

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS SEMILLAS DE *Carica papaya* L. “PAPAYA” *in vitro* FRENTE A LAS CEPAS ATCC *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*.

**Tesis presentada por la bachiller en
Farmacia y Bioquímica:**

CORDOVA CALLO, Lizet Juliana

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

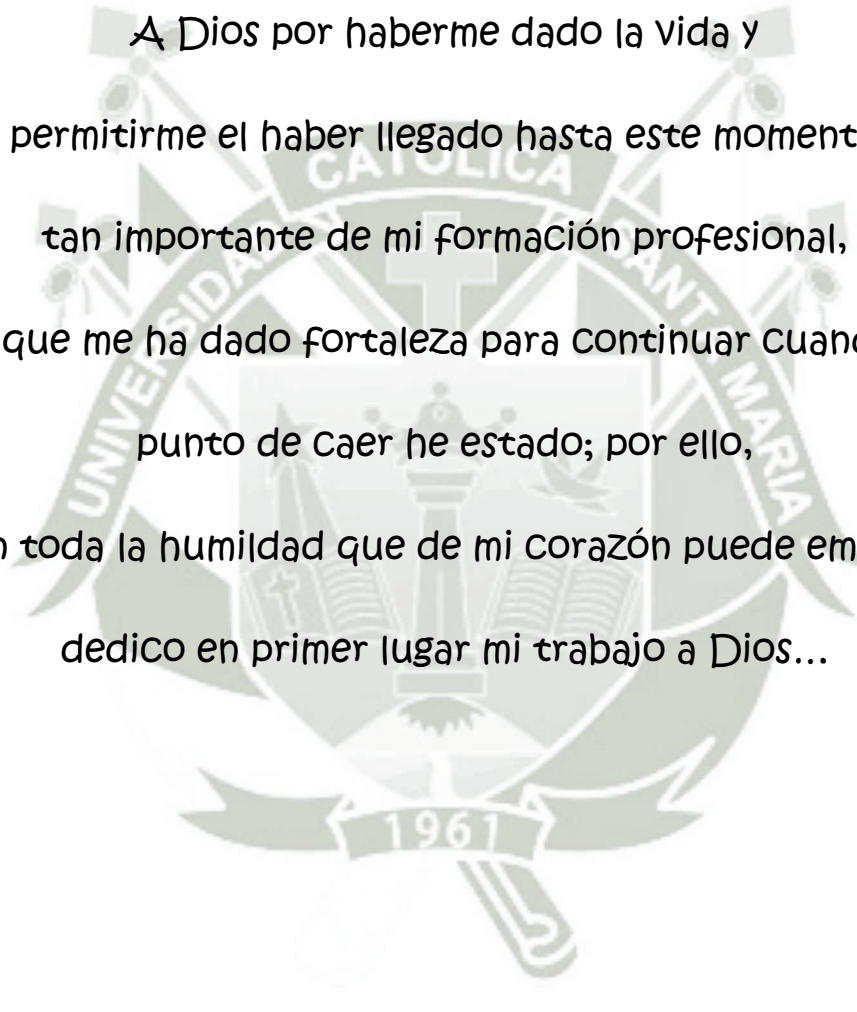
ASESOR:

Q.F. Fernando Torres Vela.

Arequipa – Perú

2013

AGRADECIMIENTOS



A Dios por haberme dado la vida y
permitirme el haber llegado hasta este momento
tan importante de mi formación profesional,
el que me ha dado fortaleza para continuar cuando a
punto de caer he estado; por ello,
con toda la humildad que de mi corazón puede emanar,
dedico en primer lugar mi trabajo a Dios...

DEDICATORIA

A mi madre Sonia, por ser la amiga y compañera que me ha ayudado a crecer, gracias por estar siempre conmigo en todo momento. Gracias por la paciencia que has tenido para enseñarme, por el amor que me das, por tus cuidados en el tiempo que hemos vivido juntas, por los regaños que me merecía y que no entendía. Con su demostración de una madre ejemplar me ha enseñado a no desfallecer ni rendirme ante nada y siempre perseverar a través de sus sabios consejos, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mi padre Julio, por acompañarme durante todo este arduo camino y compartir conmigo alegrías y fracasos. A pesar de las dificultades que podamos tener; sé que está orgulloso de la persona en la cual me he convertido. Gracias por tu comprensión, apoyo, confianza y amor.

A mi hermano Arom, por los momentos felices, que a pesar de la distancia y que no vivamos juntos se que se siente orgulloso de mí. Gracias hermanito por existir.

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Gracias por existir y estar siempre a mi lado, los AMO con todo mi corazón....!!!

Lizet Juliana

Agradecimiento a:

A mis amigos por pasar a mí
lado los momentos de mi vida
universitaria y estar siempre en las
buenas y en las malas.

Agradecimiento a la:

Facultad de Ciencias Farmacéuticas,
Bioquímicas y Biotecnológicas de la
Universidad Católica de Santa María.

Agradecimiento al:

Dr. Fernando Torres Vela.
Asesor de la presente Investigación.

Especial agradecimiento:

A todos mis maestros que
participaron en mi
Formación académica.

Agradecimiento a:

Todas las personas que me ayudaron
directa e indirectamente en la
realización de este proyecto.

ÍNDICE

CONTENIDO	Pág.
GLOSARIO DE TÉRMINOS	I
RESUMEN	1
ABSTRACT	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO I	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVOS	5
CAPÍTULO II.....	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1 <i>Carica papaya L.</i>	6
2.1.1. Historia.....	6
2.1.2. División Taxonómica	8
2.1.3. Descripción Botánica.....	8
2.1.4. Habitud.....	111
2.1.5. Composición Química	111
2.1.6. Usos Medicinales.....	14
2.1.7. Referencias Farmacológicas	155
2.1.8. Referencias Toxicológicas.....	188
2.2 METABOLITO SECUNDARIO	199
2.2.1. Importancia de los Metabolitos Secundarios.....	199
2.3 EXTRACTOS VEGETALES	19
2.3.1 Consistencia de los Extractos	20
2.3.1.1 Extractos blandos.....	20
2.3.1.2 Extractos firmes o de consistencia pilular	20
2.3.1.3 Extractos secos	20

2.3.1.4	Extractos fluidos	20
2.3.2	Características de los Extractos	20
2.3.3	Conservación de los Extractos.....	21
2.4	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	222
2.4.1.	Extracción por Soxhlet	23
2.5	CROMATOGRAFÍA.....	244
2.5.1.	Cromatografía de Capa Fina (CCF).....	244
2.6	AGENTES ANTIMICROBIANOS	255
2.6.1.	Definición y Características.....	255
2.6.2.	Antibacterianos de Comparación.....	255
2.7	DESCRIPCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO	266
2.7.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	266
2.7.2	<i>Escherichia coli</i>	277
CAPÍTULO III		299
MATERIALES Y MÉTODOS		299
3.1	LUGAR DE REALIZACIÓN.....	30
3.2	TIPO DE ESTUDIO	30
3.3	MATERIALES	30
3.3.1	Material Biológico.....	30
3.3.1.1	Semillas de <i>Carica papaya</i> L. “PAPAYA”	30
3.3.1.2	Obtención de las Cepas	30
3.3.2	Material de Laboratorio	30
3.3.2.1	Material de Vidrio	30
3.3.2.2	Equipos	301
3.3.2.3	Otros Materiales	301
3.3.2.4	Reactivos	312
3.3.2.5	Cepas Microbianas	323
3.3.2.6	Antibacterianos de Comparación.....	323
3.4	MEDIOS DE CULTIVO	333
3.4.1	Agar Mueller Hinton (MH)	333
3.4.2	Caldo Tripticasa Soya (TSB).....	334
3.4.3	Caldo peptonado	334

3.5	METODOLOGÍA	334
3.5.1	Procesamiento del Material Vegetal.....	334
3.5.1.1	Recolección	334
3.5.1.2	Estabilización	345
3.5.1.3	Secado.....	356
3.5.1.4	Fragmentación	356
3.5.1.5	Almacenaje	367
3.5.2	Método de Obtención del Extracto.....	367
3.5.3	Determinación del Rendimiento de la Extracción.....	388
3.5.4	Determinación de las Características Físicas.....	39
3.5.4.1	Análisis Organolépticos de las Semillas de <i>Carica papaya L.</i> “PAPAYA”.....	39
3.6	PROCESAMIENTO DE CEPAS EN ESTUDIO.....	40
3.6.1	Obtención de Cepas	40
3.6.2	Conservación de las Muestras	40
3.6.3	Pruebas de Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.6.3.1	Cultivo de Agar Sangre	40
3.6.3.2	Prueba de Agar Manitol Salado.....	40
3.6.3.3	Coloración Gram	41
3.6.3.4	Prueba de Catalasa.....	42
3.6.3.5	Prueba de Coagulasa.....	43
3.6.4	Pruebas de Identificación de <i>Escherichia coli</i>	43
3.6.4.1	Cultivo en EMB (Eosina-Azul de Metilo).....	43
3.6.4.2	Prueba de Catalasa.....	44
3.6.4.3	Coloración Gram	44
3.6.4.4	Prueba de Indol.....	45
3.7	ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, METANÓLICOS, DICLOROMETÁNICOS Y HEXÁNICOS DE <i>Carica</i> <i>papaya L.</i> “PAPAYA”	466
3.7.1	Marcha Fitoquímica Preliminar.....	466
3.7.2	Método de Identificación por separación de Cromatografía de Capa Fina (CCF).....	499
3.8	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	50
3.8.1	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	50

3.8.2	Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	533
3.8.3	Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por medio de Halos de Inhibición.....	533
3.9	MÉTODO ESTADÍSTICO	555
CAPÍTULO IV.....		577
RESULTADOS Y DISCUSIONES		577
RESULTADOS		58
CAPÍTULO V		¡Error! Marcador no definido.8
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS		¡Error! Marcador no definido.8
CONCLUSIONES		90
SUGERENCIAS		90
BIBLIOGRAFÍA		921
ANEXOS		998

GLOSARIO DE TÉRMINOS

- ATCC : American type culture collection.
- CCF : Cromatografía de capa fina.
- CMI : Concentración mínima inhibitoria.
- CBM : Concentración bactericida mínima.
- EMB : Eosina Azul de metilo.
- Ig G : Inmunoglobulina G.
- TL : Enterotoxina termolábil.
- TS : Enterotoxina termoestable.
- TSB : Caldo soya tripticasa.
- UV : Ultravioleta.

RESUMEN

Se realizó este presente trabajo de investigación para determinar la actividad antimicrobiana de las semillas de *Carica papaya L.* “PAPAYA” frente a las Cepas ATCC *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.

Se obtuvieron los Extractos Secos de las Semillas mediante el método de Extracción Soxhlet; posteriormente se realizó una Marcha Fitoquímica preliminar y una Cromatografía de Capa Fina (CCF) de los extractos donde se observó presencia de Taninos, Terpenos, Alcaloides y Flavonoides los que podrían proporcionar a la planta la actividad antimicrobiana frente a gérmenes Gram negativos y Gram positivos.

Luego se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el Método de Dilución de Caldo y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el Método de Dilución de Agar de las cuales se obtuvo en: *Escherichia coli* con extracto etanólico de semillas una CMI de 15.63 mg/mL y una CBM de 31.25 mg/mL; con el extracto diclorometánico de semillas se tiene una CMI de 62.5 mg/mL y una CBM de 125 mg/mL.

Para *Staphylococcus aureus* se obtuvo con extracto etanólico de semillas una CMI de 7.81 mg/mL y una CBM de 15.63 mg/mL; con el extracto diclorometánico de semillas se tiene una CMI de 31.25 mg/mL y una CBM de 62.5 mg/mL.

Luego se evaluó por el Método de Difusión de Agar la Actividad Antimicrobiana de los Extractos Secos de *Carica papaya L.* “PAPAYA” frente a microorganismos Gram negativos y Gram positivos con antibióticos de primera elección entre la cual tenemos discos de: Lincomicina 2 µg, Eritromicina 15 µg y Neomicina 30 µg, incluyendo la concentración del extracto 100 µg; mediante la medición de Halos de Inhibición.

Así se encontró que hubo diferencias significativas en los halos producidos por los antibióticos para *Escherichia coli*, ($p < 0.05$; F: 4528.00), para *Staphylococcus aureus*, ($p < 0.05$; F: 109); al realizar la prueba de Tuckey los mejores tratamientos fueron con: Lincomicina, Eritromicina y Extracto etanólico de semillas de *Carica papaya L.* para *Staphylococcus aureus*, seguidos por Lincomicina, Neomicina y Extracto etanólico de semillas *Carica papaya L.* para *Escherichia coli*.

Se concluye que la *Carica papaya L.* “PAPAYA” tiene efecto antimicrobiano.

ABSTRACT

This present work of investigation was realized to determine the antimicrobial activity of seeds of *Carica papaya L.* "PAPAYA" against the strains ATCC *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

It were obtained the dried extracts of the seeds by Soxhlet extraction method; later it was made preliminary phytochemistry march and chromatography of thin layer (CFL) of the extracts where the presence of Tannins, Terpenes, Alkaloids and Flavonoids which could provide to plant the antimicrobial activity against germs Gram negative and Gram positive.

Then that it was evaluated the antimicrobial activity by means of the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the Method of Dilution of Broth and the Bactericidal Minimal Concentration (CBM) by the Method of Agar's Dilution of which it was obtained in: *Escherichia coli* with Ethanolic Extract of seeds a CMI of 15.63 mg/mL and a CBM of 31.25 mg/mL; with Dichloromethane Extract of seeds has a CMI of 62.5 mg/mL and a CBM of 125 mg/mL.

For *Staphylococcus aureus* was obtained with Ethanolic Extract of seeds of a CMI of 7.81 mg/mL and a CBM of 15.63 mg/mL; with Dichloromethane Extract of seeds has a CMI of 31.25 mg/mL and a CBM of 62.5 mg/mL.

Then there evaluated for the Method of Agar's Diffusion the Antimicrobial Activity of Dried extracts *Carica papaya L.* "PAPAYA" opposite to microorganisms negatives Gram and positives Gram with antibiotics of first choice between which we have discs of: Lincomycin 2 µg, Erythromycin 15 µg and Neomycin 30 µg, including the concentration of extract 100 µg; by means of the meditation of Halos of Inhibition.

So it was found that there were significant differences in the halos produced by the action of the antibiotics to *Escherichia coli*, ($p < 0.05$; F: 4528.00), to *Staphylococcus aureus* ($p < 0.05$; F: 109); to carry out the test o Tuckey the best treatments were with: Lincomycin, Erythromycin and Ethanolic Extract of seeds of *Carica papaya L.* to *Staphylococcus aureus*, followed by Lincomycin, Neomycin, and extract ethanolic seeds *Carica papaya L.* to *Escherichia coli*.

It is concluded that the *Carica papaya L.* "PAPAYA" has antimicrobial effect.

CAPITULO I

GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la resistencia antimicrobiana se ha convertido en un problema mundial y se ha analizado con mayor interés en muchos países, reconociéndose oficialmente que el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos amenaza la salud pública.⁴⁵

Se sabe que las plantas han sido usadas por muchos cientos de años con una amplia variedad de propósitos. Así mismo se puede afirmar que presentan una complejidad de propiedades medicinales, entre ellas la acción antimicrobiana. Por tal motivo algunas plantas medicinales se pueden considerar como una posible alternativa de prevención de las enfermedades infecciosas.

La especie vegetal *Carica papaya* L. "PAPAYA", considerada como una planta cosmopolita de amplio cultivo en nuestro país, presenta diferentes constituyentes químicos distribuidos en toda su estructura: raíces, tallo, hojas, flores, frutos y semillas, lo que le confiere un indudable efecto medicinal.⁴⁸

La investigación científica, basada en el uso popular medicinal de esta especie, demuestra la relación que existe entre su composición química y su propiedad terapéutica, encontrándose antecedentes de la actividad antimicrobiana de las semillas, además de su buena acción ya conocida contra los parásitos intestinales.

De lo antes mencionado se planteó la presente investigación teniendo como objetivo determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólicos, metanólicos, diclometánicos y hexánicos de las semillas de *Carica papaya* L. "PAPAYA", para llegar a probar su eficacia en modelos *in vitro* frente a cepas de microorganismos patógenos, con el propósito de ampliar el conocimiento sobre su acción antimicrobiana.

HIPÓTESIS

Dado que en la medicina tradicional existen antecedentes del uso de “PAPAYA” en enfermedades infecciosas. ES PROBABLE que los extractos de *Carica papaya* L. “PAPAYA” presente propiedades antimicrobiana frente a cepas ATCC *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* *in vitro*.



OBJETIVOS

1. Obtener los extractos secos etanólicos, metanólicos, diclorometánicos y hexánicos de las semillas de *Carica papaya L.* “PAPAYA” mediante el Método de Extracción Soxhlet.
2. Identificar los metabolitos secundarios de los extractos etanólicos, metanólicos, diclorometánicos y hexánicos de *Carica papaya L.* “PAPAYA” mediante la realización de la Marcha Fitoquímica preliminar y Cromatografía de Capa Fina (CCF).
3. Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos de *Carica papaya L.* “Papaya” frente a las cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
4. Evaluar y comparar la actividad antimicrobiana “*in vitro*” de *Carica papaya L.* “Papaya” frente a cepas ATCC *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con los valores estándares de los halos de inhibición de tres antibacterianos: Lincomicina, Eritromicina y Neomicina.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 *Carica papaya L.*

2.1.1. Historia

Es una planta originaria de América tropical; sin embargo el centro de origen botánico de la especie cultivada no puede ser establecido con exactitud. Algunos autores consideran a las Antillas como su centro de origen y otros a México, América Central y aún al Perú como los lugares de donde proviene esta especie.¹

Según Linneo, Fernández había llamado a esta fruta "Higo de Mastuerzo", y tuvo la idea de clasificarla como un higo (carica en griego) y además se dice que las muestras que le llevaron provenían de la India, y especialmente de una región del Asia que se llamaba en ese tiempo *Carica*, bautizó este género con el vocablo *Carica* y lo apellidó con la denominación ya universal *Papaya*.³²

Los españoles se encargaron de llevarla a todo el trópico del orbe, la introdujeron en la República Dominicana (1525), la presentaron a los reyes de España (1535) y a las Filipinas (1550) diseminándola luego por el África, Malasia y por todas las Islas del Pacífico.³²

Desde fines del siglo XVIII, se sabía que algunos grupos indígenas sudamericanos usaban las hojas del papayo para envolver la carne de los animales que se cazaban con el objeto de hacerla más suave y sabrosa; otros acostumbraban frotar la carne dura con una tajada de papaya verde para que se ablande o añadían un pedazo de papaya verde al agua donde se hierve la carne. Edlicher y Vanquelin reportaron en 1756, la acción vermícida y digestiva del látex. Posteriormente Wurtyz en 1880, comunicó al mundo científico el descubrimiento de la Papaína una sustancia que Chittenden calificó como fermento vegetal en 1883.³²

Hubo después una serie de investigaciones y descubrimientos complementarios que progresivamente fueron atrayendo la atención de empresarios industriales.



Figura 2.1: *Carica papaya* L. “PAPAYA” ⁴²
Fuente: Sánchez, I. 1992

2.1.2. División Taxonómica

De acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist (1988) evaluado por el Herbario San Marcos del Museo de Historia Natural, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, se determinó como:

Reino	:	Plantae
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Viólales
Familia	:	Caricaceae
Género	:	Carica
Especie	:	<i>Carica papaya</i> L.

