género *Theobroma* que presentan efecto antibacteriano *in vitro* como el estudio de Poma, E. (2018), que evaluó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de cascara de cacao (*Theobroma cacao L.*) a diversas concentraciones mediante el método de Kirby Bauer y según la escala de Duraffourd se determinó el efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de bacterias presentes en la caries dental.

Por otro lado, el presente ensayo también evidenció que el aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú), al 100% evidenció un halo inhibición medio de 8.21 mm, seguido de los extractos al 75, 50 y 25% con halos de inhibición medios de 7.52, 6.80 y 6.45 mm. Frente a la cepa bacteriana *Streptococcus pyogenes*. Según la escala de Duraffourd este grupo presenta efecto antibacteriano ya que con ese halo de inhibición considera a la cepa bacteriana *Streptococcus pyogenes* sensible al extracto de 100%. Este mismo grupo presentó una diferencia de halo de inhibición medio estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) mediante las pruebas estadísticas ANOVA y Tukey. El mismo que coincide con el estudio de Carrera P., (2018) que determinó la actividad inhibitoria de extractos acuosos de la pulpa que recubre las semillas del cacao (*Theobroma cacao*) a concentraciones de 10%, 20%, 30%, 40% frente a *Streptococcus mutans* tipificada, llegando a la conclusión de obtener una actividad antibacteriana.

## 4.2. Conclusiones

1. El aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
2. Los metabolitos secundarios que se identificaron en la prueba de tamizaje fitoquímico del aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) fueron alcaloides, lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas.
3. El aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) al 75 y 100% posee efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y solo a la concentración de 100% presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
4. El aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) presenta menor efecto antibacteriano *in vitro* en comparación con la vancomicina de 30  $\mu$ g frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

## 4.3. Recomendaciones

1. Realizar investigaciones con diferentes partes del fruto de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) para el uso integral.
2. Realizar estudios instrumentales para la identificación de moléculas de importancia en el ámbito farmacéutico y cosmético.
3. Realizar estudios farmacológicos con el aceite de semillas de *Theobroma grandiflorum* (Copoazú) para futuras aplicaciones médicas.
4. Fomentar iniciativas de la investigación de productos naturales amazónicos oriundos del Perú y Latinoamérica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kapoor G., Saurabh S. y Elongavan A. Mecanismos de acción y resistencia de los antibióticos: una guía para médicos. Artículo científico publicado en la Revista de anestesiología, farmacología clínica vol.33, pp 3 (2017): 300. Consultado 7 de abril de 2021. Disponible en: doi: 10.4103 / joacp.JOACP\_349\_15
2. Ajo, M., y Díaz, J. Determinación de los parámetros óptimos de tostado de la semilla de copoazu para la obtención de chocolate de copoazu–*Theobroma grandiflorum* (Willd ex Spreng) Schum. (2018). Trabajo de investigación. Universidad Nacional de Madre de Dios. Consultado el 7 de abril del 2021. Disponible en:  
<http://repositorio.unamad.edu.pe/handle/UNAMAD/457>
3. García, K. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in vitro. Artículo científico publicado en Rev. Simiykita 2.1 (2017). Consultado el 7 de abril del 2021. Disponible en:  
<http://www.revistas.upagu.edu.pe/index.php/pr/article/view/483>
4. Garnica P, Zúñiga C.G, Huerta J.G. Actualidades en el tratamiento sistémico de la dermatitis atópica en el paciente pediátrico. Artículo científico publicado en la Revista Alergia, asma e inmunología Pediátricas 2015;24(1):18-28. Consultado el 7 de abril del 2021. Disponible en:  
[https://www.dermatologiaperuana.pe/assets/uploads/revista\\_MvjN\\_04\\_Terapeutica\\_dermatologica\\_hoy\\_29-2.pdf](https://www.dermatologiaperuana.pe/assets/uploads/revista_MvjN_04_Terapeutica_dermatologica_hoy_29-2.pdf)
5. Udkoff J, Eichenfield LF. Dermatitis atópica. En Lebwohl MG, Berth-Jones J, HeymannWR, Coulson I. Tratamiento de enfermedades de la piel. Estrategias terapéuticas completas. Medellín Colombia, Ed.Amolca, 5° ed. 2019:54-62. Consultado el 7 de abril del 2021. Disponible en:  
[https://www.dermatologiaperuana.pe/assets/uploads/revista\\_MvjN\\_04\\_Terapeutica\\_dermatologica\\_hoy\\_29-2.pdf](https://www.dermatologiaperuana.pe/assets/uploads/revista_MvjN_04_Terapeutica_dermatologica_hoy_29-2.pdf)
6. Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014-2023. [Internet] consultado el 8 de abril del 2021. Disponible en:



[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098\\_spa.pdf;jsessionid=1288853A21ECCD00A4C0B526FE622810?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=1288853A21ECCD00A4C0B526FE622810?sequence=1)

7. Andrade, M., Leal, T. Diversidad clonal y características epidemiológicas de *Staphylococcus aureus*: alta prevalencia de *Staphylococcus aureus* mecA positivo susceptible a oxacilina (OS-MRSA) asociado con aislamientos clínicos en Brasil. Artículo científico publicado en la Revista BMC Microbiol 16, 115 (2016). Consultado el 8 de abril del 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0733-4>
8. Efstratiou, A. y Lamagni, T. Epidemiología de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*: biología básica a manifestaciones clínicas [Internet]. Artículo científico publicado en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Oklahoma, 2017 [Internet] consultado el 03 de abril del 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK343616/>
9. Suárez. M., Sánchez, L., Navarro, M., Santos, M., y col. Enfermedad invasiva por *Streptococcus pyogenes*: cambios en la incidencia y factores pronósticos. Artículo científico publicado en la Revista Anales de Pediatría. Vol. 91. No. 5. Elsevier Doyma, 2019. [Internet] consultado el 03 de abril del 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2018.12.017>
10. Alvarez, G, Murillo, A., Murillo, P., Rojano, B., Méndez, A. Caracterización y extracción lipídica de las semillas del cacao amazónico (*Theobroma grandiflorum*). Artículo científico publicado en la Revista Ciencia en Desarrollo, Tunja, v. 7, n. 1, p. 103-109, June 2016. Available from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-74882016000100013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882016000100013&lng=en&nrm=iso). Access on 08 May 2020.
11. Gomes, C. da S. y Lima, R. Revisión bibliográfica de la familia malvaceae, con episfaces en las especies *Theobrama cacao* L., y *Theobrama grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum. Artículo científico publicado en la Revista Sudamericana de Educación Básica, Técnica y Tecnológica, 6 (2), 218-228. (2020) Recuperado de <https://periodicos.ufac.br/index.php/SAJEBTT/article/view/2633>
12. Pérez, W., Jorrián, J. y Melgarejo, L. Análisis de equivalencia sustancial en frutas de tres especies de *Theobroma* a través de la composición química y el perfil de proteínas. Artículo científico publicado en la Revista Food Chemistry 240 (2018): 496-504. Consultado el 03 de abril del 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.128>

13. Costa, M., Frasaio, B., Silva, A., Freitas, M., Franco, R., Conte, C. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulpa, probiótico y prebiótico: influencia sobre el color, la viscosidad aparente y la textura de yogures de leche de cabra. Artículo científico publicado en la Revista Journal of Dairy Science 98.9 (2015): 5995-6003. consultado el 03 de abril del 2020. Disponible en:  
<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9738>
14. Pardo, J., y Córdova, M. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Lavatera arborea* L. (Malva) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923," tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico, Universidad Interamericana para el Desarrollo, Lima-2020. Consultado el 6 de abril del 2021. Disponible en:  
<http://repositorio.unid.edu.pe/xmlui/handle/unid/70>
15. Santa, O., Composición química y acción antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Sida rhombifolia* L. (Malvaceae) y su aplicación en un gel dermatológico, tesis para obtener el grado de Magister en Recursos vegetales y terapéuticos, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- 2019. Consultado el 6 de abril del 2021. Disponible en:  
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11412>
16. Poma, E. Efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de cacao (*Thebroma cacao* L.) a diferentes concentraciones en muestras microbiológicas de piezas dentales con caries de pacientes que acuden al centro de salud ciudad nueva. Tacna 2018. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna- 2018. Consultado el 6 de abril del 2021. Disponible en: <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/3306>
17. de Cabral, A. Definición del perfil fitoquímico por LC / MS y primeros metabolitos aislados de *Sida planicaulis* Cav. (Malvaceae) y actividad antimicrobiana. (2019) tesis para optar el título de Maestro en productos bioactivos naturales y sintéticos, Universidad Federal de Paraibah. Consultado el 6 de abril del 2021. Disponible en: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/16772>
18. Delgado, L., de Souza, D., Soares, J., Miranda, J., Mendes, R., Cartaxo, R., y col. Actividad antibacteriana del extracto etanólico crudo de *Gossypium hirsutum* L. contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Artículo científico publicado en la Revista Electrónica Acervo Salud, 11 (3), e227. Consultado el 6 de abril del 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.25248/reas.e227.2019>

