

TÍTULO DEL PROYECTO

Composición Química del Aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* (Tara) y Determinación de su actividad antibacteriana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasas.

SIGLAS

CQAT, EFP

TIPO DE PROYECTO

Basica

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Microbiología molecular y biotecnología

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 01/04/2016 Fecha de término: 30/03/2017

PARTICIPANTES

- GONZALEZ CABEZA JOSE GUILLERMO (DOCENTE) — 000048718
- ARAUJO JIMENEZ ARMANDO (DOCENTE) — 000042098
- GOMEZ CASTRO KELLYN MYLUSKA (DOCENTE) — 000076554
- AVILA VERAU ELIO FERNANDO (INVESTIGADOR) — 000064893
- TERAN ROJAS YONY ALEXANDER (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000070981
- REYNA LOPEZ LENNIS ANTONIO (DOCENTE) — 000070550

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONOR ORREGO - UPAO (Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología. Dpto. De Ciencias - UPAO)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Perú es un país que cuenta con un arsenal de plantas curativas gracias a su biodiversidad; esto permitió su utilización de nuestros ancestros para curar sus enfermedades y así aliviar sus dolencias; estas plantas ha sido el único recurso con el que contaban los médicos de la época, fue así entonces, que se profundizo el estudio de las distintas especies vegetales que poseían propiedades curativas esto ha despertado la inquietud de pretender aislar ciertos , principios activos contenidos en sus diferentes extractos.

Una de estas plantas con un gran potencial antibacteriano es la llamada *Caesalpinia spinosa* (Tara), se trata de una especie forestal nativa de los valles interandinos la producción se distribuye por toda la costa peruana desde Piura hasta Tacna, así como en los valles interandinos de Ancash, Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Huancavelica, Huánuco y Junín. A los diversos extractos de sus vainas se le atribuyen entre otras propiedades, actividad bactericida sobre bacterias Gram positivas como el género *Staphylococcus* ^(1, 2,3).

Pseudomonas aeruginosa es el principal patógeno de la familia pseudomonadaceae anteriormente se consideraba como una bacteria saprofita o como un microorganismo inocuo debido a su poca relación con infecciones, pero a medida que ha pasado el tiempo esta ha evolucionado convirtiéndose en uno de los patógenos oportunistas con mayor poder patógeno a nivel Intrahospitalario; especialmente en pacientes inmunocomprometidos, que estén expuesto a alteración de las barreras físicas (quemaduras, cirugía, lesiones oculares, procedimientos invasivos) y enfermedades como fibrosis quística y diabetes mellitus.

Pseudomona aeruginosa ha emergido como uno de los principales patógenos hospitalarios causantes de infecciones graves y productores de -lactamasas de espectro extendido (BLEE) inusuales, como PER- 1, OXA y carbapenemasas ⁽⁴⁾. Los carbapenémicos, imipenem y meropenem son los fármacos de elección para tratamiento de las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Sin embargo, la frecuencia de aislamientos de cepas resistentes a estos medicamentos se ha incrementado considerablemente en todo el mundo y en América Latina, incluyendo Perú donde la prevalencia de infecciones por este patógeno está yendo en aumento.

La producción de carbapenemasas es un mecanismo de resistencia de gran importancia en *P. aeruginosa*, pues las cepas productoras en general resultan resistentes no sólo a imipenem y meropenem, sino también a otros antibióticos -lactámicos que se utilizan para el tratamiento. La producción de estas enzimas se debe a la presencia de genes que en su mayoría se encuentran localizados en integrones insertados, elementos móviles como transposones y plásmidos.

Con el afán de buscar nuevos principios activos que suplan a los ya existentes y que nos permitan llevar una terapia antimicrobiana exitosa, sobre todo en estas bacterias resistentes, es que se realizó un trabajo con el aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Mediante el cual se evaluó su efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina (SARM) obteniéndose resultados muy favorables ⁽⁵⁾.

Nuestra inquietud va un poquito más allá, el pretender determinar la composición química de este aceite esencial de tara y determinar específicamente que compuesto es el que está ejerciendo su efecto sobre estas bacterias multirresistentes y; a la vez nos permitirá evaluar su actividad antimicrobiana frente a bacterias resistentes como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem y meropenem.

Problema

¿Cuál será la Composición Química del Aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* (Tara) que permita determinar su actividad antibacteriana frente a cepas de *Pseudomona Aeruginosa*

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Pseudomonas presenta un alto nivel de resistencia, por un lado resistencia intrínseca o natural y por el otro lado una extraordinaria capacidad para adquirir distintos mecanismos de resistencia generalmente mediada por mutaciones ⁽⁶⁾. Un ejemplo de esto es la resistencia natural de la *P. aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprin sulfametoxazol; esta resistencia se debe a su membrana externa probablemente el factor más importante sea la presencia de bombas de expulsión sobre todo Mex AB-OprM, con capacidad para expulsar antibióticos lactámicos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetoprin ⁽⁷⁾.

La *resistencia adquirida* aparece por cambios puntuales en el DNA (mutación) o por la adquisición de plásmidos, transposones, integrones, en el primero se dan casos tales como la transformación de una -lactamasa en una -lactamasa de espectro extendido o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior de la célula bacteriana.