2.1.3. Descripción Botánica

Planta de naturaleza herbácea, de porte variado de 3 a 10 m. de altura. Es una planta frutal perennifolia, dioica con tallo único raras veces ramificado, frondosa en la parte superior y productora de látex. Es una especie polígama, diferenciando plantas femeninas, masculinas y hermafroditas.^{4, 32}

- **Tallo:** Es cilíndrico, hueco, desnudo, erecto y tiene un diámetro hasta de 30 cm.; en la base adelgazándose hacia arriba; es carnoso, poroso, y jugoso. Las cicatrices foliares grandes que presenta en la superficie del eje de la planta, marca la ubicación de hojas y frutos que se han desprendido.³²
- **Hojas:** Ubicadas en el extremo superior del tallo, en una especie de roseta espiral formando una corona o sombrilla, son alternas, simples y palmeadas sin estipulas, tienen largos pecíolos entre 50 a 90 cm. de diámetro, presenta entre 5 a 13 lóbulos; de matriz verde oscuro en el haz y verde claro en el envés, con pocas vellosidades de 70 cm. con un diseño redondo pero con profundas escotaduras y sus nervaduras son muy prominentes en el envés.³²
- **Raíces:** Consta de pocas ramificaciones, relativamente gruesas, las mismas que en su extremo distal están provistas de numerosas raicillas.³²

- **Flores:** Las flores emergen de las axilas de las hojas, son solitarias, pentámeras, nacen agrupadas en una inflorescencia cimosa hay masculinas, femeninas y hermafroditas.³²
 - o Flor Femenina: Es de forma redondeada y el estigma en forma de abanico. Son muy numerosas, pedunculadas, de color blanco, solitarias en las axilas foliares, cáliz pequeño, sésiles de 8cm de largo, corola con 5 pétalos angostos separados entre sí, triangulares de 5 a 7 cm. de largo, gineceo con ovario supero y ovoide, tri o penta carpelar, unilocular y 5 placentas con numerosos óvulos.
 - o Flor Masculina: Aparecen en ramilletes que están en el extremo del pecíolo (15 - 20 cm) de 4 cm de largo, de color blanco cremoso a veces verdosas o amarillentas; se compone de un tubo corto, en que abre 2/3 partes de su longitud formando 5 pétalos, ubicándose a su alrededor 10 estambres con anteras amarillas.
La corola es tubular (2- 3 cm.) con 5 lóbulos cortos y un pistilo rudimentario y muy delgado, careciendo de estigma.
Son flores fragantes muy atractivas para los insectos diurnos y nocturnos; ésta raras veces forman frutos o si los forma son deformes y carecen de valor comercial.
 - o Flor Hermafrodita: Puede ser flor pentandría, intermedia y alargada; son escasas y más anchas que las masculinas. Poseen 5 pétalos gruesos de color verde claro, de ápice pubescente, agudo; posee de 5 a 10 estambres. Los filamentos son largos, de dorso algo hendido, blancos adheridos al pétalo. Las anteras poseen un conector verde y encorvado; el ovario con 5 estigmas desiguales papilosos y gruesos. Los frutos pueden ser globulosos, alargados y deformes.
- **Fruto:** Tiene forma variada: esférica, periforme, ovalado, alargado y otras. Es una baya grande de hasta 40cm. de diámetro y 15 a más cm. de largo; tiene una piel delgada, savia lechosa, posee una pulpa dulce suave.

El peso varía desde 0.2 a 7.0 Kg.; el color de la pulpa puede ser de amarillo anaranjado pálido, anaranjado rojo hasta rosado oscuro. Como se observa en la Figura 2.2 la cavidad está casi vacía con las abundantes semillas cubriendo las paredes.³²



Figura 2.2: Fruto maduro de *Carica papaya* L.

- **Semillas:** Un fruto normal contiene hasta mil semillas ovoides de 5 a 7 mm de diámetro; negras y recubiertas por un arilo o envoltura mucilaginosa, gelatinosa que le da a la semilla una falsa cubierta lisa y brillante; con la superficie rugosa Figura 2.3. Es de sabor picante; el embrión es pequeño y los cotiledones están bien desarrollados.^{4,}

32



Figura 2.3: Semillas de *Carica papaya* L.

2.1.4. **Habitad**

Nativa de laderas bajas de los Andes orientales, la cuenca amazónica y Centro América en clima tropical húmedo en alturas hasta 1600 msnm. Introducida en los trópicos del viejo mundo, donde se produce comercial y artesanalmente.

El cultivo del papayo se extiende en la faja del planeta comprendido entre los 22° latitud norte y 32° latitud sur. En condiciones de ambiente ecológico favorable, calor y humedad apropiados, aproximadamente, a partir de los 10 meses de su plantada, crece satisfactoriamente en un rango de temperatura entre 22° C y 32° C. Las plantaciones con este frutal se efectúan en áreas protegidas de los vientos, con un rango de humedad relativa de 70% y 80%.³²

2.1.5. **Composición Química**

Dentro de su composición química debemos destacar su riqueza en vitaminas C y en provitamina A, en forma de *carotenos* dentro de las cuales tiene principalmente: Betacarotenos, Gamma carotenos, Épsilon carotenos y Criptoxantina, un compuesto que además de transformarse en vitamina A en nuestro organismo, presenta propiedad antioxidante, atribuyéndosele acción preventiva frente al cáncer y la enfermedad cardiovascular.

También destaca la presencia de vitaminas del grupo B como son vitamina B1 (Tiamina), B2 (Riboflavina) y B3 (Niocina).

En cuanto a los minerales, la papaya es rica en potasio y contiene cantidades apreciables de calcio, magnesio, fósforo y hierro.³⁸

También es una buena fuente de fibra (principalmente insoluble), que mejora el tránsito intestinal, evitando el estreñimiento y protege frente al cáncer de colon y la enfermedad cardiovascular.³⁸ La papaya contiene una alta proporción de agua, siendo por el contrario su contenido en nutrientes energéticos (hidratos de carbono, proteínas y grasa) muy bajo.

En papayas de pulpa roja, el pigmento o colorante natural más importante es el *licopeno*. En papayas de pulpa más amarillenta, los pigmentos más

abundantes son el grupo de las *criptoxantinas*. La intensidad del color depende de la concentración del pigmento, la cual varía de una localidad a otra.

En pulpas rojizas, los carotenos constituyen un 10% de los pigmentos, mientras que en pulpas anaranjadas alcanzan un 30%. La pulpa contiene muy pocos ácidos orgánicos (0.099%) y éstos son una mezcla de 50% de ácido cítrico y 50% de ácido málico.¹²

En el látex también encontramos compuestos como: Papaína, Lipasa, Pectasa, Quimopapaína y Carpaína. Semillas tenemos la Caricina, Carpasemina y Carpaína y las hojas la Carpaína

Tabla 2.1: Composición de la fruta de papaya

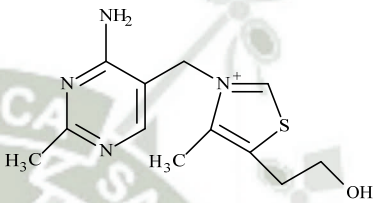
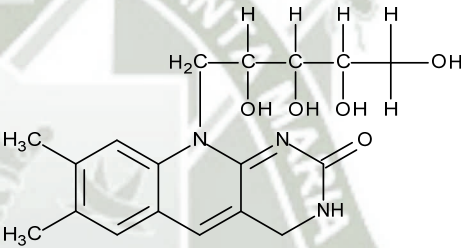
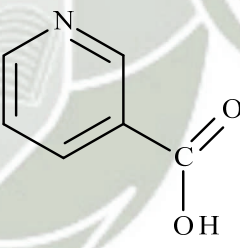
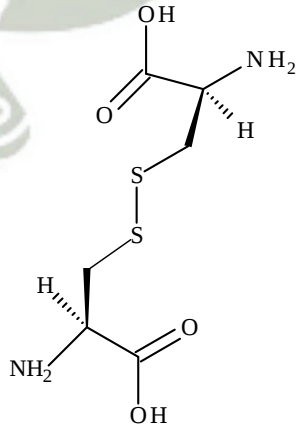
Contenido en 100gramos de porción comestible			
Componentes	Unidad de media	Fruto verde	Fruto maduro
CALORÍAS			
Valor energético	Cal	28.0	32.0
COMPONENTES MAYORES			
Humedad	%	89.7	88.8
Proteína	%	0.8	0.5
Grasa	%	0.1	0.1
Cenizas	%	0.4	0.5
Carbohidratos totales	%	8.5	9.9
Fibra	%	0.8	0.6
MINERALES			
Potasio (K)	Mg	195.0	257.0
Calcio (Ca)	Mg	45.0	24.0
Fosforo (P)	Mg	22.0	13.0
Hierro (Fe)	Mg	0.3	0.4
VITAMINAS			
Vitamina A	Ug	trazas	110.0
Tiamina (B1)	Mg	0.04	0.03
Riboflavina (B2)	Mg	0.03	0.03
Niacina (B3)	Mg	0.2	0.30
Ácido Ascórbico (C)	Mg	52.0	62.0

Fuente: FAO/INFOODS. Tabla de composición de Alimentos de América Latina

Los compuestos volátiles determinan el olor y el sabor de las frutas. Se han detectado unos 134 compuestos volátiles en la papaya, la mayoría identificados desde 1985. Los compuestos volátiles más importantes de la

pulpa de la papaya son el linool, el bencil isotiocianato y el ácido butanóico en la pulpa, encontrándose otros 20 compuestos de menor importancia.¹² El bencil isotiocianato le da a la papaya su olor fuerte característico. El linool es responsable del sabor y el aroma de la pulpa madura. Casi todos estos compuestos se encuentran conjugados en el fruto, liberándose cuando las células se rompen durante el corte o consumo de las frutas.¹²

Tabla 2.2: Principales compuestos químicos de la *Carica papaya L.* “Papaya”

Compuesto	Estructura
a) Tiamina	
b) Riboflavina	
c) Niacina	
d) Papaína	

Fuente: Elaboración propia

2.1.6. Usos Medicinales

➤ **Semillas:**

Es conocida su buena acción contra los parásitos intestinales, especialmente contra los ascárides se usa el polvo de las semillas secas 25-30g; una infusión de raíz (2-3 cucharadas al día); semilla fresca licuada con miel o el látex disuelto en agua (una cuchara grande para un adulto) puede seguir usándose con aceite de ricino u otro purgante.

Como *carminativo* el cocimiento de semillas secas y molidas (20g/L de agua) tomar un vaso 3-4 veces al día.^{10, 11}

➤ **Hojas:**

Las hojas de papaya en infusión se usa para controlar la disentería amebiana; las hojas secas se fuman contra el asma, en infusión o decocción se usan para afecciones cardíacas, infusión de hojas tiernas se aconseja como tónico cardíaco.

Como *galactogogo* el cocimiento de las hojas verdes de la planta madura (3-4 hojas en 2L de agua) tomar 2 vasos 3 veces al día.¹¹

➤ **Látex:**

El látex es utilizado para el tratamiento tónico de diversos procesos de la piel; se usa el látex (o un trozo de papaya verde, o una porción de hojas mojadas) para extirpar verruga, suavizar un callo, hacer desaparecer una peca o atacar el nido de una nigua. En preparación con glicerina se usa para aliviar la soriasis, controlar la hiperhidrosis de las manos o axilas. Puro o diluido se usa para limpiar heridas o llagas infectadas y necróticas. Una pincelación de la faringe con una mezcla de látex y glicerina ayuda a controlar la presencia de costras, secreciones en la difteria y otras faringitis graves.²⁹

Se usa tópicamente para tratar afecciones dérmicas (eczemas, erisipela, tinea), induraciones, cáncer y tumores. Por vía oral se usa para tratar esplenomegalia, catarro intestinal y parásitos intestinales (oxiuros, tricocéfalos, tenias). También se puede usar para el mismo fin el látex diluido en alcohol.¹¹

El cocimiento de cogollos se usa para sacar las lombrices y tratar paludismo y dispepsia.

➤ **Fruto:**

Se alega también que el fruto verde molido con sus semillas y disuelto en cerveza para quitarle el mal sabor, es un buen *emenagogo* y puede proveer el aborto; en otros empleos menos generalizados se prepara jarabes para la tos a partir de la fruta madura o de una infusión de las flores, el jarabe también se usa por vía oral contra afecciones intestinales y respiratorias (asma, catarro difteria, tos, tuberculosis), enfermedades venéreas, fiebre, hipertensión, locura, oliguria; se dice que el fruto mejora la digestión y previene el reumatismo.

En Loreto las mujeres consumen media papaya madura en ayuna en los días de la menstruación con fines anticonceptivos.⁴³

➤ **Raíz:**

La maceración o infusión de raíz se usa para uretritis, sífilis y contener hemorragias, se dice que en infusión concentrada puede ser abortivo.

En otros usos medicinales se indica como *sedante*, el cocimiento de raíces gruesas y añejas (20g/L de agua) tomar un vaso 3 veces al día.¹¹

➤ **Flores:**

Se usan las flores masculinas en infusión (1 taza de flores en 3 tazas de agua), tomar 1 taza 3 veces al día 3 días antes de la menstruación.

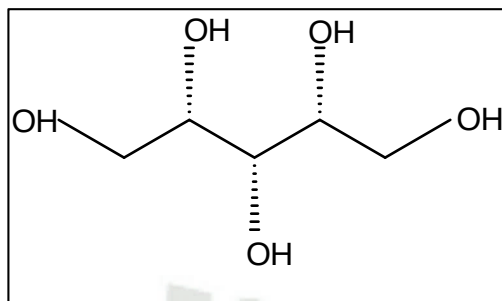
También se usa el jarabe de flores para tratar ictericia, bronquitis y otras afecciones respiratorias.

Se le atribuye propiedad amebicida, anodina, antibiótica, antiflogística, bactericida, cardiotónica, carminativa, colagoga, digestiva, diurética, emenagogo, estomáquica, expectorante, fungicida, insecticida, laxante, pectoral, pediculicida, proteolítica, tónica y vermífuga.¹¹

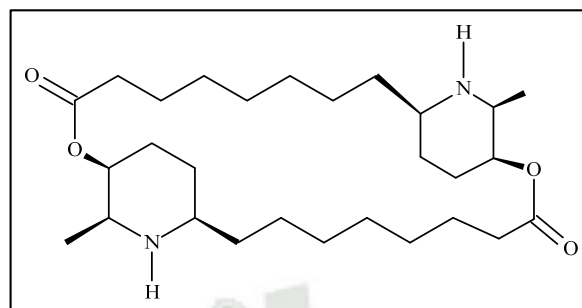
2.1.7. Referencias Farmacológicas

El *xilitol* es un diurético reconocido, antihelmíntico y productor de los niveles de bilirrubina en ratas experimentalmente intoxicadas por inyecciones saponósicas.⁴⁹ En **Alemania** y **Checoslovaquia** usan especialidades farmacéuticas como TROMALYT y UROGAX para el tratamiento de infecciones urinarias resistentes.⁴⁹ En **África** se demostró

la actividad antihipertensiva de la papaya a dosis de 0.01mg por el principio activo *carpaína*, la misma que inhibe *in vitro* cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.⁴⁹



Xilitol



Carpaína

Estudios antibacterianos demuestran que el extracto de semillas y fruto tierno y maduro son activos contra bacterias Gramnegativas; los extractos etanólicos de hojas son activos contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se tienen reportes sobre los extractos acuosos de varias partes del fruto que no tienen actividad antimicrobiana.⁴⁹

Estudios de **Nigeria** mostraron que el extracto etanólico de la hoja seca administrado por vía intraperitoneal en ratas tiene efecto *analgésico* a la dosis de 20mg/Kg, *anticonvulsivante* en dosis de 20mg/Kg y 100mg/Kg, *relajante* del músculo esquelético a la dosis de 50mg/Kg, *cronotropo* positivo a 20mg/Kg y *tranquilizante* a la dosis de 10mg/kg.⁴⁹

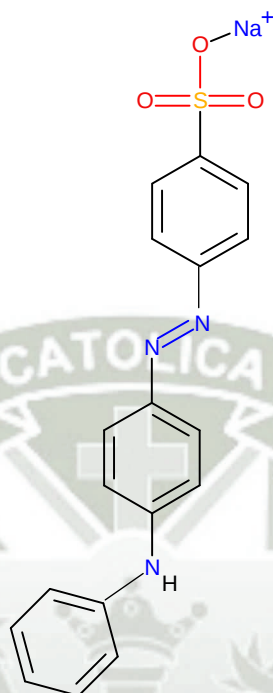
También presenta *actividad antifúngica in vitro* especialmente frene a *Candida albicans* (CL₁₀₀=138ug/ml).⁴⁹ Los extractos butánolico y en alcohol isopentílico respectivamente ejercen una *actividad espasmolítico* sobre el íleon aislado de cobayo a la concentración de 0.2mg/mL.⁴⁹

El fruto y la semilla por vía intraperitoneal en la rata tienen efecto *anticonceptivo* por impedir la implantación del huevo o cigoto en el útero.

⁴⁹

Así mismo se reporta que en estudios con animales, la ictericia provocada por la administración de saponósidos desapareció rápidamente al administrar el extracto de *Carica papaya L.*⁴⁹

De las semillas frescas machacadas se ha aislado la aglicona de glucotropaeolin bencil isotiocianato (BITC) que tiene actividad *bacteriostática, bactericida y fungicida*; la dosis efectiva única es de 4-5 g (25-30 mg BITC). La *tropaeolina* también ha sido usada como agente bactericida en infecciones intestinales y urinarias en dosis de 6 µg.⁴⁹



Tropaeolina

En una investigación realizada en **Japón**, se indica que las semillas y frutos de la papaya presentan actividad antibacteriana y antioxidante.¹⁹

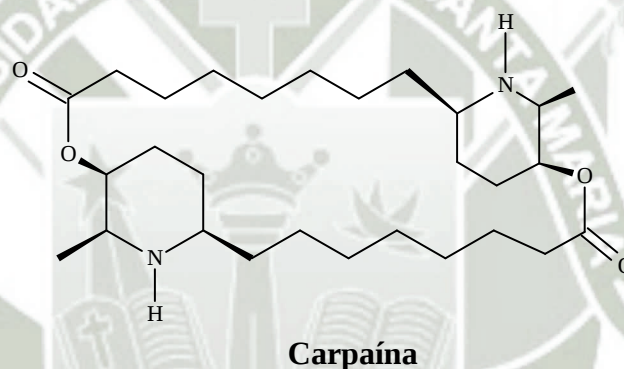
Mientras que en **Camerún** demostraron la actividad antimicrobiana frente a especies de Salmonella.³³

Por otro lado en **Jamaica**, mediante un estudio realizado sobre el efecto antibacteriano de los frutos y semillas de *Carica papaya L.*, se demostró que estas últimas son portadoras de una actividad antibacteriana que inhibe el crecimiento de los microorganismos Grampositivos y Gramnegativos. Así mismo se produjo zona de inhibición alguna por parte de los extractos de epicarpio y endocarpio.³⁵

También se ha comprobado la acción antiparasitaria de las semillas frente al parásito nematodo *Haemonchus contortus* en una investigación realizada al Oeste de África y en Perú frente a *Áscaris lumbricoides*.^{30, 34} Así mismo se relaciona la actividad antihelmíntica con el contenido de bencilisotiocianatos.³⁹ A su vez se considera a la papaya como una buena alternativa para las quemaduras en pacientes pediátricos en el caso de infecciones, tejidos necrosados y rupturas de implantes en la piel.⁴⁴

2.1.8. Referencias Toxicológicas

La *carpaína* actúa a nivel del corazón como los digitálicos y es susceptible de provocar fuertes dosis de parálisis y depresión cardíaca.⁴⁹



La *quimopapaína* tiene un efecto inmunogénico marcado en el hombre, por lo que se ha limitado su utilización clínica en instilación *in situ* (tratamiento de hernias discales), produce choque anafiláctico en el 1% de los pacientes sometidos a dicho procedimiento.

En el perro la vía intradiscal fue bien tolerada a dosis de hasta 25mg/kg, no se observó ninguna toxicidad después de varios meses. Se ha establecido la DL_{50} por vía intravenosa en el *ratón*: 79mg/kg., en la *rata*: 120mg/kg, en el *conejo*: 15mg/kg y en el *perro*: 17mg/kg. Además la *papaína* provoca enfisema pulmonar por inhalación en el perro, en el hámster y en la rata.⁴⁹ La DL_{50} del extracto acuoso de semilla, en el ratón, es superior a 10ml/kg.⁴⁹

2.2 METABOLITO SECUNDARIO

Son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales. Los metabolitos son moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con roles muy importantes en el reino vegetal, pueden suponer una ventaja competitiva considerable.⁴⁶

2.2.1. Importancia de los Metabolitos Secundarios

A lo largo de la historia, los metabolitos secundarios de las plantas han sido utilizados por la humanidad convirtiéndose en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas, que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre.⁴⁶

Así mismo es importante destacar que a pesar de todos los esfuerzos de naciones, instituciones gubernamentales y no gubernamentales e investigadores en aumentar el nivel y el caudal de conocimientos adquiridos sobre las metodologías de transformación secundaria (de frutos, flores, semillas, hojas y tallos) y de la identificación y caracterización de los metabolitos secundarios de especies vegetales priorizadas, en la actualidad sólo unos pocos metabolitos se utilizan de forma industrial, por lo que se ha creado la necesidad de generar opciones y alternativas de producción enfocadas al uso sostenible de todos aquellos recursos vegetales disponible en el entorno trabajando activamente en la detección y caracterización de sustancias producidas por diferentes especies promisorias que pueden tener aplicación en la industria (cosmética, farmacéutica, textilera y agroalimentaria).⁴⁶

2.3 EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca.⁴¹

2.3.1 Consistencia de los Extractos

Alzate en 1990, descubrió la consistencia ideal que debían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos.³

2.3.1.1 Extractos blandos

Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa.³

2.3.1.2 Extractos firmes o de consistencia pilular

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos.³

2.3.1.3 Extractos secos

Anteriormente se les conocía con la denominación de "sales esenciales". Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5 al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. La forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas (Belga, Norteamericana, noruega y mexicana), pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extractos. Golaz (1973) les dio el nombre de extractos unitarios y los recomienda para la preparación de tinturas y jarabe.³

2.3.1.4 Extractos fluidos

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada.³

2.3.2 Características de los Extractos

Estudios realizados por Corpas y Barrero entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos:

- a) Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- b) Algunos son de color café amarillento, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- c) Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- d) Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- e) La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- f) Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- g) Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico del alcohol con el cual han sido preparados.
- h) Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. Cordell (1995) propuso ensayos generales para someter a los extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final. Estos trabajos fueron remontados por Corpas, quien propuso realizar ensayos de identidad a los extractos obtenidos.³

2.3.3 Conservación de los Extractos

Según Corpas y Barriga (1993), la conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

- a) Se deben conservar protegiéndolos de la luz.
- b) Los envases deben estar bien tapados.
- c) Se deben conservar en un medio ambiente seco.³

Desde luego, son numerosos los métodos que se han indicado para la conservación de los extractos. Para mayor comodidad ellos se pueden clasificar, en dos categorías.³

En el primer grupo leñemos aquellos a los cuales no se les ha adicionado ninguna materia extraña. Al segundo grupo, por el contrario, pertenecen aquellos extractos que han sido objeto de la adición de productos extraños, de naturaleza físico-química definida. ³

2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Deben obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias, presentes en la planta y al propósito de la investigación. En el caso de búsqueda de sustancias para la comprobación de actividad biológica, la extracción del material vegetal debe hacerse en agua o con solución disotónica (0.9 % NaCl). Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces es conveniente desengrasar el material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es generalmente más eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua. ²

Los métodos de extracción Figura 2.4 se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en el material vegetal, así, para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan como solventes el éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, el etanol y la acetona .