19. Carrera P. Efecto inhibitorio de la pulpa que recubre las semillas del cacao (*Theobroma Cacao*) a diferentes concentraciones sobre la cepa de *Streptococcus mutans*: Estudio in vitro. BS thesis. Quito: UCE, 2018. Tesis para obtener el título de Odontólogo. Universidad Central del Ecuador. Consultado el 8 de abril del 2021. Disponible en:  
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15186>
20. Lock de Ugaz O. Avances en el estudio del género *Werneria* y sus metabolitos secundarios. *RevQuim* [Internet]. 24oct.1998 [citado 30jun.2021]; 12(1):69-5. Available from: <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/view/7552>
21. Resnik, D. ¿Qué es la ética en la investigación y por qué es importante? Artículo científico publicado en la Revista Ideas. 2015. Consultado el 30 de mayo del 2021. Disponible en: [https://www.niehs.nih.gov/research/resources/bioethics/whatis/index.cfm? Links = false](https://www.niehs.nih.gov/research/resources/bioethics/whatis/index.cfm?Links=false)
22. Sprenger L., Giese E., dos Santos J. y Molento M. Efecto antibacteriano in vitro de *Euterpe oleracea* mart. y extractos hidroalcohólicos de *Theobroma Grandiflorum*. *Archivos de Ciencias Veterinarias*, 21 (2). (2016). [Citado 5 octubre 2021]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v21i2.43627>
23. Nunes V., Cantanhede F., da Silva I., Moreira L., da Silva Q., Dias, D. y Moreira L. Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales extraídos de frutos autóctonos de Burití y Cupuaçu del Cerrado Maranhense. *Revista Brasileña de Desarrollo* 7.7 (2021): 67528-67537. [Citado 5 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/32567/pdf>

# **ANEXOS**

## Anexo A. Operacionalización de las variables

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	N° ITEM	VALOR FINAL	CRITERIOS
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b> Aceite esencial de <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú)	Cualitativo y Longitudinal	Se usa el solvente N-Hexano y manteca de <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. Ex Spreng) K. Schum (Copoazú) al 100%	Aceite esencial es la forma práctica de concentrar y obtener los principios activos que sintetizan los recursos vegetales	Tamizaje fitoquímico	Presencia de metabolitos secundarios	5	++++ Abundante +++ Moderado ++ Leve + Escaso	Rango de presencia o ausencia
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b> Efecto antibacteriano	Cuantitativo y Longitudinal	Conjunto de compuestos que eliminan o reducen el crecimiento de las bacterias implicadas	El efecto antibacteriano Método Kirby Bauer	Inhibición del crecimiento bacteriano	Halo de inhibición (mm)	2	Crecimiento Sin Crecimiento	Evidencia de inhibición de crecimiento

## ANEXO B. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### MARCHA FITOQUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Carbohidratos	Rvo. Molish	
Azúcares reductores	Rvo. Fehling	
Compuestos fenólicos	Rvo. FeCl <sub>3</sub> 5%	
Taninos catéquicos	Rvo. Gelatina 1%	
Flavonoides	Rvo. Shinoda	
Esteroides y triterpenoides	Rvo. Liebermann Burchard	
Cardenólidos	Rvo. Baljet	
Alcaloides	Rvo. Dragendorff	
	Rvo. Mayer	
Antraquinonas	Rvo. Borntranger	

### DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL

CEPAS	<i>Streptococcus pyogenes</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>				
Concentración del aceite esencial (%)	Halos de inhibición (mm)							
	N			X	N			X
	1	2	3		1	2	3	
100								
75								
50								
25								

## ANEXO C. CERTIFICACIÓN TAXONÓMICA

"Madre de Dios Capital de la Biodiversidad del Perú"  
"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

### **CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN** **TAXONÓMICA DE ESPECIMENES VEGETALES**

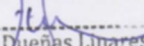
El que suscribe, Dr. HERNANDO HUGO DUEÑAS LINARES, Especialista Forestal en Identificación Taxonómica de especies de flora silvestre, mediante Resolución Directoral N° 054-2017-SERFOR/DGGSPFFS-DGSPF, con Código de Licencia LC-ES-2017-009; del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR.

**CERTIFICA**, que los ejemplares (05) presentados por los: **BACHILLERES BAEZ MAMANI ALCIDA** y **HUMPIRI PARIZELA ROXANA MARIBEL**, de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad María Auxiliadora, para su identificación y/o determinación, para efectos del proyecto de tesis "EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) K. Schum. (Copoazú) FRENTE A BACTERIAS PATOGENAS *S. pyogenes* y *S. aureus*". Corresponden a los siguientes taxa aceptados oficialmente:

✓ *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.)K. Schum. **FAMILIA MALVACEAE**

De acuerdo a la descripción de sus características vegetativas y reproductivas, las que están registrada para la Flora de Perú: Departamento de Madre de Dios; en el Catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú de Lois Brako and James L. Zarucchi (1993), al APG IV (Angiosperm Phylogenetic Group, 2016) y en el Taxonomic Name Resolution Service v4.0. (2019). Se expide el presente certificado a solicitud de las interesadas para los fines que considere conveniente. Se anexa al presente Certificado de Identificación los datos correspondientes a la especie en formato Excel.