La multirresistencia ha adquirido tal importancia que la OMS ha identificado este problema como la quinta amenaza para la salud humana y sus consecuencias generan múltiples campañas para intentar controlar esta situación ^(8,9). La importancia de la multirresistencia radica en que provoca un claro aumento de la morbi-mortalidad de los pacientes tanto en el ámbito hospitalario como ambulatorio y la repercusión en los costes sanitarios en un problema añadido por la salud pública ^(10,11). Al existir un alto grado de resistencia se ven limitadas las posibilidades terapéuticas con un déficit claro de antibacterianos efectivos para estos microorganismos ⁽¹²⁾.

Pseudomonas aeruginosa multirresistente (PAMR) forma parte de un grupo de microorganismos llamados PROBLEMATICOS O CONFLICTIVOS (Junto al *Enterococcus* resistente a vancomicina (ERV), *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM), *Enterobacterias* multirresistentes (BLEE) y *Acinetobacter baumannii*), que tienen en común la gravedad de infecciones causadas y las dificultades terapéuticas.

Esta multirresistencia incluyen a ciertos antipseudomónicos entre los que se encuentran penicilinas antipseudomónicas (Piperacilina), Cefalosporinas (Ceftacidima, cefepime), Carbapenems (Imipenem, Meropenem, Doripenem), Fluoroquinolonas (Ciprofloxacino), Aminoglucosidos (Gentamicina, Tobramicina, Amikacina), Monobactam (Aztreonam) y Polimixina (Colistina) ⁽¹³⁾.

La resistencia de *Pseudomonas* a carbapenems parece ser bastante alta en toda Europa. En Dinamarca, países bajos, Suiza Suecia y Finlandia la resistencia a carbapenems se encuentra debajo del 10% mientras que en Croacia, Turquía, Alemania, Italia, Republica checa y Grecia por encima del 25% ; en EEUU en el año 2008 la prevalencia de *PARM* como causa de infecciones nosocomiales estuvo en torno a un 10% ⁽¹⁴⁾. Según datos de US *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) *P.aeruginosa* es la segunda causa de neumonía (17%), la tercera de infección del tracto urinario (7%) y la cuarta de infección de herida quirúrgica (8%) y es el quinto patógeno más frecuente en muestras de cualquier procedencia (9%) ⁽¹⁵⁾.

Estudios revelados por la sociedad española de medicina *Preventiva, Salud Pública e Higiene* (EPINE) correspondiente a la prevalencia de infecciones nosocomiales en España 2010, la mayoría de las infecciones bacterianas fueron causadas por bacterias gramnegativas (48.9%) tanto en el ámbito nosocomial como a nivel comunitario (54.5% y 45.2% respectivamente); Teniendo en cuenta que los microorganismos aislados como es el caso de *P. aeruginosa* fue la segunda causa de infección global (8.1%) sin tener en cuenta los porcentajes según la sensibilidad ⁽¹⁶⁾.

Por otro lado a *P. aeruginosa* se le atribuye la primera causa de infección respiratoria nosocomial (18.6%) y la segunda en infecciones del tracto urinario nosocomial (9.8%), infección respiratoria comunitaria (12%) y de herida quirúrgica (10.7%) ⁽¹⁶⁾. En ciertos estudios realizados identificaron una prevalencia de aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a imipenem y meropenem del 18.9% y de 0.4% de cepas productoras de metalo lactamasas ⁽¹⁷⁾. El interés del estudio de este microorganismo radica, por lo tanto, en su elevada capacidad de adaptación, convirtiéndose en una de las bacterias más temidas a nivel intrahospitalario ocasionando una elevada tasa de mortalidad en no solo en pacientes inmunocompetentes sino en todos aquellos que sean expuestos a tratamiento invasivos;

En la actualidad las plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, para conocer los principios activos responsables de cortar, aliviar o curar las enfermedades. Un análisis de esta naturaleza debe ser realizado como una acción multidisciplinaria con la intervención de biólogos, químicos, farmacólogos y farmacognosistas ⁽¹⁸⁾

Las propiedades curativas de las plantas se atribuyen a la presencia de un "principio activo", el cual produce un efecto fisiológico. Un gran porcentaje de estos principios activos están comprendidos dentro de los productos naturales o metabolitos que son compuestos de estructura compleja y de distribución restringida, entre ellos: alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, aceites esenciales, gomas, resinas y taninos, que pueden encontrarse distribuidas por toda la

planta o en alguna de sus partes⁽³⁾.

La flora peruana es muy rica en especies a las que la medicina tradicional atribuye eficaces propiedades terapéuticas, las que sin embargo aún no son investigadas convenientemente, tal es el caso de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “taya” perteneciente a la familia de las leguminosas. La “tara”, es una planta originaria del Perú utilizada desde la época prehispánica en la medicina folclórica o popular y en años recientes, como materia prima en el mercado mundial de hidrocoloides alimenticios⁽¹⁹⁾.

Tradicionalmente la *Caesalpinia spinosa* “tara” ha sido utilizada en el tratamiento de diversas afecciones respiratorias, lo que supone que posee compuestos con actividad antimicrobiana, por ello se han realizado al respecto experiencias a nivel científico así como también con bacterias entre ellas *Staphylococcus aureus*⁽²⁰⁾.

trabajos realizados sobre el tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma que contienen extracto hidroalcohólico de tara (*Caesalpinia spinosa*) en animales de experimentación con el objetivo de Evaluar el efecto cicatrizante de hidrogeles obtenidos con radiación gamma embebidos con extracto hidroalcohólico de tara (*Caesalpinia spinosa*) se demostró que el hidrogel de quitosano-alcohol polivinílico embebido en extracto hidroalcohólico de tara mostró significativamente mayor actividad cicatrizante que el extracto hidroalcohólico de tara solo⁽²¹⁾.