Las extracciones pueden hacerse por "*extracción continua en soxhlet*", en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal.

Por "*reflujo*", el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal.

Y por "*maceración en frío*", el material se mezcla con el solvente triturado continuamente en frío. ²

La extracción puede clasificarse:

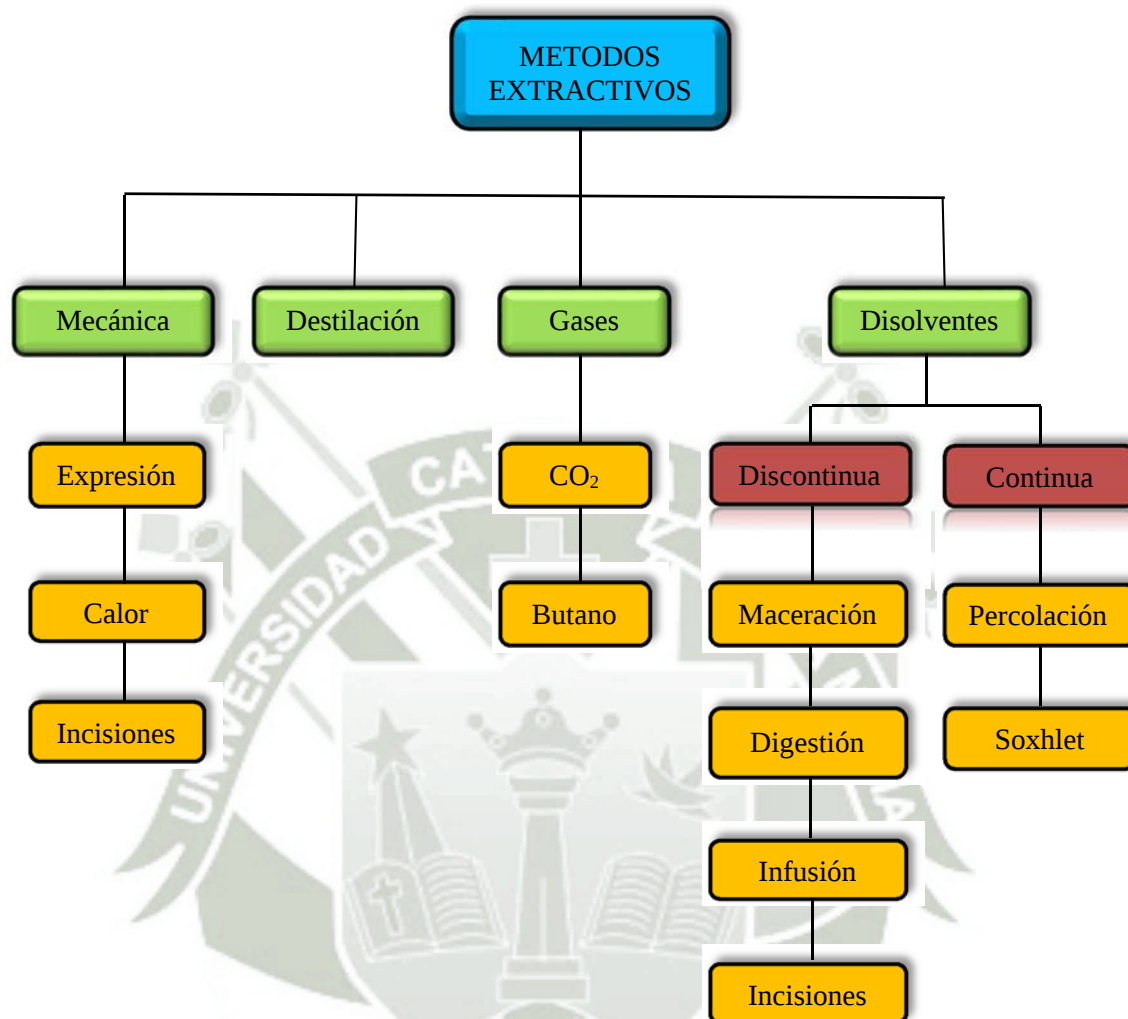


Figura 2.4: Clasificación de Métodos de Extracción
Fuente: Kuklinski, "Farmacognosia" ²⁶

2.4.1. Extracción por Soxhlet

Es un método de extracción equivalente a una digestión y a una percolación, es un sistema cerrado y que permite el flujo del solvente en ciclos. Los equipos de Soxhlet constan de tres partes: un reservorio de solvente en la parte inferior, el cual es un balón, donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición. La segunda parte es un soporte para el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro. Finalmente

se tiene un refrigerante o condensador el cual recibe los vapores del solvente que vienen desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente sobre el material vegetal. Cuando el soporte que mantiene el material vegetal se llena de solvente recién destilado, se activa un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continua en ebullición. Cada llenada del solvente en el soporte de muestra es un ciclo y pueden repetirse varios ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra.^{26, 47}

2.5 CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica de separación de los componentes de una mezcla debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria (Un sólido poroso o un líquido retenido en soporte sólido) cuando la mezcla es transportada por una fase móvil (eluyente: puede ser líquido o gaseoso). Las técnicas cromatográficas, además de ser métodos para purificar y aislar productos, tienen utilidad cualitativa (identificación).⁵

La más utilizada en química orgánica es la cromatografía líquido-sólido en sus dos variantes: Cromatografía en Columna (CC) y Cromatografía en Capa Fina (CCF).

2.5.1. Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Es una técnica analítica de gran utilidad para la determinación de la complejidad y composición de un extracto. La Cromatografía en Capa Fina usa como fase estacionaria un sólido poroso dispuesto, formándose una capa delgada, sobre una placa metálica o de vidrio con gel de sílice.¹⁷

Una vez se ha depositado la muestra sobre la placa se coloca verticalmente en un recipiente hermético que tiene el eluyente (fase móvil) en el fondo del recipiente. La fase móvil fluye en sentido ascendente arrastrando los diferentes componentes de la mezcla a velocidades diferentes, con lo que se consigue una separación.^{15, 17}

Las sustancias que se están analizando pueden controlarse visionando las placas en el visible o en el ultravioleta, o utilizando reactivos reveladores específicos para los distintos tipos de sustancias.¹⁵

2.6 AGENTES ANTIMICROBIANOS

2.6.1. Definición y Características

Los antibacterianos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlos.

Se han identificado cientos de antibacterianos y muchos han sido llevados a la etapa en que tienen utilidad en la terapia de enfermedades infecciosas. Los antibacterianos muestran diferencia notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción.²¹

2.6.2. Antibacterianos de Comparación

- Para *Staphylococcus aureus*:
 - Eritromicina 15 µg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)
 - Lincomicina 2 µg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)
- Para *Escherichia coli*:
 - Lincomicina 2 µg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)
 - Neomicina 30 µg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)

2.7 DESCRIPCIÓN DE LAS BACTERIAS EN ESTUDIO

2.7.1 *Staphylococcus aureus*

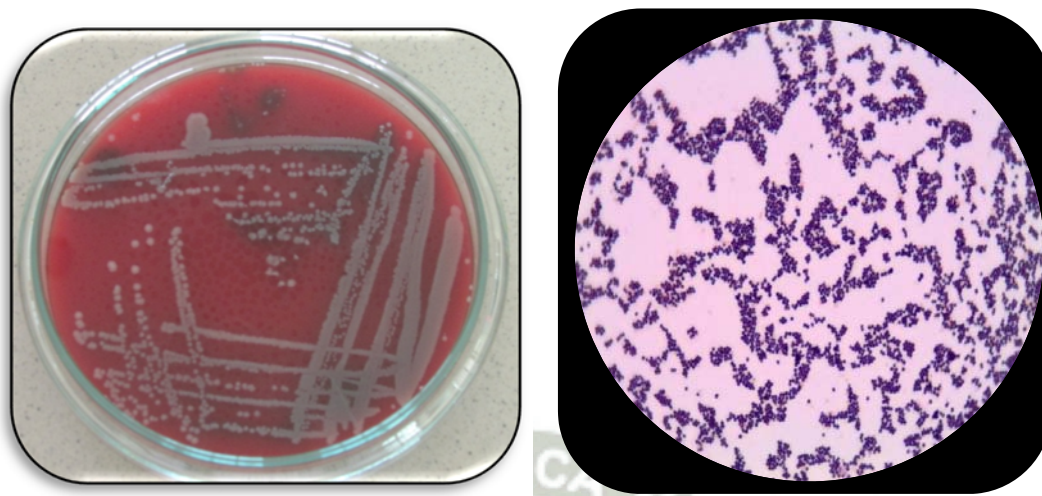


Figura 2.5: Características Macro y Microscópicas de *Staphylococcus aureus*.

Son cocos Gram positivos de 0,5 - 1 mcm de diámetro, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo. Crecen a una temperatura óptima de 37°C y se desarrollan mejor en un pH ligeramente alcalino de 7.6 la adición de glucosa favorece el crecimiento.³⁶

Forma parte de la flora normal de mucosas y piel e intervienen en procesos patológicos diversos como infecciones supurativas e intoxicaciones alimenticias.² Más del 95% de los *Staphylococcus aureus* producen proteína A, la cual puede estar asociada a la célula o al medio extracelular, con una importante afinidad por la fracción Fc de la Ig G. La presencia de proteína A o coagulasa es de gran utilidad clínica para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies de Estafilococos.⁵⁰ *Staphylococcus aureus* es una bacteria que puede causar infección en todos los grupos de edad tanto en forma esporádica como epidémica y se ha identificado como una de las principales causas de infección de heridas quirúrgicas. Su principal forma de transmisión es por contacto.⁵⁰

La capacidad de *S. aureus* para fermentar los azúcares como maltosa, manitol, trehalosa es positiva. La producción de una nucleasa termoestable

es un buen indicador de la presencia *S. aureus*, al igual que la conversión de nitratos a nitritos.³⁶

Elaboran diversas enzimas: proteasas, lipasas, fosfatasas, gelatinasas, catalasas y coagulinas.³⁶

En cultivo puro resisten una concentración de fenol al 1% durante 15 minutos, pero solo los mata una concentración al 2%. Soportan el calor húmedo a 60 °C durante 30 minutos. Muchas cepas de *S. aureus* toleran concentraciones altas de cloruro de sodio (7,5 a 10%), y son fácilmente inhibidos por colorantes como el violeta de genciana.³⁶

2.7.2 *Escherichia coli*

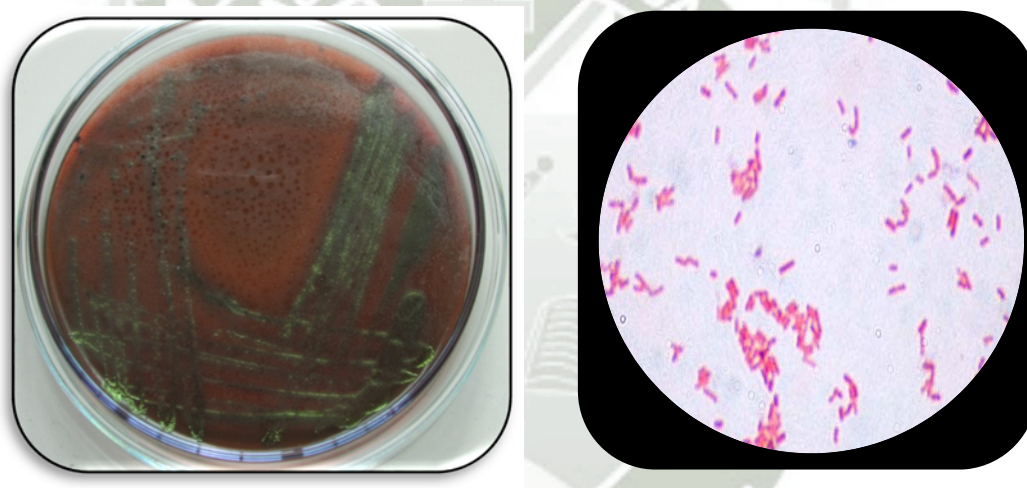


Figura 2.6: Características Macro y Microscópicas de *Escherichia coli*.

Es un bacilo de 1- 3 μm por 0.5 μm , que se presenta sólo, en pares, en cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil (por flagelos peritricos), aunque existen variantes inmóviles no flageladas. No forma esporas y por lo general es no capsulado y Gram negativo. En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente; en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor.³⁶

En agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm convexas, de borde continuo o un tanto ondulado, brillantes y de coloración blanca un poco amarillenta. Con producción de ácido y gas, fermenta la lactosa y un gran número de

carbohidratos; algunas cepas son lactosa negativas. Es indol positiva, rojo de metilo positiva, Voges Proskauer (VP) negativa y no utiliza el citrato. Produce H₂S en determinados medios.

Acidifica y coagula la leche. Pueden necesitarse pruebas adicionales en casos de *E. coli* aislada de colitis hemorrágicas, las cuales son típicamente negativas a sorbitol.

Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero posee propiedades de desarrollo en una gama bastante amplia de temperaturas; el pH favorable es de 7 alguna cepas producen hemolisina.³⁶

Se ha considerado inicialmente sólo como un habitante del intestino, desde hace cerca de tres décadas se empezó a estudiar su poder enteropatógeno. Se ha visto que las cepas toxigénicas de *E. coli* pueden producir una enterotoxina termolábil (TL), una termoestable (TS) o ambas. La TL es una proteína de alto peso molecular, que bioquímicamente es muy similar a la toxina de *Vibrio cholerae*, activando la adenilciclase. Es inactivada a 60°C. La TS es una pequeña molécula relativamente estable al ser hervida.

40

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE REALIZACIÓN

La parte experimental del presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios H-102 y H-402 de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María.

3.2 TIPO DE ESTUDIO

Investigación experimental.

Investigación descriptiva.

Investigación longitudinal.

3.3 MATERIALES

3.3.1 Material Biológico

3.3.1.1 Semillas de *Carica papaya* L. “PAPAYA”

En el presente estudio se utilizaron semillas de “Papaya” las cuales fueron adquiridas en el distrito de Juan Guerra, provincia de Tarapoto, departamento San Martín.

3.3.1.2 Obtención de las Cepas

Las Cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron obtenidas del Consorcio Industrial de Arequipa.

3.3.2 Material de Laboratorio

3.3.2.1 Material de Vidrio

- o Bagueta
- o Matraces de 10 mL, 100 mL, 200 mL y 250 mL
- o Mortero
- o Pipetas de 0.5mL, 1mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL

- o Placas petri.
- o Probeta de 50 mL y 100 mL
- o Tubos de ensayo
- o Vaso de precipitado de 100, 250 y 500 mL
- o Capilares sin Heparina.
- o Cuba Cromatográfica
- o Láminas Porta y Cubre Objetos

3.3.2.2 Equipos

- o Autoclave
- o Equipo de Soxhlet
- o Balanza Digital Scout Pro
- o Balanza Analítica (Modelo A-160 Benver Intrument Company)
- o Baño María
- o Bomba de Aire
- o Estufa (Fisher, Scientific Serie 500)
- o Incubadora
- o Rota-evaporador (Buchi),Modelo: R-114
- o Equipo de Luz Ultravioleta
- o Microscopio
- o Refrigerador (Coldex Autofront)
- o Cocina eléctrica (Gallenhamp)

3.3.2.3 Otros Materiales

- o Asa de Kolle
- o Espátula
- o Micropipeta
- o Mechero Bunsen
- o Hisopos
- o Papel Filtro Rápido WHATMAN
- o Algodón
- o Papel Aluminio
- o Papel Kraf
- o Pinzas

- o Soporte Universal
- o Frascos de vidrio color Caramelo
- o Gasa
- o Gradilla
- o Guantes Quirúrgicos
- o Jeringas de 1 mL
- o Malla de Asbesto
- o Trípode
- o Barbijos
- o Cámara digital

3.3.2.4 Reactivos

- o Etanol al 99% (Diproquim, Q.P)
- o Metanol al 99% (Merck, Q.P)
- o Diclorometano (Merck, Q.P.)
- o Hexano (Merck, Q.P.)
- o Ácido Sulfúrico 0,36N (Merck, Q.P)
- o Cloruro de Bario 0,048M (Merck, Q.P)
- Marcha Fitoquímica
 - o Tricloruro Férrico (Merck, Q.P)
 - o Anhídrido acético (Merck, Q.P)
 - o Ácido sulfúrico (Merck, Q.P)
 - o Hidróxido de sodio NaOH 5%
 - o Gelatina (UCSM H-102)
 - o Ácido clorhídrico (Merck, Q.P)
 - o Shinoda (UCSM H-102)
 - o Reactivo de Dragendorft (UCSM H-102)
 - o Vainillina (UCSM H-102)
- Cromatografía
 - o Acetato de etilo (Merck, Q.P.)
 - o Ácido acético (Merck, Q.P.)

- o Ácido fórmico (Merck, Q.P.)
- o Dragendorft A y B (UCSM H-102)
- o Amoniacó NH_3 (Merck, Q.P.)
- o Vainillina 1% con etanol (UCSM H-102)
- o H_2SO_4 5% en solución etanólica (UCSM H-102)
- o Ácido Sulfúrico cc. (Merck, Q.P.)
- o Tricloruro Férrico (Merck, Q.P.)

➤ Bateria para Coloración Gram.

- o Alcohol - Acetona
- o Cristal Violeta
- o Safranina
- o Solución de Yodo

3.3.2.5 Cepas Microbianas

- o *Escherichia coli* ATCC 25922
- o *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.3.2.6 Antibacterianos de Comparación

➤ Para *Staphylococcus aureus*:

- Eritromicina 15 μg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)
- Lincomicina 2 μg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)

➤ Para *Escherichia coli*:

- Lincomicina 2 μg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)
- Neomicina 30 μg (Discos BBL Sensi- Disc- Antimicrobial Susceptibility Test Discs)

3.4 MEDIOS DE CULTIVO

3.4.1 Agar Mueller Hinton (MH)

Carece de inhibidores que le permiten el crecimiento de gran cantidad de microorganismos, tanto Gram positivos Gram negativos. (Anexo N°2)

3.4.2 Caldo Trypticasa Soya (TSB)

Es un medio de cultivo recomendado para la recuperación y aislamiento de toda clase de bacterias, grampositivas y gramnegativas aerobias.

El caldo tripticasa soya garantiza el crecimiento de todos los microorganismos de importancia microbiológica tanto grampositivos como gramnegativos, hongos y levaduras, este medio tiene múltiples usos puede ser utilizado para el monitoreo de áreas y superficies, para el mantenimiento de cepas ATCC y para el análisis de aguas y alimentos. (Anexo N° 2)

3.4.3 Caldo peptonado

Se emplea como diluyente en muestras alimentarias, aguas y materiales diversos. Para la realización de la prueba del Indol en aquellos microorganismos capaces de producirlo.

En usos generales se puede emplear para el cultivo de una gran variedad de microorganismos, siempre y cuando no presenten exigencias particulares. (Anexo N° 2)

3.5 METODOLOGÍA

3.5.1 Procesamiento del Material Vegetal

3.5.1.1 Recolección

Para obtener las semillas de *Carica papaya L.*, se recolectaron los frutos en el distrito de Juan Guerra, provincia de Tarapoto, departamento de San Martín Figura 3.1 en el mes de Marzo del 2012 posteriormente se empacaron con protección adecuada para ser trasladados a la ciudad de

Arequipa donde fueron cortados para obtener las semillas, las mismas que se limpiaron.



Figura 3.1: Ubicación geográfica del distrito de Juan Guerra, Provincia de Tarapoto.

