

“AÑO DE LA CONSOLIDACION DEL MAR DE GRAU”
“UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA”
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
TESIS



“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In Vitro DEL EXTRACTO ETANOLICO DE HOJA Y FRUTO DEL *Capsicum frutescens* (Ají Charapita), MEDIANTE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN DISCO Y MACRODILUCION FRENTE A 4 CEPAS BACTERIANAS”.

PRESENTADO POR LOS BACHILLERES:

Salvador Enrique Rivera Vásquez
Jomeiny Marely Montenegro Carranza

**PARA OPTAR POR EL TITULO PROFESIONAL DE QUIMICO
FARMACEUTICO**

Asesores:

M.C. CHARLES OCAMPO FALCÓN
ING. ALENGUER GERONIMO ALVA AREVALO.
BLGA. JESSY PATRICIA VASQUEZ CHUMBE.

IQUITOS – PERÚ

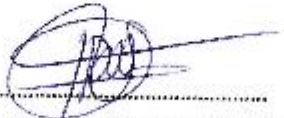
2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

Facultad de Farmacia y Bioquímica

"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE HOJA Y FRUTO DEL *Capsicum frutescens* (Aji Charapita), MEDIANTE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN DISCO Y MACRODILUCIÓN FRENTE A 4 CEPAS BACTERIANAS".

JURADO CALIFICADOR



Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG.
PRESIDENTE



ING. CLEYO LARA HERRERA
MIEMBRO



BLGO. FELIPE RIOS ISERN
MIEMBRO



M.C. CHARLES OCAMPO FALCÓN
ASESOR



ING. ALENGUER GERONIMO
ALVA AREVALO
ASESOR



BLGA. JESSY PATRICIA
VASQUEZ CHUMBE
ASESOR

DEDICATORIA

“A Dios porque Él es el gestor de los proyectos trazados en la vida, el guía de sabiduría y de protección de todos mis pasos.”

*A mis Padres **Herberth Enrique Rivera Padilla** y **Sara Cristina Vásquez Pinedo** por apoyarme incondicionalmente, estando siempre a mi lado durante este largo camino, por guiarme mediante sus palabras y consejos a no caer, perseverar y seguir adelante por sobre todas las cosas.*

A Claudia Chanamé, por ser esa persona especial a pesar de un largo camino con muchas fluctuaciones.

*A mi Abuelo, **Alfredo Benigno Rivera Ríos** aunque ya no este terrenalmente, siempre será la inspiración y motivación a superarme cada día.*

Salvador Enrique Rivera Vásquez

*“Quisiera dedicar este trabajo de tesis a **Dios**, por haberme permitido llegar hasta este momento, también por darme las fuerzas y la sabiduría para seguir adelante y no desfallecer ante las adversidades.*

*A mis padres, **Marne Carranza Castillo** y **Ramiro Montenegro Vidarte**, porque a ellos les debo todo lo que soy, por su apoyo constante e incondicional y sobre todo porque siempre creyeron en mí.*

*A mi abuela, **Aurora Castillo** porque me enseñó a tener el coraje para luchar por lo que creía y porque estoy segura que desde el cielo siempre me alentara en la búsqueda de mis objetivos.”*

Domeiny Marely Montenegro Carranza

AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo quisiéramos agradecer en primer lugar a Dios por su bendición, dándonos la oportunidad de concluir este trabajo.

Indudablemente a nuestros padres, mediante ellos fue posible el inicio y la culminación del trabajo, apoyándonos de todas las formas posibles con ahínco y vigorosidad.

A innumerables personas, cada una de ellas fueron importante para la realización y conclusión del trabajo, siendo partícipes de ideas, obtención de materiales, apoyo logístico, en fin de una u otra manera, agradecerles de todo corazón.

A nuestros Asesores:

- *Al Dr. Charles Ocampo Falcón; por apoyarnos y darnos los conocimientos referentes al trabajo, lo cual fueron vitales para nuestro desarrollo y desempeño.*
- *Al Ing. Allenguer Gerónimo Alva Arévalo; por brindarnos el laboratorio el cual está a cargo, para realizar la obtención de los extractos para nuestro trabajo, además de sus enseñanzas importantes en el proceso de nuestro trabajo.*
- *A la Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, por hacer posible la realización de los ensayos del estudio, brindándonos el laboratorio de microbiología, el cual está a cargo; además por la excelente acogida, enseñanzas y tiempo brindado.*

Al Q.f. Jean Pierre López Mesia, porque fue partícipe y esencial para la ejecución de nuestra parte experimental, facilitándonos la comprensión de los ensayos de nuestro presente estudio.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	03
AGRADECIMIENTO.....	04
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
<u>CAPITULO I</u>	
1.1 INTRODUCCION.....	15
1.3 OBJETIVOS.....	17
1.3.1 Objetivo General.....	17
1.3.2 Objetivos Específicos.....	17
<u>CAPITULO II</u>	
2.1 MARCO TEÓRICO.....	19
2.1.1 Antecedentes.....	19
2.1.2 <i>Capsicum frutescens L.</i> (Ají charapita).....	27
2.1.2.1 La clasificación taxonómica.....	27
2.1.2.2 Sinonimia.....	27
2.1.3 Descripción Botánica.....	27
2.1.4 Origen.....	29
2.1.5 Composición Química.....	29
2.1.6 Farmacología.....	29
2.2 ENSAYOS ANTIBACTERIANOS.....	30
2.2.1 Método de Macrodilución.....	30
2.2.2 Método de Difusión en disco.....	31
2.3 CEPAS EN ESTUDIO.....	33
2.3.1 <i>Pseudomonas Aureginosa</i>	33
2.3.1.1 Taxonomía.....	33
2.3.1.2 Características.....	33
2.3.2 <i>Escherichia Coli</i>	35

2.3.2.1 Taxonomía.....	35
2.3.2.2 Características.....	35
2.3.3 <i>Staphylococcus Aureus</i>	37
2.3.3.1 Taxonomía.....	37
2.3.3.2 Características.....	37
2.3.4 <i>Salmonella Tiphy</i>	39
2.3.4.1 Taxonomía.....	39
2.3.4.2 Características.....	39
2.4 VARIABLES OPERACIONALES.....	41
2.4.1 Variable Independiente.....	41
2.4.2 Variable Dependiente.....	41
2.5 INDICADORES.....	42
2.5.1 Método de Macrodilución.....	42
2.5.1.1 Independiente (X).....	42
2.5.1.2 Dependientes (Y).....	42
2.5.2 Método de Difusión en Disco.....	42
2.5.2.1 Independiente (X): Concentración del extracto.....	42
2.5.2.2 Dependiente (Y): Grado de sensibilidad.....	42
2.6 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	43
2.6.1 Método de Macrodilución.....	43
2.6.2 Método de Difusión en Disco.....	44
2.7 HIPOTESIS.....	45
<u>CAPITULO III</u>	
3.1 METODO DE INVESTIGACION.....	47
3.1.1 Método de investigación.....	47
3.1.2 Flujograma de investigación.....	48
3.2 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS.....	49
3.2.1 Procedimiento Experimental.....	49
3.2.1.1 Recolección de la Muestra Vegetal.....	49
3.2.1.2 Identificación de la Muestra Vegetal.....	49
3.2.1.3 Procesamiento de la muestra vegetal.....	49

3.2.1.4 Molienda de la Muestra Vegetal.....	50
3.2.1.5 Obtención del Extracto Etanólico.....	50
3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	51
3.3.1 Vegetal.....	51
3.3.1.1 Población Vegetal.....	51
3.3.1.2 Muestra Vegetal.....	51
3.3.2 Microbiológica.....	51
3.3.2.1 Población Microbiológica.....	51
3.3.2.2 Muestra Microbiológica.....	51
3.4 PROCEDIMIENTOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD	
 ANTIBACTERIANA.....	52
3.4.1 Método de Macrodilución.....	52
3.4.1.1 Recuperación de cultivos conservados.....	52
3.4.1.1.1 Congelados.....	52
3.4.1.1.2 Reactivación de Bacterias.....	52
3.4.1.1.3 Cultivo en Agar.....	52
3.4.1.2 Preparación Del Inóculo.....	53
3.4.1.3 Incubación.....	53
3.4.1.4 Preparación y control de extractos.....	53
3.4.1.5 Preparación del control positivo.....	55
3.4.1.6 Interpretación de datos.....	55
3.4.2 Método de Difusión en Disco.....	56
3.4.2.1 Preparación de Controles.....	56
3.4.2.2 Dilución de Extractos.....	56
3.4.2.3 Inoculación de las placas.....	57
3.4.2.4 Aplicación de los Discos.....	57
3.4.2.5 Incubación.....	58
3.4.2.6 Lectura de las placas.....	58
3.4.2.7 Interpretación de Datos.....	58
3.4.2.7.1 Valores críticos para la medida de sensibilidad en disco....	58
3.4.2.7.2 Procedimiento de Categorización.....	59
3.5 INSTRUMENTOS Y MATERIALES.....	60
3.6 ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS.....	62

3.7 NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.....	62
3.8 PROTECCION DE LOS DERECHOS HUMANOS.....	63

CAPITULO IV

4.1 RESULTADOS.....	64
4.1.1 Obtención de Extractos.....	64
4.1.1.1 Determinación del Rendimiento de Frutos y Hojas de <i>Capsicum frutescens</i> “Ají Charapita”	
4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico.....	65
4.1.3 Actividad Antibacteriana de <i>Capsicum frutescens</i> . Método de difusión en Disco.....	66
4.1.3.1 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de <i>Capsicum</i> <i>frutescens</i> “Ají charapita”.....	66
4.1.3.2 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de frutos de <i>Capsicum</i> <i>frutescens</i> “ Ají Charapita”.....	69
4.1.4 Método de Macrodilución: Determinación de la concentración Mínima inhibitoria (CIM).....	72
4.1.4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	72
4.1.5 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	74
DISCUSION.....	75
CONCLUSIONES.....	79
RECOMENDACIONES.....	81
BIBLIOGRAFIA.....	82
ANEXOS.....	89

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 01: Clasificación de la Muestra vegetal en estudio.....	27
TABLA N° 02: Taxonomía (<i>Pseudomonas aureginosa</i>).....	33
TABLA N° 03: Taxonomía (<i>Escherichia coli</i>).....	35
TABLA N° 04: Taxonomía (<i>Staphylococcus aureus</i>).....	37
TABLA N° 05: Taxonomía (<i>Salmonella Typhi</i>).....	39
TABLA N° 06: Método de Macrodilución.....	43
TABLA N° 07: Método de Difusión en Disco.....	44
TABLA N° 08: Categorización (INS). Difusión en Disco.....	59
TABLA N° 09: Rendimiento del extracto etanólico de fruto y hojas de <i>Capsicum frutescens</i>	64
TABLA N° 10: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de <i>Capsicum frutescens</i> ...	65
TABLA N° 11: Actividad antibacteriana obtenida del Extracto etanólico de <i>Capsicum frutescens</i> “Ají charapita”, según Diámetro de la zona de inhibición.....	66
TABLA N° 12: Actividad Actividad antibacteriana obtenida del Extracto etanólico de <i>Capsicum frutescens</i> “Ají charapita”, según Diámetro de la zona de inhibición.....	69
TABLA N° 13: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de <i>Capsicum frutescens</i> “Ají charapita” según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a <i>Pseudomonas aureginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella tiphy</i>	72
TABLA N° 14: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de frutos de <i>Capsicum frutescens</i> “Ají charapita” según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a <i>Pseudomonas aureginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella tiphy</i>	73
TABLA N° 15: Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto etanólico de <i>Capsicum frutescens</i> “Ají charapita” frente a las bacterias en estudio....	74

INDICE DE FOTOS

FOTO N° 01. Filtración de los Extractos.....	89
FOTO N° 02. Concentración de los extractos mediante el rotavapor.....	89
FOTO N° 03. Extracto Etanólico de Hoja.....	90
FOTO N° 04. Extracto Etanólico de fruto.....	90
FOTO N° 05. Cepas bacterianas con las que se realizó el estudio.....	90
FOTO N° 06. Microtubos, tips para micropipetas, matraz con Agar M.H, tubos de ClNa Antes de ser llevados al autoclave.....	91
FOTO N° 07. Placas para los ensayos después de sacarlos de la estufa.....	91
FOTO N° 08. Preparación de las placas con Agar M.H para los ensayos.....	92
FOTO N° 09. Siembra de las bacterias en las placas para los estudios.....	92
FOTO N° 10. Crecimiento de las bacterias de Estudio después de 24 horas de Incubación.....	92
FOTO N° 11. Cultivo bacteriano en tubo de ClNa 0.9% para su respectivo crecimiento (Izquierda). Patrón de Mac farland (Derecha).....	93
FOTO N° 12. Procedimientos realizados del ensayo de Macrodilución.....	93
FOTO N° 13. Secuencia de microtubos realizados aplicando el ensayo de macrodilución Con el Extracto de fruto y hoja de <i>Capsicum frutescens</i> para <i>Pseudomonas</i> <i>Aureginosa, staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	94
FOTO N° 14. Secuencia de microtubos relizados aplicando el ensayo de macrodilución Con el Extracto de Fruto y Hoja de <i>Capsicum frutescens</i> para <i>Salmonella</i> <i>Tiphy</i>	95
FOTO N° 15. Discos de papel whattman utilizados. Discos en la incubadora.....	95
FOTO N° 16. Inoculación de las placas.....	96
FOTO N° 17. Aplicación de los discos.....	96
FOTO N° 18. Discos para el ensayo.....	96

FOTO N° 19. Medición de los halos.....	96
FOTO N° 20. Resultados de <i>Escherichia coli</i> , difusión en disco.....	97
FOTO N° 21. Ensayos para <i>Escherichia coli</i>	97
FOTO N° 22. Resultados de <i>Salmonella tiphy (Extracto de Hoja)</i>	97
FOTO N° 23. Resultados de <i>Salmonella tiphy (Extracto de Hoja)</i>	98
FOTO N° 24. Resultados de <i>Pseudomonas aureginosa, staphylococcus aureus</i>	98
FOTO N° 25. Resultados de <i>Salmonella tiphy (Extracto de Fruto)</i>	99
FOTO N° 26. Resultados de <i>Pseudomonas aureginosa, staphylococcus aureus, Escherichia coli</i>	99

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 01. <i>Capsicum frutescens</i> “ <i>Ají Charapita</i> ”.....	89
FIGURA N° 02. Características Microscópicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
FIGURA N° 03. Características Microscópicas de <i>Escherichia coli</i>	35
FIGURA N° 04. Características Microscópicas de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
FIGURA N° 05. Características Microscópicas de <i>Salmonella Typhi</i>	39

INDICE DE IMAGENES

IMAGEN N° 01. Constancia de Certificación de la muestra vegetal.....	100
---	-----

INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA N° 01. Obtención del Extracto Etanólico de Hoja y fruto de <i>Capsicum frutescens</i>	48
GRAFICO N° 01. Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de fruto y hojas de <i>Capsicum frutescens</i>	64
GRAFICO N° 02. Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de hojas de <i>Capsicum frutescens</i> “ <i>Ají charapita</i> ” según Porcentaje de inhibición.....	68
GRAFICO N° 03. Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de frutos de <i>Capsicum frutescens</i> “ <i>Ají charapita</i> ” según Porcentaje de inhibición.....	71

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In Vitro DEL EXTRACTO ETANOLICO DE HOJA Y FRUTO DEL *Capsicum frutescens* (Ají Charapita), MEDIANTE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN DISCO Y MACRODILUCION FRENTE A 4 CEPAS BACTERIANAS”

Rivera Vásquez, S.E¹.; Montenegro Carranza, J.M¹

1: Bachilleres en Farmacia y Bioquímica; FFBQ-UNAP-IQUITOS

RESUMEN

El objetivo del Estudio fue determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hoja y fruto del *Capsicum frutescens* “Ají Charapita” mediante los métodos de Difusión en disco y Macrodilución. Las cepas utilizadas fueron, *Pseudomonas aureginosa* ATCC 27833, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella Tiphy* ATCC 27347. Se utilizó como control positivo al antibiótico Gentamicina y como control negativo al etanol/agua. El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Capsicum frutescens* (Ají Charapita) evidenció la presencia de carotenos y alcaloides en mayor abundancia en ambas partes vegetales (hojas y frutos), además de abundantes saponinas, fenoles y taninos solamente en las hojas en comparación al fruto, el cual evidenció moderada presencia de estos.

Con respecto a la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hoja, frente a *Escherichia coli*, a concentración de 12mg presentó un halo de inhibición de 13 mm, mientras que en la concentración de 6mg presentó un halo de 10mm. Frente a *Staphylococcus aureus*, el resultado fue negativo. Frente a *Salmonella Tiphy*, a concentración de 12mg presento 7mm y 6mm de halo a 6mg respectivamente.

Para el caso del extracto del fruto de *Capsicum frutescens*, a las concentraciones de 12 y 6 mg, frente a *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* no presentaron halos de inhibición; frente a *Salmonella Tiphy*, a concentración de 12mg presentó 6mm y a 6mg no presentó halo de inhibición. En el método de macrodilución, el extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* demostró ser **poco activo** frente a *Escherichia coli* (CMI: 8mg/ml); para *Staphylococcus aureus*, demostró ser **inactivo** (CMI: 32mg/ml), al igual que *Salmonella tiphy* (CMI: 16mg/ml). Para el extracto de fruto, frente a *Salmonella tiphy* demostró ser **inactivo** (CMI: 16mg/ml). Para las demás cepas de estudio con el extracto etanólico de frutos no se evidenciaron CMI alguno dentro de las concentraciones dadas en el presente estudio.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, Extracto etanólico, *Capsicum frutescens*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphy*.

"IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITY ETHANOL EXTRACT OF LEAF AND FRUIT OF *Capsicum frutescens* (Aji Charapita), BY DISK DIFFUSION AND MACRODILUTION VS. 4 BACTERIAL STRAINS"

Rivera Vásquez, S.E¹.; Montenegro Carranza, J.M¹

1: Degree in Pharmacy and Biochemistry; FFBQ-UNAP-IQUITOS

ABSTRACT

The aim of study was to determine in vitro antibacterial activity of ethanol extract of leaf and fruit of *Capsicum frutescens* "Aji Charapita" by disk diffusion and Macrodilution. Strains used were, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella tiphy* ATCC 27347. It was used as a positive control antibiotic Gentamicin as negative control and ethanol / water. The phytochemical screening of the ethanol extract of *Capsicum frutescens* (Aji Charapita) showed the presence of carotenes and alkaloids most abundant in both plant parts (leaves and fruits), plus abundant saponins, phenols and tannins only on the leaves in comparison to the fruit, which showed little presence of these.

Regarding the antibacterial activity of ethanol extract of leaf, against *Escherichia coli*, a concentration of 12mg presented an inhibition of 13 mm, while the concentration of 6mg presented a halo 10mm. Against *Staphylococcus aureus*, the result was negative. Against *Salmonella Tiphy*, a concentration of 12mg present 7mm and 6mm 6mg halo respectively.

For the case of fruit extract of *Capsicum frutescens*, at concentrations of 12 and 6 mg, *Pseudomonas aeruginosa* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* showed no inhibition halos; against *Salmonella tiphy*, a concentration of 12mg and 6mg presented 6mm did not show halo of inhibition. In the macrodilution method, the ethanolic extract of *Capsicum frutescens* leaves little shown to be active against *Escherichia coli* (MIC: 8mg / ml); for *Staphylococcus aureus*, proved inactive (CMI: 32mg / ml), like *Salmonella tiphy* (CMI: 16mg / ml). For fruit extract, against *Salmonella typhi* proved inactive (CMI: 16mg / ml). For other strains study with ethanolic extract of fruits they showed no CMI in any given concentration in this study.

Keywords: Antibacterial activity, ethanolic extract, *Capsicum frutescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphy*.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCION

El Perú, posee una gran biodiversidad en cuanto a flora, siendo alrededor de 300 mil especies vegetales consideradas de uso medicinal y muchas de ellas han sido empleadas por nuestros ancestros en el tratamiento de enfermedades producidas por microorganismos¹, pero, en cuanto a estudios farmacológicos y principios activos de las plantas medicinales en la Amazonía Peruana son escasos, por lo que existe poca información científica que determine la sensibilidad o resistencia a muchos microorganismos².

En nuestro País a nivel Nacional, hay pocos estudios o artículos científicos sobre nuestras propias plantas medicinales, es por tal motivo, se ve reflejada la preocupación y en la actualidad más énfasis en estudios de plantas medicinales, ya que estos; deben ser tomados en cuenta para futuros proyectos científicos que abarcarían a descubrimientos mucho más interesantes para nuestra comunidad científica peruana, lo cual sería un gran aporte al mundo. Existen alternativas en estas plantas maravillosas, tal es el caso del *capsicum frutescens* “**Ají Charapita**” teniendo en cuenta las evidencias de la familia de esta especie vegetal expuestas en la literatura, de su posible rol antimicrobiano frente a patógenos importantes que producen enfermedades infecciosas.