En el año 1998 encuentran que la planta de *Caesalpinia spinosa* tiene diferente acción antimicrobiana frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Penicillium sp* y *Aspergillus sp*⁽²²⁾. También se han realizado evaluaciones sobre la efectividad del extracto de tara usando el fruto (vaina) completo en los que se demostró actividad inhibitoria sobre cepas Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. Los componentes del fruto relacionados con dicha actividad corresponden exclusivamente a la cáscara de la vaina, donde la pepa no muestra actividad inhibitoria. Los halos de inhibición de la tara fueron mayores a los que produjeron extractos de Eucalipto⁽²⁰⁾. Se ha demostrado que la actividad de *Caesalpinia spinosa* frente a estreptococo hemolítico aumenta a medida que se eleva (25% a 100%) la concentración del extracto⁽²³⁾.

Estudios in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina), sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*, se encontró un efecto aceptable debido a la presencia de halos de inhibición de mayor diámetro que los obtenidos con penicilina y eritromicina, antibióticos que se ensayaron como referencia⁽²⁴⁾.

Se ha determinado mediante el método de Kirby - Bauer que el extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) presenta efecto inhibitorio sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y

Streptococcus pyogenes ⁽²⁵⁾. También se ha determinado una actividad antimicrobiana marcada de las vainas maduras (extracto crudo) de *Caesalpinia spinosa* “tara” contra *Staphylococcus aureus*, aunque no se ha logrado determinar una verdadera Concentración mínima bactericida debido a que el extracto crudo, no diluido, no logro matar a todas las bacterias, de allí que algunos piensen que el ácido gálico presente en estos vegetales sólo ejerza una acción sinérgica con otros compuestos antimicrobianos, de hecho ya hay estudios al respecto ^(26,27).

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

En los últimos tiempos el uso indiscriminado de antibióticos ha hecho que ciertos microorganismos causantes de infecciones en el ser humano generen resistencia razón por la cual se hace cada día más difícil combatir dichas infecciones. Tal es el caso de Las Infecciones Intrahospitalarias (IIH) o también llamadas Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, constituyen un desafío ineludible para los, investigadores, autoridades de los hospitales, al ser consideradas un evento adverso para el paciente que influye en la calidad de atención, en un sistema donde los servicios de salud están siendo cada vez más afectados debido a la presencia de microorganismos altamente patógenos; estos agentes bacterianos han desarrollado distintos mecanismos de defensa frente a las drogas perjudicando cada vez más la salud de los pacientes.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en su estrategia: “Salud para todos en el año 2000”, reconoce la necesidad de incorporar a la salud pública los recursos y técnicas de la medicina tradicional. Así, el medicamento natural puede contribuir a la solución del problema de salud rural, así como aliviar del alto costo y difícil adquisición de medicamentos hechos a base de insumos químicos, los que han reemplazado a muchas de las antiguas y bien establecidas drogas vegetales ⁽²⁴⁾.

De acuerdo a lo mencionado, nuestro propósito en la presente investigación es determinar a componentes químicos que estén presentes en el aceites esencial de *Caesalpinia spinosa* (tara), que contribuyan a la disminución de la viabilidad de estos patógenos resistentes, y así promover la formulación de un antimicrobiano eficaz; por otra parte buscamos en la tara al ser un recurso renovable, nativo y abundante, que su exportación no sólo sea como materia prima sino darle un valor agregado.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la composición química del aceite esencial de los frutos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y evaluar su capacidad antibacteriana frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem y meropenem.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la composición química del aceite esencial de los frutos de *Caesalpinia spinosa* “tara”
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de tara sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem y meropenem aislados del Hospital regional docente de Trujillo.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de tara sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 77297 y de *P. aeruginosa* ATCC 25927 .

V. MARCO TEÓRICO

Características generales de *P. aeruginosa*. Es la principal especie patogénica de la familia Pseudomonadaceae y se identifica fácilmente como un bacilo gran negativo, recto o ligeramente curvado, con una longitud que oscila desde 1 hasta 3 mm y una anchura de 0,5 a 1,0 mm. Las principales características morfológicas en medios de laboratorio incluyen la producción de pigmentos, especialmente un pigmento de fenacina soluble de color azul, llamado piocianina. Algunas cepas producen colonias rojas o negras debido a la síntesis de pigmentos denominados piorrubina y piomelanina, respectivamente. Otro pigmento producido por *P. aeruginosa*, con capacidad de difusión, de color amarillo verdoso a amarillo marronáceo, es la pioverdina que, cuando se produce junto con la piocianina, da lugar a una colonia típica de color verde a azul verdoso en medios sólidos.

El nombre aeruginosa procede del color verde azulado que se observa en el interior de las colonias de muchos aislados clínicos. Las colonias de *P. aeruginosa* pueden presentar una morfología sumamente variada; las colonias típicas parecen propagarse sobre la placa, extenderse con un brillo metálico y con frecuencia producen un aspecto gelatinoso o «viscoso» especialmente en zonas de gran crecimiento. Sin embargo, se ven variantes de colonias que

incluyen los morfotipos enano, coliforme y mucoide, siendo esta última morfología especialmente frecuente cuando se observan cultivos procedentes de las vías respiratorias y secreciones de pacientes con fibrosis quística (FQ).