3.5.1.2 Estabilización

Una vez recolectadas las semillas se colocan inmediatamente en bolsas de papel, las que fueron trasladadas al laboratorio H-102 de la Universidad Católica de Santa María para ser lavadas bajo chorros de agua; luego las semillas fueron separadas y dispuestos en bandejas, las cuales se sometieron a calor seco a una temperatura de 80°C en una estufa Figura 3.2, por un período de 4 horas, para que no se produzca la degeneración y deterioro de sus principios activos.²⁷



Figura 3.2: Estufa con Material Vegetal.

3.5.1.3 Secado

Una vez estabilizado el material vegetal, fue dispuesto en bandejas sobre papel Kraf, para luego ser desecado a temperatura ambiente durante 1 semana en un lugar fresco, seco y protegido de la luz solar.²⁷

3.5.1.4 Fragmentación

El material vegetal desecado Figura 3.3; se procede a pulverizar en un mortero hasta la obtención de partículas uniformes Figura 3.4, lo cual fue controlado con la ayuda de un tamiz Figura 3.6.



Figura 3.3: Pesado de las semillas



Figura 3.4: Pulverización de las semillas



Figura 3.5: Semillas pulverizadas.



Figura 3.6: Tamizado de las semillas.

3.5.1.5 Almacenaje

Las semillas pulverizadas fueron guardadas en frascos de vidrio de color ámbar rotulado y se conservaron en un ambiente fresco y seco.⁵²

3.5.2 Método de Obtención del Extracto

Se realizó en el laboratorio H-102 del Programa Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica de Santa María, mediante un equipo de Soxhlet. (Anexo N°4)

o Fundamento de equipo de Soxhlet

Se fundamenta en la extracción continua de una muestra por medio de un solvente apropiado a ebullición, para luego pasar a la fase de percolación y finalmente obtener el extracto que contiene los componentes solubles de la planta.^{8, 14}

o Procedimiento

Se pesó 10 g de muestra previamente desecada y pulverizada, se empacó en un material fibroso adecuado, el cual recibió el nombre de cartucho y fue colocado en el extractor (que forma parte del equipo), seguidamente en el balón del equipo extractor se colocó 200 mL del solvente indicado (etanol, metanol, diclorometano y hexano) y se procedió a armar el equipo,

colocando el balón en un recipiente con agua sobre una cocina eléctrica; (etanol y metanol) a una temperatura de 70°C , por un tiempo de 8 horas Figura 3.7; (diclorometano y hexano) a una temperatura de 70°C , por un tiempo de 2 horas Figura 3.8 hasta que el solvente haya agotado toda la muestra del cartucho, finalmente se procedió a desarmar el equipo sainándolo previamente y se obtuvo el extracto indicado. Dicho procedimiento se realizó por duplicado para cada solvente.

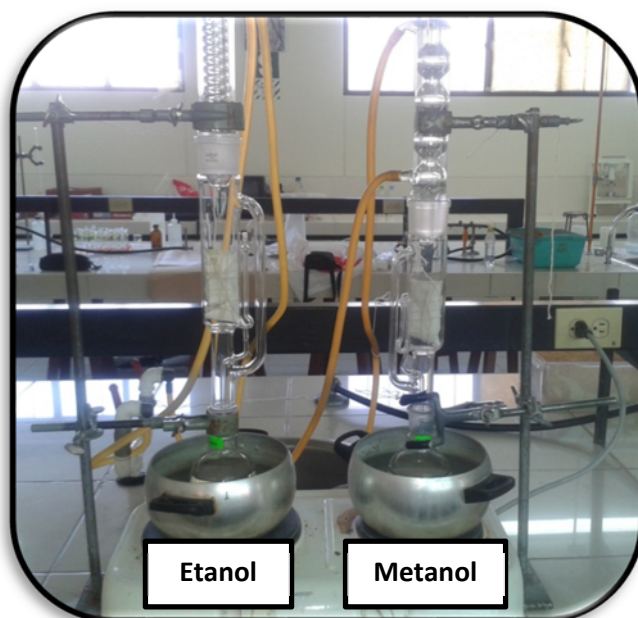


Figura 3.7: Equipo de Soxhlet
Fuente: Elaboración propia

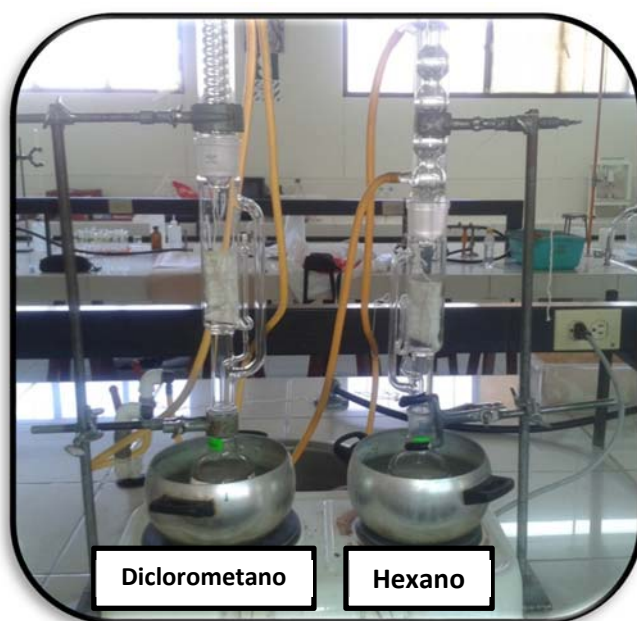


Figura 3.8: Equipo de Soxhlet
Fuente: Elaboración propia

3.5.3 Determinación del Rendimiento de la Extracción

o **Fundamento:**

El porcentaje de rendimiento de extracción (%RE) o el porcentaje de sólidos solubles, se fundamenta en determinar la diferencia de peso al evaporar el solvente del extracto obtenido.⁴⁷

El porcentaje de rendimiento se determina mediante la siguiente ecuación.

$$\%RE = \frac{\text{Peso de extracto seco}}{\text{Peso de semillas secas}} \times 100$$

o **Procedimiento:**

Se llevó el extracto al rota-vapor Figura 3.9 obteniéndose un extracto semi-seco, este extracto se colocó en un vaso precipitado previamente tarado y se llevó a baño maría hasta sequedad total, para finalmente ser pesado y determinar su porcentaje de rendimiento por diferencia de peso.



Figura 3.9: Extracto metanólico en el equipo de rota-vapor.

3.5.4 Determinación de las Características Físicas

3.5.4.1 Análisis Organolépticos de las Semillas de *Carica papaya* L. “PAPAYA”

Para este análisis se toma en cuenta los siguientes caracteres:

- o Color
- o Olor
- o Sabor
- o Aspecto

3.6 PROCESAMIENTO DE CEPAS EN ESTUDIO

3.6.1 Obtención de Cepas

Las cepas en estudio fueron *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* las cuales se obtuvieron del Consorcio Industrial de Arequipa.

3.6.2 Conservación de las Muestras

Las muestras serán repicadas en agar sangre cada 5 días.

3.6.3 Pruebas de Identificación de *Staphylococcus aureus*

3.6.3.1 Cultivo de Agar Sangre

Figura 3.13 las cepas de *Staphylococcus aureus* presentaron colonias grandes, color gris o amarillo dorado intenso. (Anexo N°2)

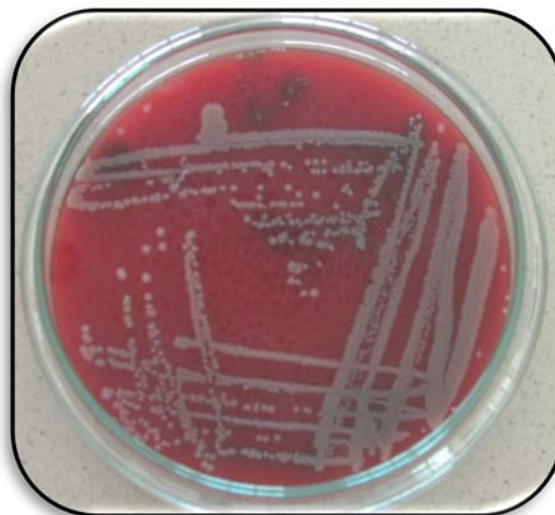


Figura 3.13: Cultivo de *Staphylococcus aureus*.

3.6.3.2 Prueba de Agar Manitol Salado

Esta prueba fue realizada en agar manitol salado en la que se produce la degradación del carbohidrato manitol hasta ácido, hace virar el indicador de fenol a un color amarillo Figura 3.14 lo que lo diferencia de otros estafilococos. (Anexo N°2)



Figura 3.14: Cultivo de *Staphylococcus aureus*.

3.6.3.3 Coloración Gram

- Se colocó una azada de bacterias sobre una lámina portaobjetos limpia.
- Se dejó secar a temperatura ambiente, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Se colocó la lámina sobre un soporte de tinción y fue cubierta con solución de Cristal Violeta por 1 minuto, luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño.
- Se cubrió la lámina con lugol durante 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con el decolorante Acetona-Alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta (10 segundos).
- Se cubrió la superficie de la lámina con Safranina por 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se secó al aire a temperatura ambiente.
- Se observó al microscopio a 40X y posteriormente a 100X con aceite de inmersión, observándose colonias gram positivas agrupadas en racimos Figura 3.15 lo que nos indica que son colonias de estafilococos.²³

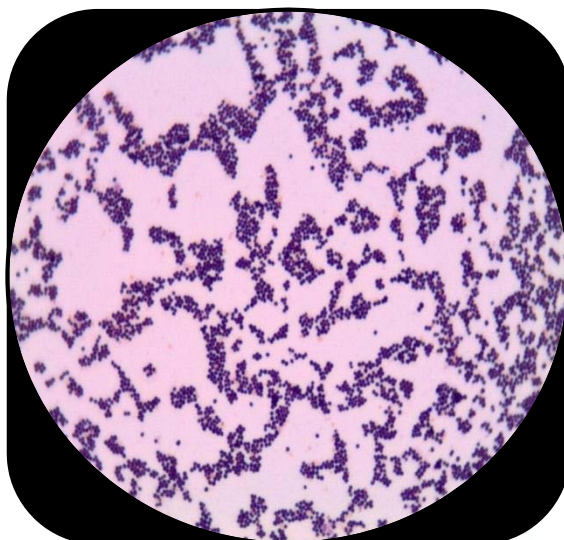


Figura 3.15: *Staphylococcus aureus*.

3.6.3.4 Prueba de Catalasa

Realizar la prueba de catalasa a partir de las colonias que han desarrollado en el agar sangre para identificar de que genero se trate.

- o Agregar en una lámina portaobjeto 1 o 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%, suspender una colonia y observar una rápida aparición y producción de burbujas de gas o efervescencia Figura 3.16 siendo este un resultado positivo. ²³ (Anexo N°3)

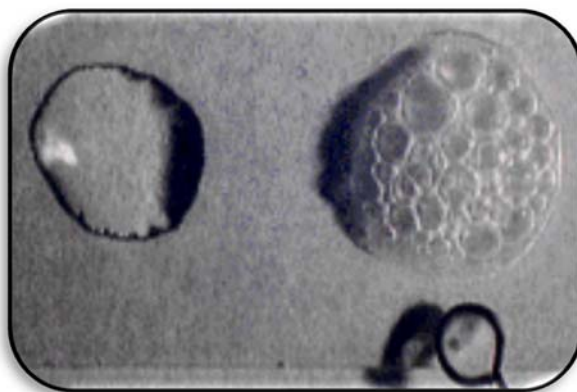
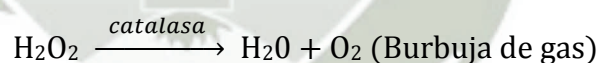


Figura 3.16: Catalasa positiva *Staphylococcus aureus*

3.6.3.5 Prueba de Coagulasa

La principal característica que diferencia a *Staphylococcus aureus* es la producción de la enzima coagulasa, las demás especies no producen esta enzima.

- o En un tubo de ensayo estéril se colocó 0.5 ml de plasma y con el asa de Kolle se colocó una colonia.

Se mezcló por rotación suave del tubo evitando remover o agitar el contenido, se colocó el tubo en la incubadora a 37°C por 4 horas, hasta observar la formación de un coágulo visible Figura 3.17 lo que se consideró una reacción positiva.²³ (Anexo N°3)

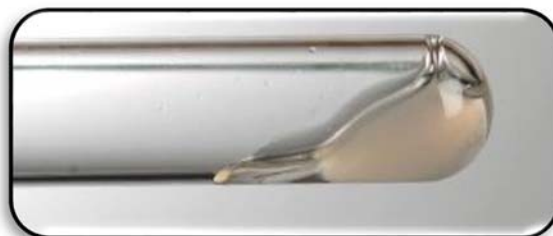


Figura 3.17: Coagulasa positiva *Staphylococcus aureus*

3.6.4 Pruebas de Identificación de *Escherichia coli*

3.6.4.1 Cultivo en EMB (Eosina-Azul de Metilo)

Figura 3.18 las cepas de *Escherichia coli* presentaron colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado.²³ (Anexo N°2)

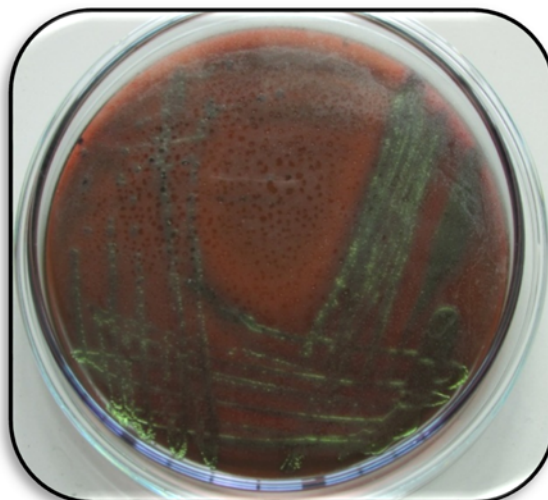


Figura 3.18: Cultivo de *Escherichia coli*

3.6.4.2 Prueba de Catalasa

Realizar la prueba de catalasa a partir de las colonias que han desarrollado en el agar sangre para identificar de que genero se trate.

- o Agregar en una lámina portaobjeto 1 o 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%, suspender una colonia y observar una rápida aparición y producción de burbujas de gas o efervescencia Figura 3.19 siendo este un resultado positivo. ²³ (Anexo N°3)

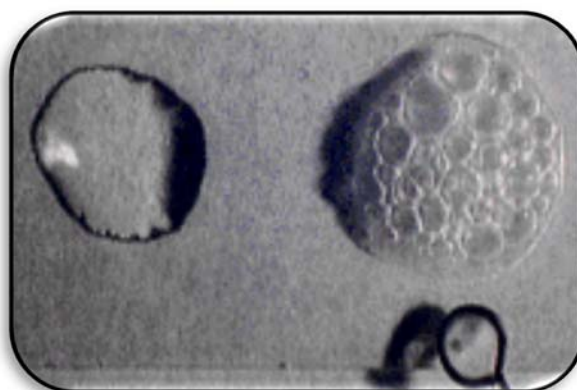
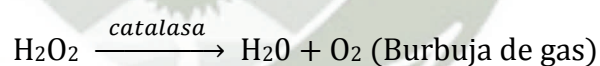


Figura 3.19: Catalasa positiva *Escherichia coli*.

3.6.4.3 Coloración Gram

- Se colocó una azada de bacterias sobre una lámina portaobjetos limpia.
- Se dejó secar a temperatura ambiente, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Se colocó la lámina sobre un soporte de tinción y fue cubierta con solución de Cristal Violeta por 1 minuto, luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño.
- Se cubrió la lámina con lugol durante 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con el decolorante Acetona-Alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta (10 segundos).
- Se cubrió la superficie de la lámina con Safranina por 1 minuto y se procedió a lavar.
- Se secó al aire a temperatura ambiente.
- Se observó al microscopio a 40X y posteriormente a 100X con aceite de inmersión Figura 3.20, observándose bacilos gram negativos.²³



Figura 3.20: *Escherichia coli*

3.6.4.4 Prueba de Indol

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. La prueba de indol está basada en la formación

de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído. Este es el principio activo de los reactivos de Kovacs y Ehrlich. El medio de cultivo utilizado debe ser rico en triptófano.

- Inocular el caldo triptófano con el organismo en estudio e incubar a 35°C durante 18 a 24 horas. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de reactivo de Kovacs por la pared interior del tubo. El desarrollo de un vivo color rojo fucsia en la interfase del reactivo y el caldo Figura 3.21, segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y una prueba positiva.



Figura 3.21: Indol positivo *Escherichia coli*.

3.7 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, METANÓLICOS, DICLOROMETÁNICOS Y HEXÁNICOS DE *Carica papaya L.* “PAPAYA”

3.7.1 Marcha Fitoquímica Preliminar

Se realizó la marcha fitoquímica preliminar para determinar cualitativamente los componentes que pudieran estar presentes en el extracto obtenido de las semillas de *Carica papaya L.* “PAPAYA”

Para esto se realizaron las siguientes reacciones:

a) Taninos

- Reacción con Gelatina:

- Fundamento

Los taninos al ser mezclados con gelatina, reaccionan dando una turbidez o precipitado de color blanco.

- Procedimiento

Se tomó un 1ml del extracto correspondiente (etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico), en un tubo de ensayo y se le añadió 1ml de gelatina, y se agitó suavemente.

- Resultado

La formación de un precipitado blanco o turbidez indica reacción positiva para taninos.²⁸

b) Compuestos fenólicos

- Reacción con Tricloruro Férrico (FeCl_3):

- Fundamento:

Los taninos al ser mezclados con sales férricas, reaccionan dando lugar a coloraciones o precipitados de color verde y azul intensos debido a la formación de tanato férrico.

- Procedimiento:

Se tomó un 1ml del extracto correspondiente (etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico), en un tubo de ensayo y se le añadió gota a gota tricloruro férrico, y se agitó suavemente.

- Resultado:

El desarrollo inmediato de color verde y azul intenso son indicativos de la presencia de compuestos fenólicos.²⁸

c) Triterpenoides y/o esteroides

- Reacción de Liebermann - Burchard:

- Fundamento:

Se basa en la acilación del anillo cromógeno por parte del ácido acético y anhídrido acético para dar lugar a la formación de coloraciones.

- Procedimiento:

Se tomó una pequeña cantidad del extracto correspondiente (etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico), en un tubo de ensayo y se añadió 1ml de anhídrido acético y seguidamente se agregó gotas de ácido sulfúrico.

- Resultado:

El desarrollo de colores verde, azul o naranja indica la presencia de Triterpenoides y/o esteroides.²⁸

d) Flavonoides

- Reacción de Shinoda:

- Fundamento:

Se basa en la reducción del anillo quinólico para dar lugar a la formación de grupos OH con aumento de dobles enlaces y por consiguiente dar origen a coloraciones.

- Procedimiento:

Al extracto correspondiente (etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico) se le colocó un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de ácido clorhídrico concentrado, y se agitó suavemente.

- Resultado:

El desarrollo inmediato de coloración es indicativo de la presencia de flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo); chalconas y auronas no dan coloración.²⁸

e) Alcaloides

- Reacción de Dragendorff:

- Fundamento:

Se basa en la reacción de alcaloides en medio básico para dar lugar a la formación de sales insolubles, las cuales se evidencian por la presencia de precipitados anaranjados.

- Procedimiento:

En un tubo de ensayo se colocó el extracto correspondiente, (etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico) y se le añadió una pequeña cantidad del reactivo recientemente preparado, se agitó suavemente.

- Resultados:

La formación de un precipitado anaranjado indica reacción positiva para alcaloides.²⁸

3.7.2 Método de Identificación por separación de Cromatografía de Capa Fina (CCF)

a) Fundamento

La Cromatografía es una técnica de separación de mezclas (muestras complejas) por una migración diferencial de los componentes de la mezcla, al ser transportados sobre una fase estacionaria, por un solvente o fase móvil el proceso es posible porque los componentes de la mezcla tienen diferente afinidad por la fase estacionaria y/o fase móvil.

La impulsión de la fase móvil se realizará por la fuerza de capilaridad. Las coloraciones generadas por las sustancias fuertes y reveladores y la distancia recorrida por cada componente de la droga en estudio permiten ver la naturaleza de los componentes.

b) Fases móviles usadas

- o Acetato de etilo / Agua / Ácido acético 10:5:1
- o Tolueno / Acetato de etilo 50:40
- o Acetato de etilo / Ácido acético / Ácido fórmico / Agua 100:11:11:26
- o Acetato de etilo / Isopropanol / Amoniaco cc. 100:2:1

c) Reactivos reveladores

- o Fe Cl₃ 5% en agua
- o Vainillina 1% - Ácido sulfúrico 5%

- o Solución etanólica de Vainillina al 1% - Solución etanólica de H_2SO_4 al 5%
- o Dragendorff
0.5ml solución A + 0.5ml solución B
2ml ácido acético + 10ml de agua

d) Preparación de la Placa Cromatográfica

Cortar una placa de sílica gel de 10 x 10 cm y marcarla con lápiz para hacer aplicaciones de muestras en forma de punto o barra. Las aplicaciones deben realizarse en carriles de 1cm de ancho, y deben quedar espacios de 1 cm entre aplicaciones. Las aplicaciones se realizarán a 1 cm del borde inferior de la placa.^{13, 15}

Desarrollo:

La placa con las aplicaciones completamente secas colocarlas en la cuba de desarrollo.¹⁵



Figura 3.23: Placa cromatográfica en la cuba

3.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.8.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

A. Método Dilución en Caldo

Se basa en la sensibilidad del Microorganismo y la exposición de una serie de diluciones de cada agente antimicrobiano, después de lo cual se determina la concentración de la droga que inhibe el crecimiento bacteriano.^{25, 37}

a) Preparación del Extracto Madre

Se prepara una solución madre con 2.5 g de “*Carica papaya L.*” los cuales se diluyen en 10ml de agua destilada estéril.