La resistencia antibacteriana es un problema de salud en creciente y de gran complejidad, que afecta a todos los individuos y poblaciones alrededor del mundo. Este problema también afecta al Perú siendo una de las causas relevantes el mal uso y abuso de antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales, comunidades, con los animales, en la agricultura que adicionan a las fuerzas del ambiente, a seleccionar y mantener cepas de bacterias resistentes.^{3, 4}

A nivel mundial el 70 % de bacterias responsables de las infecciones nosocomiales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas. En el 2005 se reportó en los Estados Unidos a nivel de centros hospitalarios, una incidencia de resistencia bacteriana del 3% por parte de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs), como *Escherichia coli* y en comparación con Latinoamérica de un 9% - 62%.⁵

En Europa las bacterias Meticilino-resistentes como *Staphylococcus aureus* mostraron un 42% de resistencia en pacientes de UCI y 27% en pacientes de otras áreas de hospitalización, en comparación con los reportes de resistencia bacteriana en Latinoamérica del 35% y Estados Unidos 25%-51%.⁵

P. aeruginosa produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como β -lactamasas de amplio espectro, metalo- β -lactamasas (MBL), alteración de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación de ADN-girasas y bombas de expulsión activa.^{6,38}

En las últimas décadas, mundialmente se ha observado la aparición de cepas de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenémicos de uso común en el tratamiento de infecciones asociadas con este patógeno⁷.

La Fiebre Tifoidea, la más grave de las Salmonelosis, continúa siendo un problema mayor en muchos países en vías de desarrollo. Si bien resulta difícil conocer su real impacto, la OMS estima que, anualmente, se registran diecisiete millones de casos anuales, con unas seiscientas mil muertes⁸.

Las plantas medicinales en la Región Loreto cumplen un papel muy importante en la vida y la salud de las personas, debido a que los pobladores focalizan y resuelven sus problemas de salud individual y colectiva, empleándolas como alternativas para el tratamiento de muchas enfermedades, en especial, la de origen microbiano.⁹

La resistencia de las cepas mencionadas anteriormente frente a los antibacterianos, ha dado paso a la investigación de alternativas basadas en productos naturales, por tal motivo los resultados que obtendremos nos permitirán contar con información científica validada, el cual nos brindará una opción fundamentada para utilizarse como una verdadera alternativa terapéutica, para progresivamente crear nuevos fármacos, buscando un menor costo y una mayor eficacia para el tratamiento de infecciones producidas por las bacterias mencionadas en el estudio.

En la comunidad de Nina Rumi (Iquitos, Perú) se viene utilizando *Capsicum frutescens* (**Ají Charapita**), como una alternativa medicinal empírica, sin embargo no han sido realizados estudios para comprobar su eficacia terapéutica y menos aún su actividad antibacteriana, por lo que significa una excelente oportunidad para su investigación.

1.3 OBJETIVOS:

1.3.1 GENERAL:

Determinar la actividad antibacteriana *In Vitro* del extracto etanólico de hoja y fruto de *Capsicum frutescens* (Ají Charapita), mediante los métodos de difusión en disco y macrodilución frente a 4 cepas bacterianas.

1.3.2 ESPECÍFICO:

- ✓ Obtener el extracto etanólico de hoja y fruto de *Capsicum frutescens* (Ají charapita).
- ✓ Realizar el análisis fitoquímico de *Capsicum frutescens* (Ají charapita).
- ✓ Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico obtenido de hoja y fruto de *Capsicum frutescens* (Ají charapita), frente a patógenos bacterianos (*Pseudomona Aureginosa*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*) mediante el método de difusión en disco.
- ✓ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de hoja y fruto de *Capsicum frutescens* (Ají charapita) frente a patógenos bacterianos (*Pseudomona Aureginosa*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*) mediante el método de macrodilución.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO:

2.1.1 ANTECEDENTES:

El uso de los pimientos por parte de los primitivos de las Américas fue registrado en algunos relatos de viajes de cronistas que participaron en los primeros viajes al nuevo Mundo; así Pickersgill (1969) cita autores relacionados a expediciones en América como Oviedo y Valdés en 1547, Acosta en 1590, Garcilazo de la Vega en 1609, Cobo en 1953, entre otros.¹⁰

De acuerdo con estos relatos las pimientos americanas eran usadas en alimentación tanto en forma de frutos como de hojas, en ritos religiosos, medicina y como instrumento monetario de los Incas.¹¹

De las 1516 especies (distribuidas en 145 familias y 594 géneros), un 50% tienen alguna investigación y la mayoría han sido examinada por su utilidad como maderas, para la confección de pulpa de papel o por sus aplicaciones en la alimentación humana o en la industria, el hombre amazónico a través de toda su historia, ha logrado identificar y utilizar una buena cantidad de especies vegetales, llegando a conocer y usar unas dos a tres mil plantas medicinales. Pocos estudios químicos y farmacológicos sobre las propiedades medicinales y tóxicas de estas plantas han sido realizados.¹²

La importancia de los conocimientos etnobotánicos y de la medicina tradicional se confirma cuando se ha encontrado que de los 119 fármacos derivados de plantas en uso actual, hay 74% que fueron descubiertos como resultado de estudios químicos para el aislamiento de las sustancias activas fueron motivadas el empleo de las plantas de origen en la medicina tradicional.¹³

Para Capsicum, todas las especies silvestres tienen frutos pequeños, verdes, pungentes, que pueden ser ovales, esféricos, cónicos u oblongos, crecen en forma erecta o decidua a madurez. Las semillas son prevalentemente diseminadas por los pájaros atraídos por el color brillante de los frutos.¹⁴

ESTUDIOS REALIZADOS: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Dorantes L., Aparicio G., (2010): El objetivo de este estudio fue evaluar por pruebas microbiológicas, morfológicas y microbiología predictiva la actividad antimicrobiana de compuestos presentes en el extracto de *C. annuum*.. Al término de las cinéticas se determinó una actividad correspondiente entre las formas de sal sódica y de ácido: El cafeato de sodio > cumarato de sodio > ferulato de sodio > cinamato de sodio. El cafeato de sodio, inclusive, logró eliminar las esporas de *Bacillus cereus*. Estos resultados se corroboraron por medio de micrografías electrónicas, las cuales mostraron en la actividad bactericida con un daño en la pared celular, mientras que las concentraciones que tenían una actividad bacteriostática mostraron un alargamiento notorio de las células, pero sin pérdida de viabilidad.¹⁵

Llenque D., Otiniano M. (2013): Se estudió el efecto de *Capsicum annuum* var. *Longum* “ají escabeche” sobre la supervivencia in vitro de la bacteria *Staphylococcus aureus* en crema huancaína. Se implementaron 4 sistemas de ensayo: Sistema 1: 300g de crema de ensayo (Control); sistema 2: 240g de crema de ensayo con 60g de crema de ají (20%); sistema 3: 225g de crema de ensayo con 75g de crema de ají (25%) y sistema 4: 210g de crema de ensayo con 90g de crema de ají (30%). Finalmente, cada frasco se inoculó con 5 mL de suspensión bacteriana de *S. aureus*, equivalente al tubo N ° 1 del nefelómetro de Mac Farland (3×10^8 UFC/mL). A las 0, 12, 24 y 36 horas de incubación en condiciones de refrigeración (4°C) se extrajeron 10g de crema homogeneizada de cada sistema de ensayo y se diluyó con 90 mL de diluyente citratado. De estos se hicieron diluciones al décimo y fueron sembradas en placas con agar nutritivo y se incubó a 37° C por 24 h. Se apreció una disminución del crecimiento de *S. aureus* frente a las concentraciones de 20%, 25% y 30 % de “ají escabeche” pero no hubo diferencias significativas entre ellas.¹⁶

Cerón-Carrillo T., Munguía-Pérez R., Santiesteban-López A.(2014): Se determinó el contenido de fenólicos totales y compuestos capsaicinoides de los extractos de tres especies de chile: Poblano, Habanero y Serrano (*Capsicum annum varannuum*, *Capsicumchinense* y *Capsicumannuum L. Acuminatum*, respectivamente) en tres estados de maduración y su relación con la actividad antibacteriana en *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* y *Penicillium spp.* El contenido de compuestos fenólicos y capsaicinoides fue determinado por medio de espectrofotometría UV-Vis usando ácido gálico y vainillina como estándares respectivamente. El extracto de chile Habanero presentó la mayor concentración de capsaicinoides y compuestos fenólicos totales. En los extractos de chiles Poblano y Habanero se observó una relación inversa entre el contenido de capsaicinoides y los compuestos fenólicos totales. Se observó una relación directa entre el estado de madurez de los frutos estudiados y su efecto antibacteriano.¹⁷

Agustín M., González R., García I., Totosaus A.: (2009): Se ha reportado que el chile ancho tiene una actividad antibacteriana debido a la presencia de capsaicinoides, así como ácido ascórbico y polifenol espolares, los cuales promueven lisis celular. Tanto los extractos de chile ancho como de romero presentaron actividad antimicrobiana, este último, debido probablemente a la presencia de ácido cafèico, ácido rosmerico, carnosol, ácido carnosólico y flavonoides, que pueden variar las condiciones fisicoquímicas en el medio de cultivo, lo cual se vio reflejado en la actividad antimicrobiana. Los resultados del estudio muestran que los extractos de romero y chile ancho pueden tener un papel importante en la preservación de los alimentos y la protección contra agentes patógenos, debido a su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano.¹⁸

Cantor F., Velásquez M., (2012): El objetivo de este estudio fue determinar los efectos del ácido acético (AA), cítrico (AC), e hipoclorito de calcio (CL), en factores microbiológicos y físicos en lechuga y chile dulce. Se empleó un diseño experimental completamente al azar evaluando dos concentraciones de cloro (50 y 100 mg/L) y ácidos orgánicos (1000 mg/L) de forma individual y mezclados, en chile dulce y lechuga inoculados con *E. Coli* (ATCC 25922). La recuperación de *E. coli* en chile dulce no fue alcanzada, por lo cual la

evaluación de antimicrobianos se realizó únicamente en lechuga (4.02 ± 0.01 Log UFC/cm).¹⁹

Colivet J., Belloso G., Hurtado E. (2006): Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos, etéreos y acuosos de ají dulce (*Capsicum chinense*), sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp* en agar nutritivo. Para obtener los extractos, los frutos de ají dulce enteros y con corte longitudinal, fueron secados en una estufa convencional a temperaturas de 70 y 100°C. Los extractos fueron obtenidos por el método de reflujo. Para la determinación de la actividad antimicrobiana se empleó el método de difusión en agar en discos de papel de filtro. Los extractos que presentaron halos de inhibición fueron los etanólicos. Se analizó su variabilidad a través de un ANOVA. Los resultados indicaron que el de mayor poder antimicrobiano fueron los extractos obtenidos a partir de ají deshidratado entero a una temperatura de 100°C, el cual fue utilizado a concentraciones de 100% y diluido a 25%, 50% y 75%; se encontró que la concentración del 25% fue efectiva para ambos microorganismos. Los ensayos fueron realizados en los laboratorios: Nutrición y Forrajes, Tecnología de los Alimentos y Microbiología de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Oriente, Monagas, Venezuela.²⁰

Ramírez A.; Aparicio G. ;(2009): El objetivo de este estudio consistió en preparar soluciones por separado en un volumen de 50 ml de las sales de los ácidos Caféico, Ferúlico, p- Cmárico y Cinámico a concentraciones de 1,0.8, 0.6, 0.4, y 0.2% A su vez a cada matraz se le adicionó caldo soya tripticaseína. Posteriormente cada matraz se inoculó con 10µl de un cultivo fresco de *E. coli* O157:H7 ajustado a la turbidez del tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland, incubando a 37°C. Posteriormente se tomaron alícuotas por triplicado a las 0, 4, 8, 12, 24, 36 y 48h; las cuales se emplearon para realizar la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) en agar soya tripticaseína (Miles, 1938). A partir del número de UFC se construyeron las curvas de sobrevivencia. Se concluyó que los componentes de los derivados del ácido cinámico que están presentes en *Capsicum annum*, se pueden considerar como una barrera para evitar el desarrollo de bacterias patógenas como *E. coli* O157:H7 en alimentos.²¹

Pino A.:(2007): El estudio tuvo por objetivo determinar la actividad antibacteriana de *Capsicum annuum var. longum* (Ají Chileno), en distintas etapas de desarrollo sobre siete bacterias con capacidad patógena para el hombre: *Escherichia coli*, dos cepas de *Proteus vulgaris* y una cepa de *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Listeria monocytogenes*. Resultados del análisis en fresco y conservado a 4° C por 48 h de los 20 extractos obtenidos, manifestaron que no existían diferencias estadísticamente significativas en la capacidad antibacteriana de los extractos en ninguna de las dos condiciones que se evaluaron. Además, los resultados arrojaron que el número de cepas inhibidas va disminuyendo a medida que el grado de maduración es mayor. Así, las cepas más susceptibles a los grados de madurez menores fueron las cepas 1 y 2 de *P. aeruginosa*, las más susceptibles a la mayoría de las diferentes etapas de desarrollo fueron las cepas 1,2 y 3 de *S.aureus* y *Enterococcus faecalis* (cepas 1, 2, 3) demostró ser más susceptible a las etapas de desarrollo del centro. Las cepas que no mostraron susceptibilidad alguna, fueron *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* y *A. baumannii*.²²

Escobar A.:(2010): En esta investigación se evaluó la actividad antimicrobiana de diversos extractos de plantas comestibles en donde se evaluó a la especie Chile poblano (*Capsicum Sp*) y mezclas de los mismos sobre el crecimiento y la formación de biopelícula por *E. coli* O157:H7; se colocaron 20 g de material vegetal seco en un vaso de licuadora a la que se agregaron 100 ml del solvente (etanol al 96% y metanol) y se trituró durante 2 min. Los extractos obtenidos fueron macerados durante 48 h a temperatura ambiente (Cho *et al.*, 2008). Posteriormente, se filtró utilizando papel filtro Whatman No. 1. El filtrado se colocó en platos de vidrios y el solvente se evaporó a temperatura ambiente. Una vez seco, el extracto se resuspendió en los solventes probados (agua, etanol al 96% y metanol) El extracto se colocó en viales estériles de color ámbar, y se mantuvo a 4° C hasta su uso, durante un máximo de 6 meses, Se utilizó el método de difusión en pozo en agar (García *et al.*, 2005). Por lo que se sembró por extensión con un asa de Driglalsky 100 µl de las cepas activadas en placas de agar Mueller Hinton. En conclusion no se encontró actividad antibacteriana para chile poblano (**Capsicum sp**), pero sí de otras especies.²³

Careaga M, Fernández E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo M. :(2003): El efecto inhibitorio del extracto de *Capsicum annum* pimiento tipo fue evaluada contra *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*, inoculados en carne carne picada mezclada con las diferentes concentraciones del extracto, y se almacena en 7 grados C durante 7 días. El efecto combinado de C. annum extracto y cloruro de sodio sobre el crecimiento bacteriano se evaluó. La concentración mínima inhibitoria de los extractos para evitar el crecimiento de *S. typhimurium* en carne picada fue de 1,5 ml/100 g de carne de vacuno, la adición de 1 %, 2 %, 3% y 4% w/w de cloruro de sodio no tienen un efecto inhibitorio adicional en relación con la presencia de Salmonella. En el caso de *P. aeruginosa*, una concentración de 0,3 ml del extracto/100 g de carne mostró un efecto bacteriostático, mientras que una concentración de 3 ml/100 g de carne mostró un efecto bactericida. Cuando el 1% w/w de cloruro de sodio se agrega a la carne junto con el extracto, la concentración necesaria para matar *P. aeruginosa* se redujo.²⁴

Golshani F., Sahraei S., Hassanshahian M., YSepehri Z. (2014): Las plantas medicinales juegan un importante papel en todos los pueblos ya que gracias a ello consituyen un sistema tradicional de medicina y obtiene una rica fuente de productos naturales. La mayoría de los cuales se han utilizado para el bienestar humano especialmente para curar enfermedades causadas por microorganismos patógenos sin efectos secundarios.El efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de *Lepidium sativum* L (LS) y *Capsicum annum* L (CL) de bacterias patógenas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella shinga*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus aureus* se determinaron utilizando el método de microdilución .²⁵

Ildiz F., Oguz E. :(2005): *Helicobacter pylori* ha convertido cada vez más resistentes a claritromicina y metronidazol en todo el mundo. El objetivo de este estudio fue demostrar la actividad in vitro de la capsaicina de metronidazol sensibles y resistentes a H. pylori. Dieciséis clínica aislamientos (incluyendo cepas resistentes a metronidazol ocho) y referencias cepa (NCTC 11637) de H. pylori fueron utilizados en el estudio. Algunas concentraciones de la capsaicina solución fueron

probadas. La capsaicina mostró efecto bactericida incluso a su más baja concentración (25 µg/ml). Este efecto se ve en una concentración de 50 µg/ml en 4 h de incubación. Pimiento picante, capsaicina, tiene actividad in vitro frente a *H. pylori* y puede ser una alternativa útil estrategia de tratamiento. Esto puede proporcionar un nuevo enfoque de tratamiento en la erradicación de metronidazol de cepas resistentes. El profundo efecto de la capsaicina sobre *H. pylori* sugiere que pequeñas dosis de capsaicina puede ayudar en el tratamiento de estómago y duodeno ulcera.²⁶

OTROS ESTUDIOS:

ESTUDIO ANTIFUNGICO:

Ezziyani M. 2004: *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*) En los ensayos de control biológico en pimiento ejercido por *Trichoderma harzianum (T.h.)* sobre *Phytophthora capsici (P.c.)*, agente causal de la podredumbre de pimiento, se ha optimizado la producción de la biomasa del antagonista T.h. al comparar su desarrollo en tres diferentes medios y soportes de cultivo. El método de producción de la biomasa de T.h. en Agua-Avena-Vermiculita resultó ser el más rentable por su rápido y abundante crecimiento, viabilidad y bajo coste para utilizarlo como inóculo del suelo, al compararlo con los crecidos en Czapek líquido y PDB. El test del antagonismo in vitro de P.c. frente a T.h. en medio PDA enriquecido con Laminarina-glucosa (3:1, v/v), mostró que T. h. aumenta los niveles de enzimas hidrolíticas β -1,3- glucanasa (lisis enzimática), ejerce una mayor competencia por espacio y nutrientes e interacciona directamente con el patógeno (micoparasitismo), todo lo cual juega un papel importante en la reducción y destrucción de la colonia del patógeno.²⁷

Moreno L., Salcedo M., Cárdenas A., Hernández P. 2012: El chile piquín, además de los usos culinarios se ha reportado su actividad en problemas cardiovasculares, enfermedades crónicas degenerativas, estimulante, digestiva y colerético, así como su capacidad de reducir los riesgos de contraer cáncer y como bactericida. Ante esta diversidad de aplicaciones se plantea la evaluación de la actividad biológica de extractos etanólico de frutos de chile piquín (*Capsicum annum L.*

varaviculare) y de capsaicina, sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*, mediante dos técnicas: 1) técnica del pozo en agar-papa-dextrosa (PDA) con la adición 20µL de cada uno de los tratamientos en concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm. . La actividad de los tratamientos se reflejó por la formación de un halo de inhibición y por el crecimiento radial del hongo, en cada técnica respectivamente. Los resultados obtenidos mostraron que tanto la capsaicina como los extractos de chile piquín inhibieron significativamente el crecimiento radial de *Aspergillus flavus*.²⁸

2.1.2 *Capsicum Frutescens* (AJÍ CHARAPITA)

2.1.2.1 La clasificación taxonómica:

TABLA 01. Clasificación de la Muestra Vegetal en estudio.

REINO	<i>Plantae</i>
DIVISION	<i>Magnoliophyta</i>
CLASE	<i>Magnoliopsida</i>
ORDEN	<i>Solanales</i>
FAMILIA	<i>Solanaceae</i>
GENERO	<i>Capsicum L., 1753</i>
ESPECIE	<i>frutescens L., 1753</i> ³⁰

2.1.2.2 Sinonimia:

Es conocida popularmente como sweetpepper, chile tabasco, pimiento, pimiento morrón, paprika, pimienta de Cayena, quaunchilli', etc.²⁹

2.1.3 Descripción Botánica:

El ají charapa es muy pequeño con una forma esférica que mide un 1/4 máximo en diámetro. Las vainas son muy finas y maduras, tienen un color rojo y amarillo. Ver figura No 01

El ají o pimiento es una planta perenne, pero se cultiva comercialmente como si fuera anual, ya que en esta última forma es mucho más rentable.