La entrada de *P. aeruginosa* en la mayoría de los humanos se produce por vía oral o respiratoria; pudiendo llegar a tener consecuencias graves, especialmente para aquéllos con comorbilidades subyacentes o una predisposición genética, como en la FQ. Por lo general, se considera que las dos principales adhesinas que desempeñan un papel en este sentido son los pili y los flagelos que presentan varias funciones incluidas tanto la motilidad como la unión a receptores.

Factores de virulencia y su importancia clínica

P. aeruginosa es un patógeno bacteriano de mucho interés, debido a múltiples factores que hacen que se convierta en el patógeno más formidable para el ser humano; esto se debe a su diversa complejidad de sus factores de virulencia. El microorganismo presenta un genoma grande de más de 6 megabases de tamaño que es sumamente flexible en términos de capacidad para incorporar y modificar el ADN. Casi todas las clases principales de sistemas de virulencia bacteriana se encuentran en este microorganismo incluidas exotoxinas, endotoxinas, toxinas secretadas de **tipo III, pili, flagelos, proteasas, fosfolipasas, proteínas de unión a hierro, exopolisacáridos**, la **capacidad para formar biopelículas** y elaboración de **piocianinas**.

El microorganismo puede crecer de manera anaeróbica si está presente una fuente de nitrato. *P. aeruginosa* es un patógeno significativo en parte debido a las prácticas médicas modernas que utilizan una gama extensa de dispositivos médicos implantados, que oscilan desde catéteres venosos hasta implantes ortopédicos, sobre los cuales el microorganismo puede colonizar y formar una biopelícula y después diseminarse por vía sistémica. *P. aeruginosa* produce una variedad de proteasas que pueden inactivar los efectores inmunitarios del huésped, son citotóxicas para las células y pueden degradar componentes tisulares permitiendo al microorganismo desarrollar el proceso infeccioso.

Las proteasas mejor estudiadas de *P. aeruginosa* son las **elastolíticas codificadas por los genes lasA (proteasa LasA) y lasB (elastasa), proteasa alcalina y proteasa IV**. Estas proteínas tienen un amplio intervalo de especificidades de sustrato y se piensa que contribuyen en la patogenia por su capacidad diversa para degradar proteínas del huésped ⁽²⁸⁾.

Intoxicación mediante factores de secreción tipo III.

Los sistemas de secreción tipo III permite la inyección directa de toxinas bacterianas en el interior de células eucariotas, causando alteraciones en el tráfico celular al inhibir el citoesqueleto de actina y también al afectar a la síntesis proteica. Para *P. aeruginosa*, la expresión de las toxinas de tipo III se asocia de manera significativa con evoluciones clínicas, incluido el aumento de la mortalidad en pacientes con infección aguda ⁽²⁸⁾.

La colonización de los tejidos implica la existencia de adhesinas; las mejor caracterizadas son las fimbrias, aunque otros tipos de adhesinas incluyen lipopolisacáridos, flagelos, proteínas de la membrana externa y alginato. La formación de biopelícula también juega un papel muy importante en la patogénesis de *P. aeruginosa*, ya que permite a este microorganismo colonizar superficies, por ejemplo, instrumentales médicos como catéteres, tubos endotraqueales y lentes de contacto, también puede contribuir a la infección crónica de las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística ^(29,30).

Mecanismos de Resistencia de *P. aeruginosa*

El gran problema de las infecciones por *P. aeruginosa*, es la limitada existencia de agentes antimicrobianos efectivos debido a la elevada resistencia intrínseca que presenta a diferentes familias de antimicrobianos como: aminopenicilinas, aminopenicilinas combinadas con inhibidores, cefalosporinas de 1^o y 2^o generación, cefamicinas, ertapenem, trimetoprim sulfametoxazol, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, glucopéptidos, antiguas quinolonas, novobiocina y nitrofurantoina. Esta resistencia natural, es debida a que *P. aeruginosa* posee una lactamasa cromosómica inducible de tipo AmpC y a la presencia de una membrana poco permeable y a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos que confieren la denominada *impermeability-mediated resistance*. Además este microorganismo tiene una elevada capacidad de adquirir resistencia mediante diversos mecanismos, a los antibióticos llamados antipseudomónicos ^(31,32).

Resistencia a los -lactámicos

De un modo general los -lactámicos actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de peptidoglucano por inhibición de la transpeptidasa, conocidas como proteínas ligadoras de penicilina (Penicilin Binding Proteins, PBP). Para ejercer su acción antimicrobiana los -lactámicos requieren penetrar la pared celular y atacar las PBP, en el caso de los gram positivos este proceso es facilitado por la presencia de gran cantidad de peptidoglucano que posee una

característica más hidrofílica. Pero en los gram negativos como *P. aeruginosa* este proceso se torna más difícil, ya que presenta lipopolisacáridos en su membrana externa lo que dificulta la penetración del fármaco, además de esto *P. aeruginosa* carece de porinas de alta permeabilidad que permitan el ingreso del fármaco dentro de la célula. Por esto sólo algunos -lactámicos presentan actividad frente a *P. aeruginosa* (33, 34,35).

