

**“UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA”**



**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICO E HIDROALCÓHOLICO DE HOJAS DE *Carica papaya*
(PAPAYO), FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, POR EL
MÉTODO DE MACRODILUCIÓN”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por Bachilleres de Farmacia y Bioquímica:

Bach. MARCK MANUEL RODRIGUEZ CARDENAS

Bach. NERIO MORI ORTIZ

Asesor:

M.C. CHARLES OCAMPO FALCON

IQUITOS – PERÚ

2014

DEDICATORIA

Nuestra tesis la dedicamos de manera especial a **DIOS** que nos da la vida nos llena de bendiciones y nos indica en todo momento el camino que nos tiene preparado, gracias a él podemos seguir en la lucha diaria de nuestras vidas.

A nuestras queridas madres **Mery Luz Ortíz Ruíz** y **Mercedes Jaqueline Cárdenas Pérez**; reciban esta modesta dedicación, como un homenaje a su grandeza, que desde niños nos brindaron su calidez, cuidado y fortaleza. Para ser mejores humanos y un ejemplo a la sociedad. Tengan presente que la gloria más grande que tenemos es el ser hijos suyos.

A nuestros queridos padres **Clever Max Mori Ríos** y **Severo Rodríguez Gamarra** ; que han sido siempre hombres admirables, que nos han brindado cuidado, amor y comprensión, quienes con sus sabios consejos orientaron nuestros pasos por el camino recto de la vida, convirtiéndose por sus virtudes en nuestros mejores amigos. Acertada y rica herencia son sus ejemplos. Por eso nuestros padres merecen hoy, mañana y siempre todos nuestros honores, cariño y el respeto de sus hijos.

A nuestro estimado y querido **Dr. Charles Ocampo Falcón**, por brindarnos sus sabios y valiosos conocimientos, motivación y orientación profesional.

En especial a ti Vivien Mercedes por ser el motivo de todo mi esfuerzo por estar apoyándome cuando más te necesitaba gracias mi amor, eres lo más bonito que me está pasando en mi vida. Te amo.

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer de manera especial a la Facultad de Industrias Alimentarias por permitirnos el uso de sus instalaciones y equipos para la ejecución del presente proyecto.

A todos nuestros amigos y compañeros de estudios por su amistad y apoyo; en especial a Roy Roger Scavino Doñez, al QF. Jorge Manuel Mesía Pinto-Catalao y a Edson Curitima Ahuanari.

A los miembros del jurado examinador: Q.F. José Daniel Torres Tejada, Mgr. (Presidente del Jurado), Q.F. Frida Enriqueta Sosa Amay, Mgr. (1^{er} Miembro) y Blgo. Felipe Ríos Isern (2^{do} Miembro) por sus exigencias en la redacción y revisión del proyecto de tesis.

A todos los profesores de nuestra querida Facultad de Farmacia y Bioquímica, que nos brindaron y enseñaron sus conocimientos en las diversas ramas de nuestra carrera, para el fortalecimiento cotidiano de nuestro aprendizaje y formación profesional como futuros químicos farmacéuticos.

Al personal administrativo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por facilitarnos los trámites de nuestro proyecto de tesis.

Por último, queremos agradecer a nuestras familias por su apoyo incondicional y aliento, por estar con nosotros en los buenos y en los malos momentos, por enseñarnos y hacernos valorar que las cosas en la vida no se obtienen fácilmente, sino que cuesta mucho esfuerzo y sacrificio, nada es imposible en la vida si en verdad se quiere alcanzar la meta y te nace del corazón las ganas de obtenerlo.

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICO E HIDROALCÓHOLICO DE HOJAS DE *Carica papaya*
(papayo), FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, POR EL
MÉTODO DE MACRODILUCIÓN”**

Bach. Marck Manuel Rodriguez Cardenas

Bach. Nerio Mori Ortiz

Resumen

En la presente investigación se determinó la Actividad Antibacteriana del extracto etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo), que fueron recolectadas en la Comunidad de Nina Rumi. Para la determinación de la actividad antibacteriana se utilizó el método de Macrodilución a las concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 mg/mL, prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos. Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922; como control positivo se utilizó gentamicina 10 µg y como control negativo suero fisiológico al 0,9%. Al analizar los resultados se observó que los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) presentaron actividad antibacteriana a dichas concentraciones. El extracto etanólico evidenció mayor actividad antibacteriana, determinándose que el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* es de 4 mg/mL y frente a *Escherichia coli* es de a 0,5 mg/mL

Palabras Claves: Extracto, Antibacteriano, Hojas, Concentración Minina Inhibitoria, *Carica papaya*

**"ANTIBACTERIAL *In Vitro* ACTIVITY GIVES THE EXTRACTS
ETANÓLICO AND HIDROALCÓHOLICO OF LEAVES *Bach* GIVES
Carica papaya (papaya), OPPOSITE TO *Staphylococcus aureus* and
Escherichia coli, FOR THE METHOD OF MACRODILUTION"**

Bach. Marck Manuel Rodriguez Cardenas

Bach. Nerio Mori Ortiz

ABSTRACT

In the present investigation Antibacterial Activity of Ethanolic leaf hydroalcoholic *Carica papaya* (papaya), which were collected in the Community of Nina Rumi extract was determined. Macrodilution method was used at concentrations of 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 and 0,25 mg / mL, test for measuring the in vitro susceptibility of pathogens to determine the antibacterial activity. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 was used; as a positive control we used 10 µg gentamycin as a negative control and 0,9% saline. In analyzing the results we observed that ethanol hydroalcoholic extracts of leaves of *Carica papaya* (papaya) showed antibacterial activity at the concentrations. Ethanol extract showed the greatest antibacterial activity was determined that the value of the minimum inhibitory concentration against *Staphylococcus aureus* is 4 mg / mL and against *Escherichia coli* is 0,5 mg / mL

Key words: Extract, Antibacterial, Leaves, Concentration Minina Inhibitoria, *Carica papaya*

INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

INTRODUCCION 11

OBJETIVOS 14

CAPÍTULO I 15

1. MARCO TEORICO 15

1.1 Antecedentes 15

1.2 Bases teóricas 16

1.2.1 Información taxonómica - *Carica papaya* (papayo) 16

1.2.2 Características botánica 17

1.2.3 Descripción botánica 17

1.2.4 Composición química y principios activos 18

1.2.5 Aspecto ecológico 18

1.2.6 Composición Fitoquímica y propiedades medicinales 19

1.2.7 Actividad biológica 20

1.2.8 Propiedades nutritivas 21

1.2.9 Uso tradicional y dosis 21

1.3 Características de las cepas en estudio 23

1.3.1 *Staphylococcus aureus* 23

A. Taxonomía 23

B. Características Morfológicas 23

C. Epidemiología 24

D. Factores de virulencia 25

1.3.2 *Escherichia coli* 27

A. Taxonomía	27
B. Características Morfológicas	28
C. Reservorio y colonización	29
D. Epidemiología	30
1.4 Ensayos antimicrobianos	31
1.4.1 Método de difusión en agar	31
1.4.2 Método de Macrodilución	33
2. DEFINICIONES OPERACIONALES	35
2.1 Variables	35
2.1.1 Variable independiente	35
2.1.2 Variable dependiente	35
2.2 Indicadores	35
2.2.1 Independiente (X)	35
2.2.2 Dependiente(Y)	35
2.3 Operacionalización de las variables	36
3. HIPÓTESIS	38
CAPÍTULO II	39
4. METODOLOGÍA	39
4.1 Método de investigación	39
4.2 Población y muestra	39
4.3 Criterios	39
4.4 Población microbiológica	40
4.5 Muestras microbiológica	40
4.6 Materiales e instrumentos	40
4.7 Instrumentos de recolección de datos	41
4.8 Procedimientos de recolección de datos	42
4.8.1 Recolección y acondicionamiento de la muestra	42
4.8.2 Obtención del extracto etanólico	42
4.8.3 Obtención del extracto hidroalcohólico	43
4.8.4 Actividad antibacteriana de los extractos por macrodilución	44

A. Preparación del inculo	44
B. Preparación del control	44
C. Lectura e interpretación de la CMI	45
4.8.5 Prueba de susceptibilidad frente a los extractos	46
4.9 Consideraciones éticas	47
4.10 Plan de análisis e interpretación de datos	47
CAPÍTULO III	48
5. RESULTADOS	48
6. DISCUSION	55
7. CONCLUSION	56
8. RECOMENDACIÓN	57
9. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	58

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 01: Clasificación de la actividad antibacteriana según la Concentración Mínima Inhibitoria.	45
TABLA N° 02: Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de <i>Carica papaya</i> (papayo) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	48
TABLA N° 03: Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de <i>Carica papaya</i> (papayo) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	50
TABLA N° 04: Resultado positivo de la Actividad antibacteriana frente a las bacterias	53

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 01: Planta <i>Carica papaya</i> (papayo)	16
FIGURA 02: Compuestos aislados de <i>Carica papaya</i>	19
FIGURA 03: Estructura propuesta para la carpaina	19
FIGURA 04: Flujograma Obtención del extracto etanólico de la hoja de <i>Carica papaya</i>	42
FIGURA 05: Flujograma de Obtención del extracto hidroalcohólico	43
FIGURA 06: Procedimiento del Método de Macrodilución en Caldo Müller Hinton	65
FIGURA 07: Procedimiento del Control del Método de Macrodilución en Caldo Müller Hinton.	66
FIGURA 08: Esterilización de materiales y medios de cultivo a utilizar.	71
FIGURA 09: Parámetros a utilizar, McFarland.	71
FIGURA 10: Preparación del medio de cultivo Muller Hinton	75
FIGURA 11: Grado de turbidez con la cepa estudiada de <i>Escherichia coli</i> del extracto Etanólico.	49
FIGURA 12: Grado de turbidez con la cepa estudiada de <i>Staphylococcus aureus</i> del extracto Etanólico.	49

FIGURA 13: Grado de turbidez con la cepa estudiada de <i>Escherichia coli</i> del extracto Hidroalcohólico.	51
FIGURA 14: Grado de turbidez con la cepa estudiada de <i>Staphylococcus aureus</i> del extracto Hidroalcohólico.	51
FIGURA 15: Control de gentamicina: Control Positivo	54
FIGURA 16: Recolección de la muestra, Nina Rumi	70

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO N° 01: Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos frente a las bacterias en estudio	53
GRAFICO N° 02: Actividad antibacteriana de los extractos frente a las bacterias	53

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las enfermedades infecciosas son una de las principales causas de muerte en cualquier parte del mundo, más aún en lugares donde hay deficiencia de saneamiento ambiental. La morbilidad y mortalidad se refleja en las condiciones de vida de las personas debido a las numerosas infecciones por microorganismos patógenos¹. Los antibióticos son los fármacos indicados para combatir las enfermedades producidas por bacterias. Estas sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio, suprimen el crecimiento de microorganismos y pueden eventualmente destruirlos.

Los antibióticos debido a su uso irracional e inapropiado han generado resistencia de los microorganismos patógenos, situación que es un problema mundial de salud pública generado en los últimos 50 años. Desde su descubrimiento en 1940, la penicilina combatió infecciones severas causadas por *Staphylococcus* sin embargo para 1950 esta bacteria adquirió resistencia a esta droga. Como una alternativa para combatir esta primera línea de resistencia se crearon penicilinas semisintéticas como meticilina, nafcilina, oxacilina y dicloxacina.

En los países en desarrollo difícilmente están disponibles los antibióticos de segunda línea, utilizados contra bacterias resistentes y de otro lado en los países desarrollados la emergencia de infecciones por bacterias multiresistentes, tanto adquiridas intrahospitalarias como en la comunidad, ha sobrepasado a la aparición de nuevos antibióticos³.