El ají o pimiento se caracteriza por poseer una raíz primaria corta pero muy ramificada. Las raíces secundarias pueden extenderse hasta 1.20 cm de diámetro y la mayoría de las raíces se localizan entre 5 y 40 cm de profundidad.²⁹

Tallo y hojas:

Aunque se considera al ají como una planta herbácea, tiene la particularidad de que su parte inferior es leñosa. Puede tener forma cilíndrica o prismática angular, glabro, erecto y con altura según la variedad. (Mayormente de 0.30 – 1.2 m).

Las hojas del ají son simples, alternas, con limbo oval – lanceolado de bordes lisos, color verde oscuro y peciolos comprimidos.²⁹

Flores:

Están localizadas en los puntos donde se ramifica el tallo, encontrándose en número de 1 – 5 por cada ramificación. Generalmente en las variedades de fruto grane se forma una sola flor por ramificación y más de una en las de frutos pequeños.²⁹

Las flores son hermafroditas, con 6 sépalos que forman un cáliz persistente, 6 pétalos y 6 estambres. Poseen ovario supero, el cual puede ser bi o trilocular y el estigma en la mayoría de los casos está a nivel de las anteras, lo que facilita la autopolinización. En la mayoría de las variedades de fruto pequeño el porcentaje de autofecundación es alto, superando generalmente a las de fruto grande.²⁹

.Fruto

El fruto consiste en una baya con 2 – 4 lóculos, los cuales forman cavidades inferiores con divisiones visibles en el caso de ajíes alargados, pero no en los redondeados. La constitución anatómica del fruto está representada básicamente por el pericarpio y la semilla. El pericarpio posee un mesocarpio con un espesor de aproximadamente 1 mm., con textura algo seca en frutos dulces. El desarrollo del pericarpio es mejor cuando la mayor parte de los óvulos han sido fecundados, lo que contribuye a una mejor forma de los frutos.³⁰

Existe una diversidad de formas y tamaños en los frutos, pero generalmente se agrupan en redondeados y alargados, con peso variando desde escasos gramos hasta 100 gramos o más. Las semillas son generalmente deprimidas, reniformes, lisas y de coloración amarillenta o blanco – amarillenta. El porcentaje de germinación generalmente es alto (95 – 98%) y se puede mantener por 4 – 5 años siempre y cuando se mantengan bajo buenas condiciones de conservación.³¹

2.1.4 Origen

Las especies silvestres del género *Capsicum* se distribuyen a través de la cadena montañosa de los Andes suramericanos y en las costas montañosas y proximidades bajas de las regiones del sur, sudeste y nordeste brasileño. La distribución es continua desde Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Brasil, Paraguay y Norte de Argentina.³²

2.1.5 Composición Química

Principios activos: contiene compuestos picantes de naturaleza fenólica como capsaicina (0,5-1%), dihidrocapsaicina, norhidrocapsaicina, homocapsaicina. Carotenoides (capsantina, capsorrubina) Flavonoides (apiósido, luteína), Hierro, Cobre, Magnesio, vitaminas (A, B1, B2, C, E). La capsaicina es una sustancia alcalina y aceitosa, soluble en agua, que solamente está presente en la placenta de los frutos, químicamente es 8-metil-N-vainillil-6-enamida. La capsaicina y dihidro capsaicina forman 80 % para 90 % de los capsaicinoides en ajíes, con lo cual son lo más pungentes de los capsaicinoides.³²

2.1.6 Farmacología

Sus usos medicinales: está en desarrollo como remedio para artritis basado en un receptor iónico proteico que se liga a la capsaicina para sobrellevar dolores crónicos; el consumo de ají picante incrementa la circulación periférica y disminuye la presión arterial; los ajíes son ricos en vitaminas A y C, bioflavonoides, todos necesarios para un óptimo crecimiento celular, y contribuyen a la elasticidad de las paredes de los vasos sanguíneos; los ajíes también son excelentes secuestradores de radicales libres y proveen una mejora momentánea del sistema metabólico; y la transpiración que provoca el consumo de picantes induce pérdida de agua que temporalmente reduce el volumen total de sangre.³³

2.2. ENSAYOS ANTIBACTERIANOS

Esta actividad consiste en la determinación de la capacidad antibacteriana de las muestras a estudiar, y su determinación ha sido una de las más representativas a nivel científico y tecnológico, muchos extractos de plantas de las más diversas familias muestran este tipo de actividad, las cuales se han atribuido a gran cantidad de sustancias, entre ellas, alcaloides, aceites, taninos, saponinas y flavonoides.³⁴

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica.³⁴ A su vez, la OMS ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud; los países tercermundistas poseen los primeros lugares en estos programas de estudio para garantizar la obtención de preparados accesibles a toda la población. Países como Cuba, han establecido un plan para mejorar la salud en la población. Esto abarca la erradicación y prevención de gran cantidad de enfermedades mediante el uso de medicamentos alternativos obtenidos de plantas, los cuales son de bajo costo con alta disponibilidad.³⁴

2.2.1 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN:

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 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como macrodilución en caldo.³⁵

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 CMI (Concentración Mínima Inhibitoria).³⁵

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 MH (Mueller Hinton) suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano.³⁵

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.³⁵

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. 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.³⁵

2.2.2 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 (Mc Farland 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. 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 2003.³⁴

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 antimicrobiana.³⁴

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.³⁴

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 menor. 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.³⁴

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.³⁴

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.³⁴

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 control.³⁴

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.³⁴

2.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS EN ESTUDIO:

2.3.1 *Pseudomonas Aeruginosa*

2.3.1.1 Taxonomía (TABLA N° 02)

REINO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Proteobacteria</i>
CLASE	<i>Gammaproteobacteria</i>
ORDEN	<i>Pseudomonadales</i>
FAMILIA	<i>Pseudomonadaceae</i>
GENERO	<i>Pseudomonas</i>
ESPECIE	<i>P. aureginosa</i> MIGULA , 1894

2.3.1.2 Características:

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia Pseudomona daceae y es un bacilo gran negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina.³⁶

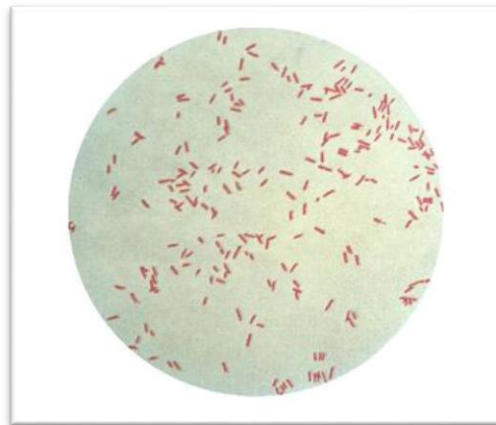


FIGURA N° 02 Característica Microscópica de *P. aureginosa*.



Foto n°01 Características Macroscópicas de *P. aureginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo aerobio, considerado un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno. Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C.³⁸

Estas características le permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias. Lo anterior favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmucomprometidos.^{37,38}

Pseudomonas aeruginosa puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por ***P. aeruginosa***, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario.³⁶

P. aeruginosa produce diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, como b-lactamasas de amplio espectro, metalo- β -lactamasas (MBL), alteración de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), mutación de porinas, modificación enzimática plasmídica, mutación de ADN-girasas y bombas de expulsión activa.^{4,5} Los carbapenémicos (imipenem y meropenem) son antibióticos de amplio espectro empleados para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por ***Pseudomonas aureginosa***. La resistencia específica a carbapenémicos es atribuida a la falta de permeabilidad en la porina (OprD), a un incremento en la expresión de las bombas de expulsión activa (MexAB-OprD) y a la producción de metaloenzimas.³⁹

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo común en el medio ambiente y puede encontrarse en las heces, el suelo, el agua y las aguas residuales. Puede proliferar en ambientes acuáticos, así como en la superficie de materias orgánicas propicias en contacto con el agua.

2.3.2. *Escherichia coli*

2.3.2.1 Taxonomía: (TABLA N°03)

REINO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Proteobacteria</i>
CLASE	<i>Gammaproteobacteria</i>
ORDEN	<i>Enterobacteriales</i>
FAMILIA	<i>Enterobacteriaceae</i>
GENERO	<i>Escherichia</i>
ESPECIE	<i>E. coli</i> ((<i>E. freundii</i>)) MIGULA , 1895

2.3.2.2 Características:

Escherichia coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole.⁴² Forma parte de la familia Enterobacteriaceae⁴⁰. Ella está integrada por bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos, capaces de crecer en agar Mac Conkey y en medios simples con o sin agregado de NaCl, 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 DNA.⁴⁰

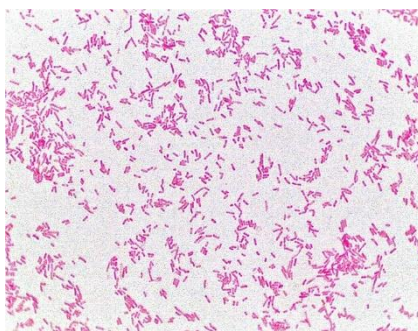


Figura n°03 Características Microscópicas de *E.coli*.

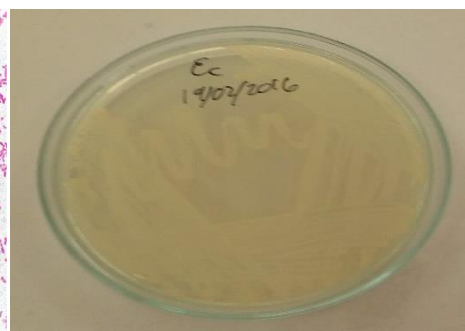


Foto n°02 Características Macroscópicas de *E.coli*

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 entero bacterias 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 Gram negativos identificados.

Escherichia coli es la especie tipo del género ***Escherichia*** 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. Son inhibidos por KCN e incapaces de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato. Son H₂S, ureasa y fenilalanina negativos, pero en general son indol positivos y descarboxila la lisina. Se clasifican en más de 170 serogrupos O según las características antigénicas de su LPS, y en serotipos por la combinación de antígenos O y H flagelares. Otros antígenos presentes en distintas cepas (capsulares, fimbriales y otros) han sido empleados para su clasificación o identificación.⁴¹

Escherichia coli coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio. 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".⁴¹

2.3.3 *Staphylococcus aureus*

2.3.3.1 Taxonomía. (TABLA N° 04)

REINO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Firmicutes</i>
CLASE	<i>Bacilli</i>
ORDEN	<i>Bacillales</i>
FAMILIA	<i>Staphylococcaceae</i>
GENERO	<i>Staphylococcus</i>
ESPECIE	<i>S.aureus</i> Rosenbach 1884

1.1.1.1 Características:

El nombre de estafilococos fue designado por Sir Alexander Ogston después de utilizar la expresión griega staphyle (racimo de uvas) para describir las características de crecimiento en grupos semejantes a uvas. Los estafilococos son cocos Gram positivos que miden cerca de 1 μm de diámetro, no móviles, aerobios facultativos y fermentadores de glucosa.⁴²

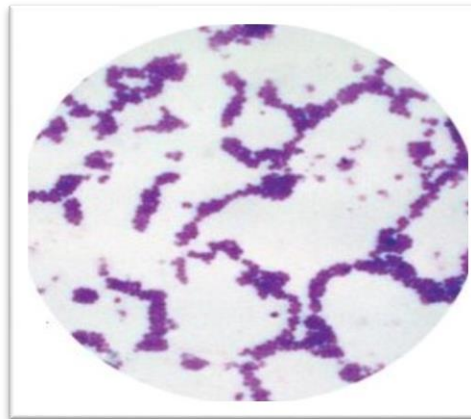


Figura n°04 Características Microscópicas de S. aureus

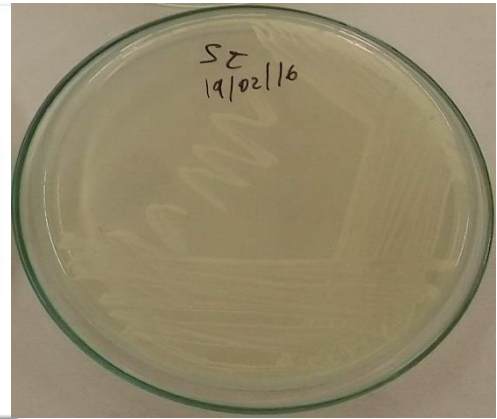


Foto n°03 Características Macroscópicas de S. aureus

El género *Staphylococcus* contiene más de 30 especies diferentes, y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas; no tienen otros hábitats importantes, excepto cuando están involucradas en infecciones.

El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, hallándose en los portadores sanos, especialmente en las fosas nasales, así como en los pacientes infectados. La colonización puede asentar sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda. *S. aureus* posee una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso y, por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide polisacárida, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas como catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas, β -lactamasas, o la secreción de diversas toxinas como la exotoxina epidermolítica, enterotoxinas o la toxina del síndrome de shock tóxico), acaba produciendo infección. Además, *S. aureus* interacciona con múltiples receptores del huésped a través de diversos componentes de superficie. Presenta asimismo una elevada capacidad de adherencia a diversos sustratos in vitro, por mecanismos que se activan también sobre diversos materiales inanimados como el polimetacrilato, el teflón o la mayoría de materiales protésicos. Al igual que *S. aureus* sensible a la meticilina, las cepas SARM se introducen en el medio hospitalario a través de pacientes, visitantes o trabajadores sanitarios. El reservorio fundamental lo constituyen los pacientes ingresados que están infectados o colonizados, extendiéndose a otros pacientes principalmente por medio de las manos del personal sanitario (infección cruzada). A medida que progresa un brote epidémico, aumenta el número de portadores nasales de SARM que constituyen, a menudo, la propia fuente de infección. La transmisión a través del entorno inanimado (reservorio ambiental) puede ser digna de mención, especialmente en ciertas áreas, como en las Unidades de Cuidados Intensivos (Pahissa, 1997).⁴³

2.3.4 *Salmonella Typhi*

2.3.4.1 Taxonomía. (TABLA N°05)

REINO	<i>Bacteria</i>
FILO	<i>Proteobacteria</i>
CLASE	<i>Gammaproteobacteria</i>
ORDEN	<i>Enterobacteriales</i>
FAMILIA	<i>Enterobacteriaceae</i>
GENERO	<i>salmonella</i>
SUB ESPECIE	<i>S. typhi</i> (ex Kauffmann & Edwards 1952) <i>Le Minor & Popoff 1987</i>

2.3.4.2 Características:

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, integrada por bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positiva, oxidasa negativo y suelen ser móviles; representa una excepción *Salmonella Gallinarum*, siempre inmóvil.

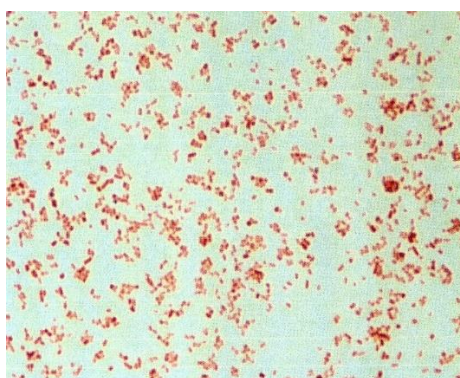


Figura n° 05 Características Microscópicas de *salmonella typhi*.



Foto n°04. Características Macroscópicas de *salmonella typhi*.

Las infecciones gastrointestinales siguen siendo un problema de salud pública mundial y entre los agentes patógenos responsables la *Salmonella* spp. es frecuente. Éste es un bacilo Gram negativo que causa enfermedad diarreica bacteriana, como resultado de ingerir alimentos contaminados, particularmente los de origen animal.⁴⁵

Salmonella presenta diferencias en cuanto a la especificidad del hospedero; mientras algunos serovars no tienen una estricta adaptación a un huésped, siendo capaces de producir enfermedades con diversas características en distintas especies animales y en el hombre, otros serovars sí son específicos, como *S. Gallinarum* para las aves o *S. Typhi* en el caso del hombre.⁴⁵

Las Salmonellosis humanas pueden clasificarse en dos grandes grupos: por un lado, las debidas a serotipos estrictamente humanos, que causan habitualmente síndromes tifoídicos con presencia de bacterias en la sangre, y las debidas a serotipos ubicuos, que provocan diarrea, vómitos y fiebre. La duración y entidad de esta enfermedad es variable, dependiendo del estado general del huésped, pudiendo ocasionalmente causar enfermedades generalizadas.⁴⁴

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y de los animales causada por microorganismos de las dos especies de Salmonella (*S. entérica*, *S. bongori*). Aunque fundamentalmente son bacterias intestinales, Salmonella está muy distribuida en el ambiente y se encuentra con frecuencia en vertidos de granjas, en las aguas residuales humanas y en cualquier material con contaminación fecal. En todos los países existe salmonelosis, pero parece ser más prevalente en áreas de producción animal intensiva, especialmente de aves y cerdos. La enfermedad puede afectar a todas las especies de animales domésticos, siendo más susceptibles los más jóvenes y los animales gestantes. La manifestación clínica más común es la enfermedad entérica, que a menudo se presenta como una diarrea sanguinolenta y muy acuosa acompañada de fiebre, pero se puede observar un amplio espectro de síntomas clínicos, como septicemia aguda, aborto, artritis, necrosis de las extremidades y enfermedad respiratoria. Los síntomas y las lesiones no son patognomónicos. Muchos animales, especialmente las aves y los cerdos, pueden estar infectados pero no mostrar enfermedad clínica. Tales animales pueden ser importantes en la diseminación de la enfermedad entre explotaciones y ser causa de intoxicación alimentaria humana.⁴⁴

2.4 VARIABLES

2.4.1 INDEPENDIENTE

El extracto etanólico obtenido de hojas y fruto de *Capsicum frutescens*.

2.4.2 DEPENDIENTE

Actividad Antibacteriana del extracto etanólico de hojas y fruto de *Capsicum frutescens*.

2.5 INDICADORES

2.5.1 PARA EL METODO DE MACRODILUCION

2.5.1.1 Independiente (X):

Concentración de los extractos:

- Concentración baja: 0.25 mg/ml
- Concentración media: 4 mg/ml
- Concentración alta: 32 mg/ml

2.5.1.2 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)

2.5.2 PARA EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY BAUER)

2.5.2.1 Independiente (X): Concentración del extracto

- Concentración alta : 12 mg
- Concentración baja : 6 mg

2.5.2.2 Dependiente (Y): Grado de sensibilidad

- Sensible (S) : Inhibición al 100%
- Intermedio (I) : Inhibición al 50%
- Resistente (R) : Resistente

2.6 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

2.6.1 Tabla N °06 Método de Macrodilución

Variable		Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Índices	Escala de medición	Tipo de variable
INDEPENDIENTE	Extracto etanólico de hoja y fruto de <i>Capsicum frutescens</i>	Producto que se obtendrá mediante el método de extracción por rotavapor	El solvente en contacto con la especie vegetal arrastrará los metabolitos secundarios solubles por extracción en rotavapor a una temperatura de 70° C durante 3 horas.	Concentración del Extracto etanólico de hoja y fruto de <i>Capsicum frutescens</i>	Concentración baja: 0.25 mg/ml Concentración media: 4.0 mg/ml Concentración alta: 64 mg/ml	Nominal	Cualitativa
DEPENDIENTE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella typhi</i> , causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo	El grado de turbidez que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Salmonella typhi</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	cualitativa

2.6.2 Tabla N°07. Método de Difusión en Disco.

Variable		Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Indices		Escala de medición	Tipo de variables
INDEPENDIENTE	Extracto etanólico de hoja y fruto de <i>Capsicum frutescens</i>	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol por rotavapor	Concentración del Extracto etanólico de hoja y fruto de <i>Capsicum frutescens</i>	La especie vegetal en contacto con etanol como solvente para arrastrar los metabolitos secundarios solubles en ellas y cuya extracción se realizó en rotavapor a una temperatura de 60° C durante 3 horas	Concentración alta: 12 mg Concentración baja: 6 mg		Nominal	Cualitativa
DEPENDIENTE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria <i>P. aeruginosa, E. coli, S. aureus y S.typhi</i> , causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo	Grado de sensibilidad que presentan los medios de cultivos inoculados con <i>Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella typhi</i> , expuesta al extracto	Indican los criterios de interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los organismos a varios agentes antimicrobianos	S	Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada apropiadamente con la dosis de extracto recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que hubiera contraindicaciones.	Nominal	Cualitativa
					R	Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente al cansadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana		
					I	Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de extracto más elevadas, siempre que las dosis usadas puedan ser aumentadas		

2.7 HIPOTESIS

El extracto etanólico de hoja y fruto de *Capsicum frutescens* (**Ají charapita**) presenta actividad antibacteriana in vitro mediante los métodos de difusión en disco y macrodilución frente a 4 cepas bacterianas.