Puerto Maldonado, 29 de marzo de 2021

  
Dr. Hugo Dueñas Linares  
ESPECIALISTA EN IDENTIFICACIÓN  
TAXONÓMICA DE FLORA SILVESTRE  
Código LIC-ES-2017-009

Av. Ernesto Rivero 1160, Puerto Maldonado-Madre de Dios-Perú  
Email: [huduli\\_hugo@yahoo.es](mailto:huduli_hugo@yahoo.es) Cel: 956-740299

**IDENTIFICACION TAXONOMICA DE ESPECIMENES VEGETALES**

**MARZO, 2021**

**"EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) K. Schum. (Copoazú)  
FRENTE A BACTERIAS PATOGENAS S. *pyogenes* Y S. *aureus*"**

**Señoritas: BACHILLERES: ALCIDA BAEZ MAMANI Y ROXANA MARIBEL HUMPIRI PARIZELA  
UNIVERSIDAD MARÍA AUXILIADORA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

Nº	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	COORDENADAS		FAMILIA	HABITO	HABITAT	LOCALIDAD	Colector	Fecha Coll	ID	FECHA ID
			ESTE	NORTE								
1	<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. Ex Spreng.) K. Schum.	"Copoazú"	479247	8609215	MALVACEAE	Arbusto 4 m.	Bosque Terreza Alta	Distrito Tambopata	ABM & RMHP	25/03/2021	HDL	29/03/2021

**Referencias:**

Vouchers colección ABM&RMHP, 25/03/2021  
 Vouchers Herbario San Marcos (HSM), 2021  
 Vouchers Herbario MOL, 2021  
 APG IV, 2016  
 Voucher Herbario "Alwyn Gentry", 2021  
 Taxonomic Resolution Service v4.0, 2021  
 The Plant List, 2021  
 Tropicos, Missouri Botanical Garden, 2021

Puerto Maldonado, 29 de Marzo de 2021  
 Dr. Hugo Dueñas Linares

Especialista en ID Taxonomía de Flora Silvestre  
 RD N° 054-2017-SERFOR/DGGSPFS-DGSPF  
 Código Licencia LC-EC-2017-009

*Hugo Dueñas Linares*  
 Dr. Hugo Dueñas Linares  
 ESPECIALISTA EN IDENTIFICACION  
 TAXONOMICA DE FLORA SILVESTRE  
 Código LIC-ES-2017-009



## ANEXO D. EVIDENCIAS FOTOGRÁFICAS DEL TRABAJO DE CAMPO

### 1. PARAMETRO DE EXTRACCIÓN DE ACEITE DE COPOAZÚ

1. Muestra: semillas de Copoazu 955 g secas + 859 g frescas= 1,814 Kg



Muestra seca



Muestra fresca

2. Molienda frío Prensado con temperatura exterior de la prensa 70,° C, interior 50 °C que estuvo en contacto con semilla como máximo.
3. Tiempo prensado 2 horas
4. Filtrado con malla textil técnica
5. Tiempo Total del proceso: 2 horas con 30 minutos
6. Control de luminosidad
7. Equipos usados de acero inoxidable

Muestra obtenida conservada  
en frasco ámbar

8. Cantidad obtenida: 150 ml



## 2. MÉTODO ENSAYO MICROBIOLÓGICO

Método: Difusión en disco - Kirby Bauer

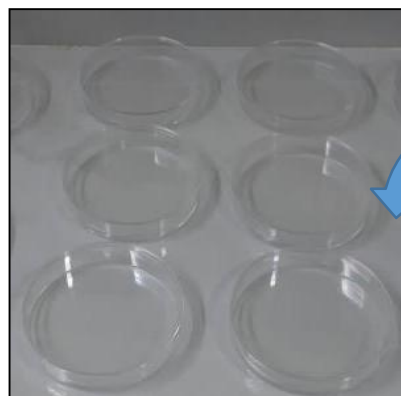
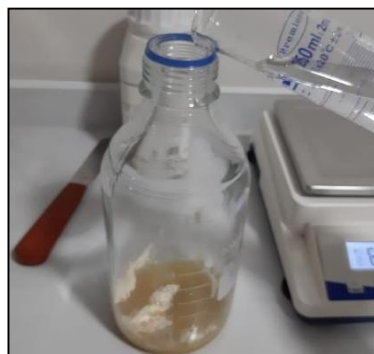
Consiste en depositar sobre la superficie de una placa de petri con agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con la diferente sustancia antibiótica.