(Concentración = 250 mg/mL) ²³

b) Preparación del Inóculo

Se tomó separadamente con una asa de kolle estéril, de 4 a 5 colonias de las placas de cada una de las cepas en estudio; para posteriormente ser diluidas en 10mL de caldo peptonado, enjuagar bien en el líquido para descargar todo el material bacteriano y luego retirar el asa de kolle Figura 3.24.

La turbidez del medio debe ser semejante a la del tubo N° 05 de la Escala de Mac Farland, la cual equivale a una concentración de 10^8 UFC/mL). ²³ (Anexo N°5)

Colocar en la estufa a 37°C por 24 horas.

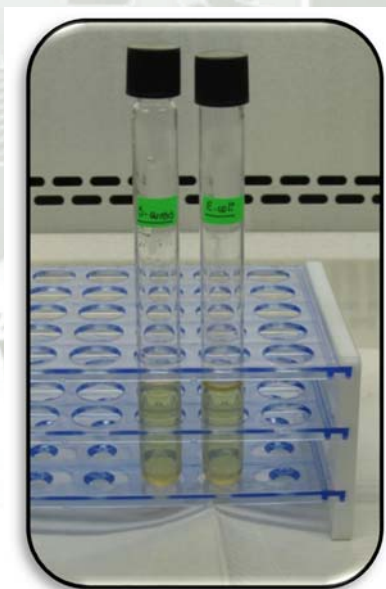


Figura 3.24: Inóculo

c) Procedimiento para determinar la CMI en Caldo Peptonado

Se realizó una dilución de 1:100 del inóculo y así se obtuvo una solución de 10^6 UFC/mL.

Es decir, se hace una dilución tomando 0.1ml del inóculo 10^8 UFC/mL y se agrega 9.9ml de caldo peptonado, repitiéndose el procedimiento para las dos baterías en estudio.²³

Se preparó dos baterías de 12 tubos estériles para cada bacteria, conteniendo 1.0 mL de caldo peptonado para cada uno.

- ✓ Al tubo N°1 de cada serie se le agregó 1.0 mL del extracto madre de "*Carica papaya L.*" previa agitación, extrayendo 1.0 mL de solución, el que se fue añadiendo al tubo N°2 de la serie.
- ✓ Del tubo N°2 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°3 y mezclar.
- ✓ Del tubo N°3 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°4 y mezclar.
- ✓ Del tubo N°4 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°5 y mezclar.
- ✓ Del tubo N°5 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°6 y mezclar.
- ✓ Del tubo N°6 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°7 y mezclar.
- ✓ Del tubo N°7 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°8 y mezclar.
- ✓ Del tubo N°8 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°9 y mezclar.
- ✓ Del tubo N°9 retirar 1.0 mL de la solución y añadir al tubo N°10 y mezclar.
- ✓ Luego añadir a cada tubo 1.0 mL del inóculo a la concentración de 10^6 UFC/ mL.
- ✓ El tubo N°11 solo contiene caldo peptonado y suspensión bacteriana (Control Positivo).
- ✓ El tubo N°12 solo contiene caldo peptonado (Control Negativo).
- ✓ Incubar los tubos a 37°C por 24 horas Figura 3.25.

Transcurrido este tiempo, observar la turbidez de los tubos para hallar el punto de ruptura, el tubo en el cual no se apreció turbidez será considerado

como la mínima concentración del antibacteriano que se requiere para no producir el desarrollo bacteriano (CIM).²³ (Anexo N°5)

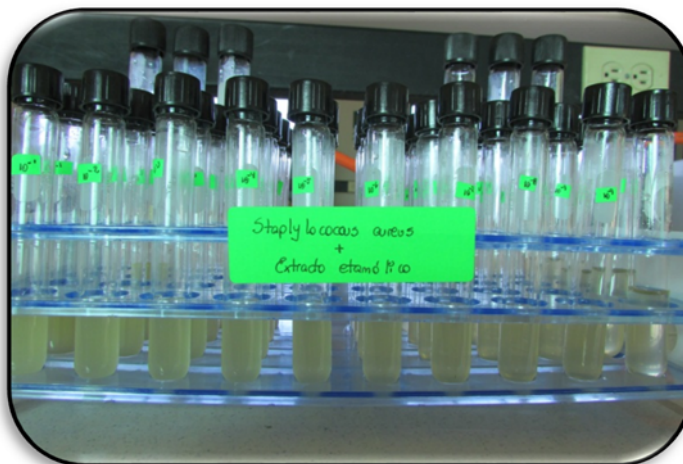


Figura 3.25: Baterías de tubos

3.8.2 Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

A. Método: Dilución en Agar

a) Fundamento

Determina la menor concentración, que produce la muerte de más del 99.9% de las bacterias en estudio.

b) Procedimiento

Se procedió a sembrar de todos aquellos tubos en los cuales no se observa turbidez, el sembrado se realizó en placas conteniendo agar Mueller Hinton.

Se incubó a 37°C por 24 horas y se observa el crecimiento bacteriano en las placas, luego se procede a indicar el punto ruptura en las placas donde hubo crecimiento y donde no hubo crecimiento.^{21, 23}

3.8.3 Determinación de la Sensibilidad Antimicrobiana por medio de Halos de Inhibición

A. Método de Difusión en Discos (Kirby - Bauer)

a) Fundamento

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos

impregnados con una concentración conocida del antibiótico. El antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco.

En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos.^{21, 31}

b) Preparación del Extracto madre:

Se prepararon tres extractos madre del extracto seco de *Carica papaya L.* "Papaya". (Anexo N°12)

(Concentración = 50 mg/ mL)

(Concentración = 100 mg/ mL)

(Concentración = 150 mg/ mL)

c) Preparación del inóculo

Se preparó de la misma manera que para la CMI.

d) Preparación de los Discos

Se elaboraron discos de papel filtro Whatman N°4 de aproximadamente 6mm de diámetro, con un perforador, los cuales fueron almacenados en un frasco y esterilizados en una autoclave por 15 minutos a 121°C.²³

e) Inoculación de los Discos

Una vez esterilizados y con la ayuda de una micropipeta, los discos fueron impregnados con los diferentes extractos.²²

f) Preparación para determinar la Sensibilidad Antibacteriana

Se prepararon placas conteniendo 20 ml de Agar Mueller Hinton para test de sensibilidad, enseguida se sometieron a un control de esterilidad por incubación a 37°C por 24 h. Luego fueron inoculadas, con ayuda de un hisopo estéril en forma horizontal de derecha a izquierda, en forma vertical de arriba hacia abajo, en el sentido de las agujas de reloj y en contra del

sentido de las agujas del reloj, teniendo la precaución de no dejar algún espacio sin suspensión, con el inóculo preparado de la suspensión de cada batería en estudio equivalente a 10^6 UFC/ mL, dejar el inóculo por 5 minutos.⁹

Una vez realizada la siembra de bacterias se dividió cada placa en 4 partes iguales, en las que se colocó los discos impregnados con el extracto de "Papaya" (3 repeticiones de una misma concentración para cada placa), dejar secar por espacio de 30 min antes de ser llevadas a incubación por 24 h a 37°C.⁹

La lectura entre sí de cada placa, expresándolos en milímetros (mm), se hace preferentemente desde el exterior de la tapa, sin quitar la tapa.

De igual forma para determinar el halo de inhibición de los antibacterianos se sembraron en placas de 130 x 20 mm la misma suspensión de bacterias usadas para el complejo activo de "Papaya". Transcurridos los 5 min se coloca los discos de los antibacterianos en comparación.

3.9 MÉTODO ESTADÍSTICO

Para el análisis de datos se realizó la técnica de análisis de varianza "ANOVA". Para el tratamiento de los datos se partió de un modelo matemático unifactorial. Como prueba estadística de prueba se utilizó la distribución de probabilidad de Fisher con un nivel de confianza del 95%. Para reforzar la decisión tomada en el análisis de varianza, se realizó la prueba de especificidad de Tuckey.

➤ Los resultados fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos:

✓ **Suma de cuadrados:**

- Suma de cuadrados (entre)

$$SC(entre) = n \sum (\bar{x} \cdot k - \bar{x}..)^2$$

Donde:

n : es el tamaño de la muestra

$\bar{x} \cdot k$: es la media del grupo

$\bar{x} \dots$: es la media general o la gran media

- Suma de cuadrados (en)

$$SC(en) = \sum (\bar{x}_{ik} - \bar{x} \cdot k)^2$$

- Suma de cuadrados (total)

$$SC(total) = \sum (\bar{x}_{ik} - \bar{x} \dots)^2$$

✓ Grados de libertad (gl)

Se halla para cada grupo donde k son el número de grupos.

$$gl(entre) = k - 1 \quad gl(en) = k(n - 1) \quad gl(total) = nk - 1$$

✓ Medias de los cuadrados:

Calculamos la media de cuadrados dividiendo cada suma de cuadrados por sus gl. Finalmente hallamos la razón de las dos medias de cuadrados, la razón F, para decir si es que existe diferencia significativa, observada en tablas para el test de Fisher, donde se observa la diferencia entre los grupos.

✓ Prueba de comparaciones múltiples: Diferencia Significativa Franca (DSF) de Tuckey.

Es una prueba de comparación múltiple. Se basa en el análisis de varianza y asegura que la probabilidad de una o más comparaciones que se juzgue significativa solamente por azar no sea mayor del 5%.

El estadístico q es igual a la raíz cuadrada de un dato estadístico para F, que se encuentra en tablas. ^{18, 20}

$$DSF = q_{(K-M)} \sqrt{\frac{MC_{(en)}}{n}}$$

Donde:

n: es como antes, el tamaño de la muestra de cada grupo.

K: es el número de grupos.

M: son los gl del término “en”, igual a K (n-1).

MC: media de los cuadrados.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

RESULTADOS

4.1 OBTENCION DE LOS EXTRACTOS DE *Carica papaya* L. “PAPAYA”

La obtención de los extractos se siguió el procedimiento detallado en 3.5.2.

Se evaluó el rendimiento y las características organolépticas de las semillas como se indica a continuación.

4.1.1. Rendimiento

Los resultados de la obtención de los extractos son expresados en porcentaje de rendimiento, para lo cual se utilizó la Ecuación del punto 3.5.3, y se elaboró la Tabla 4.1:

TABLA 4.1

Porcentaje de rendimiento de los extractos de *Carica papaya* L. “Papaya”

Soxhlet	Peso Total de las Semillas Pulverizadas (g)	Peso del Extracto Seco (g)	% Rendimiento
Etanol	20	2.49	12
Metanol	20	1.76	9
Diclorometano	20	3.14	16
Hexano	20	4.30	22

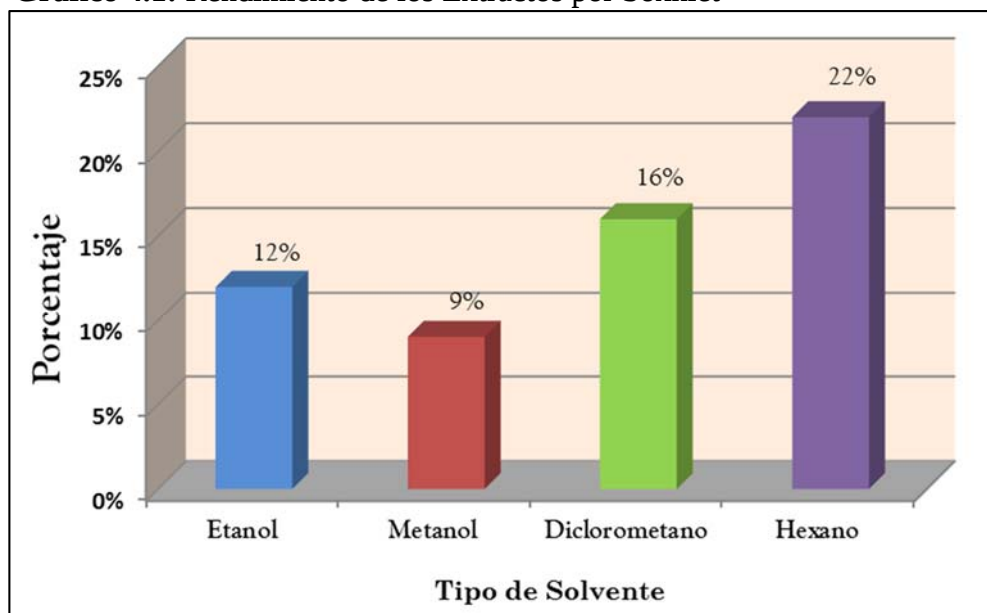
Fuente: Elaboración propia.

Como observamos en la Tabla 4.1 los mejores porcentajes de rendimiento son del extracto diclorometánico y hexánico, pero en este caso se decidió usar el extracto

etanólico y el extracto diclorometánico, debido a que se realizó una prueba previa al extracto metanólico y hexánico y no se obtuvieron halos de inhibición.

En el Grafico 4.1 observamos mediante barras, el rendimiento de los extractos obtenidos de nuestras semillas de *Carica papaya L.* “PAPAYA”

Grafico 4.1: Rendimiento de los Extractos por Soxhlet



Fuente: Elaboración propia

4.1.2. Características organolépticas de las semillas de *Carica papaya L.*

Para garantizar la obtención de un buen extracto de “Papaya” se consideró los siguientes pasos:

TABLA 4.2

Características Organolépticas de semillas *Carica papaya* L. “PAPAYA”

Características Organolépticas	Resultados
Olor	Caramelo
Color	Negro
Sabor	Picante
Aspecto	Uniforme

Fuente: Elaboración propia.

Obtenida las semillas, se procedió a realizar una evaluación sensorial de sus características organolépticas. Estas características organolépticas fueron comparadas con otras reportadas en literatura,^{4, 32} las cuales indican para estas semillas de “papaya” un color negro, olor a caramelo, un sabor picante, si observamos la Tabla 4.2 podemos ver que las características organolépticas apreciadas por los sentidos son semejantes a las reportadas en literatura, por lo que se puede decir que las semillas obtenido es de una buena calidad.

4.2 ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS, METANÓLICOS, DICLOROMETÁNICOS Y HEXÁNICOS DE *Carica papaya* L. “PAPAYA”

4.2.1. Marcha Fitoquímica Preliminar

La identificación de los metabolitos secundarios de *Carica papaya* L. se realizó según se indicó en el punto 3.7.

TABLA 4.3

MARCHA FITOQUÍMICA						
Ensayo	Reactivo	Extracción por Soxhlet				Resultado
		Etanol	Metanol	Diclorometano	Hexano	
TANINOS	Reacción con Gelatina	+	+	-	-	Blanco o Turbidez
		Blanco	Blanco	Precipitado	Precipitado	
COMPUESTOS FENÓLICOS	Reacción con Tricloruro Férrico Cl_3Fe	+	+	+	-	Verde y Azul intenso
		Verde	Verde azulado	Verde azulado	Naranja	
TRITERPENOIDES Y/O ESTEROIDES	Reacción de Liebermann - Burchard	+	+	+	+	Verde, azul o naranja.
		Naranja	Naranja	Naranja	Verde	
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	+	+	+	+	Amarillo, Rojo, Azul y Violeta
		Amarillo	Amarillo	Violeta	Amarillo	
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	+	+	+	+	Precipitado anaranjado
		Anaranjado	Anaranjado	Anaranjado	Anaranjado	
ANTRAQUINONAS	Reacción Borntrager	-	-	-	-	Rojo
		Rojo	Rojo	Rojo	Rojo	
SAPONINAS	Agua Destilada	-	-	-	-	Espuma
		Espuma	Espuma	Espuma	Espuma	

Fuente: Elaboración propia

Leyenda: Presencia (+)
No Presencia (-)

Los resultados del análisis fitoquímicos preliminares, fueron comparados con otras reportadas en literatura ^{16, 24} las cuales demostraron que nuestros extractos contienen Taninos, Compuestos fenólicos, Triterpenoides, Flavonoides y Alcaloides.

4.2.2. Método de Identificación por separación de Cromatografía de Capa Fina (CCF)

Se procedió a la realización de Cromatografía en Capa Fina para determinar la huella cromatográfica del extracto seco de semillas de

Carica papaya L. “Papaya” por medio de una serie de coloraciones características.

➤ **Taninos**

En la placa Cromatográfica se observa (coloración de verde a marrón oscuro). Al observarse bajo luz UV a 364nm presentan fluorescencia verde azulada correspondiente a este tipo de compuestos. Figura 4.1.

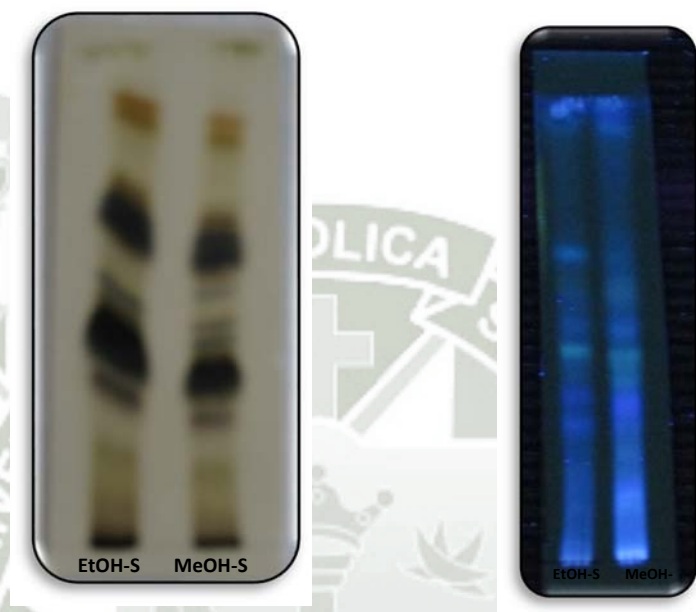


Figura 4.1: Cromatografía del Extracto Etanólico y Metanólico de semillas de “Papaya”

- EtOH-S : Extracto etanólico de semillas
- MeOH-S : Extracto metanólico de semillas

➤ **Flavonoides**

En la placa Cromatográfica se observa coloración amarilla. Al observarse bajo luz UV a 364nm presentan fluorescencia verde, amarillenta y azulada correspondiente a este tipo de compuestos. Figura 4.2.

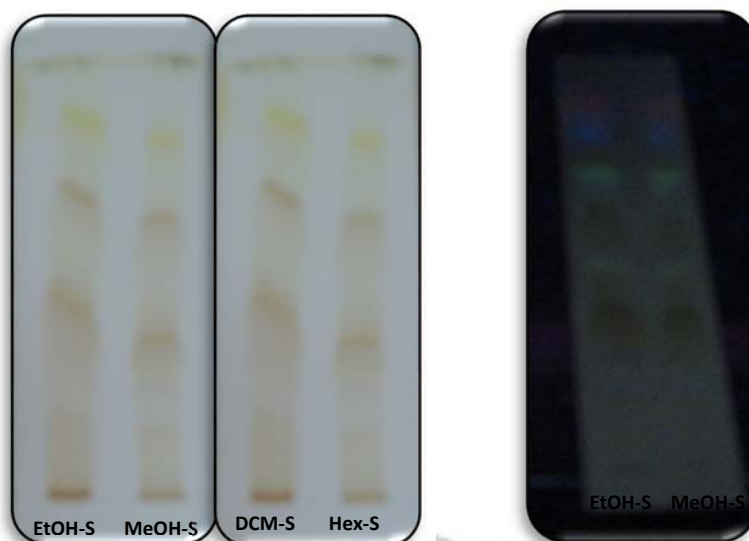


Figura 4.2: Cromatografía del Extracto etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico de semillas de *Carica de papaya L.* “Papaya”

- EtOH-S : Extracto etanólico de semillas
- MeOH-S : Extracto metanólico de semillas
- DCM-S : Extracto diclorometánico de semillas
- Hex-S : Extracto hexánico de semillas

➤ **Alcaloides**

En la placa Cromatográfica se observa coloración naranja. Figura 4.3, al observarse bajo luz UV a 364nm presentan fluorescencia naranja-amarillo correspondiente a este tipo de compuestos.