CAPÍTULO III

3.1 METODO DE LA INVESTIGACION

3.1.1. Método de investigación

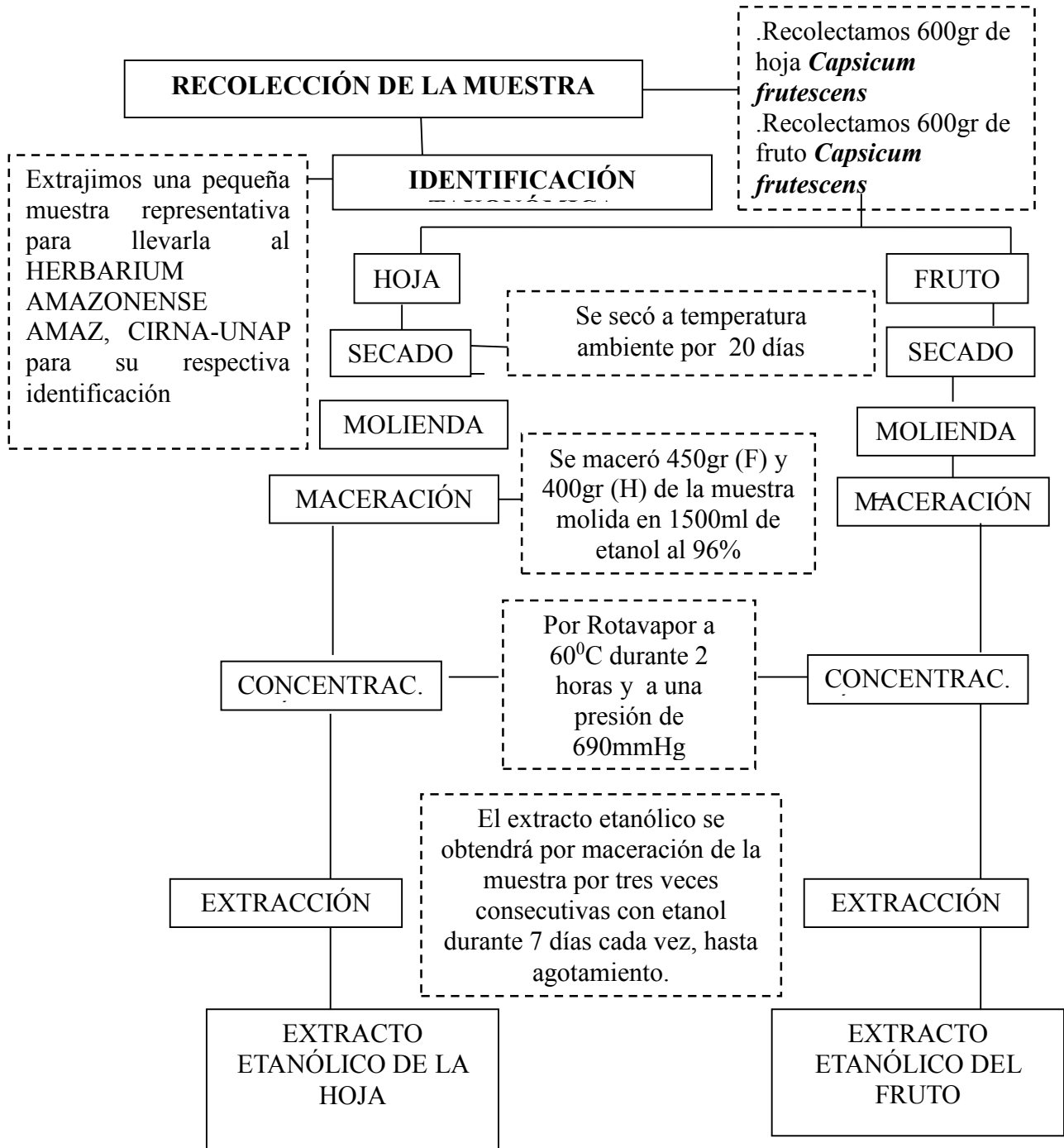
Se empleó el Diseño experimental, prospectivo y Longitudinal.

- **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.
- **Prospectivo:** Porque se desarrolló a través del tiempo.
- **Longitudinal:** Porque permite realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

3.1.2 Flujograma de la Investigación

ESQUEMA N° 1

Obtención del extracto Etanólico de las hojas y fruto *Capsicum frutescens*



3.2 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

3.2.1 Procedimiento Experimental

3.2.1.1 Recolección de la Muestra Vegetal

Las muestras de hoja y fruto *Capsicum frutescens*, fueron recolectadas en la Comunidad de Nina Rumi, San Juan, Iquitos, Perú, A las 12.10 PM a 95cm al sur oeste, con rumbo a 75°, a 9671452 de longitud y a una latitud de 9575572. Esta zona se encuentra a 222MSNM y a 0654512UTM.

3.2.1.2 Identificación de la Muestra Vegetal

La identificación taxonómica de la especie recolectada fue realizada teniendo en cuenta el nombre científico, familia, nombre vulgar. En el HERBARIUM AMAZONENSE AMAZ, CIRNA-UNAP, con la asesoría del botánico responsable, el cual determinó la categoría taxonómica empleando descriptores morfológicos, claves de identificación y bibliografía especializada. Obteniéndose el documento de certificación de la muestra por dicho lugar (HERBARIUM AMAZONENSE). Ver imagen N° 01 En Anexos

3.2.1.3 Procesamiento de la muestra vegetal

La muestra vegetal de hoja y fruto de *Capsicum frutescens*, se procesó siguiendo los procedimientos de lavado, secado, selección y maceración de cada muestra, en el laboratorio de Fitoquímica (FIA), posteriormente los extractos fueron llevados al laboratorio de Microbiología de Alimentos en donde realizamos los ensayos de nuestra investigación, estos laboratorios se encuentran dentro de la Planta Piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias, de la Universidad Nacional De la Amazonia Peruana ubicado en la Av. Freyre N° 610 – Iquitos.

3.2.1.4 Molienda de la Muestra Vegetal

La materia prima fue molida lo suficientemente pequeña, luego fue envasada en recipientes adecuados y conservadas en lugares secos y frescos para su uso.

3.2.1.5 Obtención del Extracto Etanólico

El extracto etanólico se obtuvo por maceración de las muestras (hoja y fruto) de *Capsicum frutescens* con etanol al 96% durante 7 días repitiendo el proceso 3 veces consecutivos hasta agotamiento de la muestra.

Para cada extracción se maceró 450 gr (fruto) y 400 gr (hoja) respectivamente de cada materia vegetal (tanto de hoja y fruto) Véase Tabla 01. De *Capsicum frutescens* en 1000 ml de etanol al 96% para cada muestra vegetal, durante 7 días por agotamiento. La concentración del extracto se realizó eliminando el disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 60°C y a una presión de 690 mmHg. Por espacio de 2 horas aproximadamente cada muestra (hoja y fruto), posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por un lapso de 4 a 6 días, donde que se obtuvo la suficiente cantidad de extractos con el cual se realizó los ensayos, tanto para macrodilución y difusión en discos. (Ver fotos N° 01, 02, 03,04.En Anexos)

3.3 POBLACION Y MUESTRA

3.3.1 VEGETAL

3.3.1.1 Población Vegetal

La población vegetal en estudio estuvo constituida por la especie vegetal de *Capsicum frutescens*.

3.3.1.2 Muestra Vegetal

Hoja y fruto de *Capsicum frutescens*.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

La muestra vegetal (Hojas y fruto) en buen estado, estructuralmente enteras sin presencia de deterioro, exento de plagas y otros contaminantes visibles.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

La muestra vegetal (Hojas y fruto) en mal estado, estructuralmente no enteras, partidas o incompletas, con presencia de deterioro y otros contaminantes visibles.

3.3.2 MICROBIOLÓGICA

3.3.2.1 Población Microbiológica

La población microbiológica lo constituyen las bacterias.

3.3.2.2 Muestra Microbiológica

Las muestras microbiológicas están constituidas por las cepas. (Ver foto 05, Anexos):

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27833
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Salmonella Typhi* ATCC 27347

3.4 PROCEDIMIENTOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

3.4.1 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

3.4.1.1 Recuperación de cultivos conservados

3.4.1.1.1 Congelados

Descongelamos los tubos que contienen bacterias petrificadas a temperatura ambiente por un tiempo de una hora y media, para transferir una pequeña muestra (bacterias en estudio) con el asa bacteriológica, en los tubos que contienen caldo nutritivo como medio apropiado para ejercer la reactivación de las bacterias.

3.4.1.1.2 Reactivación de bacterias

Los tubos que contienen a las bacterias con caldo nutritivo se incubaron a la temperatura de 36 °C a 37 °C por 24 horas, para ejercer una buena condición y reactivación bacteriológica.

3.4.1.1.3 Cultivo en agar

Se procedió a enfriar las placas que antes fueron retiradas de la estufa a 180 °C x 1 hora, retirando el papel de despacho en la cual estaban envueltas, para plaquear con Agar Mueller Hinton, vertiendo 20 ml en cada placas (4 placas en total) luego llevamos a la estufa a 37 °C por 24 horas, para usarlo como control de calidad (No se encontró crecimiento de microorganismos en el Agar Mueller Hinton luego de las 24 horas). Ver fotos N°06, 07,08.

De los tubos (contienen Caldo nutritivo y bacterias incubadas por 24 horas), se extrae la muestra y se siembra por estrías con el asa bacteriológica esterilizada en las 4 placas (para las 4 bacterias) con contenido de agar Mueller Hinton. (Ver foto N° 09) que se incubaron de 35 - 37 °C durante 24 horas. (Ver foto N°10)

3.4.1.2 Preparación del inóculo

De las placas sembradas con cada bacteria de estudio se extrajo con el asa bacteriológica un aproximado de tres a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en agar Mueller Hinton, para transferirlos a los tubos que contienen 3 ml de Cloruro de sodio 0.9 % (NaCl), utilizando el vortex para un mejor homogenizado, hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mac. Farland por comparación visual con dicho patrón, (Ver foto N°11). cabe recalcar que se usó una luz apropiada y se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.

La suspensión del inóculo con turbidez comparable al tubo de la escala de Mac. Farland contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/mL; para el ensayo la suspensión bacteriana se preparó agregando 0,1 mL del tubo de NaCl 0.9 %, (que contiene las bacterias de estudio) en 9.9 ml de Caldo Mueller Hinton obteniéndose un total de 10 ml con una concentración bacteriana de $1,5 \times 10^6$ ufc/mL.

3.4.1.3 Incubación:

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución.³⁴

3.4.1.4 Preparación y control de extractos:

- a) Se pesó 320 mg del extracto etanólico tanto de hoja y fruto respectivamente en viales tipo Sendorff estériles y se añadió 0.5 ml de agua destilada obteniendo una concentración de 640 mg/mL (Solución madre o Stock).*

* Se realizó el mismo procedimiento tanto para el extracto etanólico de hoja y de fruto independientemente. Los extractos que tuvieron dificultad en disolverse fueron mantenidos por algunos minutos en baño maría (temperatura de 40°C) y posteriormente nuevamente colocados en el vórtex.

- b) De la solución madre o Stock se extrajo 0.1 ml y se añadió al tubo N° 01 que contenía 0.9 ml de caldo Mueller Hinton.
- c) Posteriormente del tubo N° 01 se extrajo 0.5 ml que se añadió al Tubo N° 02 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al tubo N°08.
- d) Del tubo N° 08 se extrajo 0.5 ml que fue desechado.
- e) Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana preparada anteriormente para los ensayos.
- f) El volumen final de cada tubo fue de 1 ml.
- g) Para la preparación del control de turbidez se repitieron los pasos a),b),c),d), añadiendo finalmente 0.5 mL de caldo M-H estéril.
- h) Las concentraciones para el ensayo fueron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml, siendo el tubo N° 09 control de crecimiento (0 mg/mL). (Ver fotos N°12, 13,14)

3.4.1.5 Preparación del control positivo:

- El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico gentamicina (160 mg/2ml), del cual se utilizó 0.64 ml y se enrasó hasta 5 ml en un tubo estéril para obtener una solución madre o stock de 10'240 ug/ml.
- De la solución madre se extrajo 0.1 ml y se añadió al tubo N° 01 que contendrá 0.9 mL de caldo Mueller Hinton.
- Del tubo N° 01 se extrajo 0.5 ml que se añadió al Tubo N° 02 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al tubo así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 09
- Del tubo N° 09 se extrajo 0.5 ml que fue desechado
- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana.
- El volumen final de cada tubo fue de 1 ml.
- Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 512 ug/ml a 2 ug/ml, siendo el tubo N° 10 control de crecimiento (0 µg/mL) (ver Figura N°04)

3.4.1.6 Interpretación de datos:

La CMI corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). La CMI se expresa en µg/ml para el control positivo y en mg/ml para los extractos. (Hoja y fruto de *capsicum frutescens*)

3.4.2 MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO

3.4.2.1 Preparación del inóculo

De placas con agar Mueller Hinton sembradas con cada bacteria de estudio, se extrajo nuevamente con el asa bacteriológica un aproximado de tres a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en agar Mueller Hinton, para transferirlos a los tubos (4 tubos en total) que contienen 3 ml de Cloruro de sodio 0.9 % (NaCl), utilizando el vórtex para un mejor homogenizado, hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mc. Farland por comparación visual con dicho patrón. Ver foto N° 11 cabe recalcar nuevamente que se usó una luz apropiada y se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. Este proceso se repitió tanto para los ensayos de Macrodilución y difusión en Disco respectivamente.

La suspensión del inóculo con turbidez comparable al tubo de la escala de Mc. Farland contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/mL.

3.4.2.2 Dilución de extractos:

- Se pesaron 360 mg de cada extracto (Hoja y fruto) en microtubos de tipo Sppendorf estériles, luego fueron diluidos en 0.6 ml de una mezcla Etanol/Agua (1:1) respectivamente para cada extracto, para alcanzar una concentración de 600mg/ml (Concentración 1). Para facilitar su homogenización fueron llevados al vórtex.
- Para obtener la Concentración 2, se procedió a extraer 0.2 ml de la Concentración 1 para posteriormente ser agregado en 0.2 ml de una mezcla de Etanol/Agua (1:1) alcanzando una concentración de 300 mg/ml (Concentración 2) que fueron colocados nuevamente en el vórtex para su homogenización.
- Finalmente se procedió a impregnar a cada disco de papel whattman N°5 con 20uL de cada concentración (1 y 2 respectivamente), para ser llevados a la estufa durante 18 horas con la finalidad de eliminar la presencia del Etanol/agua que fueron utilizadas para la disolución de los

extractos. Obteniendo así discos impregnados de 12 mg (Concentración 1) y 6 mg (Concentración 2). Ver foto N°15

- Cabe precisar que se realizó el mismo procedimiento tanto para el extracto etanólico de hoja y de fruto independientemente.

3.4.2.3 Inoculación de las placas:

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (4 tubos), se procedió a extraer con una micropipeta 100 uL del inóculo (4 tubos correspondiente a las 4 bacterias de estudio), para luego verter en placas con Agar Mueller Hinton, que ya fueron preparadas para el ensayo (3 placas por bacteria) diseminando con la espátula de Drigalsky en todas las direcciones de la superficie de cada placa, asegurando una distribución uniforme del inóculo. (Ver Foto N°16)
- Antes de colocar los discos dejamos secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.
- Cabe precisar que se realizó el mismo procedimiento tanto para el extracto de hoja y fruto independientemente.

3.4.2.4 Aplicación de los discos:

- Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril y la punta de una aguja que se nos ayudó a presionar suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar. (Ver foto N° 17)
- Se colocaron los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. Los discos no fueron removidos una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que difunden rápidamente en la superficie.
- Los discos usados para el estudio fueron: Discos de los Extractos (hoja y fruto) de 12mg y 6 mg, Discos de control negativo: Etanol/agua (1:1) (Ver foto N°18) los cuales fueron llevados a la estufa durante 18 horas eliminando la presencia de estos, Discos de Control positivo: Gentamicina 10 ug.

3.4.2.5 Incubación:

Se incubaron las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, durante 24 horas.

Después del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa, para proseguir con la medición de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

3.4.2.6 Lectura de las placas e interpretación de los resultados:

- Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando la regla vernier.(Ver foto N°19)
- Se debe mantener iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.
- Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.
- El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento bacteriano, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

3.4.2.7 Interpretación de datos para el método de difusión en disco

3.4.2.7.1 Valores críticos para la medida de sensibilidad en disco:

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la distribución de las CMI para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados in vitro y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados.³⁵

3.4.2.7.2 Procedimiento de categorización:

Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios.³⁵ (Tabla)

TABLA 08. CATEGORIZACIÓN

Categorías	Concentración mínima inhibitoria (mg/L)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
S	CIM \leq c	DHI \geq D
R	CIM $>$ C	DHI $<$ d
I	C $<$ CIM \leq C	DHI $<$ D

FUENTE: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN DE LA INS.

Por otra parte la lectura interpretativa del antibiograma, fundada en el conocimiento de los antibiofenotipos de sensibilidad y resistencia permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo de fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma.³⁵

3.5 INSTRUMENTOS Y MATERIALES:

Material de Vidrio

- ❖ Embudos.
- ❖ Erlenmeyers de 250 y 500 ml.
- ❖ Placas petri
- ❖ Matraz 1000 ml.
- ❖ Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- ❖ Probetas de 10, 100, 250 y 1000 ml.
- ❖ Tubos con tapa rosca (75 x 120 mm.)
- ❖ Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- ❖ Vasos de precipitado de 5, 10, 20, 50 y 100 ml.
- ❖ Espátulas Drigalsky.

Material de Metal

- ❖ Asa de Kolle para siembra bacteriológica.
- ❖ Cuchillo mediano.
- ❖ Escobillas lava tubos.
- ❖ Regla vernier
- ❖ Gradilla metálica.
- ❖ Pinza estéril

Otros Materiales

- ❖ Algodón COPPON
- ❖ Detergente Ariel
- ❖ Guantes quirúrgicos 7 ½ family Doctor
- ❖ Mascarillas Family Doctor
- ❖ Papel aluminio B&T
- ❖ Papel de despacho B&T
- ❖ Papel secante B&T
- ❖ Plumón marcador ARTESCO
- ❖ Soportes para tubos SIGMA

Equipos

- ❖ Autoclave AUTESTER
- ❖ Balanza analítica (Mettler Toledo AG 204)
- ❖ Cocina eléctrica (PRACTICA/modelo: cocineta eléctrica HP1)
- ❖ Estufa de cultivo a 35 °C. (Merck / Model: 1235-2).
- ❖ Mechero de Bunsen
- ❖ Incubadora JSB. MOD-ST 22 QV
- ❖ Potenciómetro - pH meter CORNING PR 15
- ❖ Refrigerador de 2-8 C°(MABE /Modelo. RML10WHPN 50)
- ❖ Rotavapor. BÜCHI. R-3000 (Equipo completo) 120V 60HZ.
- ❖ Vórtex MIXER MODEL VM-1000.
- ❖ Cámara de flujo laminar. (Magnehelic “Forma Cientific Model: 13089-799.
- ❖ Micropipetas de 20, 100, 500 uL

Reactivos

- ❖ Ácido clorhídrico 0.5 M J.T. BAKER
- ❖ Ácido Sulfúrico 0.2M
- ❖ Agua destilada Estéril
- ❖ Cloruro de bario y Carbonato de sodio.
- ❖ Etanol 96°

Medios de Cultivo

- ❖ Agar Mueller Hinton. MH - OXOID
- ❖ Caldo Nutritvo.
- ❖ Caldo Mueller Hinton. MH - OXOID

Material de Bioseguridad

- ❖ Mandiles de laboratorio. MEDIC
- ❖ Gorro, Mascarilla N 78.
- ❖ Guantes quirúrgicos descartables N°7,7 ½.
- ❖ Lentes de protección. B&T

3.6 ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS

El procesamiento de datos con respecto a las variables de estudio se realizó mediante el software estadístico SPSS 22 para Windows y Minitab versión en español, los cuales nos permitieron elaborar cuadros de distribución de frecuencia, gráficos y calcular los datos estadísticos necesarios para el estudio.

Se presenta el análisis estadístico descriptivo de acuerdo a los datos obtenidos del estudio como son: Desviación típica, dispersión (varianza). Gráficos (histogramas, barras, tortas, etc.).