### 1. Preparación de Medio de Cultivo

#### 1. Agar Mueller Hinton

El medio de cultivo fue preparado partiendo de la base deshidratada y siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

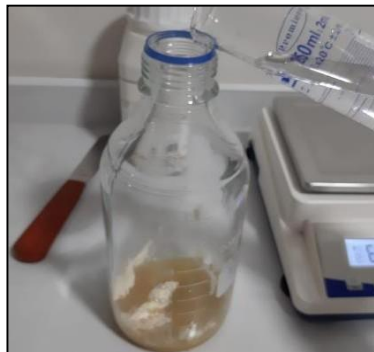
1. Se pesó 3.8 gr. de Agar Mueller Hinton deshidratado y se adicionó 100 ml de agua destilada, posteriormente se procedió a calentar con agitación constante hasta lograr la disolución total del medio de cultivo, por último se esterilizó empleando un autoclave sometiendo al medio de cultivo a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos.
2. Una vez finalizado el proceso en el autoclave se dejó enfriar hasta que el medio de cultivo alcanzó una temperatura entre 45°C – 50°C y se distribuyó en placas petri estériles de 90 x 15 mm.



## 1. Agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero

El medio de cultivo fue preparado partiendo de la base deshidratada y siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

1. Se pesó 3.8 gr. de la base deshidratada y se adicionó 100 ml de agua destilada, a continuación se procedió a calentar con agitación frecuente hasta lograr la disolución total del medio de cultivo, por último se esterilizó en autoclave sometiéndolo a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos.
2. Una vez terminado el proceso en la autoclave se dejó enfriar hasta que el medio de cultivo alcanzó una temperatura entre 45°C – 50°C para agregar posteriormente 5% de sangre bovina estéril al medio fundido y estéril.
3. Una vez adicionada la sangre se homogenizó el medio de cultivo y se distribuyó en placas petri estériles de 90 x 15 mm.



4. **Activación de la cepa: Kwik-stik microbiologics - *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Para preparar el inóculo se empleó el producto Kwik-stik microbiologics® que contiene a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 liofilizada en un pellet.

1. El Kwik-stik tiene en la superior una ampolla con líquido hidratante, el cual fue liberado al apretar una sola vez la mencionada ampolla que se encuentra en la tapa. Luego de realizar esta operación el Kwik-stik se mantuvo en posición vertical para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad, que contiene el gránulo.
2. Por último se presionó la parte inferior de la unidad para lograr una suspensión homogénea.
3. De inmediato se procedió a saturar el hisopo, que contiene el producto, con el material hidratado y se transfirió a una placa con agar sangre para *Streptococcus pyogenes* y agar nutritivo para *Staphylococcus aureus*, los cuales fueron incubados a 37 °C. Durante 24 horas.



*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

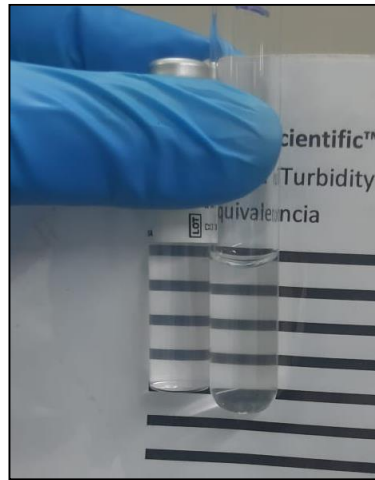


*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

4. **Método de preparación del inóculo**

1. Se realizó la suspensión directa, en solución salina (cloruro de sodio 0.9%), de colonias obtenidas de cada una de las placas anteriormente incubada durante 24 horas.

2. La turbidez resultante fue inmediatamente ajustada comparándola de manera visual con la turbidez del estándar 0.5 de Mc. Farland.



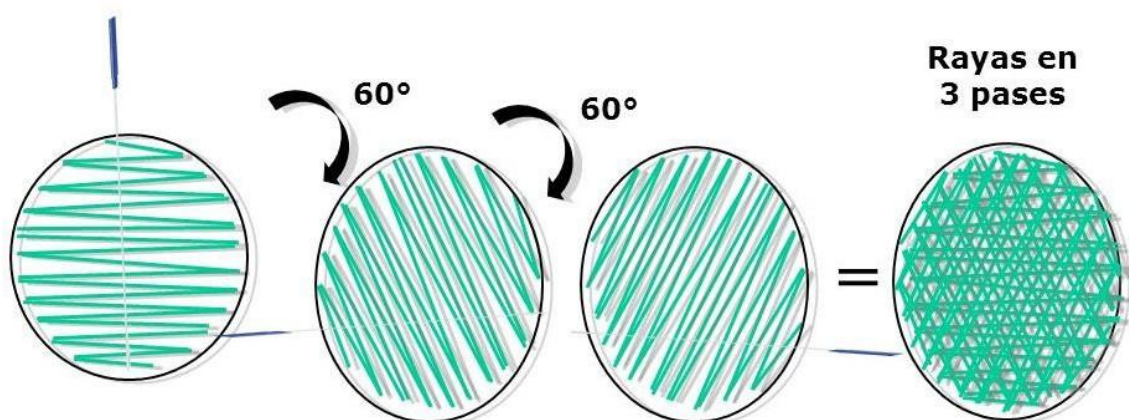
*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615