A nivel mundial, el 70% de las bacterias responsables de las infecciones nosocomiales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas¹⁰. La etnobotánica constituye una herramienta muy útil para dirigir estudios de actividad con base en la medicina tradicional¹¹. Desde tiempos antiguos, nuestros antepasados recurrieron a la utilización de las plantas para curar sus males, aliviar sus dolores y curar sus heridas, transmitiéndose estos conocimientos de persona a persona y de generación en generación^{1, 12}.

Las enfermedades infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* afecta a millones de personas en el mundo, registrándose en nuestro país 16,5 millones de consultas externas solicitadas a los organismos nacionales de prestación de servicios de salud, representando el 4.35% durante el año 2010. En Loreto durante el 2011 se presentaron 42,824 casos de enfermedades infecciosas, siendo las mujeres adultas y niños los más afectados.

En el 2005 se reportó en los Estados Unidos a nivel de los centros hospitalarios, una incidencia de resistencia bacteriana del 3% por parte de enterobacterias productoras de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEEs), como *Escherichia coli*; en comparación con Latinoamérica, fue del 9% a 62%. En Europa las bacterias meticilino-resistentes como *Staphylococcus aureus* mostraron un 42% de resistencia en pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) y 27% en pacientes de otras áreas de hospitalización; en comparación con los reportes de resistencia bacteriana en Latinoamérica, que fue del 35% y de Estados Unidos que fue del 25% al 51%.¹⁵.

Las plantas medicinales son utilizadas por millones de personas la mayor parte de los países en vías de desarrollo, debido a la falta de asistencia de los servicios de salud, a su bajo costo y efectividad atribuida en ciertas culturas^{1,16}. La población rural usa y seguirá usando de manera empírica las plantas como medicina tradicional para curar diversas enfermedades. Se estima que para el año 2,020 la población mundial habrá alcanzado la cifra de 7.5 mil millones de habitantes, de los cuales el 75% vivirá en países subdesarrollados que actualmente consumen menos del 15% del mercado farmacéutico, lo que hace suponer que esta masa poblacional buscará cada vez más el recurso de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de salud¹⁷.

En el Perú y, sobretodo, en el departamento de Loreto, se hace uso de un gran número de especies vegetales para curar las enfermedades y los síndromes¹⁷. Loreto cuenta con una diversidad de recursos naturales, destacando grandes variedades de especies vegetales.

El presente trabajo es una contribución al desarrollo de investigación en *Carica papaya* (papayo), así como para resaltar, validar y rescatar los valores ancestrales sobre su uso, siendo el punto de partida la identificación de sus principios activos; permitiendo en un futuro su cultivo sostenible para la elaboración y comercialización como medicamento, brindando una nueva alternativa económica en el control, prevención y tratamiento efectivo de diversas infecciones producidas por bacterias mencionadas en nuestro estudio. Así mismo los resultados obtenidos servirán como base para el inicio de muchas otras investigaciones referente a esta especie.

OBJETIVOS

GENERAL:

Determinar la actividad antibacteriana *In Vitro* de los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el método de Macrodilución.

ESPECÍFICOS:

Obtener los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo).

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) frente a *Staphylococcus aureus* mediante el método de Macrodilución.

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papaya) frente a *Escherichia coli* mediante el método de macrodilución.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Hewitt D, et al (2008), demostraron que *Carica papaya* presenta acción antibacteriana pues inhibe el crecimiento de microorganismos Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, y Gramnegativos como *Escherichia coli*, *Porphyromona vulgaris*, *Salmonella*, entre otros^{12,13,14}. Demostraron que también es efectiva inhibiendo hongos levaduriformes como *Candida albicans*^{12, 14}.

Drasar, BS y Hill, MJ. (1974), demostraron que el extracto etanólico de las hojas de *Carica papaya* tiene efecto antinematodo, antifúngico y antibacteriano. Los extractos etanólicos de hojas son activos contra *E. coli* y *S. aureus*⁴. Los extractos acuosos y etanólicos de la raíz y flor presentaron actividad fungicida contra *Dreschlera oryzae*⁵.

Cuellar-Cuellar, A.; Scull-Lezama, R; et al (2012), demostraron la actividad antimicrobiana de las hojas de la especie *Carica papaya L* frente a la cepa de *Plasmodium berghei*. Para ello realizaron una extracción total en un equipo Soxhlet, procesándolo por el sistema de cambio de fase ácido-base-solvente orgánico para tener una fracción en alcaloides con un 1% de rendimiento. Este extracto fue evaluado teniendo en cuenta una IC50 aceptable como positiva de 50 µg/mL. De esta fracción, mediante un proceso de contracorriente con 5 intercambiadores, se purifica un producto con todas las características del alcaloide que al realizar los espectros de RMN de 1H y 13C se asigna para el mismo la estructura del alcaloide carpaína.⁴⁴.

Mena, J; Yopez, M; et al (2005), demostraron la actividad antibacteriana en *in vitro* de extractos de pulpa y semillas de *Carica candamarcensis* en poblaciones de *Helicobacter pylori*.

Para ello obtuvo cuatro tipos de extractos: acuoso de pulpa y semilla y aceite esencial de pulpa y semilla mediante hidrodestilación asistida por radiación con microondas; la evaluación de antibiosis se realizó por el método de difusión en Agar Columbia suplementado con sangre de cordero al 8% utilizando sensidiscos impregnados con 1.5 µl de cada extracto. El análisis de varianza y la prueba de medias de Tukey evidencian que el aceite esencial de pulpa tiene efecto inhibitorio significativamente mayor; el análisis químico del aceite esencial de pulpa demuestra la presencia de compuestos como octanol, linalool, farnesol y decanoato de butilo, esterres y derivados que pueden estar asociados con la actividad biológica.

1.2. BASES TEÓRICAS:

1.2.1. INFORMACIÓN TAXONÓMICA



Figura 1. *Carica papaya*

División:	<i>Spermatophyta.</i>
Subdivisión:	<i>Magnoliophytina.</i>
Clase:	<i>Magnoliatae.</i>
Orden:	<i>Violales.</i>
Familia:	<i>Caricaceae.</i>
Género:	<i>Carica.</i>
Especie:	<i>Carica papaya</i> ⁴² .

1.2.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.

Sistema radical: el sistema radical es típico o pivotante formado por una raíz principal y varias secundarias. Este es poco profundo, napiforme, dispuesto generalmente de forma vertical y radial con alto contenido de agua y consistencia relativamente blanda. El 65% del área radical de la papaya está a 30 centímetros de profundidad²².

Tallo: es cónico y rara vez ramificado, su altura y grosor varía con la variedad a cultivar. El tallo joven es hueco, dividido por tabiques membranosos y a medida que se desarrolla en la parte inferior se llena de un tejido suave y la corteza toma consistencia fibrosa. El color de la corteza del tallo joven varía entre verde y tonalidades moradas que después pasan a color grisáceo según envejece²².

Hojas: son alternas, largas, anchas, lobuladas y de origen caulinar al cual están unidas por un largo pecíolo tubular que toma coloración de verde a morado en relación con la variedad. Su diámetro oscila entre 0.50 a 0.80 m. Una planta de papaya es capaz de producir de 1 a 2 hojas por semana, y una planta con más de 30 hojas bien desarrolladas está apta para ofrecer una buena fructificación²².

Flores y frutos: esta especie emite varios tipos de flores y cada una origina un tipo diferente de fruto en cuanto a forma y calidad, principalmente. En una misma planta pueden aparecer flores femeninas, masculinas y hermafroditas²².

1.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol de porte mediano, tronco recto y simple. Hojas palmati-lobuladas, grandes, sostenidas por largos pecíolos, glabras, verdes oscuras. Flores dioicas dispuestas en panojas largas y péndulas. Fruto esférico, cilíndrico o periforme de 10 a 15 cm de largo, anaranjado cuando maduro. Pulpa anaranjada o amarilla²³.

Hábitat: el lugar de origen más aceptado para la papaya o fruta bomba, es América Central que se extendió hacia todas las regiones tropicales del planeta.^{21, 22}.

Nativa de laderas bajas de los Andes Orientales, la cuenca amazónica y Centro América, crece en clima tropical húmedo en alturas hasta 1500 msnm²⁴. Aunque es capaz de crecer en casi todos los suelos, mayormente crece en suelos franco-arenosos, profundos, bien estructurados con altos niveles de materia orgánica y buen drenaje²⁵.

1.2.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y PRINCIPIOS ACTIVOS:

Las hojas contienen alcaloides, taninos (0.5 a 0.6 %) y glicósidos, no contiene saponinas; la corteza y raíz contienen alcaloides y taninos. Las semillas contienen glucósidos (caricina, carpasemina, sinigrina), una enzima (mirosina), tropaolina y 25% de un aceite con un bajo valor de yodo. La corteza contiene xilitol (pentaalcohol) ysaponósidos²⁶.

1.2.5. ASPECTOS ECOLÓGICOS:

Cultivo: la humedad y el calor son las condiciones esenciales para el buen desarrollo del papayo. Requiere zonas de una pluviometría media de 1800 mm anuales y una temperatura media anual de 20 a 22°C; aunque puede resistir fríos ligeros, si no tiene la cantidad suficiente de calor, se desarrolla mal y los frutos no llegan a madurar. El papayo se desarrolla en cualquier tipo de suelo siempre que sean suelos ligeros, fértiles (ricos en humus), blandos, profundos y permeables⁴³.

Cosecha: la cosecha empieza a los 9 meses de hecho el semillero o 7 meses después del trasplante, son un factor concluyente en el tiempo de vida de las frutas⁴³.

1.2.6. COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y PROPIEDADES MEDICINALES

Quitosano: polisacárido que presenta una ligera resistencia al vapor de agua, permeabilidad selectiva frente a los gases y propiedades antifúngicas y antibacterianas.

Glucósidos cianogénicos de las hojas, como (2R) –prunasina y sambunigrina
Danielona, fitoalexina. Aislada del fruto con actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*⁴⁵.

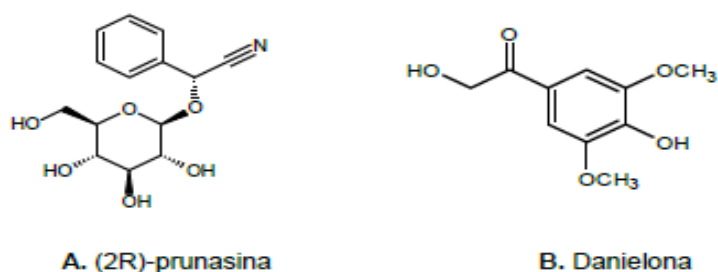


Figura 2. Compuestos aislados de *Carica papaya*

In vitro, la carpaína inhibe al *Mycobacterium tuberculosis* y actúa a nivel del corazón de igual manera que los digitálicos pues a dosis elevadas provoca parálisis y depresión cardiovascular⁴⁵.

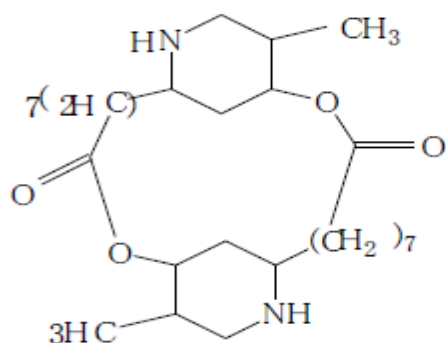


Figura 3. Estructura propuesta para la carpaína

Aceites esenciales: son sustancias cuyos principales componentes son sustancias fenólicas que además son las responsables de conferir actividad antimicrobiana⁴⁴.