3.7 NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Un exitoso programa de seguridad en el laboratorio abarca un proceso continuo de reconocimiento, evaluación y mitigación de riesgos, asociado a acciones que aseguran que el proceso sea sostenible en el tiempo. El riesgo de las exposiciones, las infecciones adquiridas en el laboratorio y la liberación no intencionada de agentes o materiales para el medio ambiente, se debe reducir al garantizar la competencia de los técnicos, profesionales y auxiliares de laboratorio en todos los niveles. La competencia es un factor medible y documentable que involucra no sólo las habilidades que pueden ser enseñados y desarrollados, sino también el juicio y la capacidad de reconocer las limitaciones del entorno de trabajo y las habilidades propias y de las otras personas en el laboratorio. La gestión del riesgo biológico consiste en un sistema o conjunto de procesos orientado a controlar los riesgos asociados a la manipulación, almacenamiento, eliminación de agentes biológicos y toxinas en el laboratorio. Estos procesos fueron realizados a cabalidad en el presente trabajo cumpliendo con las normas establecidas.⁴⁶

3.8 PROTECCION DE LOS DERECHOS HUMANOS

En los laboratorios del área de microbiología donde se realizaron los ensayos experimentales del estudio, constituyen un medio de trabajo especial ya que el personal de trabajo, y los que se encuentran alrededor de las áreas de trabajo, lo constituye el ser humano, por ende se presenta riesgos de enfermedades infecciosas, y de lesiones, es por ello que se tomaron estrictas medidas de bioseguridad, con la finalidad de salvaguardar la integridad del personal humano, respetando, guiándonos y cumpliendo con las medidas y estipulaciones que enmarcan la protección de los derechos humanos.

4.1 RESULTADOS:

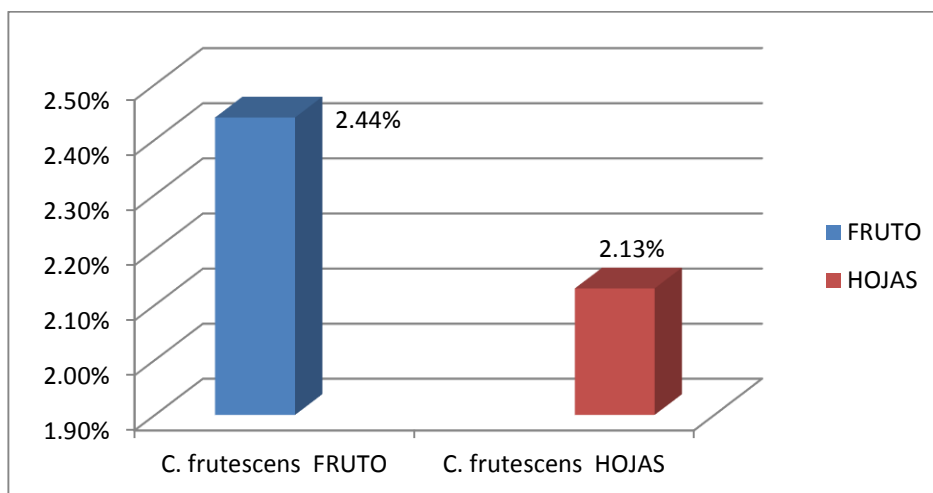
4.1.1 Obtención de Extractos vegetales.

4.1.1.1 Determinación del Rendimiento de Frutos y Hojas de *Capsicum frutescens* “Ají charapita”

Tabla N°09. Rendimiento del extracto etanólico de fruto y hojas de *Capsicum frutescens*.

Parte de planta	Cantidad de Muestra vegetal (g.)	Cantidad Muestra seca para maceración (g.)	Cantidad de Extracto etanólico (g.)	Porcentaje de Rendimiento (%)
Fruto	600	450	11	2.44 %
Hojas	600	400	8.5	2.13 %

Grafico N°01: Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de fruto y hojas de *Capsicum frutescens*.



El Grafico N°01, representa el rendimiento en porcentaje, de cada una de las partes de la planta utilizadas (Frutos y hojas) de *Capsicum frutescens*, obtenidas por equipo Rotavapor. En la Tabla N°01, se determinó el rendimiento de cada parte utilizada, donde se observa que el fruto presenta ligeramente mayor rendimiento frente a las hojas, donde de 450 g. de frutos se obtuvo un rendimiento de 2.44% y en hojas de 400 g. se obtuvo un rendimiento de 2.13%.

4.1.2 Identificación de Metabolitos Secundarios: Tamizaje Fitoquímico.

Tabla N°10 Determinación del Tamizaje Fitoquímico de frutos y hojas de *Capsicum frutescens* “Ají charapita”

METABOLITO	ENSAYO	PARTE ENSAYADA	
		FRUTOS	HOJAS
ALCALOIDES	Drangendorff	+++	+++
TRITERPENOS E ESTEROIDES	Liebermann – Burchard	++	++
QUINONAS	Borotrager	+	+
CUMARINAS	Baljet	0	0
CAROTENOS	Carr - Price	+++	+++
ACEITES ESENCIALES – GRASAS	Sudán III	++	+
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	0	0
SAPONINAS	Espuma	++	+++
FENOLES Y TANINOS	Cloruro Férrico	++	+++
AMINOACIDOS Y AMINAS	Ninhidrina	+	++
GLICOSIDOS CARDIOTÓNICOS	Kedde	+	+
FLAVONOIDES	Shinoda	++	++
MUCILAGOS	Prueba del Tacto	0	0
PRINC. AMARGOS – ASTRINGENTES	Prueba del Gusto	++	++
GLICÓSIDOS	Molish	+	++

(+++)
Abundante, (++) Moderado, (+) Leve, (0) Ausente,

4.1.3. Actividad antibacteriana de *Capsicum frutescens* "Aji charapita". Método de Difusión en Disco

4.1.3.1 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* "Aji charapita".

TABLA N° 11: Actividad antibacteriana obtenida del Extracto etanólico de *Capsicum frutescens* "Aji charapita", según Diámetro de la zona de inhibición.

BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ETANOLICO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
	HOJAS	(mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)	%	RESULTADO
	(mg)				
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	12	13.0 ± 0.5	INTERMEDIO	61.03	MODERADAMENTE ACTIVO
	6	10.0 ± 1.1	RESISTENTE	46.95	MODERADAMENTE ACTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Salmonella tiphy</i>	12	7.0 ± 1.5	RESISTENTE	32.86	INACTIVO
	6	6.0 ± 1.0	RESISTENTE	28.17	INACTIVO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA 10ug	21.3 ± 2.2	SENSIBLE		

* Esquema DZI frente a Control positivo

Resistente : <12 mm
Intermedio : 13 - 14 mm
Sensible : > 15 mm

Fuente: MPPSAMDD^(xxxx)

& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición

Inactivo : < 40%
Poco activo : 40 – 50%
Moderadamente activo: 51 – 75%
Buena actividad :> 76 %

La tabla n°11. , se muestra el promedio y desviación estándar de los diámetros de la zona de inhibición que se obtuvieron en las lecturas del ensayo de disco difusión, a diferentes niveles de concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “Aji charapita” frente a *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*.

El control Positivo (Gentamicina 10ug), obtuvo un promedio de 21.3 mm. en el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (Sensible = >15 mm.).⁵⁶

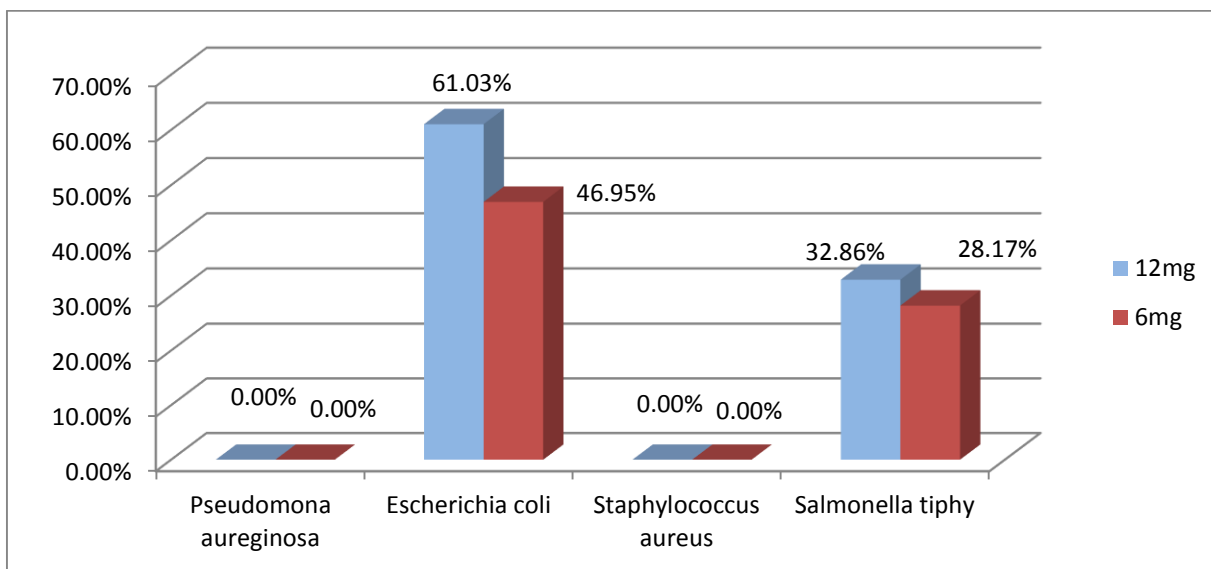
En el extracto etanólico de *Capsicum frutescens* , se evaluaron a concentraciones de 12 y 6 mg. encontrándose para *Pseudomonas aureginosa* diámetros en la zona de inhibición de 0.0mm. y 0.0mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de RESISTENTE, por no registrar inhibición del crecimiento bacteriano (Resistente = <12 mm).

Para *Escherichia coli* a concentración de 12 y 6 mg, se encontraron diámetros en la zona de inhibición de 13.0mm. y 10.0mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de INTERMEDIO (13 – 14 mn.) y RESISTENTE (< 12 mn).

Para *Staphylococcus aureus* a concentración de 12 y 6 mg, se encontraron diámetros en la zona de inhibición de 0.0mm. y 0.0mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de RESISTENTE, por no registrar inhibición del crecimiento bacteriano (Resistente = <12 mm).

Para *Salmonella tiphy* a concentración de 12 y 6 mg, se encontraron diámetros en la zona de inhibición de 7.0mm. y 6.0mm. respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de RESISTENTE (DZI < 12 mn).

GRAFICO N° 02: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* "Aji charapita" según Porcentaje de inhibición respecto al control positivo



El grafico N°02 muestra los porcentajes de inhibición del extracto etanólico de *Capsicum frutescens* "Aji charapita" en las diferentes concentraciones frente a *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*.

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran los extractos etanólicos a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose para *Pseudomonas aureginosa* un porcentaje de inhibición de 0% en ambas concentraciones de 12mg y 6mg; lo cual se obtiene como resultado INACTIVO (Inactivo: < 40%, Poco activo: 40 – 50%, Moderadamente activo: 51 – 75%, Buena actividad :> 76 %)

Para *Escherichia coli* se tiene 61.03% y 46.95% en las concentraciones de 12mg y 6mg respectivamente; lo cual demuestra tener MODERADA ACTIVIDAD.

Para *Staphylococcus aureus* se tiene 0% en ambas concentraciones de 12mg y 6mg; lo cual se obtiene como resultado INACTIVO.

Para *Salmonella tiphy* se tiene 32.86% y 28.17% en las concentraciones de 12mg y 6mg respectivamente; lo cual demuestra tener como resultado INACTIVO, por encontrarse por debajo de 40%.

4.1.3.2 Actividad antibacteriana del extracto etanólico de Frutos de *Capsicum frutescens* "Ají charapita".

TABLA N°12: Actividad antibacteriana obtenida del Extracto etanólico de *Capsicum frutescens* "Ají charapita", según Diámetro de la zona de inhibición.

BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ETANOLICO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
	FRUTOS	(mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)	%	RESULTADO
	(mg)				
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
<i>Salmonella tiphy</i>	12	6.0 ± 1.7	RESISTENTE	29.56	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
CONTROL POSITIVO	GENTAMICINA 10ug	20.3 ± 2.2	SENSIBLE		

* Esquema DZI frente a Control positivo

Resistente : <12 mm

Intermedio : 13 - 14 mm

Sensible : > 15 mm

Fuente: MPPSAMDD^(xxxx)

& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición

Inactivo : < 40%

Poco activo : 40 – 50%

Moderadamente activo: 51 – 75%

Buena actividad :> 76 %

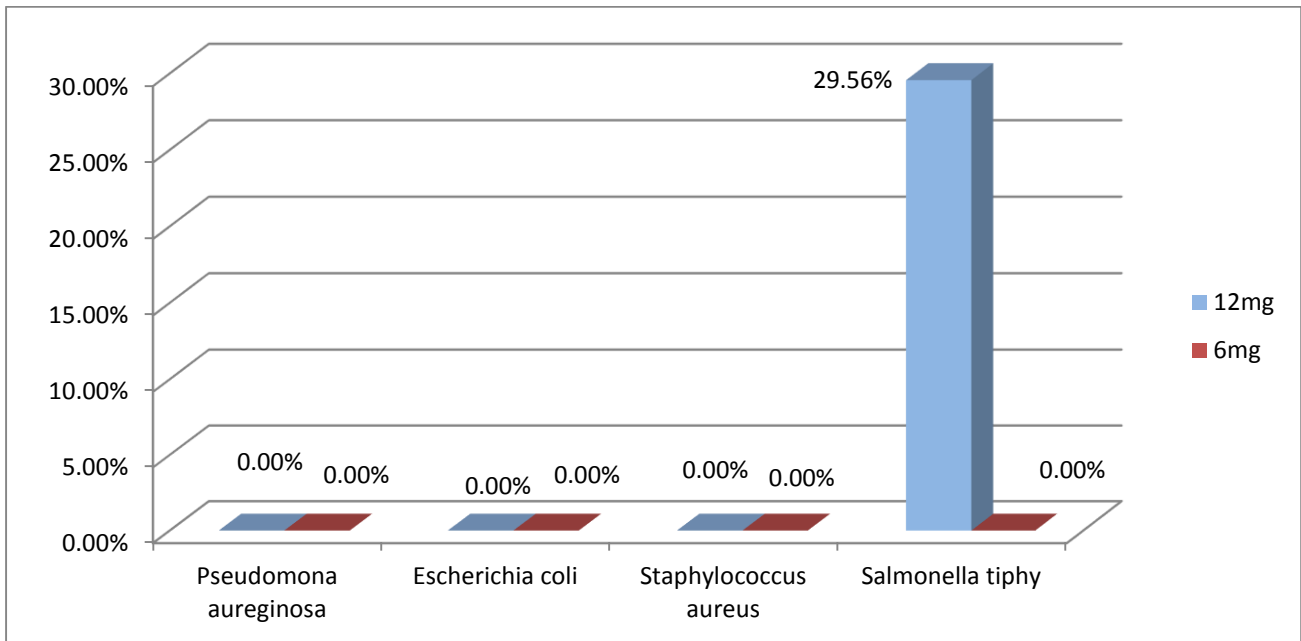
La tabla N°12. , se muestra el promedio y desviación estándar de los diámetros de la zona de inhibición que se obtuvieron en las lecturas del ensayo de disco difusión, a diferentes niveles de concentraciones del extracto etanólico de frutos de *Capsicum frutescens* “Aji charapita” frente a *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*.

El control Positivo (Gentamicina 10mg), obtuvo un promedio de 20.3 mm. En el Diámetro de la zona de inhibición (DZI), encontrándose como resultado SENSIBLE según parámetros del método de Kirby – Bauer (Sensible = >15 mm.).

En el extracto etanólico de frutos *Capsicum frutescens*, se evaluaron a concentraciones de 12 y 6 mg. para *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* no se encontró diámetros en la zona de inhibición (0.0mm), los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de RESISTENTE, por no registrar inhibición del crecimiento bacteriano (Resistente = <12 mm).

Para *Salmonella tiphy* a concentración de 12 y 6 mg, se encontraron diámetros en la zona de inhibición de 6.0mm. y 0.0mm. Respectivamente, los cuales obtuvieron como resultados la clasificación de RESISTENTE (DZI < 12 mn).

GRAFICO N°03: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de frutos de *Capsicum frutescens* "Aji charapita" según Porcentaje de inhibición respecto al control positivo.



El grafico N°03, muestra los porcentajes de inhibición del extracto etanólico de frutos de *Capsicum frutescens* "Aji charapita" en las diferentes concentraciones frente a *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*.

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran los extractos etanólicos a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose tanto para *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* un porcentaje de inhibición de 0% en ambas concentraciones de 12mg y 6mg; lo cual se obtiene como resultado INACTIVO (Inactivo: < 40%, Poco activo: 40 – 50%, Moderadamente activo: 51 – 75%, Buena actividad :> 76 %)

Para *Salmonella tiphy* se tiene 29.56% y 0% en las concentraciones de 12mg y 6mg respectivamente; lo cual demuestra tener como resultado INACTIVO, por encontrarse por debajo de 40%.

4.1.4 Método de Macrodilución: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).

4.1.4.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

TABLA N°13: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “Ají charapita” según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*.

BACTERIA EN ESTUDIO	N° DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	----	-----	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	C3	8 mg/ml	POCO ACTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i>	C1	32 mg/ml	INACTIVO
<i>Salmonella tiphy</i>	C2	16 mg/ml	INACTIVO

* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderado activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007

En la Tabla N° 13, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas *Capsicum frutescens* “Ají charapita” según la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 8mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “Ají charapita” demostró ser Poco activo frente a *Escherichia coli*.

Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 32mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “Ají charapita” demostró ser Inactivo frente a *Staphylococcus aureus*.

En el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 16mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “Ají charapita” demostró ser Inactivo frente a *Salmonella tiphy*.

TABLA N° 14: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de Frutos de *Capsicum frutescens* “Ají charapita” según Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), frente a *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*.

BACTERIA EN ESTUDIO	N° DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	----	-----	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	----	-----	INACTIVO
<i>Staphylococcus aureus</i>	-----	-----	INACTIVO
<i>Salmonella tiphy</i>	C2	16 mg/ml	INACTIVO

* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderado activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007

En la Tabla N°14, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de frutos *Capsicum frutescens* “Ají charapita” según la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 16mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de frutos de *Capsicum frutescens* “Ají charapita” demostró ser Inactivo frente a *Salmonella tiphy*.

Para las demás cepas de Estudio no se evidenciaron CMI alguno dentro de las concentraciones dadas en el presente estudio.

5.3.2.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

TABLA N° 15: Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto etanólico de *Capsicum frutescens* “Aji charapita” frente a las bacterias en estudio.

Especies bacterianas	Clasificación	CBM
P. aureginosa	Bacilos gram-negativos	-----
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos gram-negativos	-----
S. aureus	Cocos gram-positivos	-----
<i>Salmonella tiphy</i>	Bacilos gram-negativos	-----

A partir de los tubos donde no se observó crecimiento bacteriano (CMI) tanto de hoja y de fruto, se procedió a determinar la CONCENTRACION BACTERICIDA MINIMA (CBM.), que se entiende como la menor concentración del extracto del ensayo (hoja y fruto) de capsicum frutescens que no solo inhibe el desarrollo de las bacterias sino que también las destruye.

Para esto se efectuó el subcultivo del contenido de los tubos que presentaron CMI en el ensayo realizado. Ver tablas (N°06, 07,09) en placas de agar, en donde se observó después de la incubación durante 24 h, el desarrollo de colonias, por el cual no se evidenció presencia de **CMB** en el extracto etanólico de hoja y fruto de *Capsicum frutescens* frente a las cepas bacterianas de estudio.

DISCUSION

En el presente estudio se evaluó, la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas y frutos de *Capsicum frutescens* frente a 4 cepas bacterianas (*Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella tiphy*), mediante el método de Difusión en disco “Kirby – Bauer” y difusión en caldo (macrodilución).

Para la preparación de los extractos vegetales, se utilizaron hojas y frutos en buen estado, los cuales fueron cortados, molidos y secados a temperatura ambiente; el método escogido para la extracción del extracto etanólico, fue mediante la técnica de maceración en frío a una presión atmosférica y temperatura ambiental (37°C) ^{47,48}. Después de la maceración en frío por una semana, se filtró utilizando papel filtro para concentrarlo en rotavapor a una temperatura de 40° C y una presión de 690 mm Hg, por espacio de 3 horas obteniendo extracto alcohólico de las hojas y frutos de *Capsicum frutescens* “Ají charapita”.

Los resultados obtenidos en el estudio respecto al rendimiento del extracto fueron de 2.44% en hojas y 2.13% en frutos de *Capsicum frutescens* “Ají charapita”.