*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

### 3. Inoculación de placas

1. Dentro de los 15 minutos posteriores al ajuste de la turbidez del inóculo, se procedió a sumergir un hisopo estéril en la suspensión obtenida; el hisopo se rotó varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo y por encima del nivel del líquido, esto con la finalidad de remover el exceso de inóculo.
2. Posteriormente se inoculó sobre la superficie seca del agar Muller Hinton y Muller Hinton sangre; para esto se realizaron estrías en tres direcciones diferentes rotando la placa 60° cada vez, esto con la finalidad de asegurar una distribución uniforme del inóculo.
3. Previamente todas las placas fueron marcadas para posteriormente colocar los discos.







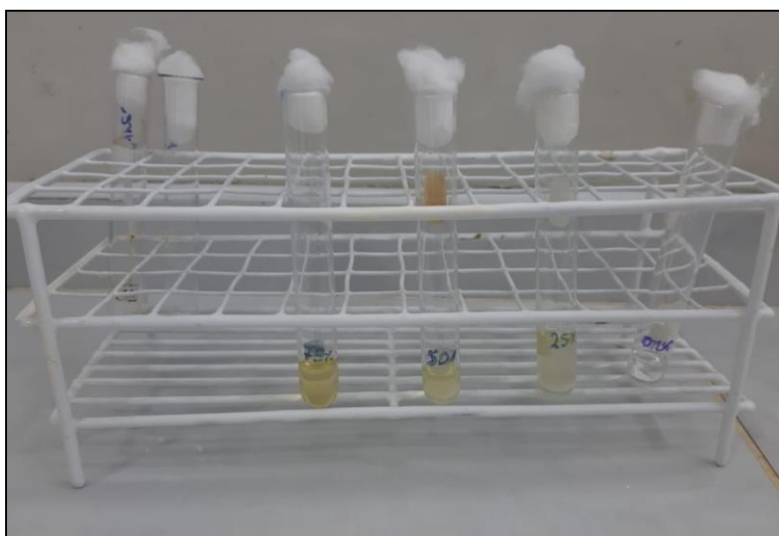
#### 4. Preparación de discos de sensibilidad

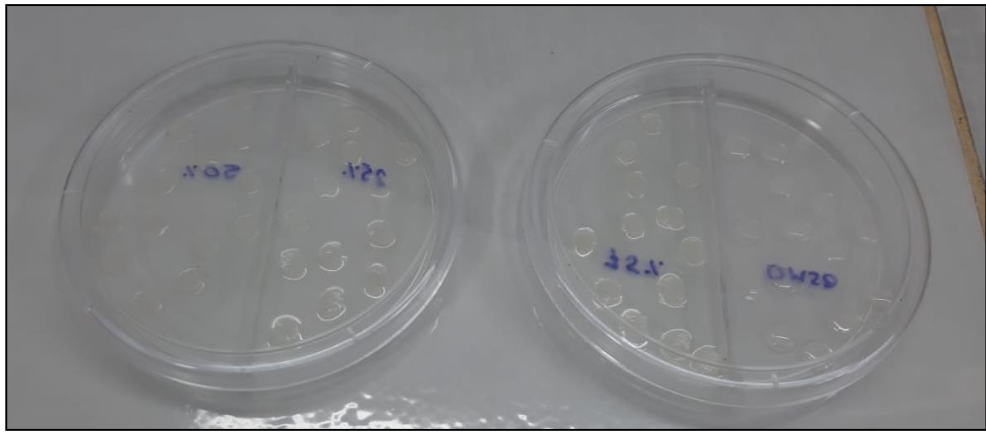
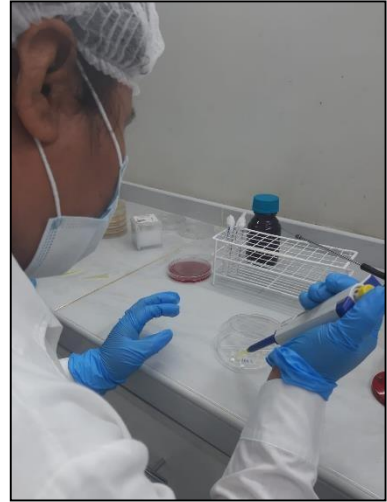
Para la preparación de los discos se emplearon discos de papel filtro whatman N° 1 de 6 mm de diámetro previamente esterilizados.