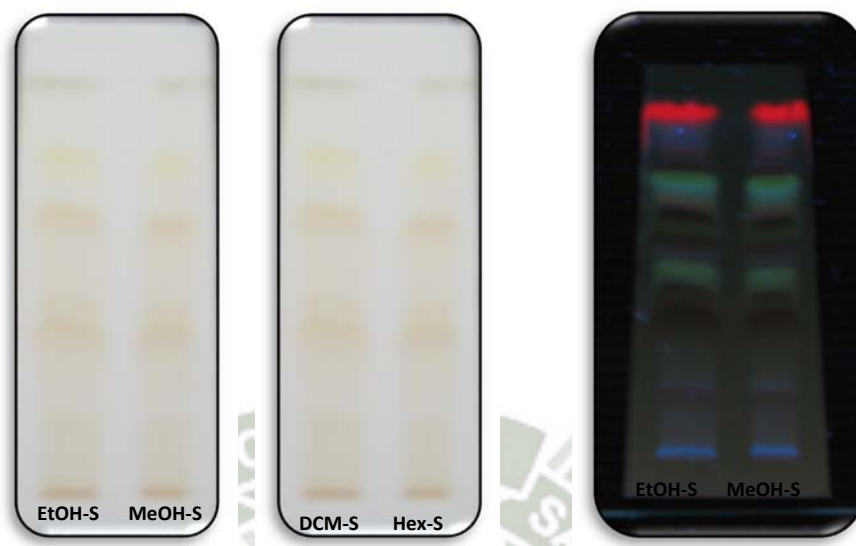


Figura 4.3: Cromatografía del Extracto etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico de semillas de *Carica de papaya L.* “Papaya”

- EtOH-S : Extracto etanólico de semillas
- MeOH-S : Extracto metanólico de semillas
- DCM-S : Extracto diclorometánico de semillas
- Hex-S : Extracto hexánico de semillas

➤ **Terpenos**

En la placa Cromatográfica se observa colores característicos. Figura 4.4, al observarse bajo luz UV a 364nm presentan fluorescencia violeta-azulada correspondiente a este tipo de compuestos.

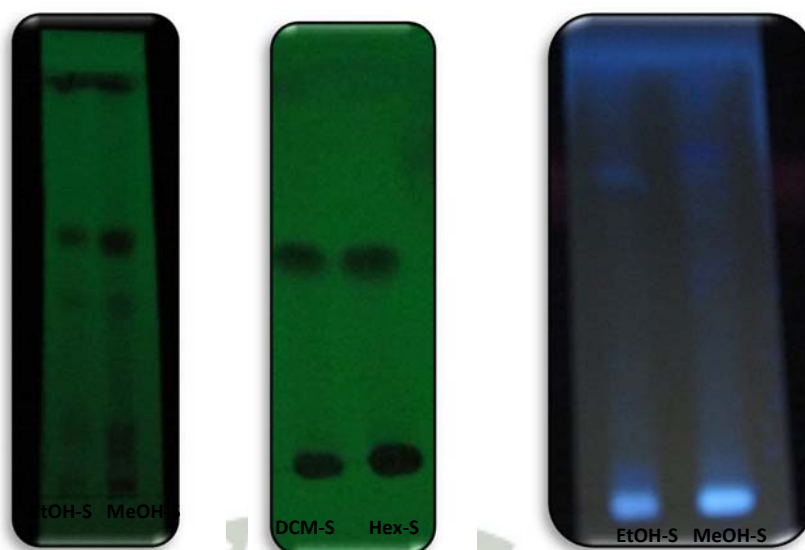


Figura 4.4: Cromatografía del Extracto etanólico, metanólico, diclorometánico y hexánico de semillas de *Carica de papaya L.* “Papaya”

- EtOH-S : Extracto etanólico de semillas
- MeOH-S : Extracto metanólico de semillas
- DCM-S : Extracto diclorometánico de semillas
- Hex-S : Extracto hexánico de semillas

TABLA 4.4

**CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF) DE LOS EXTRACTOS
ETANÓLICOS, METANÓLICOS, DICLOROMETÁNICOS Y HEXÁNICOS DE
*Carica papaya L. "PAPAYA"***

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)					
Ensayo	Revelador	Extracción por Soxhlet			
		Etanol	Metanol	Diclorometano	Hexano
TANINOS	FeCl ₃ 5% en agua	Coloración Verde-Azulada	Coloración Verde-Azulada	-	-
FLAVONOIDES	Solución etanólica de Vainillina al 1% Solución etanólica de H ₂ SO ₄ al 5%	Coloración Amarilla	Coloración Amarilla	Coloración Amarilla	Coloración Amarilla
AICALOIDES	Dragendorff A y B	Coloración Naranja	Coloración Naranja	Coloración Naranja	Coloración Naranja
TERPENOS	Vainillina 1% Ácido sulfúrico 5%	Coloración Violeta-Azulada	Coloración Violeta-Azulada	Coloración Violeta-Azulada	Coloración Violeta-Azulada

Fuente: Elaboración propia.

**4.3 PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN PARA LAS CEPAS ATCC
Staphylococcus aureus y *Escherichia coli*.**

TABLA 4.5

Identificación de *Staphylococcus aureus*.

Pruebas	<i>Staphylococcus aureus</i>
Coloración Gram	Positivo
Catalasa	Positivo
Coagulasa	Positivo
Manitol salado	Positivo

Fuente: Elaboración propia.

TABLA 4.6

Identificación de *Escherichia coli*.

Pruebas	<i>Escherichia coli</i>
Coloración Gram	Positivo
Catalasa	Positivo
Indol	Positivo

Fuente: Elaboración propia.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Seguidamente se trabajó para hallar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto seco de las semillas de *Carica papaya* L. “Papaya”, frente a cada una de las bacterias por el método de dilución en caldo. Se empleó este método ya que el extracto a pesar de tener un color amarillo, logro mostrar el punto de ruptura y se pudo observar la turbidez en los tubos.

Este procedimiento se realizó como se indica en el punto 3.8.1 C.

TABLA 4.7
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada bacteria por el Método de Soxhlet con Etanol

	N° de Tubos										Control (+)	Control (-)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Caldo peptonado	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Extracto madre (250mg/ml)	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	/	/
Inóculo 10 ⁶ UFC/ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	/
Concentración final del extracto (mg/ml)	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0,24	/	/
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
CIM					7,81							
Crecimiento <i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM				15,63								

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Como podemos observar el punto de ruptura para *Staphylococcus aureus* se encuentra entre el tubo 5 y 6, es decir que la CMI es de 7.81 mg/mL y para *Escherichia coli* se encuentra entre el tubo 4 y 5, es decir que la CMI es de 15.63 mg/mL.

Discusión:

La Concentración mínima inhibitoria (CMI), fue comparada con otras reportadas en literatura ^{6, 16} las cuales mostraron que la Tabla 3 ¹⁶ la CMI para *Staphylococcus aureus* es de 100 mg/mL mientras que en la Tabla 4.7 los resultados obtenidos por nuestro estudio indicaron que la CMI para *Staphylococcus aureus* es de 7.81 mg/mL para *Escherichia coli* la Tabla 3 ¹⁶ y Tabla 3.7 ⁶ la CMI es de 100 mg/mL y 17.34 mg/mL respectivamente, mientras que en la Tabla 4.7 los resultados obtenidos por nuestro estudio indicaron que el CMI para *Escherichia coli* es de 15.63 mg/mL. Por lo cual demostramos que la CMI de nuestro estudio es más eficaz que nuestra literatura. ^{6, 16}

TABLA 4.8

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada bacteria por el Método de Soxhlet con Diclorometano

	Nº de Tubos										Control (+)	Control (-)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Caldo peptonado	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Extracto madre (250mg/ml)	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	/	/
Inóculo 10 ⁶ UFC/ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	/
Concentración final del extracto (mg/ml)	125	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98	0,49	0,24	/	/
Crecimiento <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM			31,25									
Crecimiento <i>Escherichia coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CIM		62,5										

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Como podemos observar el punto de ruptura para *Staphylococcus aureus* se encuentra entre el tubo 3 y 4, es decir que la CMI es de 31.25 mg/mL y para *Escherichia coli* se encuentra entre el tubo 2 y 3, es decir que la CMI es de 62.5 mg/mL.

Discusión:

Sin embargo, en nuestro estudio el extracto etanólico de *Carica papaya L.* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus* es más eficaz a una menor concentración y en la Tabla 4.8 el extracto diclorometánico de *Carica papaya L.* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; es más eficaz a una mayor concentración.

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MINIMA (CBM)

Para la determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) se empleó el método de dilución en placa para cada bacteria en estudio; inoculando todos aquellos tubos en los cuales no se observó turbidez.

Este procedimiento se realizó como se indica en el punto 3.8.2 B.

TABLA 4.9

Concentración Bactericida Mínima (CBM) para cada bacteria por el Método de Soxhlet con Etanol

Nº de Tubos	1	2	3	4	5
Concentración final del extracto (mg/ml)	125	62,50	31,25	15,63	7,81
<i>Staphylococcus aureus</i>	NC	NC	NC	NC	C
CBM				15,63	

Fuente: Elaboración propia.

NC: No creció

C: Creció

Interpretación:

Se puede observar en la Tabla 4.9 que la CBM para *Staphylococcus aureus* es de 15.63 mg/mL.

Discusión:

La Concentración bactericida mínima (CBM), fueron comparados con otras reportadas en literatura ¹⁶ las cuales mostraron que la Tabla 3 ¹⁶ la CBM para *Staphylococcus aureus* es de 200 mg/mL y en la Tabla 4.9 los resultados obtenidos por nuestro estudio indicaron que el CBM para *Staphylococcus aureus* es de 15.63 mg/mL.

TABLA 4.10
Concentración Bactericida Mínima (CBM) para cada bacteria por el
Método de Soxhlet con Etanol

Nº de Tubos	1	2	3	4
Concentración final del extracto (mg/ml)	125	62,50	31,25	15,63
<i>Escherichia coli</i>	NC	NC	NC	C
CBM			31,25	

Fuente: Elaboración propia.

NC: No creció

C: Creció

Interpretación:

Se puede observar en la Tabla 4.10 que la CBM para *Escherichia coli* es de 31.25 mg/mL.

Discusión:

La Concentración bactericida mínima (CBM), fueron comparados con otras reportadas en literatura ^{6, 16} las cuales mostraron para *Escherichia coli* que en la Tabla 3 ¹⁶ y Tabla 3.9 ⁶ la CBM es de 150 mg/mL y 58.53 mg/mL respectivamente en la Tabla 4.10 los resultados obtenidos por nuestro estudio indicaron que la CBM es de 31.25 mg/mL.

Por lo cual demostramos que la CBM de nuestro estudio es más eficaz que nuestra literatura. ^{6, 16}

TABLA 4.11

**Concentración Bactericida Mínima (CBM) para cada bacteria por el
Método de Soxhlet con Diclorometano**

Nº de Tubos	1	2	3
Concentración final del extracto (mg/ml)	125	62,50	31,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	NC	NC	C
CBM		62,5	

Fuente: Elaboración propia.

NC: No creció

C: Creció

Interpretación:

Se puede observar en la Tabla 4.11 que la CBM para *Staphylococcus aureus* es de 62.5 mg/mL.

TABLA 4.12

**Concentración Bactericida Mínima (CBM) para cada bacteria por el
Método de Soxhlet con Diclorometano**

Nº de Tubos	1	2
Concentración final del extracto (mg/ml)	125	62,50
<i>Escherichia coli</i>	NC	C
CBM	125	

Fuente: Elaboración propia.

NC: No creció

C: Creció

Interpretación:

Se puede observar en la Tabla 4.12 que la CBM para *Escherichia coli* es de 125 mg/mL.

4.6 MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN PARA LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y DICLOROMETÁNICOS.

Se procedió a realizar la comparación de los halos de inhibición con las diferentes concentraciones de los extractos para cada bacteria, dicho procedimiento se realizó mediante el análisis de EXCEL y ANOVA.

Se procedió hacer diluciones a diferentes concentraciones a partir del extracto madre. (Anexo N°12) las nuevas concentraciones son las siguientes:

(Concentración = 50 mg/ mL)

(Concentración = 100 mg/ mL)

(Concentración = 150 mg/ mL)

Nuestra concentración inicial del extracto madre es de 250 mg/ mL la cual también trabajaremos para poder tener el halo de inhibición.

TABLA 4.13

Halos de Inhibición con el Método de Extracción por Soxhlet con el Solvente Etanol.

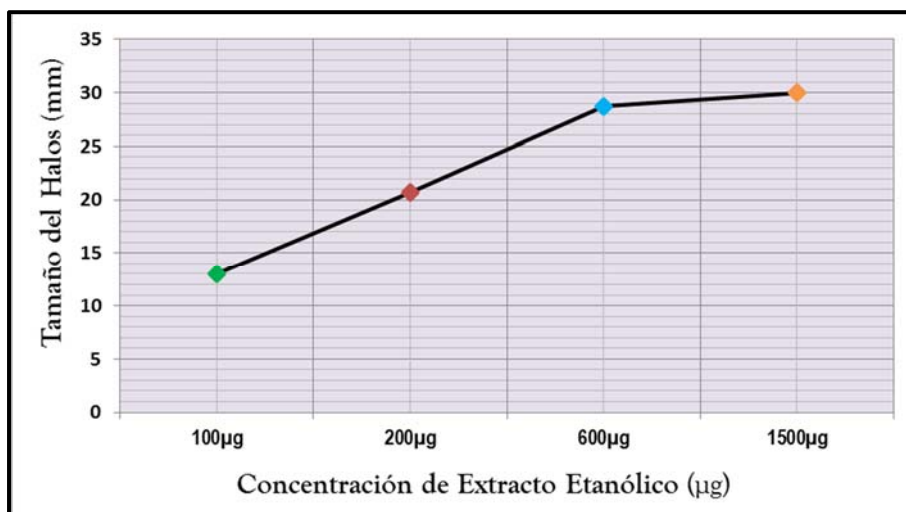
ETANOL	100µg	200µg	600µg	1500µg
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	13 mm	20 mm	28 mm	30 mm
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	13 mm	21 mm	29 mm	30 mm
<i>Staphylococcus aureus 3</i>	13 mm	21 mm	29 mm	30 mm
Promedio	13 mm	20,7 mm	28,7 mm	30 mm

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la Tabla 4.13 muestra datos registrados a diferentes concentraciones por el método de extracción por soxhlet con el solvente etanol para *Staphylococcus aureus 1*, *Staphylococcus aureus 2*, *Staphylococcus aureus 3*, observándose que la concentración 1500 µg tiene mayor halo de inhibición y la concentración 100µg tiene menor halo de inhibición.

Gráfico 4.2: Curva de Concentración del Extracto vs. Tamaño del Halo



Fuente: Elaboración propia.

Discusión:

De acuerdo a varios estudios según literatura ^{7, 16, 51} se ha comprobado el efecto antimicrobiano de *Carica papaya* L. frente *Staphylococcus aureus*.

Los resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por medio de halos de inhibición, el extracto etanólico de nuestro estudio mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

❖ ANOVA Simple - Halos por ETANOL S. AUREUS

Variable dependiente: Halos

Factor: ETANOL (S. AUREUS)

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para halos. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de halos para los 4 diferentes niveles de ETANOL S. AUREUS.

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. (Anexo N° 6)

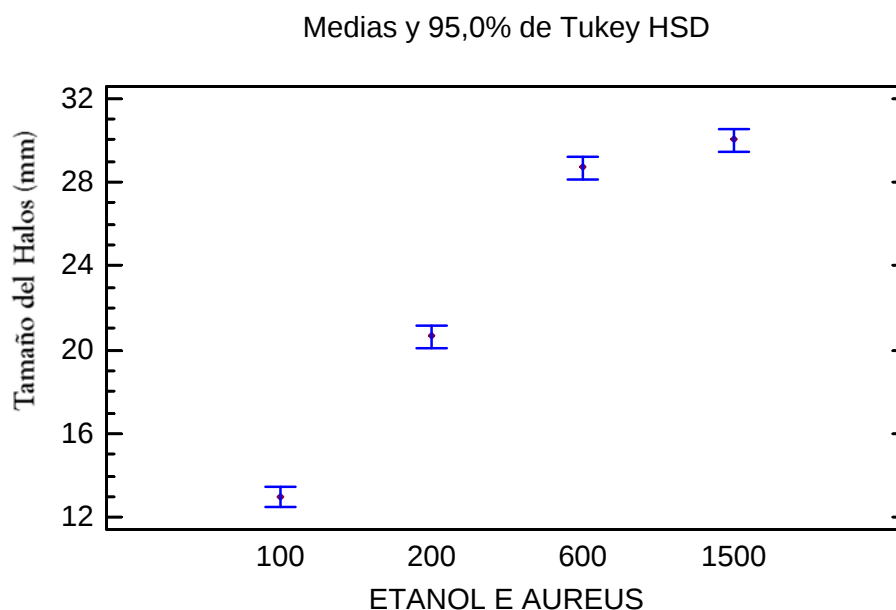


Figura 4.5: Comparación de los halos de inhibición (mm) producidos por la cepa de *Staphylococcus aureus* con extracto etanólico de semillas.

Al observar la gráfica de cajas y bigotes, indica que realmente existe diferencia estadísticamente significativa entre la cepa *Staphylococcus aureus* y los halos de inhibición.

TABLA 4.14

Halos de Inhibición con el Método de Extracción por Soxhlet con el Solvente Etanol.

ETANOL	100µg	200µg	600µg	1500µg
<i>Escherichia coli 1</i>	10 mm	12 mm	13 mm	16 mm
<i>Escherichia coli 2</i>	10 mm	13 mm	14 mm	16 mm
<i>Escherichia coli 3</i>	10 mm	13 mm	14 mm	16 mm
Promedio	10 mm	12,7 mm	13,5 mm	16 mm

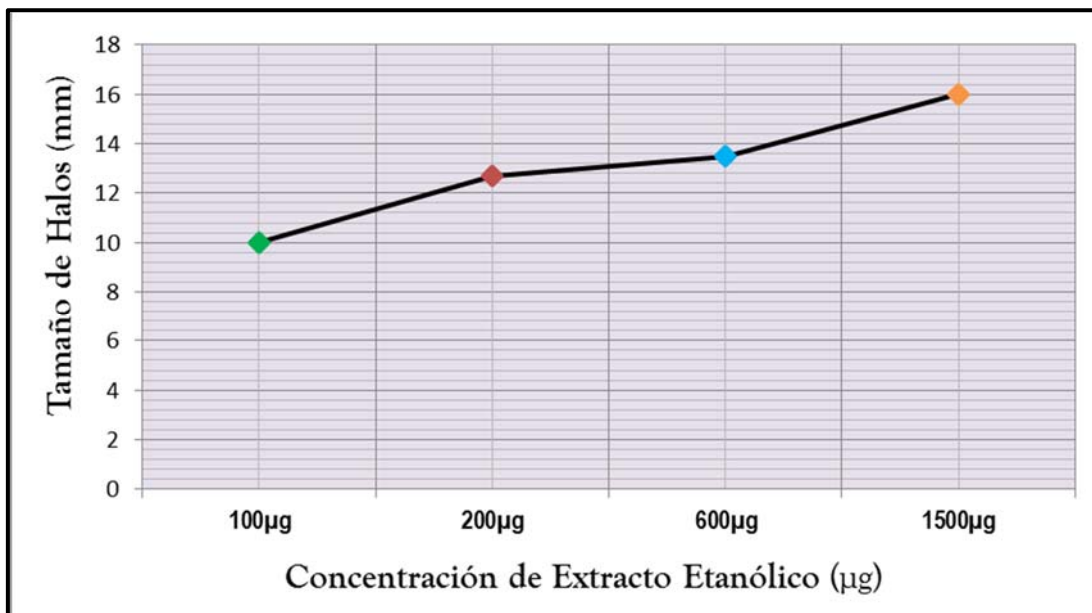
Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la Tabla 4.14 muestra datos registrados a diferentes concentraciones por el método de extracción por soxhlet con el solvente etanol para *Escherichia coli 1*, *Escherichia coli 2*,

Escherichia coli 3, observándose que la concentración 1500 μg tiene mayor halo de inhibición y la concentración 100 μg tiene menor halo de inhibición.

Gráfico 4.3: Curva de Concentración del Extracto vs. Tamaño del Halo



Fuente: Elaboración propia.

Discusión:

De acuerdo a varios estudios según literatura ^{7, 16, 51} se ha comprobado el efecto antimicrobiano de *Carica papaya* L. frente *Escherichia coli*.

Los resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por medio de halos de inhibición, el extracto etanólico de nuestro estudio mostró actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*.

❖ ANOVA Simple - Halos por ETANOL E. COLI

Variable dependiente: Halos
Factor: ETANOL (E. COLI)

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para halos.

Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de halos para los 4 diferentes niveles de ETANOL E. COLI.