El estudio de las características farmacognósticas del extracto etanólico de las hojas y frutos de *Capsicum frutescens* se realizaron mediante protocolos descritas en las referencias bibliográficas. Del tamizaje fitoquímico se obtuvieron respuesta positiva para una gran diversidad de grupos funcionales, se comprobó la presencia de alcaloides, carotenos en ABUNDANCIA (+++); triterpenos, esteroides, principios amargos astringentes y flavonoides MODERADAMENTE (++); quinonas y glicósidos cardiotónicos con LEVE presencia (+) en los extractos etanólicos de ambas partes (hojas y frutos), además de ABUNDANTE (+++) fenoles y saponinas; aminoácidos y aminos MODERADAMENTE(++) solamente en el extracto etanólico de las hojas en comparación con el fruto, el cual se puede ver que hay una MODERADA (++) presencia de fenoles y saponinas; y una LEVE(+) presencia de aminoácidos, aminos.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Yañez P. y col.⁵⁰, quienes realizaron la identificación de metabolitos secundarios (tamizaje fitoquímico) de varias especies del género *Capsicum*, dentro de ellas *C. frutescens* encontrando compuestos fenólicos y taninos, alcaloides aceites y grasas, azúcares reductores y saponinas.

Los métodos más usados en la actualidad para evaluar actividad antimicrobiana de sustancias extraídas de plantas medicinales son: el método de Kirby –Bauer o disco difusión y el método de pocillos o excavación que también sirven para hallar no sólo la potencia de los antibacterianos, sino también, la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos o sustancias usadas como posibles antibióticos⁴⁹.

En nuestro estudio utilizamos el método de difusión en disco “Kirby-Bauer”, y se utilizó como Control positivo (Antibiótico) a Gentamicina 10ug, además del extracto etanólico de hojas y frutos de *C. frutescens* en 2 niveles de concentraciones.

Los diámetros de los halos de inhibición del control positivo (Gentamicina 10ug) fue de 21.3 ± 2.2 mm, lo cual, según el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión del Instituto Nacional de Salud, lo califica como SENSIBLE (Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones).

En estudios similares realizados por Rodríguez M, Zevallos F.⁵¹ desarrollados en el Instituto de Medicina Tradicional – Essalud; utilizaron como control positivo al antibiótico Gentamicina 10ug y obtuvieron un diámetro de inhibición de 20.4 mm y 19.9 mm.; asimismo Ríos N, Dávila R.⁵² y Rojas, Ochoa, Ocampo y Muñoz.⁵³ En una evaluación de actividad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria de distintos extractos de plantas medicinales; donde utilizaron como controles positivos a Sulfato de Gentamicina 1.0 ug/ml, clindamicina 0.3 ug/ml y nistatina 1.0 ug/ml.

Según los resultados obtenidos, respecto a la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de *C. frutescens* frente a *Pseudomonas aureginosa* a las concentraciones de 12mg y 6mg, no se obtuvo inhibición alguna, no evidenciando un diámetro de zona de inhibición (DZI), el cual nos indicó como resultado RESISTENTE en comparación con los criterios de categorización del Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, frente a su control positivo; donde indica que cuando se utiliza como antibiótico de control positivo a sulfato de Gentamicina; se categoriza como RESISTENTE cuando el halo de inhibición se

encuentra <12mm; Intermedio cuando el halo de inhibición es de 13 – 14 mm y Sensible si es >15mm.

Frente a *Escherichia coli*, a concentración de 12mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de 13 mm, el cual se lo categoriza como inhibición INTERMEDIA, mientras que en la concentración de 6mg/ml obtuvo un DZI de 10mm, categorizándose como RESISTENTE por tener un halo de inhibición <12mm.

Frente a *Staphylococcus aureus*, en ambas concentraciones no presento halo de inhibición, considerándolos RESISTENTE.

Frente a *Salmonella Tiphy*, a concentración de 12mg presento un DZI de 7mm y a concentración de 6mg presento un DZI de 6mm, los cuales son considerados como RESISTENTES por encontrarse por debajo del criterio de categorización (<12 = Resistente).

Con estos resultados encontrados se calculó el porcentaje de inhibición para determinar la actividad antibacteriana, tomando como referencia el protocolo de estudio del Instituto de Medicina Tradicional (Inactivo: < 40%, Poco activo: 40 – 50%, Moderadamente activo: 51 – 75% Buena actividad :> 76 %) obteniéndose para *Pseudomonas aureginosa* en ambas concentraciones un valor de 0% de inhibición, por lo tanto es considerado INACTIVO. *Escherichia coli* a la concentración de 12mg obtuvo un 61.03%, y a la concentración de 6mg obtuvo un 46.95%, lo cuales son considerados como MODERADAMENTE ACTIVO. *Staphylococcus aureus* en ambas concentraciones un valor de 0% de inhibición, por lo tanto es considerado INACTIVO.

Salmonella tiphy a la concentración de 12mg obtuvo un 32.86%, y a la concentración de 6mg obtuvo un 28.17%, lo cuales son considerados como INACTIVOS.

Asimismo, para el caso del extracto etanólico del fruto de *Capsicum frutescens*, a las concentraciones de 12 y 6 mg, frente a las diferentes bacterias estudiadas, se obtuvieron los siguientes resultados.

Pseudomonas aureginosa, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 6mg y 12mg, no presentaron halos de inhibición, considerándolos como RESISTENTE.

Solo frente a *Salmonella Tiphy*, a concentración de 12mg presento un DZI de 6mm y a concentración de 6mg no presento DZI, los cuales son considerados como RESISTENTES por encontrarse por debajo del criterio de categorización (<12 = Resistente).

Respecto al porcentaje de inhibición, el extracto etanólico de frutos de *C. frutescens*, solo obtuvo un 29.56% frente a *Salmonella tiphy* a la concentración de 12mg/ml; considerando a todos los grupos de bacterias como INACTIVO.

Respecto a nuestros resultados, algunos estudios difieren con lo realizado; Monroy A.⁵⁴ , Lee H y col.⁵⁵ mencionan que extractos de *Capsicum annuum* tiene capacidad de inhibir el crecimiento microbiano, también atribuyen que puede deberse a la presencia de capsaicinoides, ácido ascórbico y polifenoles polares, los cuales promueven a lisis celular.

Colivet J, y col.¹⁰. Estudiaron diferentes extractos de *Capsicum chinense*, sobre el crecimiento en *E. coli* y *Bacillus sp.* Quienes demostraron que solo el extracto etanólico presento inhibición del crecimiento bacteriano, debido a que posiblemente la mayoría de los componentes activos presentes en *C. chinense* son solubles en etanol.

CONCLUSIONES

- ❖ Del tamizaje fitoquímico, se comprobó la presencia de alcaloides, carotenos en ABUNDANCIA (+++); triterpenos, esteroides, principios amargos astringentes y flavonoides MODERADAMENTE (++); quinonas y glicósidos cardiotónicos con LEVE presencia (+) en los extractos etanólicos de ambas partes (hojas y frutos), además de ABUNDANTE (+++) fenoles y saponinas; aminoácidos y aminas MODERADAMENTE(++) solamente en el extracto etanólico de las hojas en comparación con el fruto, el cual se puede ver que hay una MODERADA (++) presencia de fenoles y saponinas; y una LEVE(+) presencia de aminoácidos, aminas.

- ❖ Asimismo, para el caso del extracto etanólico del fruto de *Capsicum frutescens*, a las concentraciones de 12 y 6 mg, frente a las diferentes bacterias estudiadas, se obtuvieron los siguientes resultados: *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 6mg y 12mg, no presentaron halos de inhibición, considerándolos como RESISTENTE. Solo frente a *Salmonella Tiphy*, a concentración de 12mg presento un DZI de 6mm y a concentración de 6mg no presento DZI, los cuales son considerados como RESISTENTES por encontrarse por debajo del criterio de categorización (<12 = Resistente).

- ❖ Con respecto al extracto etanólico de Hoja, frente a *Escherichia coli*, a concentración de 12mg/ml obtuvo un Diámetro de Zona de inhibición de 13 mm, el cual se lo categoriza como inhibición INTERMEDIA, mientras que en la concentración de 6mg/ml obtuvo un DZI de 10mm, categorizándose como RESISTENTE por tener un halo de inhibición <12mm. Frente a *Staphylococcus aureus*, en ambas concentraciones no presento halo de inhibición, considerándolos RESISTENTE. Frente a *Salmonella Tiphy*, a concentración de 12mg presento un DZI de 7mm y a concentración de 6mg presento un DZI de 6mm, los cuales son considerados como RESISTENTES por encontrarse por debajo del criterio de categorización (<12 = Resistente).

- ❖ Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 8mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “*Ají charapita*” demostró ser **Poco activo** frente a *Escherichia coli*. Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 32mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “*Ají charapita*” demostró ser **Inactivo** frente a *Staphylococcus aureus*. En el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 16mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de hojas de *Capsicum frutescens* “*Ají charapita*” demostró ser **Inactivo** frente a *Salmonella tiphy*.

- ❖ Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 16mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de frutos de *Capsicum frutescens* “*Ají charapita*” demostró ser **Inactivo** frente a *Salmonella tiphy*. Para las demás cepas de Estudio no se evidenciaron CMI alguno dentro de las concentraciones dadas en el presente estudio.

RECOMENDACIONES

- Realizar fraccionamiento, aislamiento y purificación de los componentes más abundantes que se encuentre en *Capsicum frutescens*, para probar cuál de las fracciones tiene un mejor efecto antibacteriano o determinar un sinergismo entre sus componentes.
- Realizar diseños de ensayos antibacterianos con diferentes controles positivos como oxaciliana, penicilina, eritromicina, etc, con el objetivo de profundizar los estudios.
- Desarrollar otros ensayos para corroborar la sensibilidad antimicrobiana de *C. frutescens* y así validar los resultados obtenidos.

BIBLIOGRAFIA

1. **Rahalison, L, Hamburger, M, Hostettman, K, Monod, M and Frenck E.:** Phytochemical Analisis 2, 199-203, (1991).
2. **Nisbet, L y Moore M.:** Current Opinion in Biotechnology 8, 708-712. (1997).
3. **Obregón L.:** Fitoterapia: Importancia de su desarrollo al servicio de salud. FITO 2003 Lima, Perú.
4. **Machado L.:** Materias primas vegetales para la industria de fitofármacos. FITO 2003. Lima, Perú.
5. **Espinoza V. Muñoz F.:** Gérmenes bacterianos más frecuentes y su patrón de sensibilidades y resistencias en un Hospital Pediátrico de tercer nivel. [Tesis para obtener el título de Pediatría Médica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
6. **Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Martínez-Romero E.:** Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. Salud Pública. Mex. 2009; 51(suppl 3):S439-S446.
7. **Samuelson O, Toleman MA, Sundsfjord A, Rydberg J, Leegaard TM, Walder M.:** Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:346-352.
8. Typhoid Fever. WHO Fact Sheet N149. March 1997; <http://www.who.int/inffs/en/fact149.html> [consulta: 9 abril 2002]
9. **Barquero A.:** Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. Rev. Quím Viva 6: 19 – 35, 2007.

10. **Colivet J., Belloso G., Hurtado E.:** Comparación del efecto inhibitor de extractos de ají dulce (*Capsicum chinense*) Sobre el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Bacillus sp.*, ciencias biotecnológicas experimentales. (18)(2) México (2006).
11. **García, M. A.; Baena, D.; Vallejo, F.:** Estudio de la diversidad genética de las accesiones de *Capsicum spp.* del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia – Sede Palmira. p 102.2006.
12. **Loizeau, P.; Spichiger, R.:** Moraceae. Contribución a la Flora de la Amazonía Peruana. Génova, IT, p. 17-85. IIAP-PUB.033. (1990).
13. **Reynel, C; Pennington, T; Pennington, R; Flores, C; Daza, A.:** Árboles útiles de la Amazonia Peruana y sus usos, un manual con apuntes de identificación, ecología y propagación de las especies. Ilustraciones. (2003).
14. **Neumann R.:** Ajíes y capsaicina: desde especia, insecticida, defensa personal hasta medicinal.2004.
15. **Dorantes L., Aparicio G.:** Evaluación de los Extractos de *Capsicum annuum* como Antimicrobiano Naturales Mediante la Microbiología Predictiva. Instituto Politecnico Nacional, Escuela Nacional de Extractos Biologicas Sección de Estudios de Posgrado Investigación. Mexico D.F. 2010.
16. **Llenque D., Otiniano M.:** Supervivencia de *Staphylococcus aureus* en crema huancaína preparada con diferentes concentraciones de *Capsicum annuum* var. Longum “ají escabeche”, Rev. “Ciencia y Tecnología”, Escuela de Postgrado – UNT.2013.
17. **Cerón-Carrillo T., Munguía-Pérez R., Santiesteban-López A.:** Actividad antimicrobiana de extractos de diferentes especies de chile (*Capsicum*), Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Puebla; México. Rev. IbCi – Julio 2014.

18. **Agustín M., González R., García I., Totosaus A.:** ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) Y CHILE ANCHO (*Capsicum annuum* L. *grossum* sendt), XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Morelos. Estado de México, (2009).
19. **Cantor F., Velásquez M.:** Efecto del uso de ácido acético, cítrico e hipoclorito de calcio para control de *Escherichia coli* (ATCC 25922) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. El Zamorano, Honduras. 27 p.2012.
20. **Colivet J., Belloso G., Hurtado E :** Comparacion del efecto inhibidor de extractos de aji dulce (*Capsicum chinense*) Sobre el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Bacillus sp.*, ciencias biotecnológicas experimentales. (18)(2) México (2006).
21. **Ramirez A., Aparicio G., Cárdenas A., Dorantes L.:** Actividad antibacteriana de los compuestos activos del capsicum annum sobre *Escherichia Coli* O157:H7. Laboratorio de Bioquímica de los Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas(IPN).Prol. de Carpio y Plan de Ayala s/n. 11340.D.F.México.(2009).
22. **Pino A.:** Análisis de la actividad antibacteriana de extractos de capsicum annum var. Longum(aji chileno) en distintas etapas de desarrollo, sobre diferentes microorganismos. Universidad de Talca. Licenciado en Tecnología Médica. México (2006).
23. **Escobar A.:** Extractos de plantas como inhibidores de la formación de Biopelícula de *Escherichia coli* 0157: H7, facultad de ciencias biológicas, Universidad Autónoma de nuevo León, Mexico.julio, (2014).

24. **Careaga M, Fernández E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo M. :** Antibacterial activity of Capsicum extract against Salmonella typhimurium and Pseudomonas aeruginosa inoculated in raw beef meat., Int J Food Microbiol. 2003 Jun 25; 83(3):331-5.
25. **Golshani F. , Sahraei S., Hassanshahian M. Y Sepehri Z.:** In Vitro Antimicrobial Assessment of Lepidium Sativum L. and Capsicum annum L Extracts, J J Microbiol Pathol. 2014, 1(1): 002.
26. **Ildiz F., Oguz E.:** In Vitro Activity of capsaicin against helicobacter pylori, introduction, Annals of Microbiology, 55 (2) 125-127 (2005).
27. **Ezziyyani M.:** Biocontrol de Phytophthoracapsici en pimiento (Capsicum annum L.) mediante una combinación de microorganismos antagonistas. Anales de Biología 26: 35-45, 2004.
28. **Moreno L., Salcedo M., Cárdenas A., Hernández P.:** Efecto Antifúngico de Capsaicina y extractos de chile piquín (Capsicum annum L. var. aviculare) sobre el crecimiento In Vitro de Aspergillus Flavus. Departamento de Química Analítica. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Núm. 34, pp. 171-184, ISSN 1405-2768; México, 2012.
29. **Heiser, C. y Smith, P.:** New species of Capsicum from south América. Brittonia, 10(4): 194 – 201.1958.
30. **D’Arcy. W. y Eshbaugh W.:** New World peppers (Capsicum-Solanaceae) north of Colombia. Baileya 19: 93-105.1974.
31. **Neumann R.:** Ajíes y capsaicina. desde especia, insecticida, defensa personal hasta medicinal.2004.

32. **Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G.** Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. *Braz J Microbiology.* 2000; 31:247-56.
33. **Desta, B.:** Ethiopian tradicional herbal drugs. Part II: antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 129-139.(1993).
34. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova. (1997).
35. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. Villanova. (1998).
36. **Victorica J, Galván M.:** *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water Science and.*
37. **Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ,** et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959-964
38. **Engel J, Balachandran P.** Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 2009; 12:61-66.
39. **Tan TT.** “Future” threat of gram-negative resistance in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37:884-890.
40. **Drasar B.; Hill M.:** Human intestinal flora. Academic Press, London, , 1974
41. **Donnenberg MS.** Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature* 406: 768-774, 2000.

42. **Kloss W.** Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans. En: Crossley KB, Archer GL, Eds. The Staphylococci in human disease. Nueva York: Churchill Livingstone, 1997:113-215.
43. **Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, Alcalá L, Bouza E.** Grupo de Trabajo para el estudio de estafilococos. Situación actual de la resistencia de Staphylococcus en España. Cuarto estudio nacional (1996). Rev Clin Esp 1997; 197:12-18.
44. **WRAY C. & WRAY A., EDS** (2000). Salmonella in Domestic Animals. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
45. **Kaye K, Engemann J, Fraimow H, Abrutyn E.:** Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. Infect Dis Clin North Am. 2004; 18(3):467-511.
46. **Organización Mundial de la Salud.** Manual de bioseguridad en el laboratorio. 2005. Tercera Edición. Ginebra.
47. **Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M.** (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from Ocotea quixos (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. Food Chem. 85:415-421.
48. **Dartois V, Sanchez-Quezada J, Cabezas E, Chi E, Dubbelde C, Dunn C, Granja J, et al.** (2005). Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. Antimicrob Agents Chemother. 49:3302-3310.
49. **Toribio MS, Oriani DS y Skliar MI.** Actividad antimicrobiana de Centaurea solstitialis y Centaurea calcitrapa. Ars. Pharm. 2004; 45(4): 335-341.

50. **Yáñez P, Balseca D, Rivadeneira L, Larenas C.** Características Morfológicas y de Concentración de Capsaicina en Cinco Especies Nativas del Género *Capsicum* cultivadas en Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 2015; 22(2): 12-32.
51. **Rodríguez M, Zevallos F.** Actividad antibacteriana in vitro del fruto de *Morinda citrifolia* L. y planta entera de *Notholaena nivea* (Poir.) Desv. frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, *Imet- Essalud* 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.
52. **Ríos N, Dávila R.** “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE *Geranium ayavacense* SOBRE *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013”. *Essalud* 2013, [tesis de pregrado]. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonía Peruana; 2014.)
53. **Rojas, J., Ochoa, V., Ocampo, S., Muñoz, J.** Detección de la actividad antimicrobiana de 10 plantas medicinales utilizados en la medicina folclórica de Colombia: Una posible alternativa en el tratamiento de las infecciones nosocomiales. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2006; 6: 2-2
54. **Monroy A, Gonzales R, Garcia I, Totosa A, Minor H.** ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.) Y CHILE ANCHO (*Capsicum annum* L. *grossum* sendt). XII Congreso Nacional de Biotecnología y bioingeniería.
55. **Lee Y.; Horward, L. R. y Villalón, B.** (1995). Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annum*) cultivars. *Journal of Food Science*. 60(3):472-476.
56. **Guerra G. y Guerra H.:** Bioseguridad en el Laboratorio. Bioseguridad. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud-INS. Organismo Público Descentralizado del Sector Salud. (2000).