Cada uno de los discos fue embebido con 10 uL de muestra de la siguiente manera:

1. Discos embebidos con aceite de copoazu al 100 %.
2. Discos embebidos con aceite de copoazu al 75 %.
3. Discos embebidos con aceite de copoazu al 50 %.
4. Discos embebidos con aceite de copoazu al 25 %.
5. Discos embebidos con DMSO
6. Discos de vancomicina de 30 ug.

Posteriormente los discos fueron puestos sobre la superficie del medio de cultivo sólido previamente inoculado con cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923





## 7. Incubación

Las placas se incubaron durante 24 horas en posición invertida a 37°C dentro de los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos. Las placas con agar sangre fueron incubadas dentro de una jarra de anaerobiosis. (Sistema Gaspak)

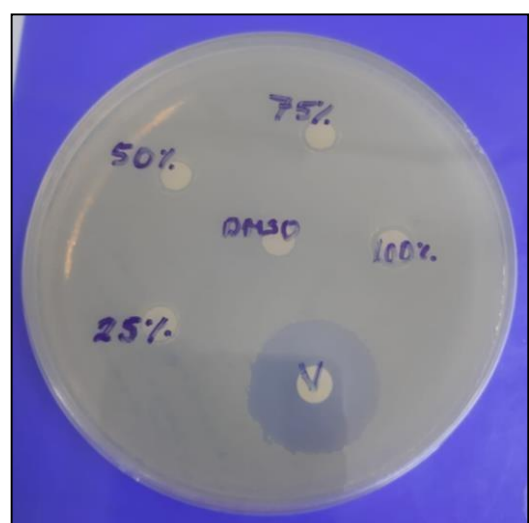
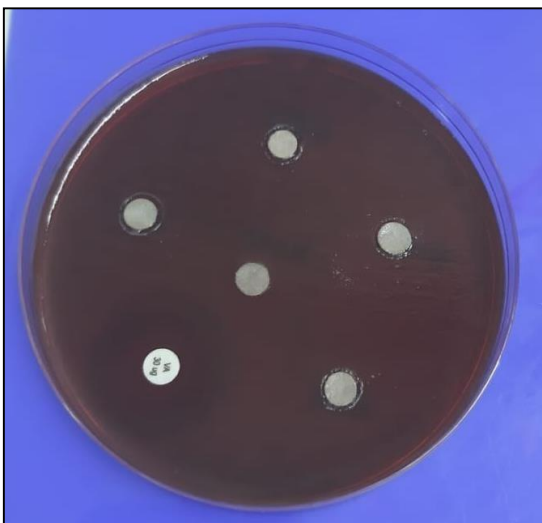
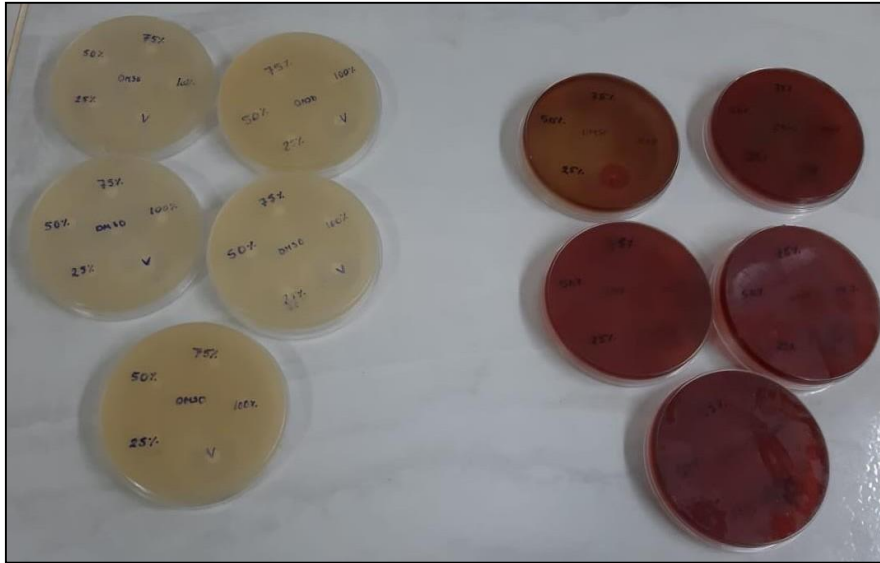


## 8. Lectura de resultados

Halos de inhibición de los 6 grupos fueron medidos empleando un vernier.