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas

entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. (Anexo N° 7)

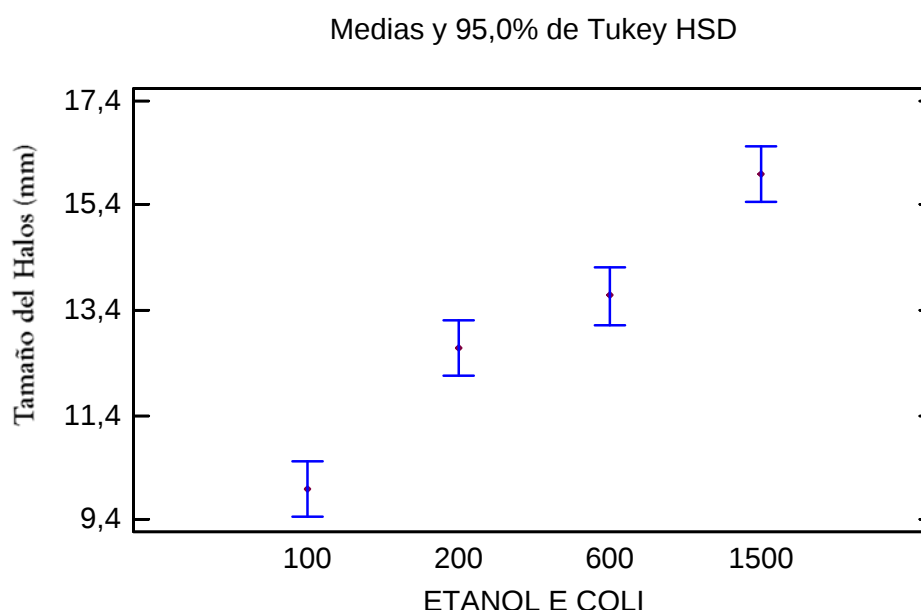


Figura 4.6: Comparación de los halos de inhibición (mm) producidos por la cepa de *Escherichia coli* con extracto etanólico de semillas.

Al observar la gráfica de cajas y bigotes, indica que realmente existe diferencia estadísticamente significativa entre la cepa *Escherichia coli* en estudio.

TABLA 4.15

Halos de Inhibición con el Método de Extracción por Soxhlet con el Solvente Diclorometano.

DICLOROMETANO	100µg	200µg	600µg	1500µg
<i>Staphylococcus aureus 1</i>	9 mm	15 mm	18 mm	20 mm
<i>Staphylococcus aureus 2</i>	8 mm	15 mm	17 mm	20 mm
<i>Staphylococcus aureus 3</i>	8 mm	15 mm	17 mm	20 mm
Promedio	8,3 mm	15 mm	17,3 mm	20 mm

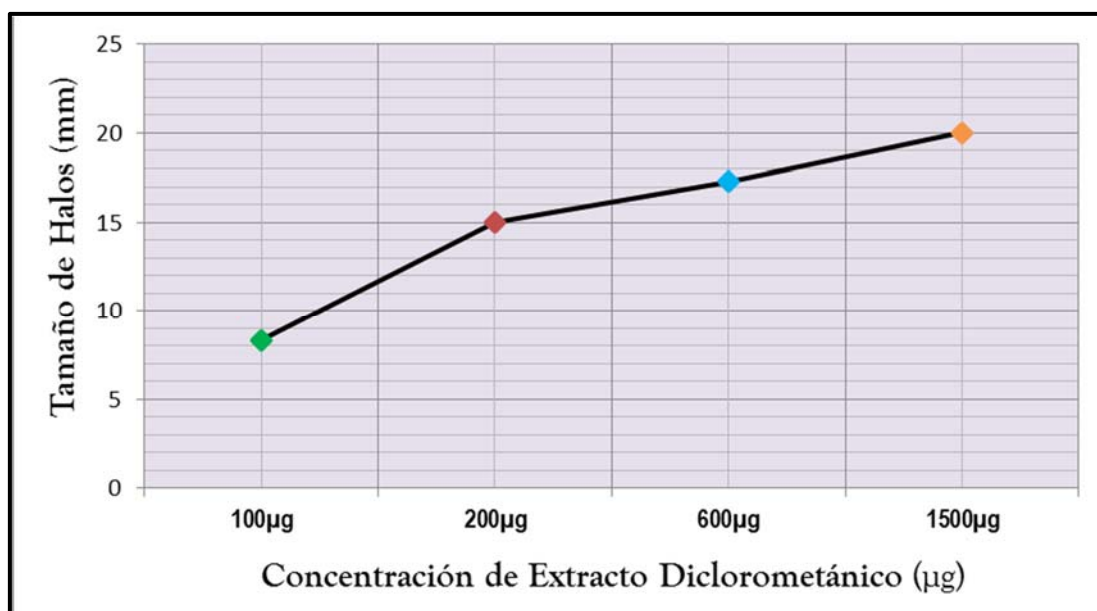
Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la Tabla 4.15 muestra datos registrados a diferentes concentraciones por el método de extracción por soxhlet con el solvente etanol para *Staphylococcus aureus 1*, *Staphylococcus aureus 2*, *Staphylococcus aureus 3*, observándose que la concentración

1500 μg tiene mayor halo de inhibición y la concentración 100 μg tiene menor halo de inhibición.

Gráfico 4.4: Curva de Concentración del Extracto vs. Tamaño del Halo



Fuente: Elaboración propia.

❖ ANOVA Simple - Halos por DICLOROMETANO S. AUREUS

Variable dependiente: Halos

Factor: DICLOROMETANO (S. AUREUS)

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para halos. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de halos para los 4 diferentes niveles de DICLOROMETANO S. AUREUS.

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. (Anexo N° 8)

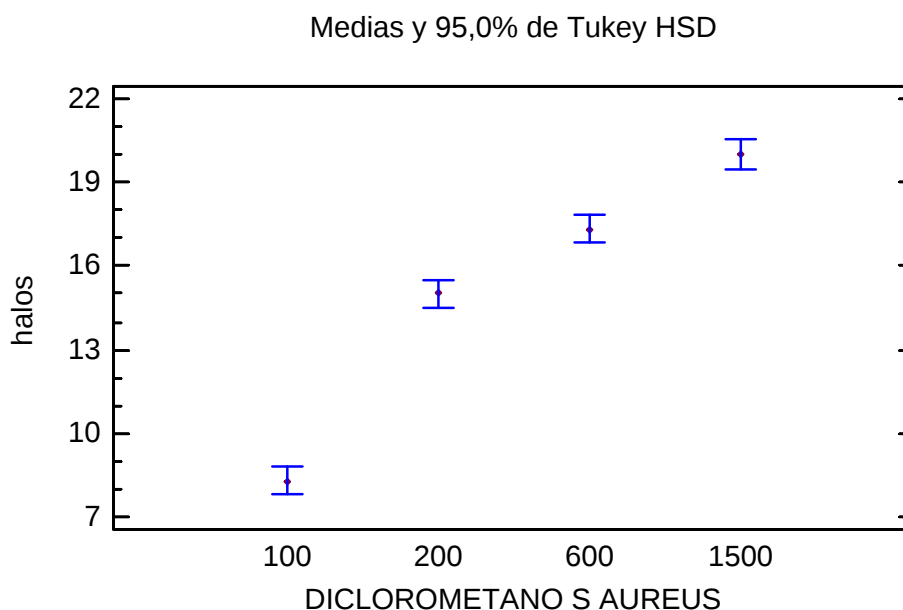


Figura 4.7: Comparación de los halos de inhibición (mm) producidos por la cepa de *Staphylococcus aureus* con extracto diclorometánico de semillas.

Al observar la gráfica de cajas y bigotes, indica que realmente existe diferencia estadísticamente significativa entre la cepa *Staphylococcus aureus* en estudio.

TABLA 4.16

Halos de Inhibición con el Método de Extracción por Soxhlet con el Solvente Diclorometano.

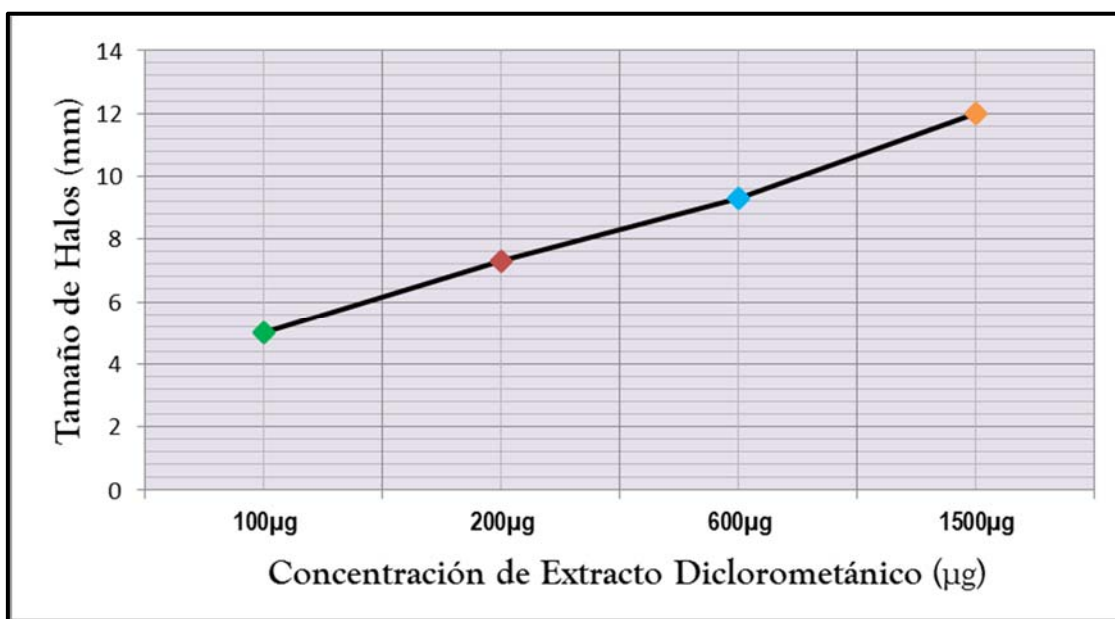
DICLOROMETANO	100µg	200µg	600µg	1500µg
<i>Escherichia coli</i> 1	5 mm	8 mm	10 mm	12 mm
<i>Escherichia coli</i> 2	5 mm	7 mm	9 mm	12 mm
<i>Escherichia coli</i> 3	5 mm	7 mm	9 mm	12 mm
Promedio	5 mm	7,3 mm	9,3 mm	12 mm

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la Tabla 4.16 muestra datos registrados a diferentes concentraciones por el método de extracción por soxhlet con el solvente etanol para *Escherichia coli* 1, *Escherichia coli* 2, *Escherichia coli* 3, observándose que la concentración 1500 μg tiene mayor halo de inhibición y la concentración 100 μg tiene menor halo de inhibición.

Gráfico 4.5: Curva de Concentración del Extracto vs. Tamaño del Halo



Fuente: Elaboración propia.

❖ ANOVA Simple - Halos por DICLOROMETANO E. COLI

Variable dependiente: Halos

Factor: DICLOROMETANO (E. COLI)

Número de observaciones: 12

Número de niveles: 4

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para halos. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de halos para los 4 diferentes niveles de DICLOROMETANO E. COLI.

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. (Anexo N° 9)

Medias y 95,0% de Tukey HSD

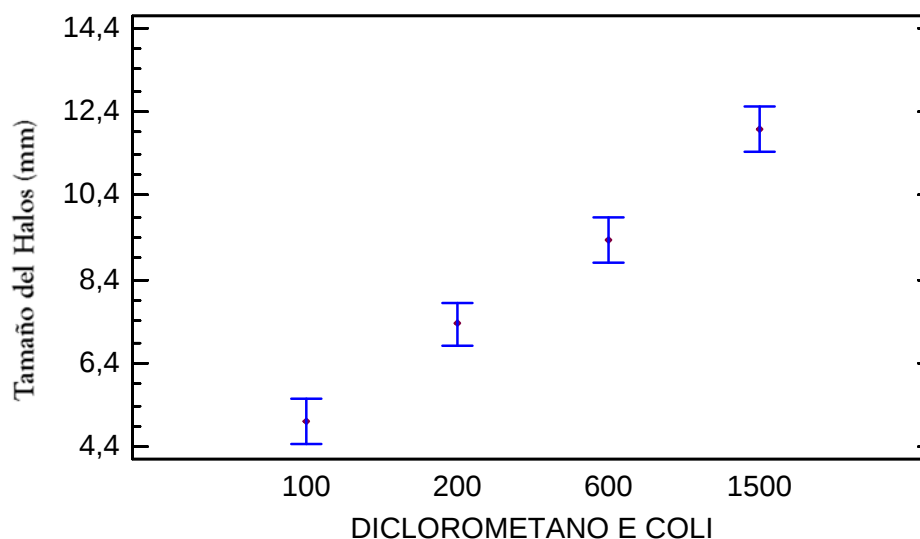
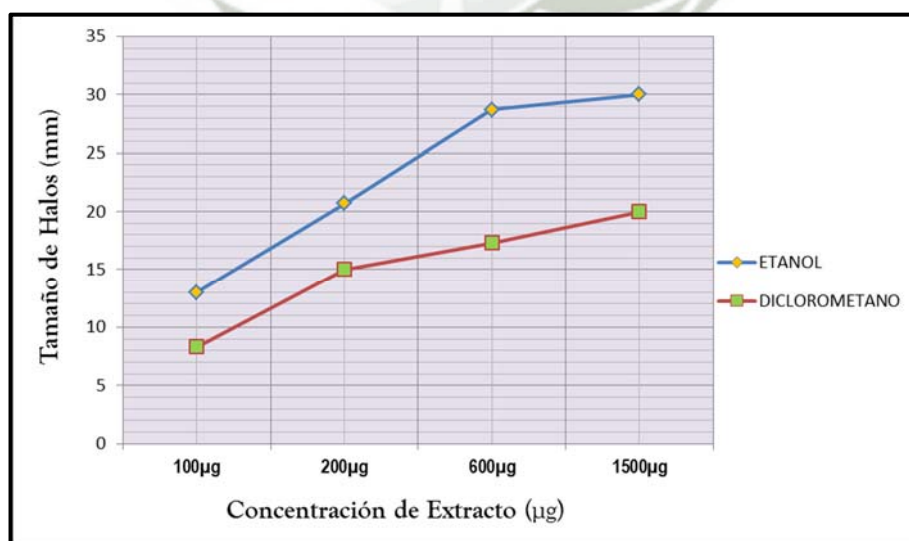


Figura 4.8: Comparación de los halos de inhibición (mm) producidos por la cepa de *Escherichia coli* con extracto diclorometánico de semillas.

Al observar la gráfica de cajas y bigotes, indica que realmente existe diferencia estadísticamente significativa entre la cepa *Escherichia coli* en estudio.

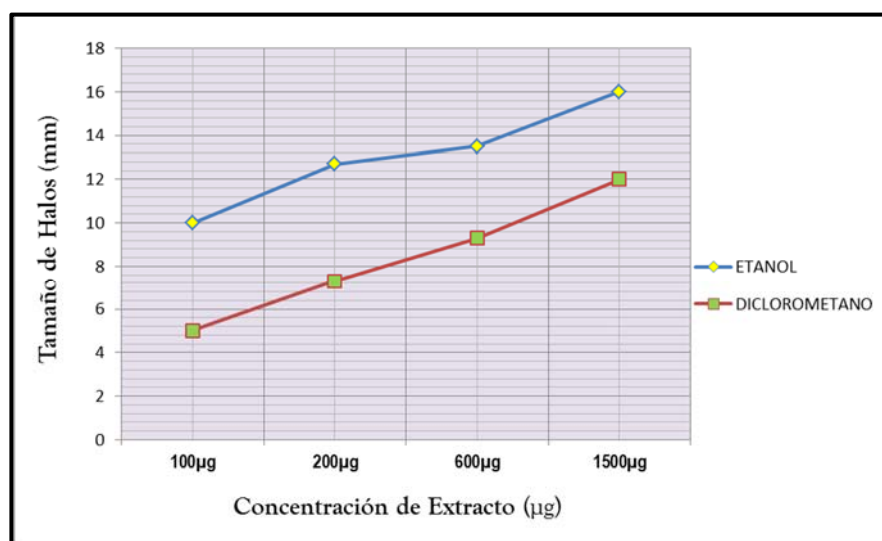
❖ CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y DICLOROMETÁNICOS FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Gráfico 4.6: Concentraciones de los Extractos vs. Tamaño del Halos



Fuente: Elaboración propia.

Gráfico 4.7: Concentraciones de los Extractos vs. Tamaño del Halos



Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

Se observa en el Gráfico 4.6 y Gráfico 4.7 que el extracto etanólico es más eficaz ya que presenta mayor halo de inhibición frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Por lo cual se trabajará con el extracto etanólico para comparar los halos de inhibición con los antibióticos en estudio.

Discusión:

Los resultados de la prueba de sensibilidad antimicrobiana por medio de halos de inhibición, el extracto etanólico y diclorometánico de nuestro estudio mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

El extracto etanólico fue más eficaz que el extracto diclorometánico debido a que el *Staphylococcus aureus* en la Tabla 4.13 y Tabla 4.15 demostró que a una concentración de 100 µg tiene un halo de inhibición de 13 mm y 8.3 mm respectivamente, para *Escherichia coli* la Tabla 4.14 y Tabla 4.16 a una concentración de 100 µg tuvo un halo de inhibición de 10 mm y 5 mm respectivamente.

Según literatura ¹⁶, el extracto etanólico para *Staphylococcus aureus* obtuvo un halo de inhibición de 8 mm a una concentración de 250 mg/mL el cual fue menor que nuestro extracto etanólico en estudio, ya que con la misma concentración nos dio un halo de

inhibición de 30 mm, por lo cual se concluye que nuestro extracto etanólico es más eficaz que el de la literatura ¹⁶.

4.7 COMPARACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICION CON DIFERENTES ANTIBIÓTICOS

La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de semillas de *Carica papaya* L. fue comparable a la de los antibióticos. La demostración de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico contra las bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron eficaces.

Tabla 4.17

Halos de Inhibición de los Diferentes Antibióticos para *Staphylococcus aureus*

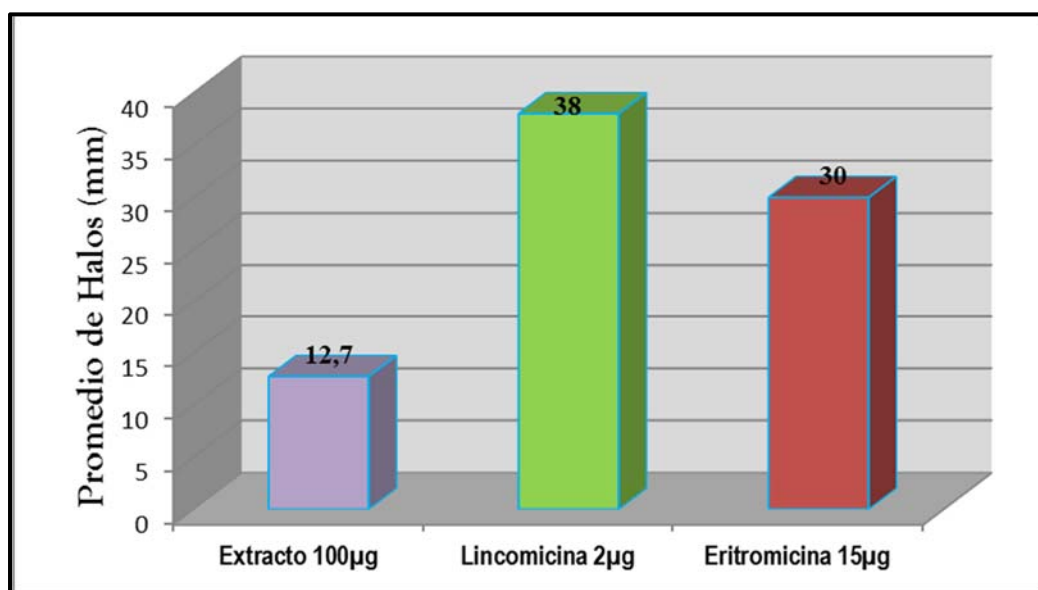
EXTRACTO ETANÓLICO			
Antibioticos	100µg	Lincomicina 2µg	Eritromicina 15µg
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	12 mm	38 mm	30 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	13 mm	38 mm	30 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> 3	13 mm	38 mm	30 mm
Promedio	12,7 mm	38 mm	30 mm

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la Tabla 4.17 nos muestra que la Lincomicina presenta el mayor halo de inhibición con 38 mm, siendo este el antibiótico de elección. En la Fotografía N°1 se observa la diferencia de los tamaños de los halos de inhibición frente a Lincomicina y Eritromicina. En la Fotografía N°3 se observa la diferencia de los tamaños de los halos de inhibición frente a Lincomicina, Eritromicina y nuestro extracto etanólico de semillas de *Carica papaya* L.