Impermeabilidad

La baja permeabilidad necesita la presencia de porinas específicas para la captación de nutrientes. Las porinas en *P. aeruginosa* pueden ser divididas en tres grandes familias: la familia **OprD** de porinas específicas (19 miembros), la familia **OprM** de porinas de eflujo y la familia **TonB**-interacción. Siendo, sólo las de tipo OprD importantes en la captación de antibióticos (36).

La impermeabilidad adquirida debido a la pérdida de la porina OprD es un importante mecanismo de resistencia a carbapenems. La penetración de imipenem (IPM) y otros carbapenems (aunque no de otros -lactámicos) ocurre a través de la porina OprD que está en la membrana externa y es específica para el transporte de aminoácidos dibásicos y glutamato:

La analogía estructural entre éstos y los carbapenems explica la capacidad para penetrar la membrana utilizando la OprD. La afinidad y la capacidad de difusión de IPM es casi 70 veces mayor que la de meropenem (MER), debido a la naturaleza más hidrofílica de IPM. La pérdida de esta porina (junto con la producción de AmpC) puede determinar la resistencia a IPM. Por otro lado IMP tiene capacidad de seleccionar, intra-tratamiento, cepas con mutaciones en la OprD. Se ha demostrado que la capacidad de esta bacteria para eliminar los antibióticos que penetran en la misma, empleando sistemas de expulsión activa, es tan importante como la baja permeabilidad de su membrana externa (36, 37).

Sistemas de Eflujo

Las bombas de eflujo son complejos proteicos de membrana que expulsan de la bacteria sustancias tóxicas para ésta. Los sistemas de eflujo activos (bombas de eflujo) propios de la especie presentan una amplia especificidad de sustratos, siendo responsables en parte de la resistencia natural en *P. aeruginosa*.

Los sistemas de eflujo capaces de expulsar antibióticos se dividen en cinco clases: la superfamilia mayor facilitador (MFS), la familia cassette de unión-ATP (ABC), la familia de resistencia-nodulación-división (RND), la familia pequeña multidroga resistentes (SMR) y la familia de

expulsión de componentes tóxicos y multidrogas (MATE).

Todas las bombas de expulsión de los carbapenémicos pertenecen a la familia RND, los denominados sistemas tripartitos. Un transportador de reflujo situado en la membrana citoplasmática, una porina de tipo channel-tunnel en la membrana externa que expulsa al exterior al antibiótico y una proteína de fusión de membrana (MFP) encargada de establecer un nexo de unión entre ambas (38, 39).

Uno de los sistemas de eflujo que se expresa en cepas salvajes de *P. aeruginosa* es llamado MexA – MexB – OprM- MexB es una proteína que actúa como bomba localizada en la membrana citoplasmática, OprM es una porina que promueve la exportación de sustancias situado en la membrana externa y MexA es una proteína que liga los dos componentes anteriores, situada en el espacio periplasmático. Esta bomba tiene la capacidad de expulsar al exterior de la bacteria, en contra del gradiente de concentración, a -lactámicos (excepto IPM), cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfonamidas, tetraciclinas y trimetoprima.

La capacidad de MexA – MexB - OprM para eliminar MER pero no IPM se debe a la diferente estructura molecular de ambos compuestos: MER posee un radical lipofílico no presente en IPM, que le permite ser reconocido y eliminado por la bomba (40, 41). Las bombas de expulsión, además de ser constitutivas, tienen también la capacidad de ser inducidas por antibióticos, especialmente ciprofloxacina; además, los cambios mutacionales, incluso de una sola base nucleotídica en el ADN cromosómico de la bacteria, pueden provocar la hiper expresión de estas bombas. La hiper expresión de otra bomba MexE-MexF-OprN confiere resistencia a quinolonas y algunos -lactámicos, que incluyen MER y IPM.

Carbapenemasas

Las carbapenemasas de tipo OXA pueden ocurrir naturalmente en algunos organismos gram negativos, así como pueden ser adquiridas por la incorporación de material genético. Las carbapenemasas de tipo OXA son designadas con las siglas CHDLs, por *Carbapenem-Hidrolising class D -lactamasas* (42). Las CHDLs presentan capacidad de hidrolizar carbapenems en tanto que no presentan actividad sobre aztreonam y cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Caesalpinia spinosa (Tara)

La *Caesalpinia spinosa*, pertenece a la Familia Caesalpiníaceae, se trata de una planta originaria del Perú, y debido a sus características físico químicas ha hecho que se convierta en uno de los productos de mayor importancia en el mercado mundial ⁽⁴³⁾. El término Tara no está relacionado a un área geográfica o lugar determinado, sino más bien esta planta es producida en varias zonas del país, y cultivada en terrenos situados entre los 1,000 y 2,900 m.s.n.m., por lo que sus principales productores los departamentos de Cajamarca, La Libertad, Ayacucho, Huancavelica, Apurímac, Ancash, Cuzco y Huánuco. Últimamente se está cultivando la tara orgánica en la provincia de Cañete, en pleno arenal, existiendo alrededor de 200 hectáreas con proyección a 320 hectáreas para el próximo año ⁽⁴⁴⁾.

Respecto a la aplicación en el campo industrial se obtiene goma de uso alimenticio e industrial, proveniente del endospermo, mediante un proceso térmico mecánico, constituyéndose como alternativa de las gomas tradicionales en la industria mundial de alimentos, pinturas, barnices, entre otros. Esta goma ha sido aprobada, por resolución el 26 de Setiembre de 1996 (Nº E.C.C: E-417) por la Comunidad Europea, para ser usada como espesante y estabilizador de alimentos para consumo humano ⁽²³⁾.