ANEXOS

FIGURA N°01. *Capsicum frutescens* “Aji Charapita”



. OBTENCION DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

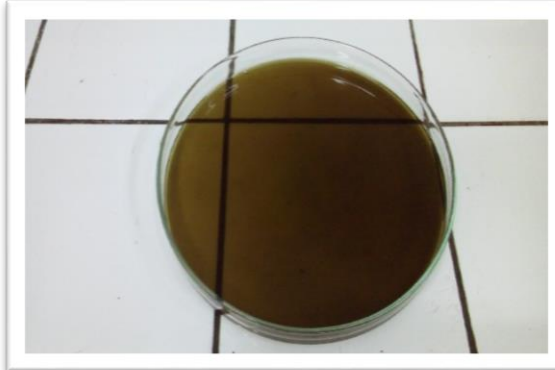
Foto N° 01 Filtración de los extractos



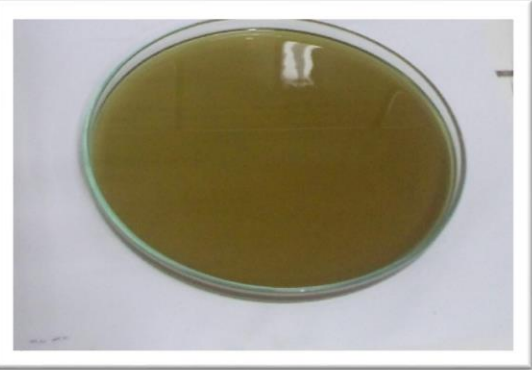
**Foto N°02 Concentración de los extractos
Mediante el rotavapor.**



Foto N° 03 Extracto Etanolico de Hoja

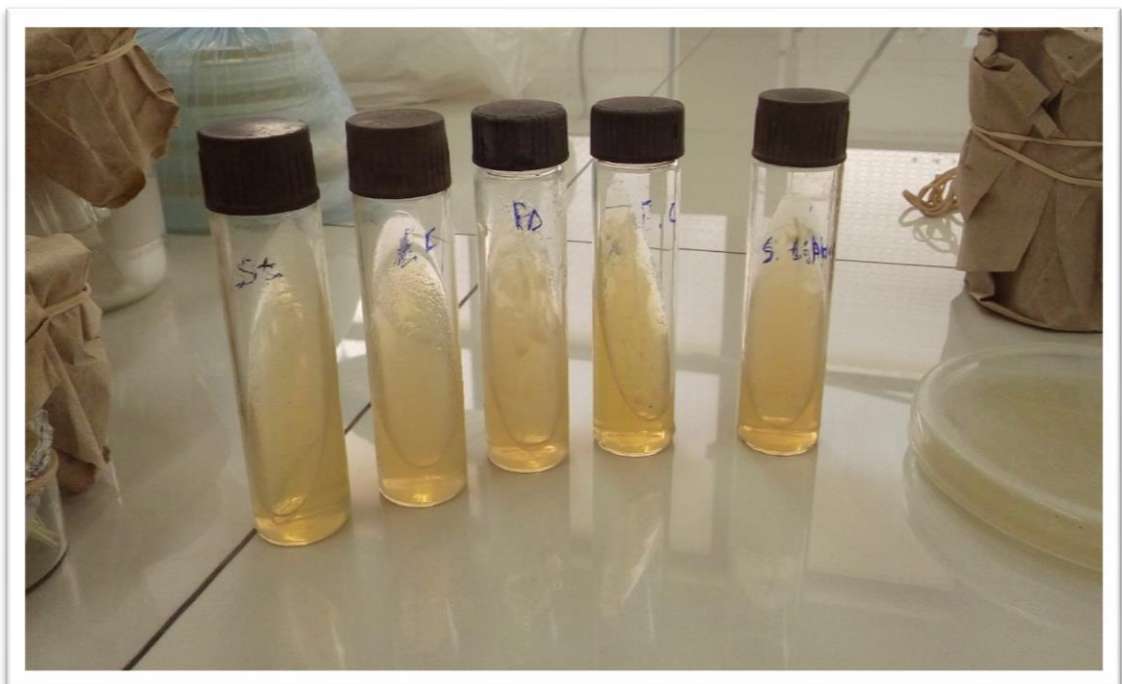


FotoN° 04 Extracto etanólico de Fruto



.Población microbiológica

Foto N° 05 Cepas bacterianas con las que se realizó el estudio



Procedimientos de los ensayos de actividad antibacteriana

FOTO N° 06 MICROTUBOS, TIPS PARA MICROPIPETETAS, MATRAZ CON AGAR MUELLER HINTON, TUBOS DE CINa ANTES DE SER LLEVADOS AL AUTOCLAVE.



FOTO N° 07 PLACAS PARA LOS ENSAYOS DESPUES DE SACARLOS DE LA ESTUFA



FOTO N° 08 Preparación de las placas con Agar Mueller Hinton para los ensayos

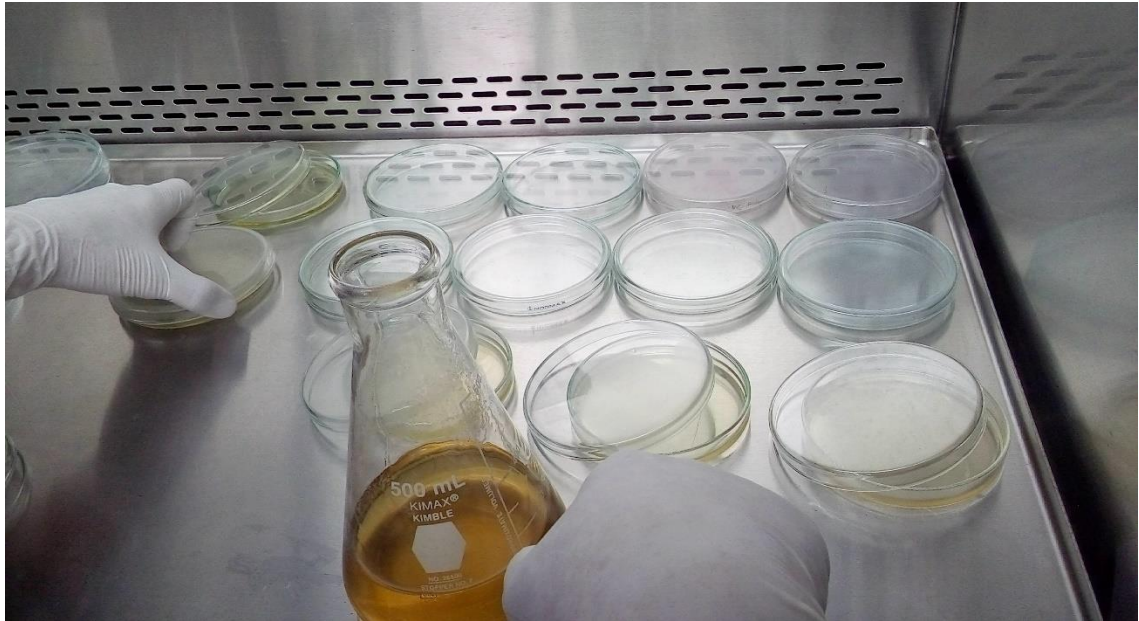
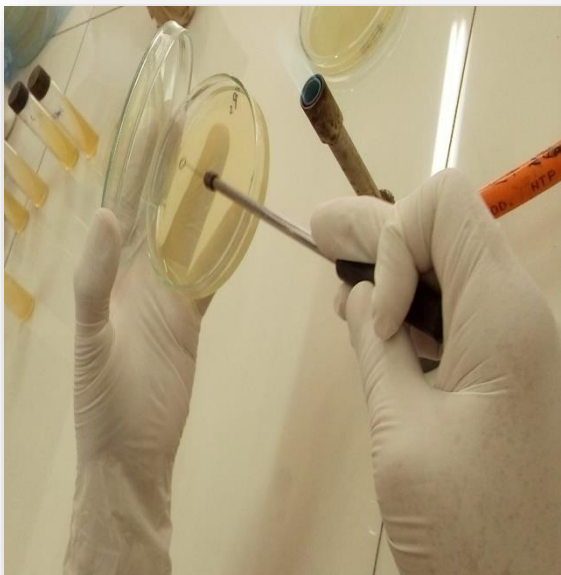


Foto N°09 Siembra de las bacterias en las Placas para los estudios.



FotoN°10 Crecimiento de las bacterias de Estudio después de 24 horas de incubación

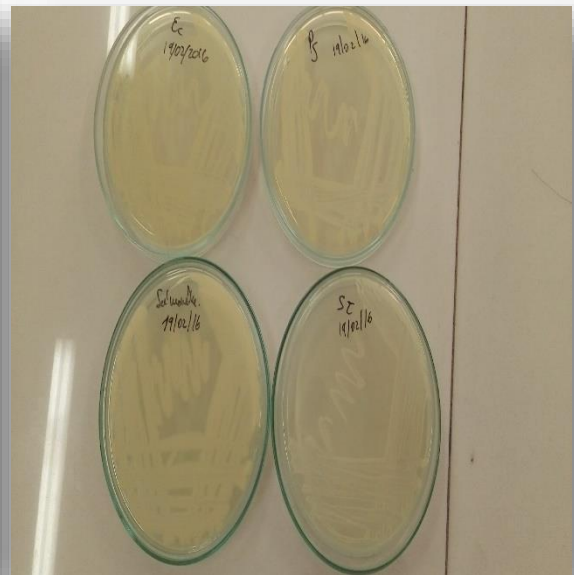


Foto N° 11 Cultivo bacteriano en tubo de CNa 0.9% para su respectivo crecimiento (izquierda). Patrón de Mac farland (derecha)

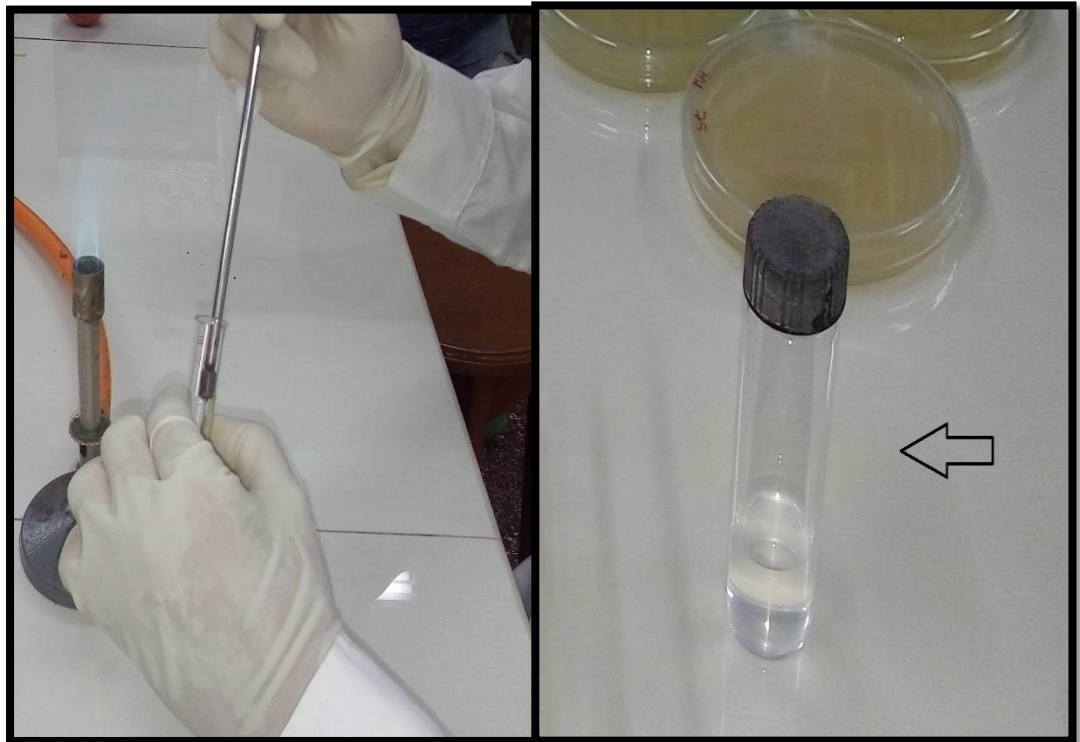


Foto N° 12 Procedimientos realizados del ensayo de Macrodilución



Foto N° 13 Secuencia de microtubos realizados aplicando el ensayo de macrodilución con el Extracto de Fruto y Hoja de *Capsicum frutescens* para *Pseudomonas aureginosa*, *staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

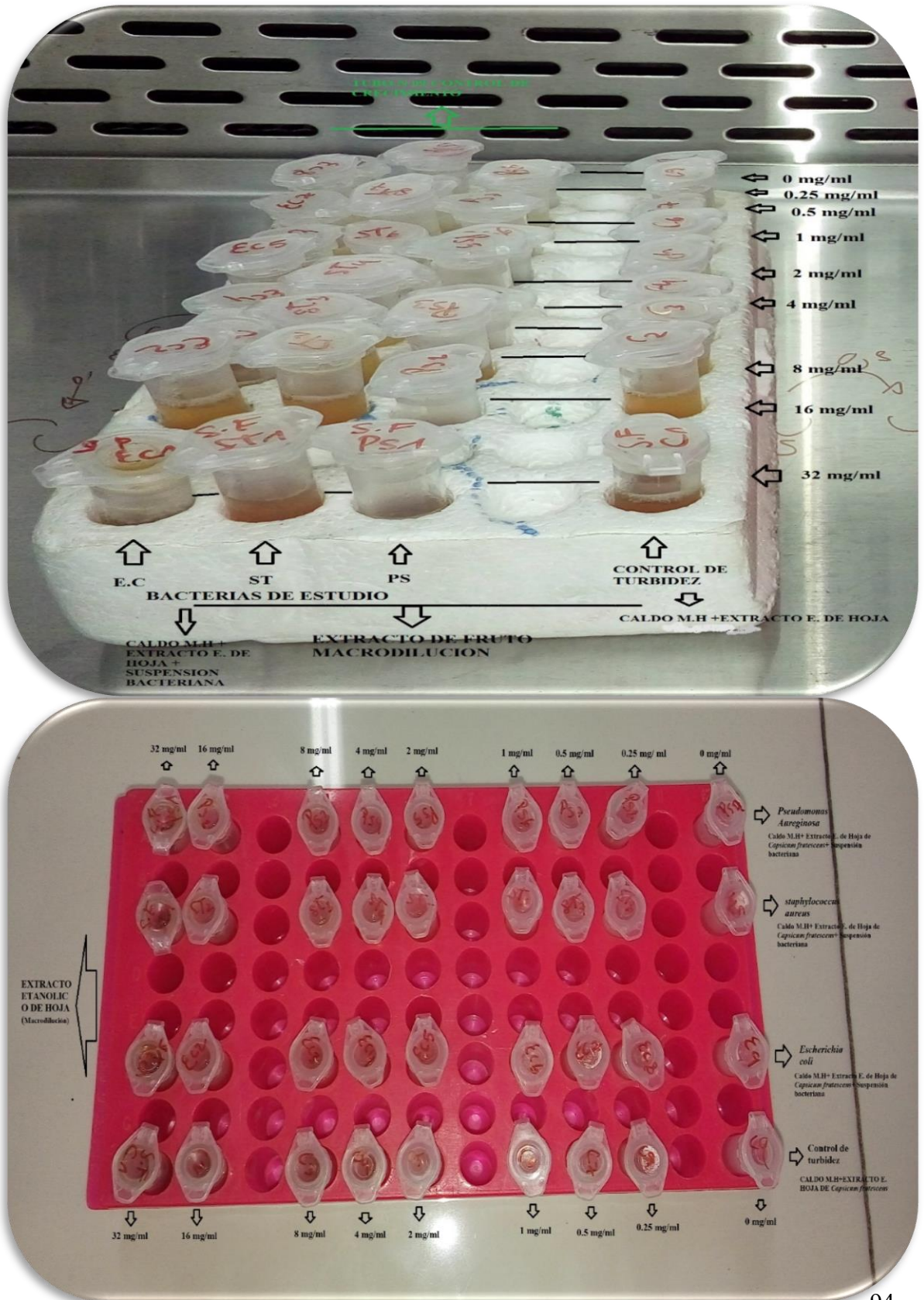


Foto N° 14 Secuencia de microtubos realizados aplicando el ensayo de macrodilución con el Extracto de Fruto y Hoja de *Capsicum frutescens* para *Salmonella tify*

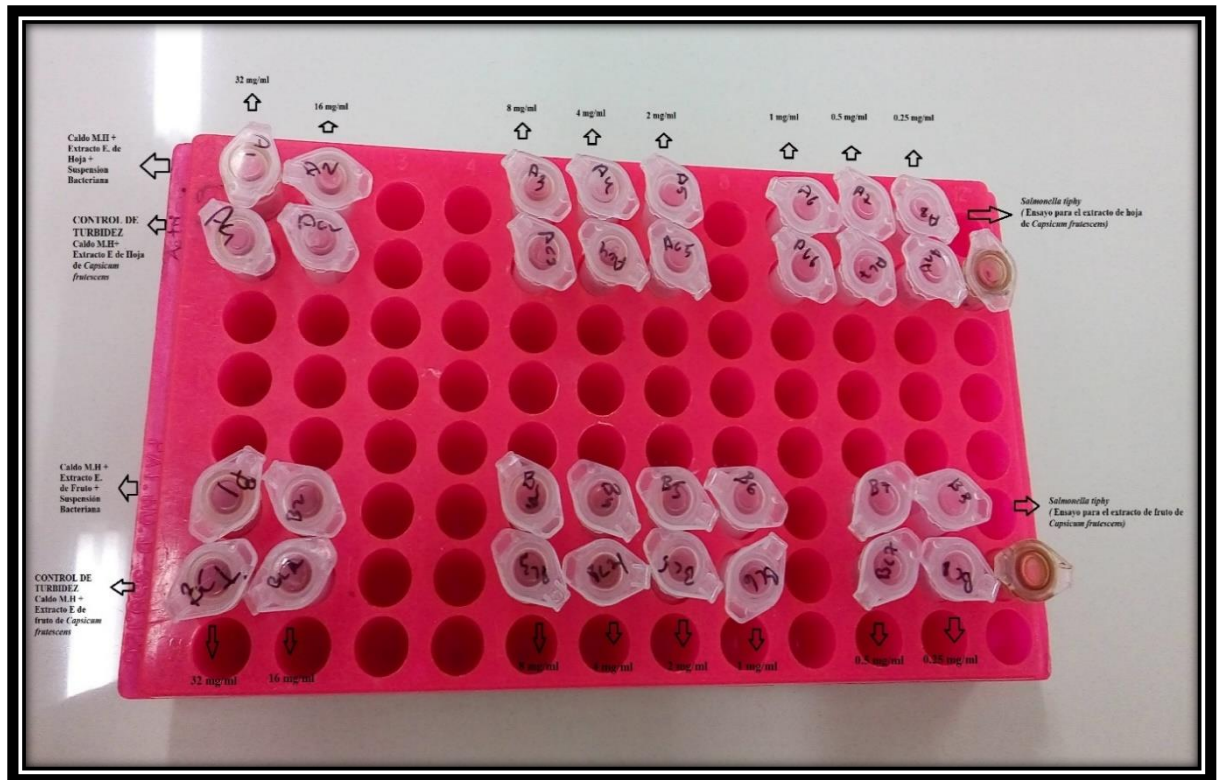


Foto N° 15. Discos de papel whattman utilizados. Discos en la incubadora

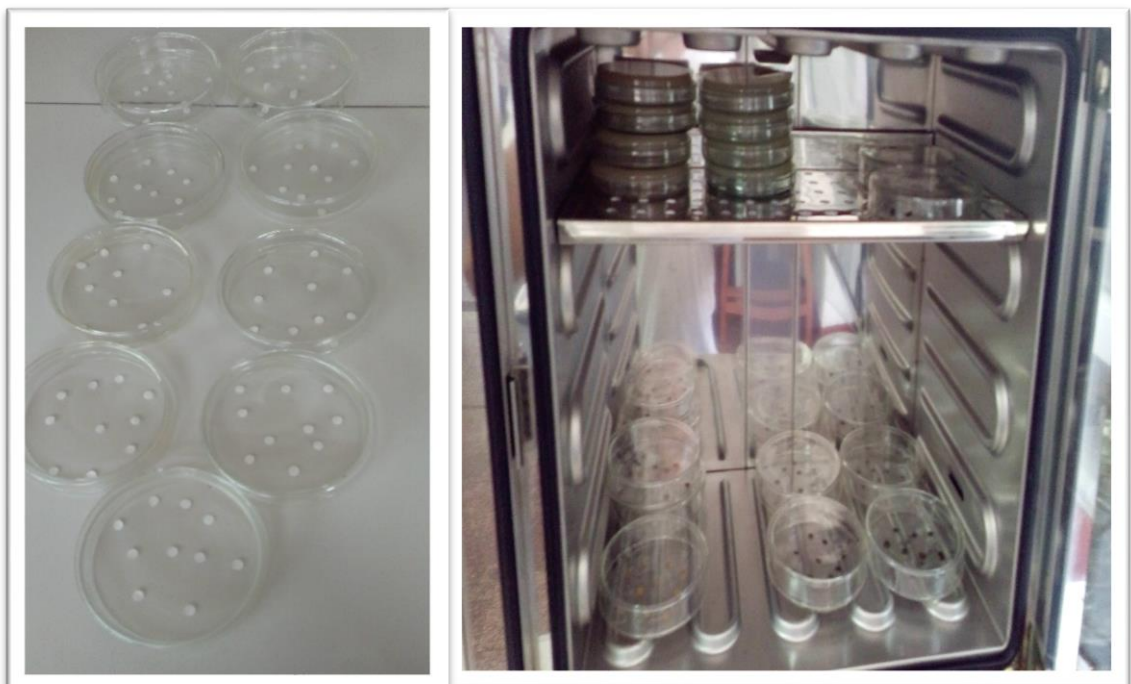


Foto N°16 Inoculación de las Placas.