9. Discos embebidos con aceite de copoazu al 100 %.
10. Discos embebidos con aceite de copoazu al 75 %.
11. Discos embebidos con aceite de copoazu al 50 %.
12. Discos embebidos con aceite de copoazu al 25 %.
13. Discos embebidos con DMSO
14. Discos de vancomicina de 30 ug.





## ANEXO E. INFORME DE LABOTARIO



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

### Informe de Resultados

Solicitado por : Bez Mamani Alcida  
Humpiri Parizela Roxana Maribel

Muestra : Aceite de coposú  
Fecha de ensayo: 10-07-2021

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	100%	75%	50%	25%	Vancomicina 30 ug	DMSO
Staphylococcus aureus ATCC 25923	9.05	8.27	7.34	6.82	22.47	6
	9.01	8.24	7.31	6.83	22.48	6
	9.04	8.26	7.33	6.82	22.39	6
	9.01	8.20	7.32	6.81	22.41	6
	9.03	8.24	7.31	6.82	22.48	6
Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	100 %	75%	50%	25%	Vancomicina 30 ug	DMSO
Streptococcus pyogenes ATCC 19615	8.21	7.55	6.69	6.39	22.86	6
	8.22	7.52	6.83	6.48	22.88	6
	8.23	7.50	6.80	6.46	22.86	6
	8.21	7.54	6.89	6.48	22.89	6
	8.22	7.53	6.81	6.48	22.88	6

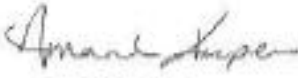


\*Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición.

  
Lic. T.M. Walter A. Sini Rodriguez  
CTMP. 10808

# ANEXO F. ATCC STAPHYLOCOCCUS AUREUS 25923



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<p><b>Specifications</b>  <b>Microorganism Name:</b> Staphylococcus aureus subsp. aureus  <b>Catalog Number:</b> 0360  <b>Lot Number:</b> 360-389**  <b>Reference Number:</b> ATCC® 25923™  <b>Purity:</b> Pure  <b>Passage from Reference:</b> 3</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2021/08/30  <b>Release Information:</b>  <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon  <b>Release Date:</b> 2019/09/08</p>
<p style="text-align: center;"><b>Performance</b></p> <p><b>Macroscopic Features:</b>          Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, SBAP smooth, opaque, beta hemolytic</p> <p><b>Microscopic Features:</b>          Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters</p> <p><b>Medium:</b></p> <p><b>Method:</b>          Gram Stain (1)</p>	
<p><b>ID System:</b> MALDI-TOF (1)          See attached ID System results document.</p>	<p><b>Other Features/ Challenges/ Results</b>          (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive          (1) Coagulase (rabbit plasma -tube): positive          (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative          (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm          (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm          (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm</p> <p style="text-align: center;">          Amanda Kuperus          Quality Control Manager          AUTHORIZED SIGNATURE</p>
<p><small>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-end;"> <div data-bbox="295 1422 438 1624">     <small>TESTING CERT #2635.01</small> </div> <div data-bbox="534 1433 1356 1534"> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> <p><small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> </div> </div>	

# ANEXO G. ATCC STREPTOCOCCUS PYOGENES 19615



**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

<p><b>Specifications</b>                  Microorganism Name: Streptococcus pyogenes (group A)                  Catalog Number: 0385                  Lot Number: 385-162**                  Reference Number: ATCC® 19615™                  Purity: Pure                  Passage from Reference: 3</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2021/07/30  <b>Release Information:</b>                  Quality Control Technologist: Mary L. Bowman                  Release Date: 2019/08/22</p>
<b>Performance</b>	
<p><b>Macroscopic Features:</b>                  Two colony types, both are circular, convex, entire edge; one is medium &amp; beta hemolytic, other is small and alpha hemolytic, turning to beta as culture ages.  <b>Microscopic Features:</b>                  Gram positive cocci</p>	<p><b>Medium:</b>                  SBAP  <b>Method:</b>                  Gram Stain (1)</p>
<p><b>ID System: MALDI-TOF (1)</b>                  See attached ID System results document.</p>	<p><b>Other Features/ Challenges: Results</b>                  (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative                  Bacitracin differential: Sensitive</p> <div style="text-align: center;">                       Amanda Kuperus                      Quality Control Manager                      AUTHORIZED SIGNATURE                 </div>
<p><small>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>▲ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="311 1243 518 1422">                   ACCREDITED  <small>REFERENCE MATERIAL PRODUCER</small>  <small>EST. 1956, #1</small>                  ATCC Licensed                  Derivative             </div> <div data-bbox="558 1400 1388 1444"> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologia, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="311 1444 518 1590">                   ACCREDITED  <small>TESTING CERT #2055.01</small> </div> <div data-bbox="558 1467 885 1489"> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</small></p> </div> </div>	