Especie Botánica: *Caesalpiniaspinosa* (Molina) Kuntze

División: Magnoliópsida (Angiospermae)

Clase: Magnoliópsida (Dicotiledónea)

Sub- clase: VRosidae

Familia: Cesalpinia

Género: *Caesalpinia*

Especie: *Caesalpiniaspinosa* o *C. tinctoria*

Etimología: *Caesalpinia*, en honor a de Andrea *Caesalpinia* (1524 - 1603), botánico y filósofo italiano; *spinosa*, del latín *spinosus*, con espinas (Cabellos 2009)

Descripción Botánica:

La tara es un árbol pequeño en sus inicios, de dos a tres metros de altura; pero, puede llegar a medir hasta 12 metros en su vejez; de fuste corto, cilíndrico y a veces tortuoso, y su tronco, está provisto de una corteza gris espinosa, con ramillas densamente dobladas, en muchos casos las ramas se inician desde la base dando la impresión de varios tallos.

Composición Química

Las vainas contienen taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; asimismo se han aislado galato de etilo y cuatro galatos del ácido quínico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-di-O-galoilquínico y de 3,4,5- tri-O-galoilquínico, y a los ácidos 3,4-di-O- galoilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico¹¹(Camacho, Martínez – Navarrete y otros 1999) Delendospermo se ha separado la goma o hidrocoloidegalactomanánico en la que los componentes monoméricos galactosa y manosa se encuentran en una relación de 24, 41:70,90 (1:2,9). La viscosidad intrínseca permitió su peso molecular promedio en 351400, así mismo la goma da lugar a soluciones acuosas con características de fluido pseudoplástico con una viscosidad promedio de 4000 cp⁽⁴⁵⁾.

VI. HIPÓTESIS

Implícita

VII. METODOLOGÍA

METODOLOGÍA.

TIPO DE INVESTIGACION

| | | | |
|--|--|--|--|
| Según el período en que se capta la información | Según la evolución del fenómeno estudiado | Según la comparación de poblaciones | Según la interferencia del investigador en el estudio |
|--|--|--|--|

| | | | |
|-------------|--------------|-------------|--------------|
| Prospectivo | Longitudinal | Comparativo | Experimental |
|-------------|--------------|-------------|--------------|

ÁREA DE ESTUDIO

La presente investigación corresponde al área de Microbiología y Química, por lo que se realizará en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología del Departamento de Ciencias de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada Antenor Orrego.

DE LA APROBACIÓN DEL PROYECTO

La ejecución del presente proyecto de investigación dependerá de la aprobación de la Oficina de Investigación de la Universidad Privada Antenor Orrego

DISEÑO DE EJECUCIÓN

MATERIAL BIOLÓGICO

CULTIVOS

Los cultivos de *Peudomona aeruginosa productora de carbapenemasas* forman parte del cepario del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología (UPAO), encontrándose conservadas a -35°C en medios glicerizados. Estos fueron obtenidos y caracterizados fenotípica y genotípicamente a partir de muestras clínicas del Hospital Regional Docente de Trujillo, entre setiembre - noviembre del 2015.

CEPAS CONTROL

Se empleará dos cepas: *Peudomona aeruginosa* ATCC 77297; *Peudomona aeruginosa* ATCC 25927 será adquirida del Laboratorio Gen Lab o Laboratorio Mercantil.

FRUTOS DE *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “TARA”

Los frutos (vainas) de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” serán recolectados de cultivos del área rural de la Región Cajamarca provincia bambamarca, durante el mes de enero y febrero del 2016 y serán identificados por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad Privada Antenor Orrego (UPAO) ó por el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo.

PROCEDIMIENTOS

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

Primera fase Para la extracción del aceite esencial se trabajará con 20 Kg de frutos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” utilizando un sistema de hidrodestilación por arrastre con vapor de agua.

Segunda fase La fracción del destilado en el cual se encuentra el aceite esencial será sometida a un tratamiento con Diclorometano con la finalidad de lograr una adecuada separación.

Tercera fase. El aceite será recuperado mediante el empleo de un Rota vapor.

DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA.

Los aceites recuperados de las vainas de *Caesalpinia spinosa* serán sometidos al análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE FRUTOS DE *Caesalpinia spinosa* (MOLINA) KUNTZE SOBRE LA VIABILIDAD DE *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasas.

Para la evaluación del efecto del aceite esencial de frutos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze sobre la viabilidad de, *Pseudomonas aeruginosa* productora de carbapenemasas se realizará mediante la técnica de macrodilución en tubo; ésta técnica consiste en realizar distintas concentraciones del aceite esencial en caldo Trypticase soya (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.078%, 0.039%, 0.019%.) ⁽⁵⁾.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI) la concentración mínima inhibitoria se realizará mediante el empleo de cada una de las concentraciones descritas anteriormente a las cuales se les adicionará la cepa previamente reactivada (100 ul). Estas diluciones serán acompañada con dos controles; el control positivo (Tubo conteniendo caldo TSB + cepa) y un control negativo (Caldo TSB sin cepa); posteriormente se hará una lectura en tiempo cero mediante espectrofotometría a una densidad óptica de 600nm; luego serán incubados a 37°C por 24 a 48 horas y en agitación continua; pasado este tiempo se procederá a realizar las lecturas finales nuevamente por espectrofotometría.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA BACTERICIDA (CMB) La CMB se realizará a partir de la siembra en agar Trypticase soya (TSA) esta consiste en lo siguiente.