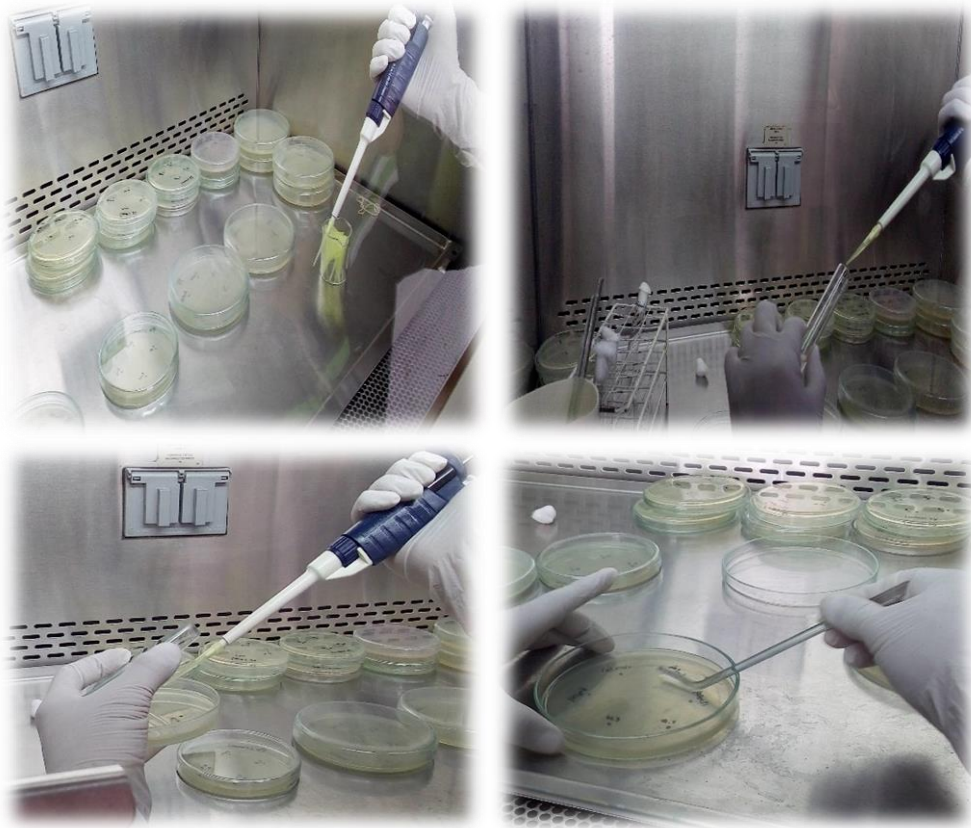


Foto N° 17 Aplicación de Discos

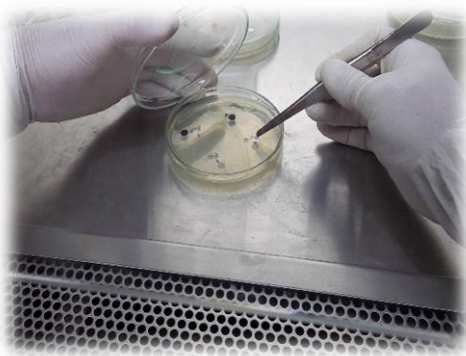


Foto N° 18 Discos para el ensayo

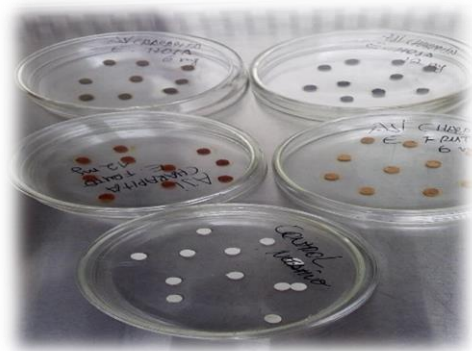


Foto N° 19 Medición de los halos

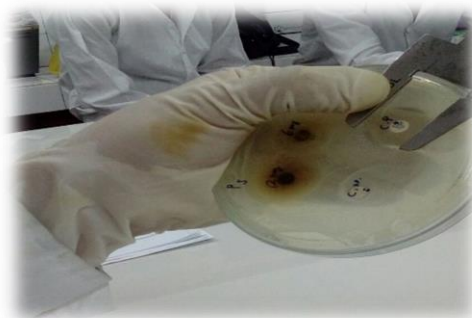


Foto N° 20. Resultados de E.C, Difusión en Disco.

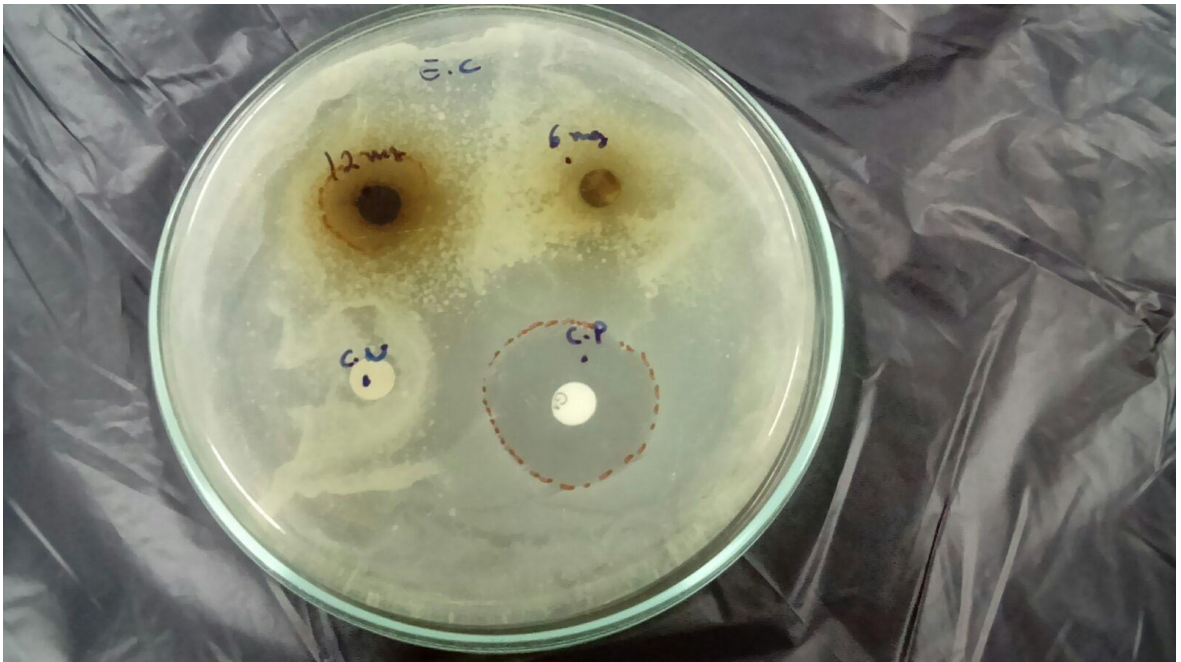


Foto N° 21 Ensayos para E.C
(E. De Hoja de *Capsicum spp.*)

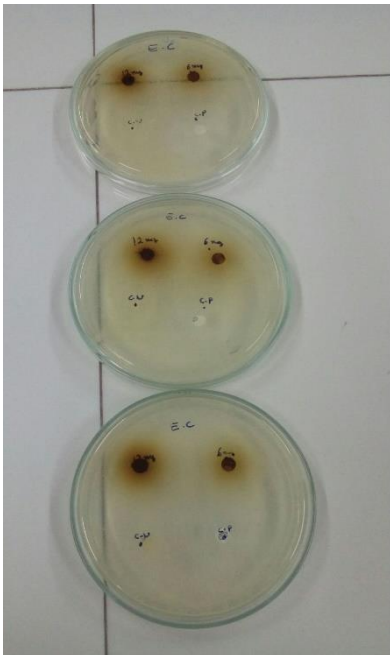


Foto N° 22. Resultados de *Salmonella tiphy*,
(E. De Hoja de *Capsicum spp.*)

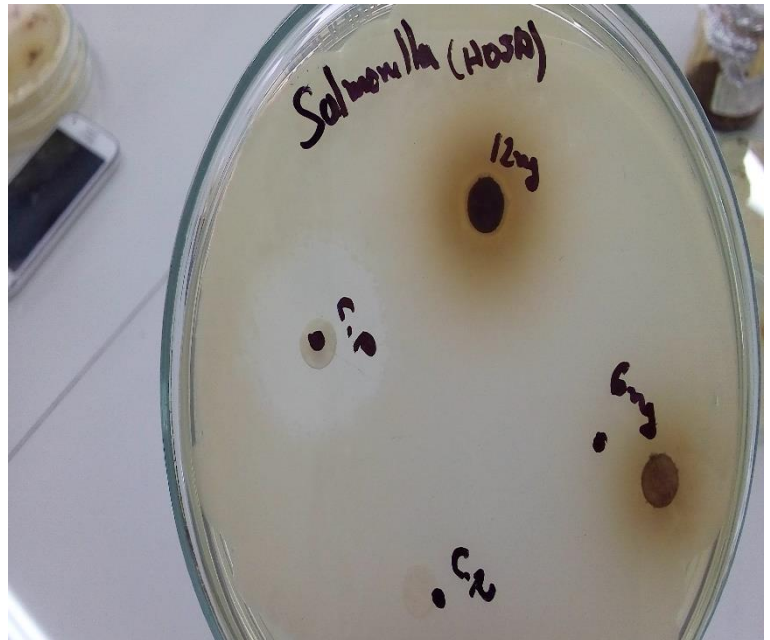


Foto N° 23. Resultados de *Salmonella tiphy* (Extracto de Hoja), Difusión en Disco.

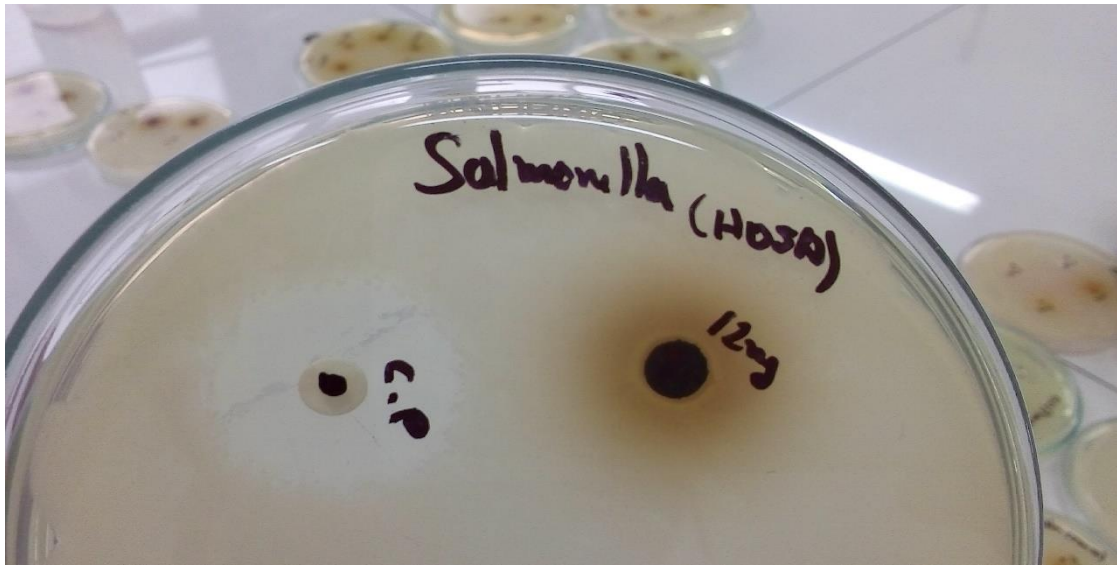


Foto N° 24. Resultados de *Pseudomonas aureginosa*, *staphylococcus aureus*. Difusión en Disco

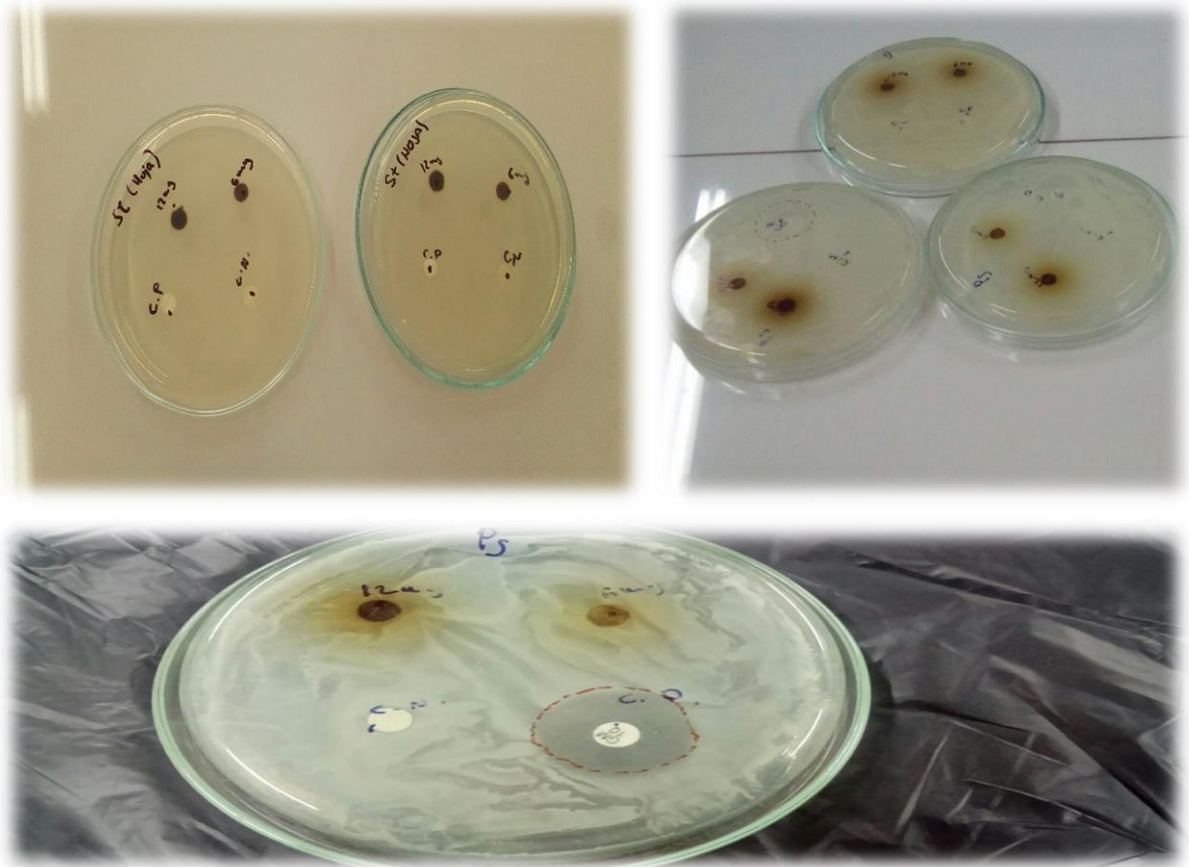


Foto N° 25. . Resultados de *Salmonella typhi* (Extracto de Fruto), Difusión en Disco.

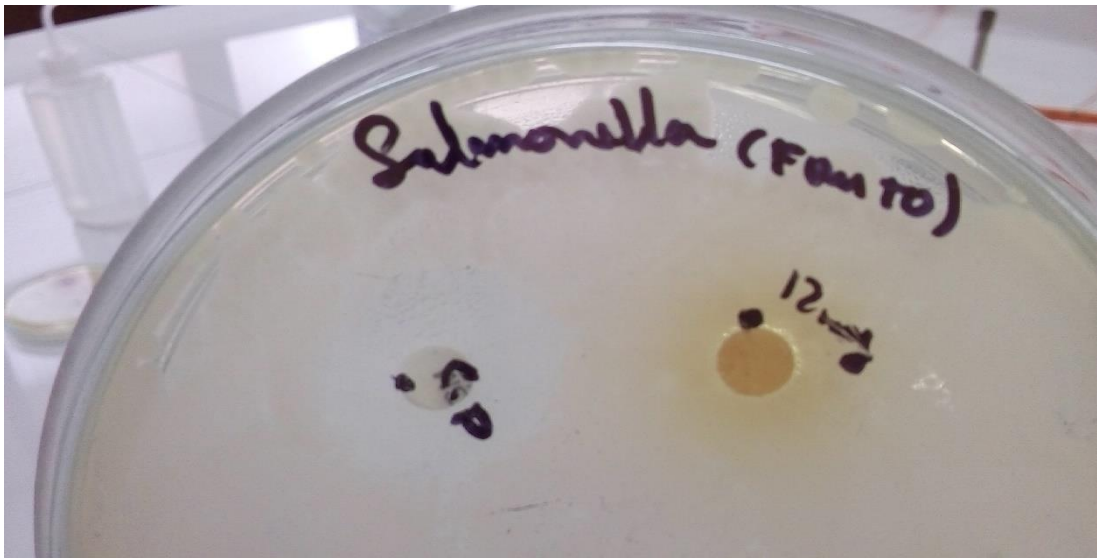
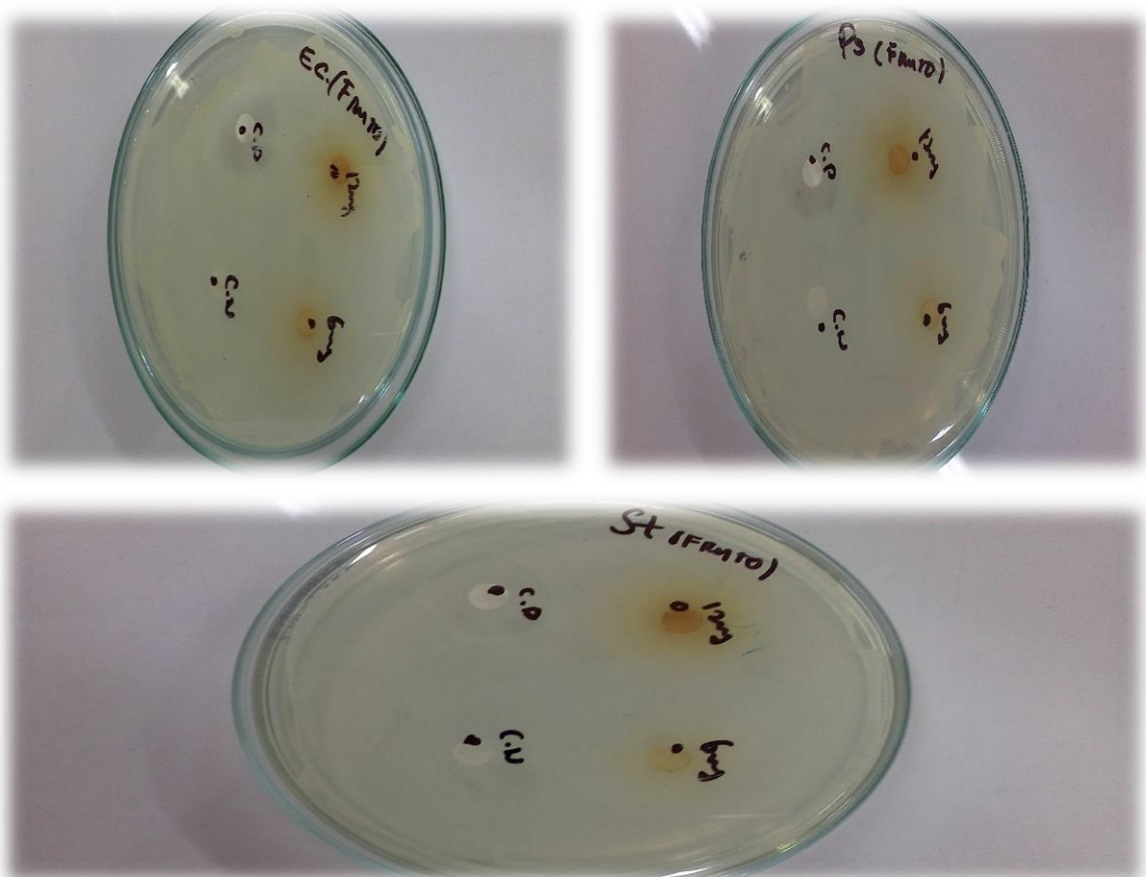


Foto N° 26. Resultados de *Pseudomonas aureginosa*, *staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. .Difusión en Disco





Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA Nº 65

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por los Bachilleres: **SALVADOR ENRIQUE RIVERA VASQUEZ y JOMEINY MARELY MONTENEGRO CARRANZA**; de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; son parte de la tesis titulada: **“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE HOJA Y FRUTO DEL *Capsicum frutescens* (ají charapita), MEDIANTE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN DISCO Y MACRODILUCIÓN FRENTE A 4 CEPAS BACTERIANAS”**. La cual fue verificado e identificado en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

Familia	Nombre Científico	Nombre Vulgar
SOLANACEAE	<i>Capsicum frutescens</i> L.	“ají charapita”

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 12 de Diciembre del 2014

Atentamente,


Blgo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA M.Sc.
Coordinador, AMAZ-CIRNA-UNAP