1.2.7. ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Actividad Antihelmíntica: presenta acción antihelmíntica, demostrada en ratones infectados con larvas de *Heligmosomoides polygyrus*, y en perros con *Ascaris lumbricoides*¹².

Infertilidad en Ratones: así como diversos estudios destacan las excelentes propiedades curativas de esta enzima, existen otros estudios que sugieren que la *papaína* del látex podría ocasionar infertilidad ya que reduce la producción espermática en ratas a las cuales se les ha administrado dosis orales de entre 10 y 50 mg/día por 30, 60 y 90 días. Además podría tener efecto abortivo a corto tiempo después de la concepción al dar dosis orales de 20 mg/kg de peso a ratas hembras durante 20 días; en este caso la *papaína*, aparentemente, disuelve las proteínas responsables de la adherencia del huevo fecundado a las paredes del útero ¹⁶.

Propiedades antiulcerosa: en un estudio realizado en el Departamento Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Farmacológicas de la Universidad de Nigeria, se utilizó el fruto integral de papaya verde para el tratamiento de las úlceras pépticas. A dos grupos de ratas les fueron provocadas úlceras gástricas mediante indometacina y alcohol, respectivamente. Posteriormente fueron tratadas con un extracto elaborado con la papaya verde. En ambos grupos se demostró una reducción significativa de las lesiones ulcerosas. Los autores del estudio utilizaron dos tipos de extractos de papaya verde: uno elaborado en agua y otro elaborado con alcohol.

Al comparar los efectos de ambos extractos encontraron que el extracto acuoso era más efectivo para tratar las úlceras inducidas por alcohol, mientras que el extracto elaborado con alcohol era más efectivo para combatir las úlceras producidas por la indometacina. La investigación de la toxicidad de ambos extractos demostró que son muy seguros⁴¹.

1.2.8. PROPIEDADES NUTRITIVAS

Su principal componente es el agua, seguido por los hidratos de carbono, la mayoría simples, aunque en pequeñas cantidades, obteniendo así un valor calórico bajo. Destaca su aporte de potasio que es un mineral necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso; sirve para la actividad muscular normal, interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. Es una fuente muy importante de vitamina C que interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes; favorece la absorción del hierro en los alimentos y la resistencia a las infecciones. También contiene vitamina A que es esencial para la visión, el buen estado de la piel, el cabello, las mucosas, los huesos y para el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Además, ambas vitaminas cumplen la función de antioxidante. La papaya es una buena fuente de fibra, que mejora el tránsito intestinal⁴¹.

1.2.9. USO TRADICIONAL Y DOSIS

Problemas de hígado: en caso de cirrosis se puede tomar una cucharadita de zumo de semillas endulzado con miel o con zumo de limón para evitar el sabor picante. En el Caribe se trata la diarrea con papaya verde, se corta el rodajas el fruto y se hace hervir en 1 litro de agua por 15 minutos; estos efectos se hacen más relevantes cuando se ingiere en ayunas³³.

Problemas de menstruación: cuando existen menstruaciones difíciles la papaya tiene acción oxiótica, que serán adecuadas para facilitar la menstruación; estas mismas propiedades puede ser aprovechadas por las mujeres lactantes, incrementando la producción de leche, al colocar una gota de látex de papaya verde en los pezones³².

Elimina el acné: las propiedades proteolíticas y bactericidas de la papaya son muy útiles para granos y espinillas, aplicando una loción de zumo de papaya durante 15 minutos, y luego enjuagar con abundante agua fría³².

Anginas: los gargarismos hechos con zumo de papaya resultan muy efectivos para la angina³³.

Otros usos: se ha descrito que el papayo es una de las plantas medicinales más usadas en la prevención de las complicaciones de la Diabetes mellitus, como son las complicaciones vasculares, metabólicas, retinopatías, desórdenes digestivos, entre otros. La *papaína* del papayo se indica básicamente en la profilaxis y durante el tratamiento del daño causado por toxinas metabólicas en condiciones de degeneración crónica¹⁵. Además, se ha observado que favorece el buen funcionamiento del hígado y páncreas; aunque su mecanismo de acción aún no se ha determinado, se cree que actúa inhibiendo la acción hepatotóxica del tetracloruro de carbono (CCl₄)¹².

Otro aporte de la *papaína* en la salud de las personas es que ayuda a disolver tumores cancerosos y linfáticos, hernias discales y formaciones anormales que se producen en las arterias en ciertas formas de arterioesclerosis^{12,13}.

Reacciones adversas y advertencias.

El látex puede ocasionar lesiones serias o reacciones adversas en personas sensibles.

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

1.3.1. *Staphylococcus aureus*

A. Taxonomía

Reino	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	<i>Staphylococcaceae</i>
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S. aureus</i>
Nombre Binomial	<i>Staphylococcus aureus</i>

B. Características Morfológicas

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia facultativa, cuya temperatura de crecimiento es de 30° a 37°C, Grampositiva, productora de coagulasa y catalasa; es inmóvil, no esporulada y se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas pero no infectadas por ella²⁸.

Pueden producir una gama de enfermedades relativamente benignas, que van desde infecciones cutáneas hasta mucosas, tales como la foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía²⁸.

En la actualidad este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias¹.

S. aureus, probablemente, el más versátil de los microorganismos patógenos.

Puede producir enfermedad por toxinas o súper antígenos, invadir cualquier órgano o tejido y originar supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteriemia. Es el microorganismo con mayor capacidad de originar metástasis por vía hematológica. Puede crecer en el citoplasma celular, formar biopelículas y originar bacteriemia persistente o infección crónica o permanecer quiescente y reactivarse meses o años más tarde. Coloniza determinadas áreas de la piel y las mucosas, donde causa reinfecciones, contaminan el entorno y se extiende a otros pacientes. De otro lado, si la densidad de población bacteriana en el foco infeccioso es elevada, *S. aureus* puede hacerse resistente a la mayoría de antibióticos empleados en monoterapia.^{29,30}.

C. Epidemiología

Staphylococcus aureus es un agente patogénico ubicuo que es considerado como parte de la microbiota normal; se encuentra en la piel y en las fosas nasales del individuo sano pero en ocasiones en que las defensas caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son los pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas por este microorganismo.

Los seres humanos son un reservorio natural de *S. aureus*. Entre el 30% y el 50% de los adultos sanos están colonizados; entre el 10% y el 20% se mantienen colonizados persistentemente.^{28,29}.

S. aureus es una de las bacterias patógenas más importantes a nivel global. Cerca de un cuarto de la población porta alguna de sus cepas en cierta etapa de su vida o todo el tiempo. Si en las personas se desarrolla una infección por esta bacteria es muy probable que la responsable sea una de las propias cepas de *S. aureus* que colonizan el organismo.

En años recientes las infecciones por *S. aureus* han reaparecido debido a que la bacteria se ha vuelto resistente a los antibióticos con los que normalmente se la combate³⁰.

Desde hace muchos años se han reportado brotes epidémicos de *S. aureus* por todo el mundo. Éstos se han detectado en una gran variedad de lugares, tales como hospitales, centros de atención y clínicas, y en la comunidad. Actualmente, estos brotes se dividen en infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad³⁰.

D. Factores de Virulencia

S. aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano. La función principal de estas proteínas puede ser la de ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. Algunas cepas producen proteínas adicionales como la toxina del síndrome del shock tóxico 1 (TSST-1), las enterotoxinas estafilocócicas (SE), las toxinas exfoliatinas (ETA y ETB, del inglés Exfoliative Toxins A y Exfoliative Toxins B) y la leucocidina.

Los factores de virulencia de *S. aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped³⁰.

En base a esto, los factores de virulencia se han clasificado en tres categorías:

- 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa.
- 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Panton-Valentine (PVL), proteína A, lipasas y polisacáridos capsulares.
- 3) los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ ³⁰.

Los factores de virulencia más importantes, son:

La coagulasa producida por *S. aureus*, la que existe en dos formas, una forma unida (llamada también factor de aglomeración) y una forma libre.

La coagulasa unida a la pared celular del estafilococo se une a la protrombina; este complejo transforma el fibrinógeno en fibrina insoluble y esto provoca la aglomeración de los estafilococos.

La coagulasa libre reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (CRF, del inglés Coagulase Reactive Factor), presente en el plasma, dando lugar a un complejo análogo a la trombina que reacciona con el fibrinógeno formando el coágulo de fibrina. La coagulasa se utiliza como marcador de la virulencia y permite diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas). La importancia de la coagulasa en la patogenia de la enfermedad radica en que esta enzima causa la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, localizando la infección y protegiendo a la bacteria de la fagocitosis ³⁰.

Las enterotoxinas estafilocócicas, forman parte del grupo de toxinas conocidas como superantígenos toxina pirogénicos PTSAgs (del inglés **Pyrogenic Toxin Superantigens**), ya que tienen actividad biológica de pirogenicidad y superantigenicidad. Se conoce una gran variedad de estas toxinas.

Cuando se consumen alimentos contaminados con *S. aureus*, las toxinas estafilocócicas causan gastroenteritis, estimulan el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central, que se manifiesta por vómitos, los cuales acompañan a la enfermedad gastrointestinal ³⁰.

Otros síntomas incluyen meningitis, faringitis, conjuntivitis, vaginitis, edema, artralgia, irritabilidad, fatiga y dolor abdominal. En adultos puede producir síndrome de dificultad respiratoria, coagulación intravascular y falla renal.

El síndrome del shock tóxico puede ser menstrual (por coincidir con el periodo menstrual), y está asociado con el uso de tampones, o bien ser no menstrual en cuyo caso se pueden producir abscesos, celulitis, bursitis, infecciones posparto e infecciones vaginales ³⁰.

La toxina α o hemolisina α , es considerada como el prototipo de las citotóxicas formadoras de poros; es citolítica para un gran número de células, entre las que se encuentran los monocitos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas y células endoteliales.

La toxina α es secretada por *S. aureus* y se integra en la membrana de las células blanco, formando heptámeros cilíndricos que son capaces de lisar las células eucariontes. Los poros que produce permiten la entrada y salida de iones y moléculas pequeñas que eventualmente producen la muerte de las células nucleadas y la lisis osmótica de los eritrocitos. La formación de poros también produce eventos secundarios que promueven el desarrollo de secuelas patológicas. Estos eventos incluyen la activación de endonucleasas, excitosis de plaquetas y liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. El efecto final en el hospedero es el edema pulmonar o síndrome de dificultad respiratoria. La toxina α es dermonecrótica y neurotóxica y puede ser letal para ciertos animales ³⁰.

1.3.2. *Escherichia coli*

A. Clasificación taxonomía

Reino	Bacteria
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Enterobacteriales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	Escherichia
Especie	<i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia freundii</i>)
Nombre Binomial	<i>Escherichia coli</i>

B. Características Morfológicas

E. coli es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano. El huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y la flora microbiana que reside en el colon humano y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida.^{30,31}. Incluye gérmenes generalmente móviles, que producen ácido y gas a partir de la glucosa, la arabinosa, y habitualmente de la lactosa y otros azúcares. Producen reacción positiva de rojo de metilo, y negativa de Vogues-Proskauer. Sin embargo, se ha precisado que seis grupos patógenos o patotipos de *E. Coli* ocasionan diarrea en sujetos sanos. Ella está integrada por bacilos Gramnegativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples con o sin agregado de cloruro de sodio, fermentadores y oxidativos en medios con glucosa u otros carbohidratos, catalasa positivos, oxidasa negativos, reductores de nitratos a nitritos, y poseedores de una proporción G+C de 39 a 59% en su ADN. Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales.

En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gramnegativos identificados³¹.