De cada uno de los tubos incubados a 37°C por 24 a 48 horas y en agitación continua. Se tomará una alícuota y se sembrará mediante la técnica por estría en agar TSA; luego serán incubadas a 37°C por 24 a 48 horas, pasada este tiempo serán evaluadas con la finalidad de obtener resultados finales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Se diseñará una base de datos en Microsoft Excel y, posteriormente, se analizarán en SPSS. Se efectuará un análisis univariado para conocer las frecuencias de las variables.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Carrión L., M, Quispe C., S.; Matos Ch., A, (2011) Goma de tara (Caesalpinia spinosa): descripción y aplicaciones. I Congreso Nacional de Investigación. Universidad Peruana Unión.
2. Araujo D., J.; y Salas A., R. (2009) Actividad antimicrobiana del extracto crudo de la vaina de Caesalpinia spinosa "tara" frente a Staphylococcus aureus. Científica 6 (2): 142 – 155

3. Escobar, L.E.; Chávez, M. (2008) Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. Rev. Med. Vallejana; 5(1): 28-37.
4. Salim M, Pedro E, Paula E. (2007) Epidemiología molecular de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a -lactámicos de amplio espectro en el Hospital San Jerónimo de Montería Universidad de Córdoba Colombia.
5. Fernando A; Alexander.T (2015) Efecto in vitro del aceite esencial de los frutos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, "Tara", sobre la viabilidad de cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Rev.Pueblo Continente vol. 26(1)
6. Canton R. et al 2006 mecanismos de multirresistencia e importancia actual en microorganismos gram positivos y gram negativos. Ef infecciosas MicrobiolClin monogr, 5(5):3-6.
7. Poole K (2001) Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. J Mol Microbiol Biotechnol ; 3:255-64
8. Rice LB (2009) the clinical consequences of antimicrobial resistance. Curr Opin Microbiol, 12:476-81.
9. <http://www.who.int/patientsafety/campaigns/amr/en/index.html>
10. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman – Igra Y, Cabili S, Carmeli Y (2006) Multidrug – resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. Antimicrob Agents Chemother, 50:43-48.
11. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, et al (2009) Bad Bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America. Clin Infect Dis, 48: 1-12.
12. Falagas MF, Bliziotis IA (2007) Pandrug-resistant gram negative bacteria: the dawn of the post – antibiotic era? Int J Antimicrob Agents, 29: 630-636.
13. Falagas ME, Kolestis PK, Bliziotis LA (2006) The diversity of definitions of multidrug – resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of medical microbiology, 55: 1619-1629.

14. Kallen AJ, Hidron AI, Patel J, et al (2010) multidrug resistance among gram – negative pathogens that caused healthcare – associated infections reported to the national healthcare safety network, 2006 – 2008. *Infect control hosp epidemiol*, 31: 528 – 31.
15. El solh a alhajhusain A (2009) Update on treatment of pseudomona aeruginosa pneumonia J *Antimicrob chemother*, 64 (2): 229 – 38.
16. Epine (2010). Estudio de prevalencia de infecciones nosocomiales(2010) informe global de españa sociedad española de medicina preventiva, salud pública e higiene.
17. Gutierrez O, Juan C, cercenado E, et al (2007) molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in pseudomona aeruginosa isolates from spanish hospitals. *Antimicrobial Agents chemoter*, 51: 4329 – 35.
18. Lock de Ugaz, O., (1994) *Investigación Fitoquímica*. 2ª ed. Lima: fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
19. Ogata K., Arellano C. y Zúñiga D. (2008) Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de diferentes especies vegetales cultivados. *Zonas Áridas* 12(1).
20. Liu B. H.; Lengua V. L. A.; León M., G.; La Torre D., C.; Huapaya Y., J. ; Chauca, J. (2002) Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y el *Eucalyptus* sp. "Eucalipto". *Horizonte Médico*. Vol. 2, Nº 1-2.
21. Rojas N., Avilés R., Villacaqui E., Neira E., Ramos W., Santiago J., (2011) Tratamiento de quemaduras con películas obtenidas por radiación gamma que contiene extracto alcohólico de tara (*Caesalpinia spinosa*) en animales de experimentación. *Dermatología Peruana*. 21 (1): 6 – 12.
22. López C.; Garro V.; Yrel V.; y Gallardo T. (1998) Acción antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze o tara, de diferentes regiones del Perú. *Ciencia e investigación*, 1 (1): 27 – 31.

23. De La Cruz L., P. (2004) Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. Revista del Instituto de Investigación FIGMMG. UNMSM. Vol. 7, N.º 14, 64-73.
24. Escobar, L.E.; Chávez, M. (2008) Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. Rev. Med. Vallejana; 5(1): 28-37.
25. Añanca, E.R. (2009) Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis para Título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Jorge Basadre, Tacna.
26. Radji M.; Agustama R. A.; Elya B.; Tjampakasari C. R. (2013) Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* Asian Pac J Trop Biomed, 3 (8): 663 – 667.
27. Araujo D., J.; y Salas A., R. (2009) Actividad antimicrobiana del extracto crudo de la vaina de *Caesalpinia spinosa* “tara” frente a *Staphylococcus aureus*. Científica 6 (2): 142 – 155.
28. Mandel, Douglas y Benites. Enfermedades infecciosas principios y práctica 7ma edición cap.219: 1837 – 61.
29. Engel JE. Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: A. R. Hauser and J. Rello (Eds.) Severe Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Kluwer Academic Publishers. Boston, MA. 2003; pp. 201-229.
30. Engel JE. Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. In: A. R. Hauser and J. Rello (Eds.) Severe Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Kluwer Academic Publishers. Boston, MA. 2003; pp. 201-229.
31. Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J Antimicrob Chemother. 2001; 47(3):247-50.
32. Livermore DM. -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8(4): 557–584.

33. Livermore DM. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8(4): 557–584.
34. Chambers HF, Sande MA. Farmacos antimicrobianos. En: Hardman JG, Limbird LE. Goldman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica 9ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 2001: Cap 43: p. 757 – 776.
35. Burton G, Osborne NF, Pearson MJ, Southgate R. The β -lactam antibiotics, p. 277-363. In M. E. Wolff (ed.), Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Fifth ed, vol. 4. John Wiley & Sons, Inc., Betchworth, Surrey, England. 1997.
36. Hancock RE, Brinkman FS. Function of Pseudomonas porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol. 2002; 56: 17-38.
37. Hancock RE, Brinkman FS. Function of Pseudomonas porins in uptake and efflux. Annu Rev Microbiol. 2002; 56: 17-38.
38. Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(4): 672-93.
39. Molkhonov VV, Mokhonova EI, Akama H, Nakae T. Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in Pseudomonas aeruginosa. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 322(2): 483-9.
40. Gómez C, Leal A, Pérez M, Navarrete M. Mecanismos de resistencia en Pseudomonas aeruginosa: entiendo a un peligroso enemigo. Rev. Fac. Med. (Bogotá). 2005; 53(1):27-34.
41. Aires JR, Kohler T, Plesiat P. "Involvement of an active efflux system in the natural resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides". Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43: 2624-2628.
42. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 24-38.

43. Brack, A. (1999). Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles del Perú. PNUD –Centro Bartolomé de las Casas, Cusco.
44. Cabellos, I. (2009). Monografía de *Caesalpinia spinosa* “Tara” (Molina) Kuntze. Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. 32pp.
45. Siccha, A., Lock, O., Molina, M. Determinación Cuantitativa de Galactomananos en las Gomas de Tara, Charán y Uña de Gato, por Cromatografía de Gases. Bol. Soc. Quim. Del Perú, 1994, 60: 39-43.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

| ACTIVIDAD | INICIO | FIN |
|--|---------------|------------|
| Recolección de vainas de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara) | 03/05/2016 | 30/06/2016 |
| Extracción del aceite esencial | 01/07/2016 | 31/10/2016 |
| Determinación química del aceite esencial. | 01/11/2016 | 30/12/2016 |
| Informe Parcial del Proyecto | 21/11/2016 | 29/11/2016 |
| Determinación del Efecto antibacteriano frente a <i>P. aeruginosa</i> resistente a Carbapenems | 01/01/2017 | 28/02/2017 |
| Análisis de resultados y presentación del informe final. | 01/03/2017 | 30/03/2017 |
| Informe Final del Proyecto | 20/03/2017 | 30/03/2017 |

PRESUPUESTO

| DESCRIPCION | CANTIDAD | PRECIO_UNITARIO | PRECIO_PARCIAL |
|----------------------------|-----------------|------------------------|-----------------------|
| Caesalpinia spinosa (tara) | 300 LB | 1 | 300 |
| OTROS | 5000 UNI | 0.72 | 3600 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 500 | 500 |
| OTROS | 1000 UNI | 0.15 | 150 |
| OTROS | 10 UNI | 10 | 100 |
| OTROS | 1 UNI | 80 | 80 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 500 | 500 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 400 | 400 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 500 | 500 |
| OTROS | 2000 UNI | 0.40 | 800 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 300 UNI | 2 | 600 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 24 UNI | 10.42 | 250.08 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 2 UNI | 150 | 300 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 10 UNI | 15 | 150 |
| OTROS | 1 UNI | 500 | 500 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 400 | 400 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 5 UNI | 50 | 250 |
| OTROS | 1000 UNI | 0.80 | 800 |
| OTROS | 1000 UNI | 0.30 | 300 |
| OTROS | 60 UNI | 2.50 | 150 |
| REACTIVOS E INSUMOS | 1 UNI | 500 | 500 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 5 UNI | 30 | 150 |
| OTROS | 10 UNI | 0.29 | 2.90 |
| OTROS | 1 UNI | 700 | 700 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 20 UNI | 10 | 200 |
| OTROS | 1 UNI | 1000 | 1000 |
| OTROS | 1 UNI | 700 | 700 |
| OTROS | 10 UNI | 40 | 400 |
| OTROS | 1000 UNI | 0.15 | 150 |
| MATERIAL DE VIDRIO | 250 UNI | 0.83 | 207.50 |
| OTROS | 100 UNI | 2 | 200 |
| OTROS | 2 UNI | 30 | 60 |
| OTROS | 2 UNI | 15 | 30 |
| OTROS | 10 UNI | 5 | 50 |
| OTROS | 10 UNI | 10 | 100 |
| TRANSPORTE NACIONAL | 2 UNI | 500 | 1000 |
| APOYO | 1 UNI | 3000 | 3000 |
| Total | | | 19080.48 |