E. coli se ubica en el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de simbiosis²⁸.

De manera alarmante, las cifras de letalidad en países subdesarrollados son elevadas (20 a 50%), lo que convierte a la infección por EPEC en una anomalía clínica de inmediata respuesta. Además, se ha notificado en algunos países latinoamericanos que la infección por EPEC supera a la provocada por *Campylobacter spp.* y rotavirus en la población infantil^{28, 29}.

E. coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización, que se transmiten por vía fecal oral de persona a persona o a través del agua y alimentos³².

C. Reservorio y Colonización

Los rumiantes, y en particular el ganado bovino y ovino, son el principal reservorio de estas bacterias. Otros animales como las cabras, los cerdos, los caballos, las aves de corral, los perros y los gatos, pueden actuar también como reservorio. Los animales portadores no muestran ningún signo clínico y eliminan las bacterias *E. coli* por las heces³¹.

Como integrante de la flora normal del hombre y de muchos animales, se lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de "bacterias coliformes".

Estas son enterobacterias que pertenecen al género *Escherichia* y a otros relacionados como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, y que tienen en común la capacidad de fermentar la lactosa en un lapso no mayor de 48 horas, con producción de ácido y gas. Son gérmenes de gran ubicuidad y capacidad de proliferación, y a la vez de fácil cultivo e identificación, y por lo tanto muy útiles como indicadores de contaminación, pero no son enteropatógenos como grupo (como tampoco lo es *E. coli*), y por lo tanto su presencia en alimentos, ambiente o pacientes no certifica la etiología de una infección intestinal o un brote de ETA³¹.

E. coli puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal (peritonitis, sepsis, etc.), pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas en esta localización, que se transmiten por vía fecal-oral de persona a persona o a través del agua y alimentos³¹.

Las colonias de *E. coli* en agar E.M.B. (eosina y azul de metileno) tienen 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja³³. En agar MacConkey las colonias son rojas con halo turbio.³³

D. Epidemiología

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, no solamente por sus capacidades patogénicas sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole³⁴.

Esta especie bacteriana es una de las más abundantes en el tubo digestivo de los animales de sangre caliente. Desde la década de los 40 se han estudiado cepas de *E. coli* en las que determinados serotipos se asociaban a brotes epidémicos de enteritis grave en lactantes²⁸. Forma parte de la familia Enterobacteriaceae³⁴.

1.4. ENSAYOS ANTIMICROBIANOS

La actividad antimicrobiana de los productos naturales de origen vegetal, tanto extractos de plantas como sustancias puras, pueden ser detectadas cuando se colocan esas muestras en contacto con varios microorganismos y se observa la respuestas del crecimiento microbiano³⁵.

Existe una gran variedad de métodos para detectar actividad antimicrobiana. Dependiendo del método los resultados pueden ser influenciados debido a que ellos no son igualmente sensitivos o no se basan en los mismos principios^{27, 36, 37}.

Normalmente, esos métodos son clasificados en tres grandes grupos: métodos de difusión, dilución y antibiograma³⁶.

1.4.1. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a agentes antimicrobianos expresada como CMI, se puede ensayar mediante varios métodos. Uno de ellos es la *Técnica de Dilución en Agar*, técnica que se basa en la preparación de una serie de placas de agar a las cuales se agrega el antimicrobiano a probar, en distintas concentraciones incluidas en el medio. Luego cada una de dichas placas se inocula con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio (McFarland 0,5). Las placas se examinan después de incubar por 18 a 24 horas a 35°C: se observa si hubo crecimiento bacteriano o ausencia de él y se determina la CMI del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles, cada detalle debe ser controlado cuidadosamente en base a las normas internacionales. Este método ha sido descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) año 2003^{18,19}.

Conocido como test de Kirby – Bauer, ese método fue estandarizado por Bauer *et al.* en 1996. Este es el ensayo más usado en la separación de plantas con actividad antimicrobiana en la práctica clínica y está recomendado por la Clinical and Laboratory Institute (CLSI).

Básicamente, consiste en colocar un reservorio impregnado con la muestra en contacto con un medio de cultivo inoculado y, al final del periodo de incubación, medir el diámetro de la zona clara (zona de inhibición de crecimiento) alrededor del reservorio. La medida del diámetro es un buen indicador de la actividad antimicrobiana⁴.

Algunos autores utilizan placas Petri conteniendo dos capas de medio. La primera capa es colocada en la placa y luego, después de su solidificación, otro tipo de agar mezclado con microorganismos es colocado por encima del primero^{3,5}.

Existen diferentes reservorios, como discos de papel, cilindros de acero inoxidable y cavidades perforadas del agar. Algunos autores consideran las cavidades el único reservorio apropiado para extractos acuosos, pues la interferencia de las partículas es mucho menor⁶. Muchas veces, antes de impregnar la muestra en los reservorios, estos son esterilizadas por medio de filtración con filtros Millipore de 0.45 μm . Tal procedimiento es hecho principalmente cuando se trata de extractos acuosos^{7,8}.

Antes de incubar el sistema inoculado, puede ser mantenido a temperaturas más bajas por algunas horas con el objetivo de facilitar la difusión de la muestra y, consecuentemente, aumentar el diámetro de inhibición, mejorando el límite de detección. Algunos estudios consideran suficiente mantener las placas a 4°C durante 1 a 2 horas^{9,10}.

No existe ningún valor patrón que determina que la muestra es activa o no.

Es frecuente expresar los resultados como un criterio para determinar el grado de susceptibilidad o sensibilidad y la resistencia.

En estos casos, son creadas escalas basadas en el tamaño de las zonas de inhibición. Cuanto mayor sea el halo, más sensible es el microorganismo^{11,12}.

Algunos autores solo consideran una muestra activa si la razón del halo de la muestra por el halo del control fuera mayor que cero; o sea, el halo de la muestra es igual o mayor que el del control¹³.

Existe una variación del método de difusión en agar utilizado tanto para aceites esenciales como para extractos brutos. En esta técnica, los microorganismos son inoculados en la superficie del agar y después de 10 minutos, 1 gota de 10 µL de la muestra es colocada en el centro de la placa. Después del periodo de incubación, el diámetro de la zona de inhibición es medido^{14,15}.

Algunos estudios validan la actividad antimicrobiana activada por la luz utilizando la técnica de difusión en agar. En estos casos, una placa es expuesta a la luz U.V. por dos horas, mientras otras placas son mantenidas en ambiente oscuro. Después del periodo de incubación, los diámetros son medidos y se verifica si la exposición a la luz UV fue capaz de aumentar ese halo, sugiriendo la presencia de sustancias activadas por fluorescencia^{16, 17}.

El método de difusión en agar no es apropiado para investigar la actividad de algunas muestras que no se difunden fácilmente en el agar⁴⁵.

1.4.2. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales son realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 mL. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo.

A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como macrodilución en caldo¹⁸.

Fundamentos: Consiste en exponer a las cepas en estudio a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)¹⁸.

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con 1ml de caldo Muller Hinton (MH) suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano¹⁸.

Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente: Se colocan 2 mL de solución del antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 mL de caldo MH. Con una pipeta estéril se transfiere 1 mL del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 mL al tercer tubo.

El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 mL, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en el caldo. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga entre 10^5 y 10^6 UFC/mL, ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Añadir a cada tubo 1mL del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35°C entre 16 y 20 horas¹⁸

2. DEFINICIONES OPERACIONALES

2.1. VARIABLES

2.1.1. INDEPENDIENTE

Las diferentes concentraciones de los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo).

2.1.2. DEPENDIENTE

Actividad antibacteriana de los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo).

2.2. INDICADORES

2.2.1. Independiente (X):

Concentración de los extractos:

Concentración baja = 0.25 mg/ml

Concentración media = 4 mg/ml

Concentración alta = 32 mg/ml

2.2.2. Dependientes (Y):

Grado de turbidez:

4 = No inhibición.

3 = Ligera inhibición (inhibición del 25%),

2 = Inhibición aparente del crecimiento (inhibición del 50%),

1 = Ligera turbidez del medio (inhibición del 75%)

0 = 100% de inhibición.

2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
Extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de <i>Carica papaya</i> (Papayo)	Productos que se obtendrán mediante el método de extracción etanólica e hidroalcohólica utilizando rotavapor.	El solvente en contacto con la especie vegetal arrastrará los metabolitos secundarios solubles en él, con extracción en rotavapor a una temperatura de 70°C durante 3 horas	Concentración del extracto etanólico e hidroalcohólico de hojas de <i>Carica papaya</i> (Papayo)	Método de Macrodilución; Concentración baja = 0,25 mg/ml Concentración media = 4,0 mg/ml Concentración alta = 32 mg/ml	Nominal	Cuantitativa

Variable Dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
Actividad antibacteriana	Acción que ejerce una sustancia sobre alguna bacteria, inhibiendo o destruyendo su crecimiento. Consiste en la alteración de la pared celular, la membrana citoplasmática, el núcleo o el ribosoma de la bacteria por acción de agentes químicos externos que producen una inhibición (acción bacteriostática) o destrucción del crecimiento bacteriano (acción bactericida).	El grado de turbidez que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> expuesta al extracto en estudio.	Grado de turbidez	0 Ausencia de turbidez en los cultivos de las cepas ensayadas, inhibición del 100%. 1 Ligera turbidez del medio, inhibición del 75% 2 Inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%. 3 Ligera inhibición, inhibición del 25% 4 No inhibición	Nominal	Cuantitativa

3. HIPÓTESIS

Ho: Los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* “papayo”, no presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, por el método de macrodilución.

Ha: Los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* “papayo”, presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, por el método de macrodilución.

CAPITULO II

4. METODOLOGÍA

4.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

Se empleó el diseño tipo *experimental* y *prospectivo*.

Es experimental, porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.

Es prospectivo, porque se desarrolló a partir de la aprobación del proyecto.

4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

Población: estuvo constituida por la especie vegetal *Carica papaya* (papayo). Estas fueron recolectadas en el centro poblado de Nina Rumi, ubicado en la carretera Zúngarococha del distrito de San Juan Bautista.

Muestra: hojas de *Carica papaya* (papayo). La especie vegetal fue identificada por un especialista del Herbarium Amazonense mediante las exsicatas allí existentes.

4.3. CRITERIOS

Criterios de Inclusión: se recolectaron hojas frescas, jóvenes y sanas.

Criterios de Exclusión: hojas que presentan contaminación con bacterias u hongos o en mal estado de conservación.

4.4. POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA

La población microbiológica estuvo constituida por las especies bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

4.5. MUESTRA MICROBIOLÓGICA

Las muestras microbiológicas estarán constituidas por cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

4.6. MATERIALES E INSTRUMENTOS

Material de vidrio: embudos, matraz Erlenmeyer de 250 y 500 cc, frasco ámbar con tapa-rosca, matraz Erlenmeyer de 1000 cc, micropipeta Pasteur, pipetas de 1, 2, 5 y 10 cc, probetas de 10, 100, 250 y 1000 cc, tubos ensayo con tapa-rosca (75 x 120 mm), tubos de ensayo de 5 y 7 cc, vasos de precipitado de 5, 10, 20, 50 y 100 cc, bagueta de vidrio, placas de Petri.

Material de metal: asa de Kolle para siembra bacteriológica, cuchillo mediano, escobillas lava-tubos, espátulas medianas, gradilla metálica, pinza estéril, regla vernier.

Medios de cultivo: agar Müller Hinton, agar nutritivo, caldo Müller Hinton.

Otros materiales: algodón, detergente, guantes quirúrgicos, hisopos, papel aluminio, papel de despacho, papel secante, papel tissue, parafilm 2' x 250', plumón marcador, soportes para tubos.

Material de bioseguridad: mandiles, mascarilla N° 78, guantes quirúrgicos descartables N° 7.1/2, Lentes de protección.

Equipos:

- ✓ Autoclave AUTESTER MOD. 437 – P. que trabaja a 15 libras de presión x 121°C x 15 minutos.
- ✓ Balanza analítica marca Sartorius sensible a la decimo de miligramo.
- ✓ Baño termostataado SELECTA PRECISTERM
- ✓ Cámara fotográfica profesional SONY DSC – S3000
- ✓ Estufa SELECTA
- ✓ Incubadora Microbiológica MEMMERT.
- ✓ Potenciómetro – pH meter CORNING PR 15
- ✓ Refrigeradora FRIOLUX
- ✓ Rotavapor BÜCHI, que trabaja a 60°C, a una presión de 690 mmHg durante 3 horas
- ✓ Cabina de bioseguridad NUAIRE CLASS II
- ✓ Desionizador de agua OPTIC IVYMEN SYSTEMN AC – L8
- ✓ Micropipetas de 10, 20, 30 y 40 uL.
- ✓ Pipeteador automático LABMATE SOFT
- ✓ Mechero de Bunsen
- ✓ Vórtex MIXER MODEL VM-1000

Reactivos y medios de cultivo: ácido clorhídrico 0.5 M, ácido sulfúrico 0.2 M, agua destilada, carbonato de sodio, etanol 70°, cloruro de bario.

4.7. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La muestra de *Carica papaya* (papayo) fue recolectada en Centro Poblado de Nina Rumi –Río Nanay, ubicado en la carretera Zungarococha, distrito de San Juan Bautista, Iquitos. Una especie representativa de la muestra fue llevada al Herbarium Amazonense de La Universidad Nacional de la Amazonía Peruana –UNAP, donde el personal especialista identificó la planta de acuerdo con las exsicatas existentes en el mismo, clasificándola como *Carica papaya*, como figura en el certificado emitido por el Herbarium. De los extractos preparados se realizó el experimento y los datos se recogieron en una hoja de reporte analítico.

4.8. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.8.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

La muestra vegetal de *Carica papaya* (papaya) fue estudiada en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP), ubicado en la carretera Nina Rumi, distrito de San Juan Bautista (Iquitos), para el respectivo trabajo de investigación. Una pequeña porción de la muestra fue adecuadamente guardada en el almacén del mismo laboratorio, en envases de vidrio debidamente sellados con parafina.

4.8.2. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

El extracto etanólico se obtuvo por maceración de la muestra con renovación de solvente por 10 veces consecutivas con etanol durante 7 días cada vez.

Para cada extracción se puso a maceración 1200 g de materia prima (*Carica papaya*), en 3 000 mL de etanol, durante 7 días. La concentración del extracto se realizó por eliminación del disolvente a presión reducida en un rota vapor, a una temperatura de 60° C y a una presión de 690 mmHg. por espacio de 3 horas aproximadamente, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por 3 días.



Figura 4. Flujograma Obtención del extracto etanólico de la hoja de *Carica papaya*

4.8.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

El extracto hidroalcohólico se obtendrá por maceración de la muestra por 10 veces consecutivas con etanol 1mL/agua 1mL durante 7 días cada vez.

Para cada extracción se pondrá a maceración 1200 g de materia prima, la muestra vegetal de *Carica papaya* (papayo), en 3000 mL de etanol/agua, durante 7 días. La concentración del extracto se realizará por eliminación del disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 60° C y a una presión de 690 mmHg por espacio de 3 horas aproximadamente; posteriormente se dejará secar a temperatura ambiente por 3 días.



Figura 5. Flujograma de Obtención del extracto hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya*

4.8.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

A. Preparación del inóculo

El inóculo estándar, para macrodilución en caldo Müller Hinton, se puede obtener por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland o por suspensión directa de colonias, en caldo o solución fisiológica, hasta alcanzar dicha turbidez. Una vez obtenido el inóculo de turbidez comparable al 0,5 de McFarland, diluir en caldo (macrométodo) para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado, cada pocillo o tubo contenga aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. La concentración del inóculo ajustado puede variar dependiendo del método de inoculación utilizado y del microorganismo en estudio, por lo tanto se debe calcular para cada situación. Para realizar este cálculo se debe decidir el volumen exacto en el cual se va a realizar la inoculación.

B. Preparación del control

El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico gentamicina (160 mg/2mL), del cual se utilizó 0,64 mL y se enraso hasta 5 mL en un tubo estéril para obtener una solución madre o stock de 10240 ug/mL.

De la solución madre se extrajo 0,2 mL el cual fue añadido al Tubo N° 01, este contenía 1,8 mL de Caldo Müller Hinton, como resultado de la mezcla se obtuvo 2 mL.

Posteriormente del Tubo N° 01 se extrajo 1 mL que fue añadido al Tubo N° 02, y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 08.

Del Tubo N° 08 se extrajo 1 mL que fue desechado.

Después de este proceso se añadió a todos los tubos 1 mL de la suspensión bacteriana. Así, las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 5120 µg/mL a 20 µg/mL.

Se agregó 1mL del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución de muestra y al tubo control de crecimiento y se homogenizo la mezcla. No deben transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo. Se debe tener en cuenta que tanto la muestra, como el inóculo sufrirán una dilución al medio. Es aconsejable realizar un control de pureza del inóculo subcultivando una alícuota en un medio sólido no selectivo.

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos fue de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución.

C. Lectura e interpretación de la CMI.

La CMI corresponde a la mínima concentración del antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CMI se expresa en µg/ml.³⁸

Tabla 1. Clasificación de la actividad antibacteriana según la Concentración Mínima Inhibitoria.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
> 16 mg/ml	Inactivo
6 a 15 mg/ml	Poco activo
1 a 5 mg/ml	Moderado activo
< 1 mg/ml	Buena actividad

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antibacteriana IMET – EsSalud, 2007.

4.8.5. PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD FRENTE A LOS EXTRACTOS. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO

Se pesó 640 mg del extracto en viales tipo Sendorff estériles, fue diluido en 1 mL de disolución metanol/agua (1:1) para alcanzar una concentración de prueba de 640 mg/mL (Solución madre o solución stock).

De la solución madre se extrajo 0,2 mL y se añadió al tubo N° 01; este contenía 1,8 mL de caldo Mueller Hinton, como resultado de la mezcla se obtuvo 2 mL.

Posteriormente del Tubo N° 01 se extrajo 1 mL que fue añadido al Tubo N° 02; y así sucesivamente hasta llegar al tubo N°08.

Del tubo N° 08 se extrajo 1 mL que fue desechado.

Después del proceso se añadió a todos los tubos 1 mL de la suspensión bacteriana.

El volumen final mínimo, en cada tubo, fue de 2 mL.

Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 32 mg/mL a 0,25 mg/mL.

Los extractos que no se disolvieron por agitación fueron mantenidos por algunos minutos en baño maría (temperatura de 40°C) y colocados nuevamente en el vórtex.

4.9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El área de microbiología donde se realizaron los ensayos experimentales, constituye un medio ambiente de trabajo especial que puede presentar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que trabajan en el laboratorio o cerca de él. Por ello se contará con estrictas medidas de bioseguridad.³⁹

4.10. PLAN DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Para la elaboración de la base de datos y el análisis estadísticos se utilizó los programas Microsoft Excel 2010 y el programa SPSS versión 21 para Windows.

Los resultados se presentó en tablas, cuadros y gráficos. La correlación se analizará con tablas de contingencia con $P < 0.05$ con un grado de confianza del 95%.

CAPÍTULO III

5. RESULTADOS

Tabla 2: Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Carica papaya* (papayo) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Tubos	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CMI	Desarrollo bacteriano	CMI	Desarrollo bacteriano
1	32 mg/mL	Negativo	32 mg/mL	Negativo
2	16 mg/mL	Negativo	16 mg/mL	Negativo
3	8 mg/mL	Negativo	8 mg/mL	Negativo
4	4 mg/mL	Negativo	4 mg/mL	Negativo
5	2 mg/mL	Positivo	2 mg/mL	Negativo
6	1 mg/mL	Positivo	1 mg/mL	Negativo
7	0,5 mg/mL	Positivo	0,5 mg/mL	Negativo
8	0,25 mg/mL	Positivo	0,25 mg/mL	Positivo

En la Tabla N° 01: la Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus* se dio en el tubo N° 04 a una concentración de 4 mg/mL, determinado por la ausencia de turbidez clasificada como de moderada actividad. Mientras para *Escherichia coli* en el tubo N° 07 la Concentración Mínima Inhibitoria fue de 0,5 mg/mL, esto demostró una buena actividad debido a que no hubo crecimiento bacteriano. (Ver Figura N° 11 y N° 12).

Figura 11. GRADO DE TURBIDEZ CON LA CEPA ESTUDIADA DE *Escherichia coli*



CMI 0,5 mg/mL

Figura 12. GRADO DE TURBIDEZ CON LA CEPA ESTUDIADA DE *Staphylococcus aureus*



CMI 4 mg/mL

Tabla N° 03: Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de *Carica papaya* (papayo) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Tubos	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	CMI	Desarrollo bacteriano	CMI	Desarrollo bacteriano
1	32 mg/mL	Negativo	32 mg/mL	Negativo
2	16 mg/mL	Negativo	16 mg/mL	Negativo
3	8 mg/mL	Negativo	8 mg/mL	Negativo
4	4 mg/mL	Negativo	4 mg/mL	Positivo
5	2 mg/mL	Negativo	2 mg/mL	Positivo
6	1 mg/mL	Positivo	1 mg/mL	Positivo
7	0,5 mg/mL	Positivo	0,5 mg/mL	Positivo
8	0,25 mg/MI	Positivo	0,25 mg/mL	Positivo

En la Tabla N° 02: la Concentración Mínima Inhibitoria para *Staphylococcus aureus* se dio en el tubo N° 05 a una concentración de 2 mg/mL, esto debido a una ligera turbidez, clasificándola como moderada actividad. Mientras para *Escherichia coli* la Concentración Mínima Inhibitoria fue de 8 mg/mL, esto no demostró tener una buena actividad debido a que hubo crecimiento bacteriano. (Ver Figura N° 13 y N° 14).

Figura 13. GRADO DE TURBIDEZ CON LA CEPA ESTUDIADA DE *Escherichia coli*

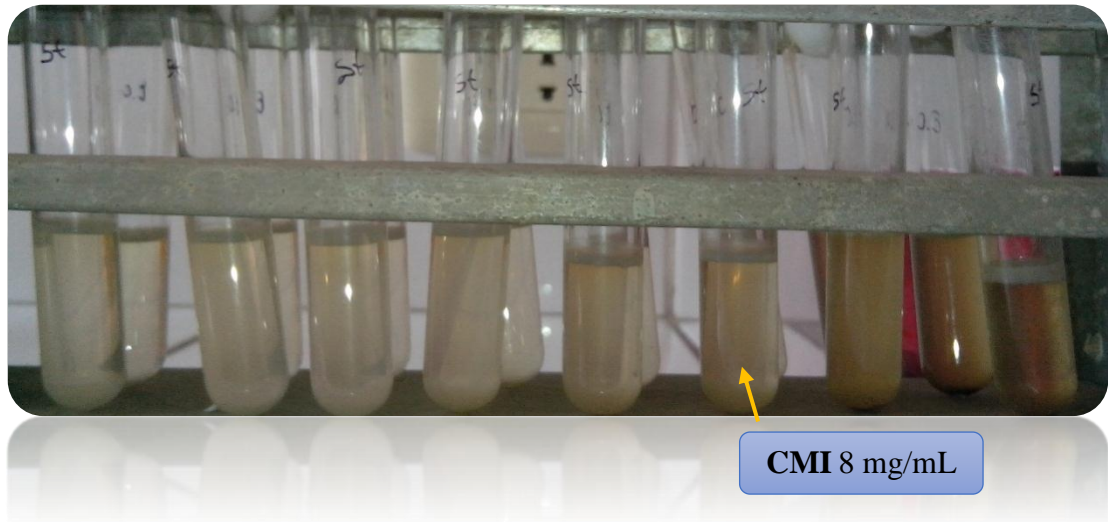


Figura 14. GRADO DE TURBIDEZ CON LA CEPA ESTUDIADA DE *Staphylococcus aureus*

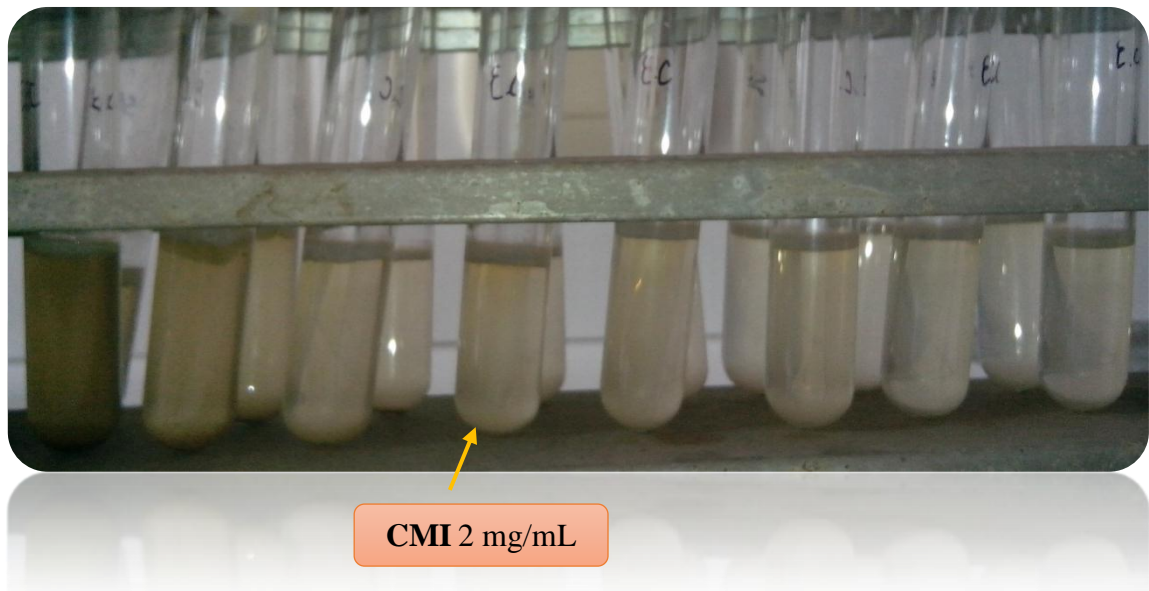


GRÁFICO N° 01: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO E HIDROALCOHÓLICO DE *Carica papaya* FRENTE A *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*.

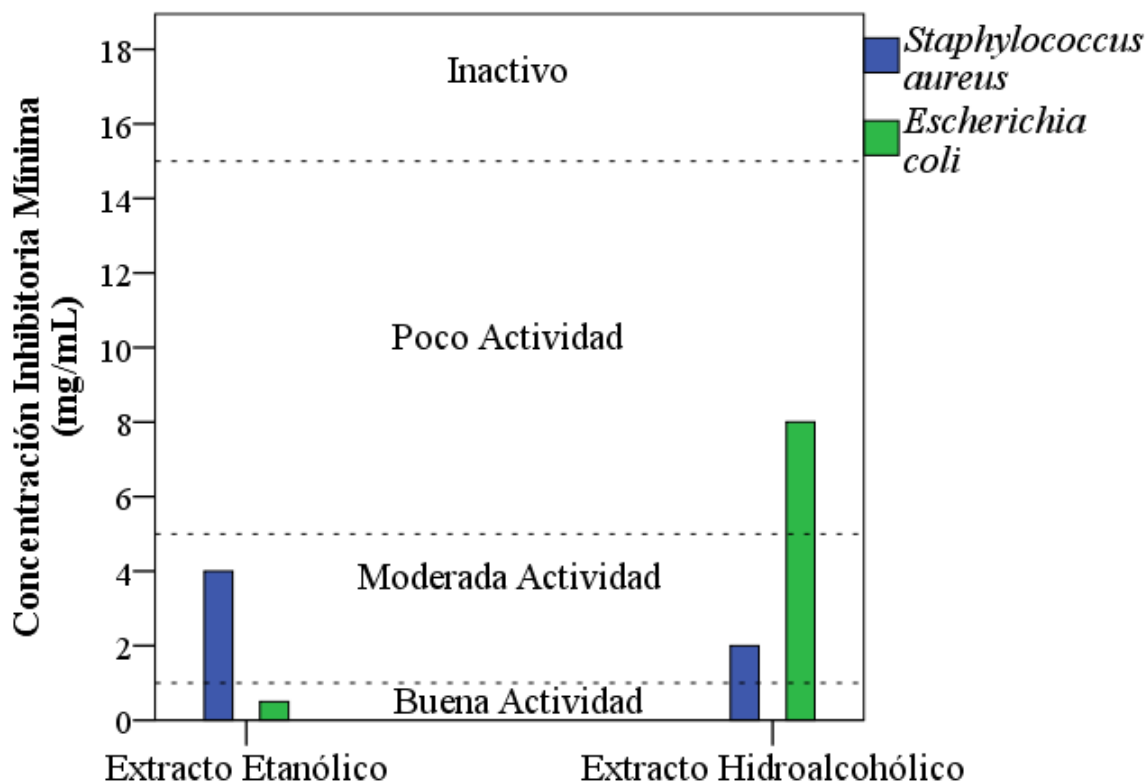


Gráfico que muestra la clasificación de la concentración inhibitoria mínima

Gráfico N° 01: en el gráfico podemos comparar la Concentración Mínima Inhibitoria. Se observa que el extracto etanólico de hojas de *Carica papaya*, a concentración de 4 mg/mL, demostró tener Moderada Actividad frente a la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*, y frente de la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* a concentración de 0,5 mg/mL, demostró Buena Actividad.

Referente al extracto hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* a concentración de 2 mg/mL, demostró tener Moderada Actividad frente a la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*, y frente de la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* a concentración de 8 mg/mL, demostró tener Poco Actividad.

Tabla N° 04: RESULTADO POSITIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICO E HIDROALCOHÓLICO DE *Carica papaya* FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Microorganismo	Tipo de Extracto	
	Etanólico	Hidroalcohólico
<i>Staphylococcus aureus</i>	Moderada Actividad	Moderada Actividad
<i>Escherichia coli</i>	Buena Actividad	Poca Actividad

GRÁFICO N° 02: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS FRENTE A LAS BACTERIAS *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*.

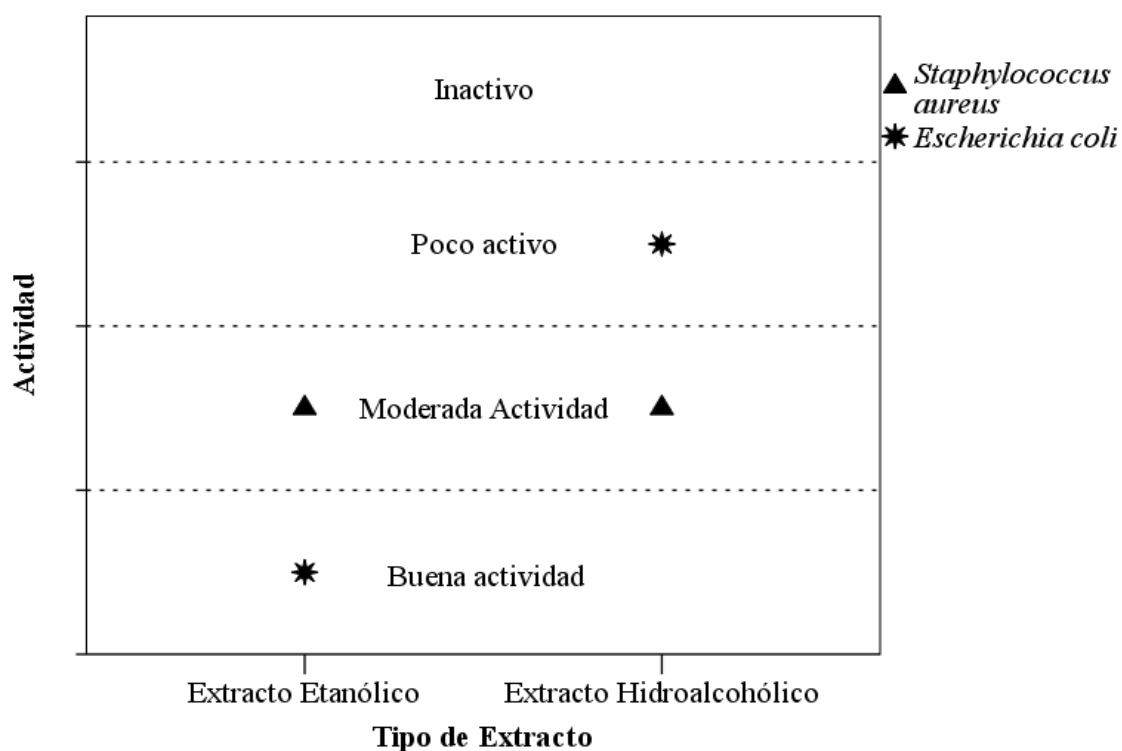


Figura 15. CONTROL DE GENTAMICINA: CONTROL POSITIVO:



6. DISCUSIÓN

El presente trabajo se basó en la investigación de la actividad antibacteriana de los extracto etanólico e hidroalcohólico (polares) obtenidos de la maceración de hojas de *Carica papaya*. Se eligió dentro de los diferentes métodos para evaluar la actividad antibacteriana, al método de Macrodilución. Las diluciones de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 mg/mL, contra las cepas estandarizadas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Al analizar los resultados se observó que los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) presentaron actividad antibacteriana a concentraciones bajas. El extracto etanólico evidenció mayor actividad antibacteriana, determinándose que el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* es de 4 mg/mL y frente a *Escherichia coli* es de 0,5 mg/mL, de manera que la posibilidad de encontrar un principio activo de alta potencia es muy prometedor.

Hewitt D, *et al.*, demostraron que el extracto de las hojas de *Carica papaya* presentan acción antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; así mismo, Drasar, B.S. y Hill, M.J. también demostraron que el extracto etanólico de las hojas de *Carica papaya* también demostró que tiene actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*. Con el presente trabajo se demostró que los extractos etanólico e hidroalcohólico de la muestra de hojas de *Carica papaya* procedente de la Carretera Zungarococha, también presentan actividad antibacteriana frente a las cepas referenciales de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

7. CONCLUSIONES

El presente estudio se realizó con el propósito de determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extracto etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el método de macrodilución. Por lo que llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de los extracto etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el método de macrodilución.
2. Se logró obtener mediante maceración a temperatura ambiente los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya*.
3. El extracto etanólico de hojas de *Carica papaya* (papayo), evaluado mediante el método de macrodilución demostró una Concentración Mínima Inhibitoria de 0,5 mg/mL frente a *Escherichia coli* y 4 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, clasificándosele como buena actividad.
4. El extracto hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo), evaluado mediante el método de macrodilución demostró una Concentración Mínima Inhibitoria de 8 mg/mL frente a *Escherichia coli* y 2 mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, clasificándosele como poca actividad.
5. Se determinó que el extracto etanólico de las hojas de *Carica papaya* (papayo) mostró la Concentración Mínima Inhibitoria más baja frente a *Escherichia coli* que fue la mayor actividad antibacteriana *in vitro* mediante el método de macrodilución y el extracto hidroalcohólico mostró la Concentración Mínima Inhibitoria más baja frente a *Staphylococcus aureus*.
6. Los resultados encontrados demostraron que la hipótesis nula fue rechazada y la hipótesis alterna fue aceptada como verdadera.

8. RECOMENDACIONES

1. Incentivar a los estudiantes que se continúe con estudios de tipo experimental acerca de plantas de uso medicinal.
2. Emplear nuevas metodologías para la evaluación de la actividad antibacteriana de la planta *Carica papaya* (papayo).
3. Que se realice el tamizaje fitoquímico de las hojas de *Carica papaya* (papayo) para determinar los grupos químicos constituyentes responsables de su acción bacteriológica frente a las cepas en estudio.
4. Que se realice el aislamiento e identificación por métodos espectrométricos y cromatográficos para el reconocimiento químico de los metabolitos responsables de su actividad bacteriológica.
5. Que se realice el estudio *in vitro* de otros órganos de *Carica papaya* (papayo) para determinar su posible actividad antibacteriana frente a otras bacterias patógenas.
6. Que se realicen ensayos pre-clínicos y clínicos para su aplicación en preparados farmacéuticos contra las bacterias sensibles.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Maldonado, F; Llanos, F; Zavaleta, J.: Uso y prescripción de medicamentos antimicrobianos en el Hospital Apoyo de la Merced. Revista Médica Peruana. 2002; N° 19, 181-185.
2. Sangama, D.; Espinoza, G. (2009). “Evaluación de la actividad biológica *In Vitro* de extractos y fracciones de nueve especies vegetales de la Amazonía Peruana sobre formas parasitarias de Plasmodium, Leishmania y Tripanosoma”. Tesis de Pre-grado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
3. Villegas, L. La Investigación y el desarrollo integral de la biodiversidad en el Perú. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana “Cayetano Heredia”. 2005.
4. Kasper, Dennis L.; Braunwald, E.; Fauci, A.S.; Hauser, S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L.; Isselbacher. Eds. Harrison, Principios de medicina interna. 16^a Edición. Sección 5. Capítulo 120.
5. Drasar, BS; Hill, MJ. Human intestinal flora. Academic Press, London, UK., 1974.
6. Mejia, K; Rengifo, E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana. 1995. Mejía K. Diagnóstico de recursos vegetales de la amazonía peruana. 1995. Rengifo, E. Las ramas floridas del bosque. 2007.
7. Villegas, L. La Investigación y el desarrollo integral de la biodiversidad en el Perú. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana “Cayetano Heredia”. 2005.
8. Mejia, K; Rengifo, E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana. 1995. Mejía K. Diagnóstico de recursos vegetales de la amazonía peruana. 1995. Rengifo, E. Las ramas floridas del bosque. 2007.

9. Villar L. Villavicencio O. Manual de Fitoterapia. Organización Panamericana de la Salud. EsSalud-Lima. 2001; 7 - 8.
10. Brook G. Carroll K. Butel J. Morse S. Microbiología médica. 19ª Edición. Editorial Manual moderno. Bogotá – Colombia. 2008, 235 - 275.
11. Osuna Torres, L.; Tapia Pérez, ME; Aguilar Contreras, A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales, estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Publicaciones y Ediciones de la Universidad de Barcelona. España. pp. 25, 31, 39, 42, 50, 64 y 69.
12. Treating Livestock with Medicinal Plant: Beneficial or Toxic? .<http://www.guiaverde.com/arboles/caricapapaya.htm>.
13. Rincón Sibarita: La Fruta de la Vida.
14. Dawkins Hewitt, H.; Wint, Y; Obiefuna, P.C; Wint, B. “Antibacterial Effects of Carica Papaya Fruit on Common Wound Organisms”. West Indian Med J. 2003; 52: 290-292.
15. Savickiene. N.; Dagilyte, A.; Lukosius, A; Zitkevicius, V. “Importance of Biologically Active Components and Plants in the Prevention of Complication of Diabetes Mellitus”. Medicina (Kaunas). 2002; 38: 970-975
16. Van Palestein. W. H, Ijsseldijk. M. and J.H.J Huis in ‘T Veld. “A Selective Medium for the Two Major Subgroups of the Bacterium *Streptococcus mutans* Isolated from Human Dental Plaque and Saliva”. Archs oral Biol. 1983; 28: 599- 603.
17. Producto Nacional à base de Papaína Remueve Cáriessem uso da Broca.
18. Galas .M, Corso. A, Pasterán. F. y P. Ceriana.” XVII Curso Intensivo de Actualización en Antimicrobianos”. 2003. pp 9, 11, 76, 95- 104.

19. VILLAR, T., *et.al.* 1997. “VI CONGRESO ITALO-LATINOAMERICANO DE ETNOMEDICINA ALESSANDRO MALASPINA”. Guatemala. Libro de Resúmenes. (s.p.)
20. Rodríguez. C.M, “Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos”www.google.com
21. Chandler, W. H. 1967. Frutales de hoja perenne. Primera edición. Editora Revolucionaria. La Habana. Cuba. p. 366 -390.
22. Mederos, E. 1991. Fruticultura. Editorial Pueblo y Educación. La Habana. Cuba. P 94 – 121.
23. Guerrero, MG. Obtención y aprovechamiento de extractos vegetales de la flora salvadoreña. 2da. ed. San Salvador. Editorial Universitaria. 1994. (p.124, 125, 173, 180, 181, 224, 379).
24. Morton JF. Fruits of Warm Climates. Winterville. Creative Resources Systems Inc. 1987. (p.336, 346).
25. Standley, PC; Williams, LO. Flora of Guatemala, Fieldiana: Botany. 24(7):148.1961.
26. Roque, JM. Flora Médico-guatemalteca. Guatemala. Tipografía Nacional. Tomo I. 187 p.
27. Grover, R.K. and J.D. Moore. 1962. Toxicometric studies of fungicides against brown rot organisms *Sclerotiniafructicola* and *S. laxa*. Phytopathology 52(1): 876-880.
28. Wikipedia, La EnciclopediaLibre:
[http:// es.m.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli](http://es.m.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli).
[http:// es.m.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus](http://es.m.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).

29. W. J. Zumba, A., L.; Sumari, R., Evaluación de la Actividad Antimicrobiana *in vitro* de los extractos liofilizados de ocho ecotipos de *Bixaorellana L.* IMET – EsSALUD – 2008. Iquitos – Perú. 2009. Pag. 24, 25 y 27, 28; 37.

30. Jaime, A.; Bustos-Martínez, Aída. Hamdan-Partida2, Marcia Gutiérrez-Cárdenas. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *RevBiomed* 2006; 17:287-305.

31. Nataro, JP.;Kaper, JB. Diarrhea genic *Escherichia coli*.*Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142- 201, 1998.

32. Neidhardt FC. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd edition. ASM Press, Washington, 1999.

33. Elika. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. *Escherichia coli*. 28 de Febrero del 2013.www.elika.net.

34. Ewing Wh. Edwards AndEwing´S. Identification of Enterobacteriaceae. 4th. Edition, Elsevier, 1985.

35. CORDERO, J. y H. BOSHIER (EDS.). Árboles de Centroamérica. Un Manual para Extensionistas. Instituto Forestal de Oxford – CATIE. San José, Costa Rica. Pág. 1079, 2003.

36. ARGUETA, V. A., CANO A., L.M.; RODARTE M.E. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana II. Instituto Nacional Indigenista. México. D.F. Pág. 1032 – 1033. 1994.

37. COS, P., VLIETINCK, A.J., BERGHE, D.V., MAESA, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof – of – concept”. *J. Ethnopharmacol.*, 106: 290 – 302. 2006.

38. SACSAQUISPE, R.; VELASQUEZ, J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. 2000.
39. HIJAIR GUERRA, GISELY. Bioseguridad en el Laboratorio. Bioseguridad Ministerio de Salud del Perú. Instituto Nacional de Salud INS. Organismo Público Descentralizado del Sector Salud 2000
40. Taroco, V. Seija, R. Vignoli, Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Procedimientos de Microbiología Clínica. 2001; 663 - 670.
41. EZIKE AC, Akah PA, Okoli CO, Ezeuchenne NA, Ezeugwu S. *Carica papaya* (Paw-Paw) unripe fruit may be beneficial in ulcer. J Med Food. (2009)12(6): 1268-73).
42. Plantas de uso Medicinal en Centro América. 1995. Editorial Llerena. OPS/OMS. Perú pp 78, 79, 80.
43. Cuéllar-Cuéllar, Armando Ph.D., Scull-Lezama, Ramón M.Sc., Martínez Armenteros, Yuniel Lic. Fernández-Calienes, AYME Lic., Monzote, Lianet Ph.D.(2012). Evaluación preliminar de la composición química de las hojas de *Carica papaya L* y del efecto anti protozario de un extracto enriquecido en alcaloides a partir de la misma. Profesores del Departamento de Farmacia, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Ciudad de La Habana. Cuba.
44. Weninger, B.; Robineau, L. 1988. Elementos para una Farmacopoea Caribeña. Tramil. Edición Endacaribe. Cuba.

ANEXOS

ANEXO N° 01

Preparación del Agar Mueller Hinton:

1. Preparar el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
2. Autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45°C a 50°C. Una vez esterilizado y solidificado, medir el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente.

Esta medición puede realizarse:

- a. Utilizando un electrodo de superficie
 - b. Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión
 - c. Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro
3. Repartir el medio en placas Petri (60 ml a 70 ml o 25 ml a 30 ml, para placas de 150 mm o 100 mm de diámetro interno, respectivamente, de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.
 4. Realizar las pruebas de esterilidad para cada lote de MuellerHinton, incubando una o dos placas de cada lote entre 30°C y 35°C durante 24 horas o más. Estas placas utilizadas deben ser luego descartadas.

Fuente: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.⁴⁰

ANEXO N° 02

RECUPERACIÓN DE CULTIVOS CONSERVADOS

1. Congelados: descongelar a temperatura ambiente o en baño de agua entre 36°C y 37°C. Transferir una alícuota del criotubo a un medio apropiado como agar tripticasa soya.
2. Cultivos en agar: con asa de siembra estéril romper el agar y tomar una asada para sembrar en medio sólido o caldo tripticasa soya. Incubar entre 35 y 37°C durante 18 a 24 horas, y antes de utilizarlos realizar previamente otro subcultivo obteniendo colonias aisladas.

Fuente: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.⁴⁰

ANEXO N° 03

Procedimiento del Método de Macrodilución en Caldo Müller Hinton

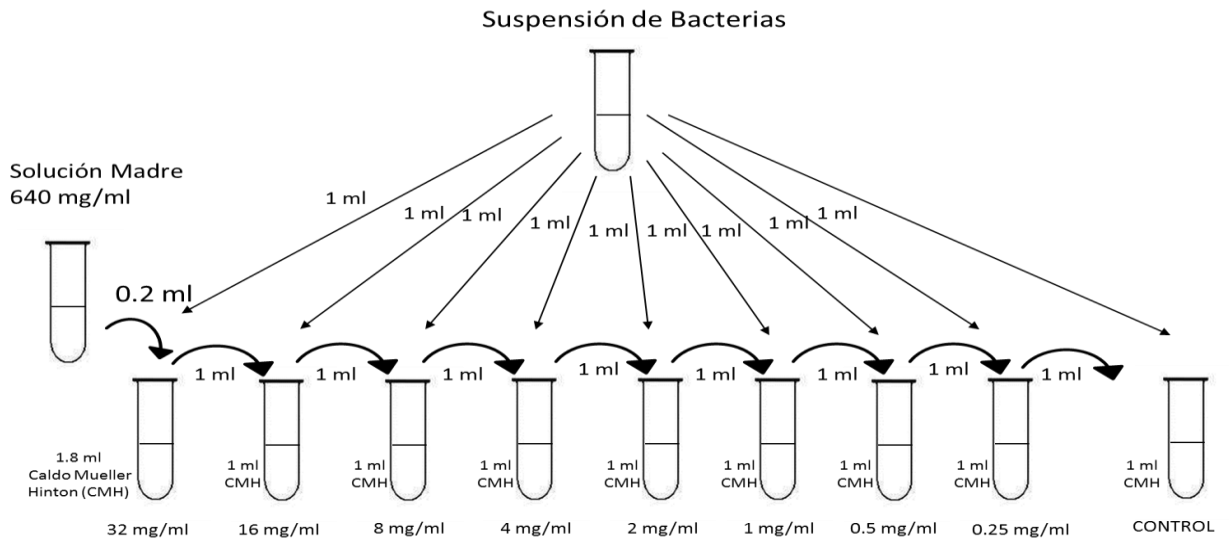


Figura 6.

ANEXO N° 04

Procedimiento del Control del Método de Macrodilución en Caldo Müller Hinton

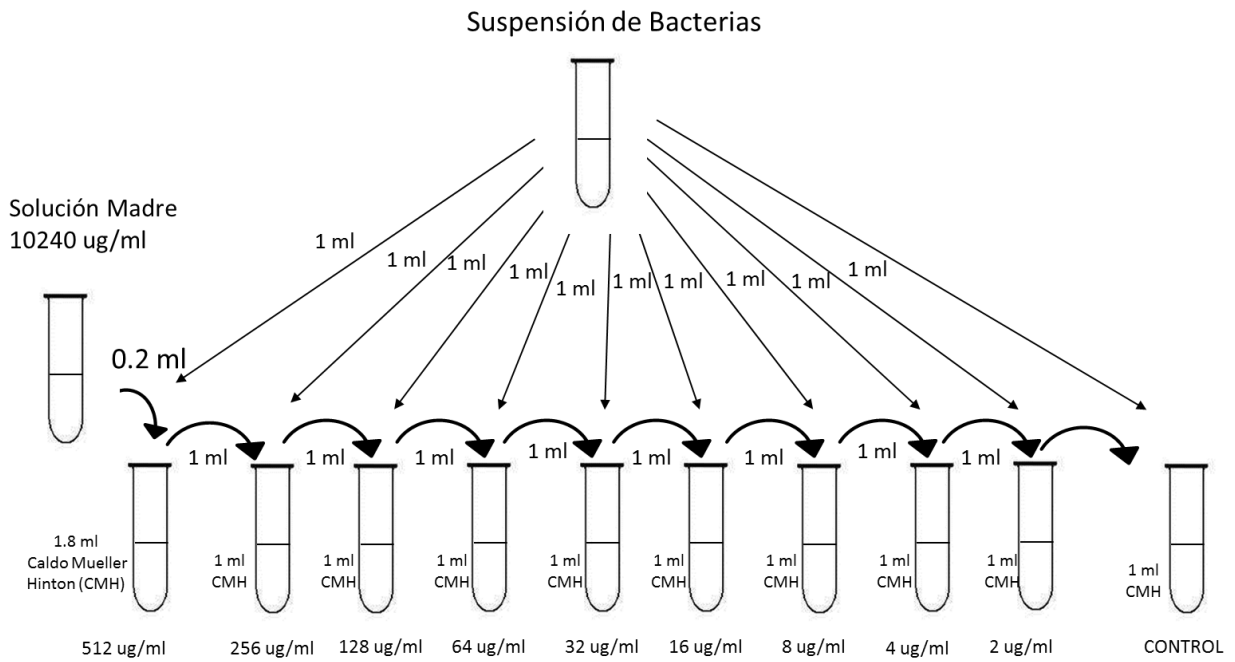


Figura 7.

ANEXO N° 05

NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- ✓ Entrar al laboratorio en forma ordenada, dejar las carteras, libros y otros objetos personales en el lugar que se les indique para tal fin.
- ✓ Llevar puesta la bata de laboratorio en todo momento. La misma debe permanecer completamente cerrada.
- ✓ Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar la sesión práctica.
- ✓ Lavar las manos con agua y jabón antes de realizar las actividades programadas, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.
- ✓ Trabajar cerca del mesón, adoptando una buena postura y estando físicamente cómodo.
- ✓ Llevar un calzado apropiado, preferiblemente cerrado y de suela antideslizante en las áreas de laboratorio.
- ✓ Evitar llevar al laboratorio accesorios que podrían ser fuente de contaminación (joyas, por ejemplo).
- ✓ Mantener el cabello recogido.
- ✓ Evitar desplazamientos innecesarios y movimientos bruscos. Hablar sólo lo indispensable.

- ✓ No comer, beber, fumar, almacenar comida, objetos personales o utensilios, aplicarse cosméticos ni ponerse o quitarse lentes de contacto en ningún área del laboratorio.
- ✓ Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica.
- ✓ Mantener el área de trabajo ordenado, libre de libros, cuadernos u objetos personales, exceptuando aquellos equipos y materiales necesarios para la realización del trabajo práctico.
- ✓ Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero. Nunca debe dejar éste desatendido.
- ✓ Regresar los reactivos y equipos empleados (microscopio, mechero, etc.), limpios y de manera ordenada a su respectiva ubicación una vez finalizada la actividad. Reporte cualquier daño de los mismos.
- ✓ Colocar los materiales de vidrio contaminados en los recipientes dispuestos para tal fin; por ejemplo: las pipetas en los pipeteros, tubos y placas de Petri en las ollas de desecho, etc.
- ✓ No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas de los mismos y estar seguro de cómo emplearlo.
- ✓ No devolver sustancias a sus envases originales.
- ✓ Emplear la propipeta al medir líquidos. Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. De igual manera, las pipetas tendrán tapones de algodón para reducir la contaminación de estos dispositivos de pipeteo.
- ✓ Realizar solamente aquellas actividades indicadas, no llevar a cabo experimentos no autorizados.

- ✓ Reportar inmediatamente cualquier accidente (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc.); ningún accidente debe ser catalogado como menor.

- ✓ Reducir al mínimo la formación de aerosoles durante la realización de cualquier trabajo práctico.

- ✓ Extremar las precauciones cuando se utilicen agujas y jeringas a fin de evitar la inoculación accidental, así como la generación de aerosoles durante su manipulación y desecho.

- ✓ Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.

ANEXO N° 06

UBICACIÓN DE LA LOCALIDAD DE NINA RUMI – SAN JUAN –
LORETO

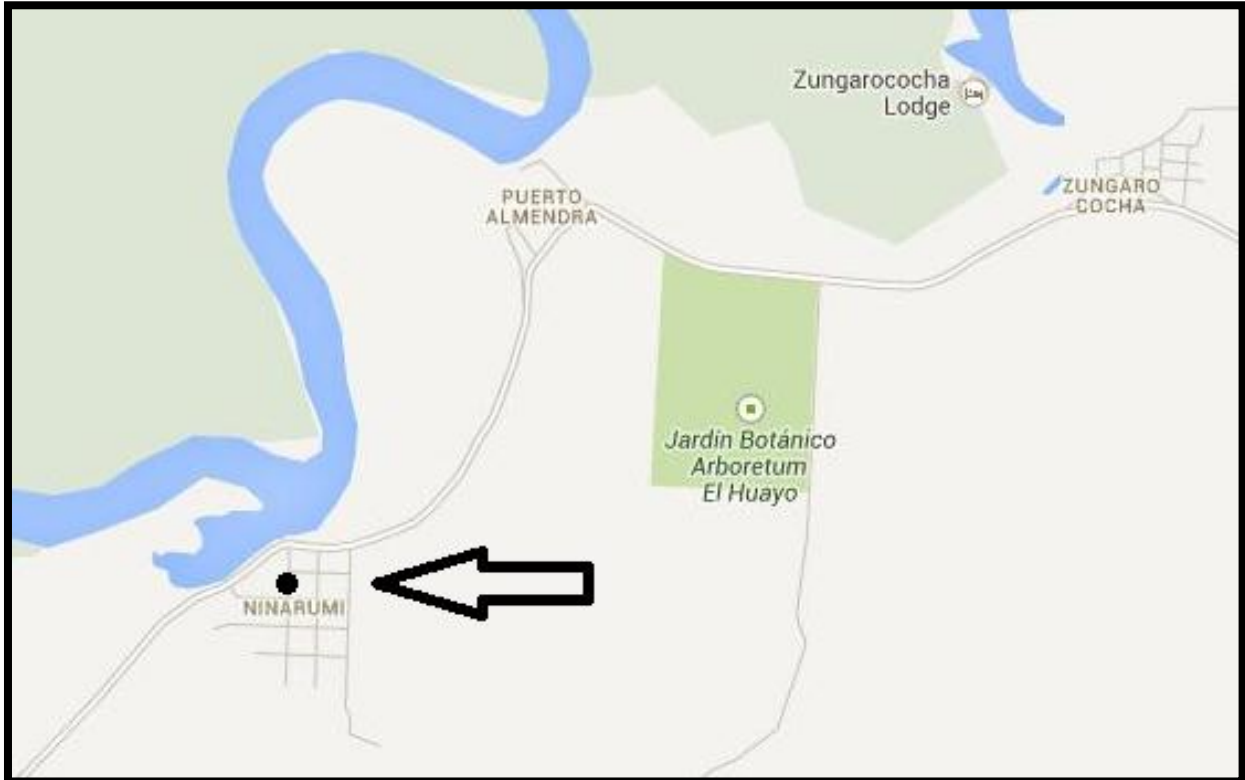


Figura 16. Recolección de la muestra, NINA RUMI

ANEXO N° 07

**ESTERILIZACIÓN DE MATERIALES Y MEDIOS DE CULTIVO A
UTILIZAR**



Figura 8.

ANEXO N° 08

PARAMETROS A UTILIZAR: Mc FARLAND



Figura 9.

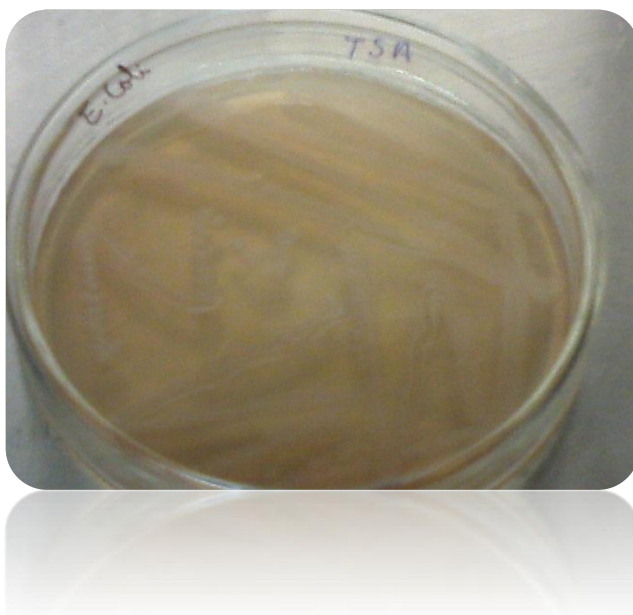
ANEXO N° 09

BACTERIAS PETRIFICADAS



ANEXO N° 10

BACTERIAS RECUPERADAS



ANEXO N° 11

METANOL



ANEXO N° 12

DILUYENDO LA MUESTRA



ANEXO N° 13

SEMBRANDO LAS BACTERIAS EN ESTUDIO



ANEXO N° 14

VORTEX



ANEXO N° 15

CALDO MULLER - HINTON



Figura 10.