Gráfico 4.8: Halos de Inhibición frente a *Staphylococcus aureus*

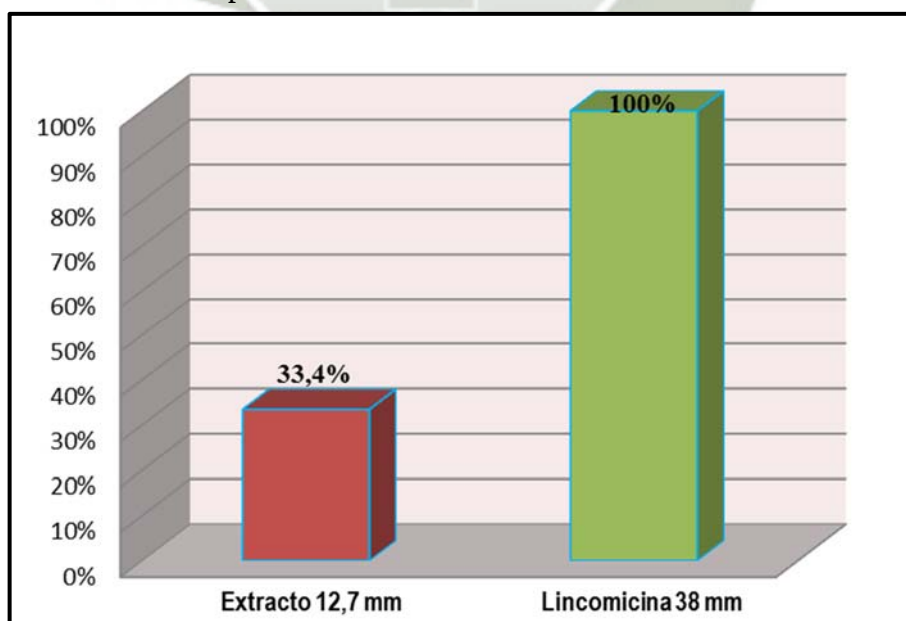


Fuente: Elaboración propia.

Discusión:

En la Tabla 4.17 el extracto etanólico a una concentración de 100 µg (la menor de nuestras concentraciones) frente a los antibióticos usados para *Staphylococcus aureus* (Lincomicina 2 µg, Eritromicina 15 µg) se obtuvo halos de inhibición de 12.7 mm para el extracto etanólico, 38 mm para Lincomicina y 30 mm para Eritromicina.

Gráfico 4.9: Representación Porcentual



Fuente: Elaboración propia.

❖ ANOVA Simple - Halos por EXTRACTO ETANÓLICO

Variable dependiente: Halos

Factor: EXTRACTO ETANÓLICO (S. AUREUS)

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para halos. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de halos para los 3 diferentes niveles de EXTRACTO ETANÓLICO.

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. (Anexo N° 10)

Medias y 95,0% de Tukey HSD

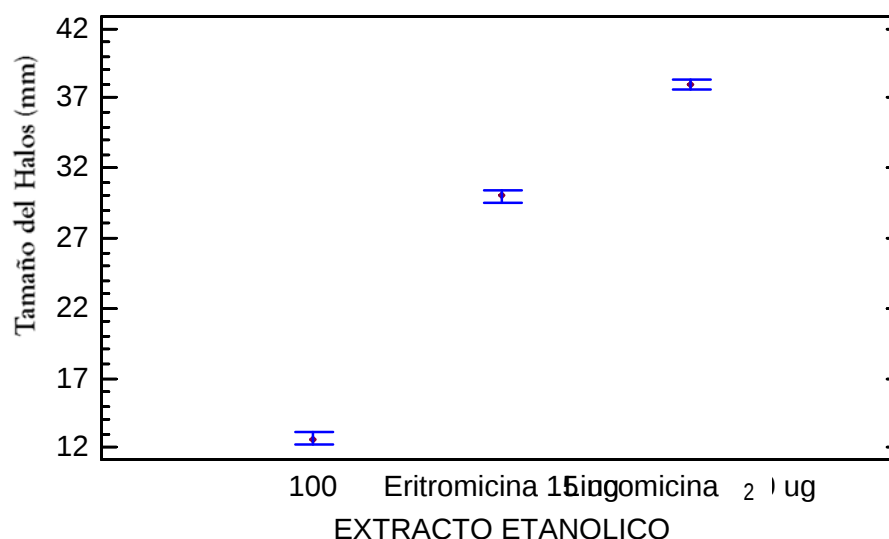


Figura 4.9: Tamaño de los halos de inhibición (mm) para *Staphylococcus aureus* con los diferentes antibióticos.

Al observar la gráfica nos indica que la Lincomicina y Eritromicina muestran una diferencia estadísticamente significativa; al igual que el extracto etanólico de semillas.

Según los resultados se puede observar que el mejor antibiótico para *Staphylococcus aureus* es Lincomicina, seguido por Eritromicina y Extracto etanólico de semillas.

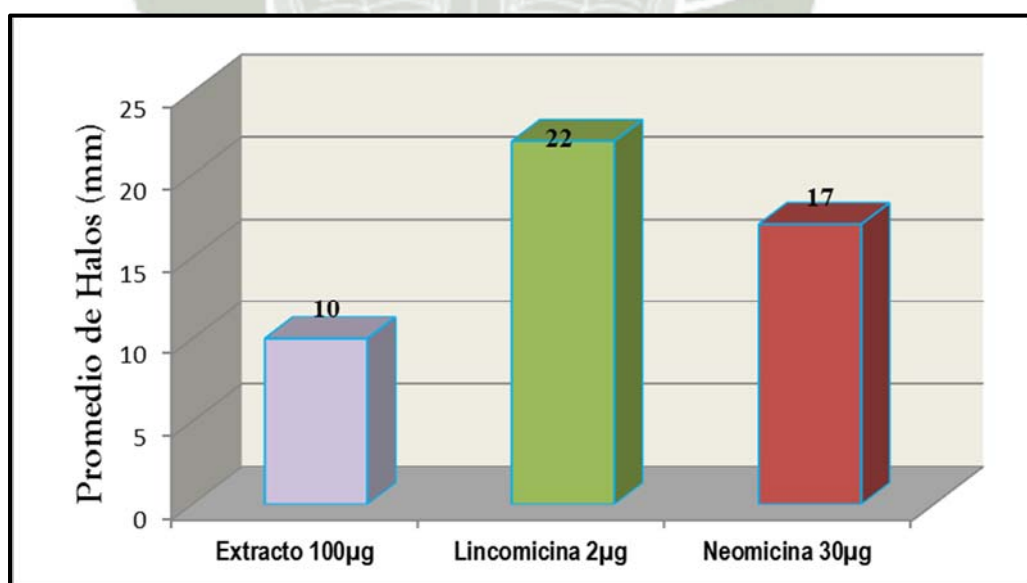
Tabla 4.18
Halos de Inhibición de los Diferentes Antibióticos para *Escherichia coli*.

EXTRACTO ETANÓLICO			
Antibioticos	100µg	Lincomicina 2µg	Neomicina 30µg
<i>Escherichia coli</i> 1	10 mm	22 mm	17 mm
<i>Escherichia coli</i> 2	10 mm	22 mm	17 mm
<i>Escherichia coli</i> 3	10 mm	22 mm	17 mm
Promedio	10 mm	22 mm	17 mm

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación:

En la Tabla 4.18 nos muestra que la Lincomicina presenta el mayor halo de inhibición con 22 mm, siendo este el antibiótico de elección. En la Fotografía N° 2 se observara la diferencia de los tamaños de los halos de inhibición frente a Lincomicina y Neomicina. En la Fotografía N° 4 se observara la diferencia de los tamaños de los halos de inhibición frente a Lincomicina, Neomicina y nuestro extracto etanólico de semillas de *Carica papaya L.*

Gráfico 4.10: Halos de Inhibición frente a *Escherichia coli*


Fuente: Elaboración propia.

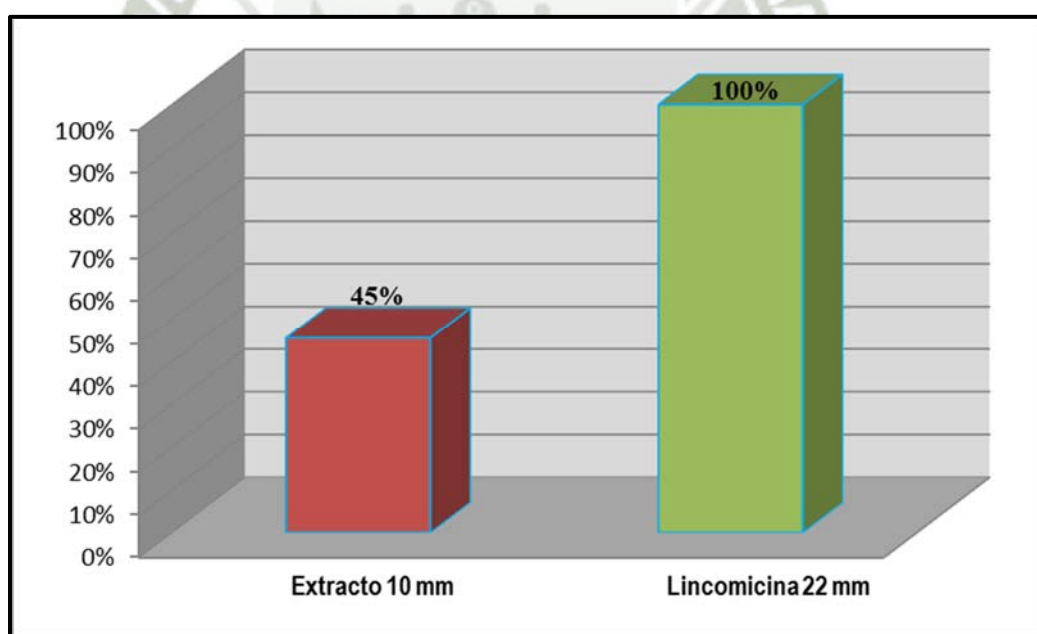
Discusión:

En la Tabla 4.18 el extracto etanólico a una concentración de 100 μ g (la menor de nuestras concentraciones) frente a los antibióticos usados para *Escherichia coli* (Lincomicina 2 μ g, Neomicina 30 μ g) los halos de inhibición fueron 10 mm para el extracto etanólico, 22 mm para Lincomicina y 17 mm para Neomicina.

Por lo que se concluye que hay una diferencia estadísticamente significativa debido a que los halos de inhibición de los antibióticos fueron superiores a nuestro extracto etanólico de semillas de *Carica papaya L.* pero nuestro estudio nos determinó que a mayor concentración del extracto etanólico tendremos mayor halo de inhibición como se demuestra en la Tabla 4.17 y Tabla 4.18.

Según literatura ^{16, 24}, las bacterias gram negativas fueron más susceptibles al extracto etanólico pero en nuestro estudio se demostró que las bacterias gram positivas fueron más susceptibles que las gram negativas.

Gráfico 4.11: Representación Porcentual



Fuente: Elaboración propia.

❖ ANOVA Simple - Halos por EXTRACTO ETANÓLICO

Variable dependiente: Halos

Factor: EXTRACTO ETANÓLICO (E. COLI)

Número de observaciones: 9

Número de niveles: 3

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de un factor para halos. Construye varias pruebas y gráficas para comparar los valores medios de halos para los 3 diferentes niveles de EXTRACTO ETANÓLICO.

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras. (Anexo N° 11)

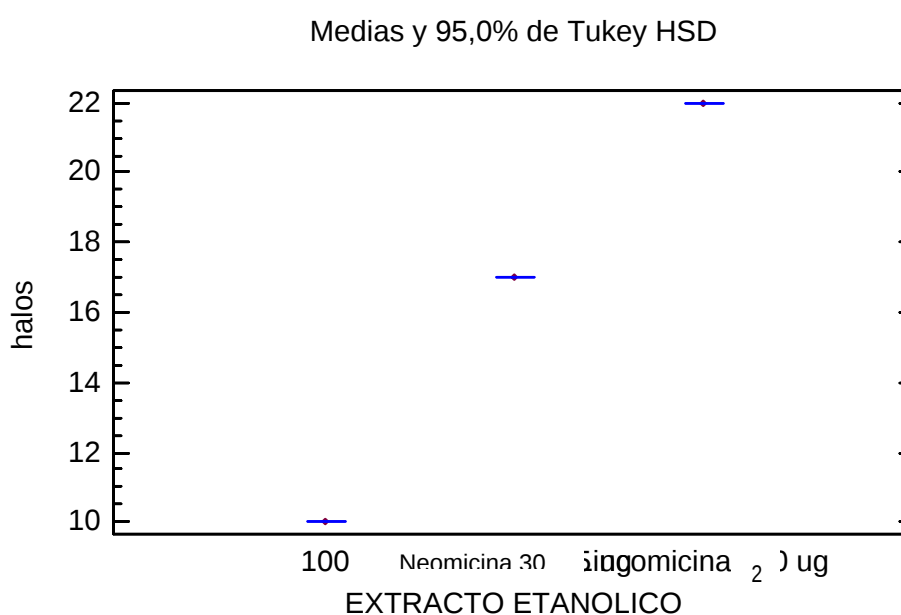


Figura 4.9: Tamaño de los halos de inhibición (mm) para *Escherichia coli* con los diferentes antibióticos.

Al observar la gráfica nos indica que la Lincomicina y Neomicina muestran una diferencia estadísticamente significativa; al igual que el extracto etanólico de semillas.

Según los resultados se puede observar que el mejor antibiótico para *Escherichia coli* es Lincomicina, seguido por Neomicina y Extracto etanólico de semillas.

FOTOGRAFIA N°1

HALO DE INHIBICIÓN DE *Staphylococcus aureus* CON ANTIBIÓTICOS



Interpretación:

Se observa que la Lincomicina tiene un efecto mayor que la Eritromicina.

FOTOGRAFIA N°2

HALO DE INHIBICIÓN DE *Escherichia coli* CON ANTIBIÓTICOS

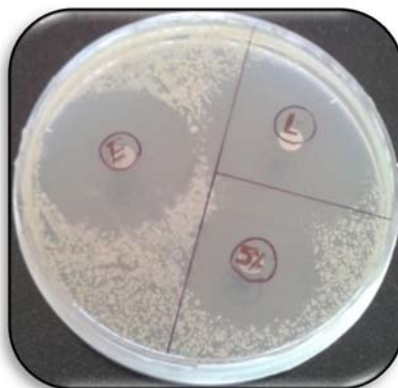


Interpretación:

Se observa que la Lincomicina tiene un efecto mayor que la Neomicina.

FOTOGRAFIA N°3

HALO DE INHIBICIÓN DE *Staphylococcus aureus* CON ANTIBIÓTICOS Y EXTRACTO ETANÓLICO

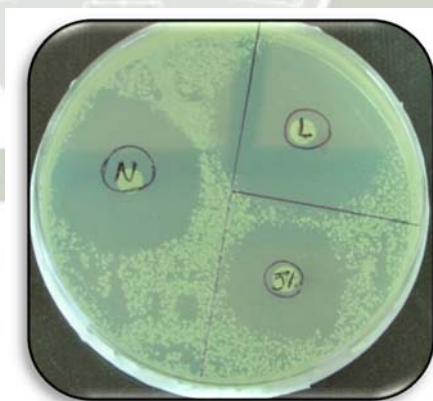


Interpretación:

Se observa que la Lincomicina tiene efecto mayor que la Eritromicina seguido en menor proporción por el extracto etanólico.

FOTOGRAFIA N°4

HALO DE INHIBICIÓN DE *Escherichia coli* CON ANTIBIÓTICOS Y EXTRACTO ETANÓLICO



Interpretación:

Se observa que la Lincomicina tiene efecto mayor que la Neomicina seguido en menor proporción por el extracto etanólico.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron los extractos etanólicos, metanólicos, diclorometánicos y hexánicos por método de extracción por Soxhlet, encontrándose diferencia en el rendimiento de cada extracto siendo el de mayor rendimiento con el solvente hexano con un rendimiento de 22% y el de menor rendimiento fue el solvente metanol con un rendimiento de 9%.
2. Mediante la marcha fitoquímica y cromatografía de capa fina (CCF) que se realizó a los extractos etanólicos, metanólicos, diclorometánicos y hexánicos de semillas de *Carica papaya* L. “Papaya”; se aprecia la presencia de Taninos, Flavonoides, Alcaloides y Terpenos excepto en los extractos diclorometánicos y hexánicos, no se aprecia Taninos.
3. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las cuales se obtuvo: para *Staphylococcus aureus* con extracto etanólico una CMI de 7.81 mg/ml y una CBM de 15.63 mg/ml; con el extracto diclorometánico se tiene una CMI de 31.25 mg/ml y una CBM de 62.5 mg/ml y para *Escherichia coli* con extracto etanólico una CMI de 15.63 mg/ml y una CBM de 31.25 mg/ml; con el extracto diclorometánico se tiene una CMI de 62.5 mg/ml y una CBM de 125 mg/ml, lo cual nos indica que el extracto etanólico de semillas es eficaz frente a nuestras bacterias en estudio.
4. En la comparación de los extractos con los antibióticos se pudo observar que el extracto etanólico de semillas presenta actividad antimicrobiana ya que hubo presencia de halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; los antibióticos usados para *Staphylococcus aureus* (Lincomicina, Eritromicina) y para *Escherichia coli* (Lincomicina, Neomicina), presentó una diferencia estadísticamente significativa debido a que el halo de inhibición fue superior a nuestro extracto.

SUGERENCIAS

1. Es necesario revalorizar el estudio de las plantas, ya que podrían ser una alternativa para la prevención y curación de enfermedades.
2. Se recomienda realizar investigaciones que determinen los efectos secundarios del Extracto Seco de *Carica papaya* L. “Papaya” como antibacteriano.
3. Realizar pruebas “*in vivo*” para valorar la efectividad y toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *Carica papaya* L. “Papaya” como también poder determinar sus dosis terapéuticas para su uso en la población.
4. Investigar el desarrollo de una forma farmacéutica para el tratamiento antimicrobiano de *Carica papaya* L. “Papaya”.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Agricultura Técnica Vol. 48 Enero – Marzo (1988) N°1.** Universidad Agraria la Molina.
2. **Arévalo A. Myriam, Enciso R Alexandra (1996).** Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de *Espeletias* encontradas en el páramo de Guasca. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C.
3. **Barreto B. Juan Felipe (1997).** Efectos Antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* causantes de enfermedades de la piel. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C.
4. **Brack Egg, Antonio (1999).** Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Perú
5. **Bruneton, Jean. (2001).** “Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales” II Edición, Zaragoza-España, Editorial Acribia S.A.
6. **Cáceres Ramírez, Pierina; Rincón Santos, Ivoone (2006).** Efecto antibacteriano del extracto de la *Urtica ureas L.* “Ortiga menor” *in vitro* frente a microorganismos gram negativos presentes en infecciones urinarias. Tesis presentada para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico U.C.S.M Arequipa.

7. **CN. Akujobi, (2010).** Determination of Antibacterial Activity of Papaya (Paw-Paw) Extracts. Department of Medical Microbiology/ Parasitology. Nigerian Journal of Clinical Practice. Vol. 13(1).
8. **Caminada, AM. (1998).** Análisis Fitoquímico y Evaluación del Efecto antiinflamatorio de los extractos de hojas de *Stachytarpheta Cayennensis* Yanahuactu en animales de experimentación. Tesis presentada para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico U.C.S.M. Arequipa.
9. **Castro Chambi, Glenny. (2003).** “Efecto in vitro del Aceite esencial de *Satureja boliviana* “Muña” sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*”. Tesis presentada para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico U.C.S.M. Arequipa.
10. **Cornejo Alarcón, Víctor (1986).** Las Plantas Medicinales y su correcta utilización. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Instituto de investigación de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Área de Botánica.
11. **Cueva Sevillano, Alfonso (2003).** Enciclopedia Plantas Medicinales propiedades y usos. 1º Edición 2003. Tomo I y II. Editorial A.F.A. – Editores Importadores S.A. Perú.
12. **Cultivo de lechosa, Fundación de Desarrollo Agropecuario, Guía técnica N°14, Segunda Edición 1998.** Santo Domingo, República Dominicana.
13. **Domínguez S., Xorge Alejandro.** “Cromatografía en Papel y Capa Delgada” Departamento de Química Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey; Monterrey, N.L. México
14. **Domínguez S. (1982).** Cromatografía en papel y en capa delgada, 2da. Edición. Editora: Eva V. Chesneav

15. **Domínguez, X.A. y Domínguez, S. (1990).** “Química Orgánica Experimental. Técnicas de extracción con disolventes orgánicos” Tomo I México.
16. **Doughari, J. H.; Elmahmood A.M. (2007).** Studies on the antibacterial activity of root extract of *Carica papaya* L. Department of Microbiology, Federal University of Technology, Adamawa Sate, Nigeria. Journal of Microbiology.
17. **Espinoza Salazar, Inés Mercedes (2003).** “Análisis Fitoquímico y Actividad Antibacteriana de *Tilladsia Recurvata*”. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Ciencias Biológicas de la Salud.
18. **Fenstein (1993).** Alvan Bioestadística Clínico. The Edition C.V. Mosby Company.
19. **G. Dawkins, H. Hewitt, Y. Wint, P.C. Obiefuna, B Wint (2003).** Antibacterial Effects of Carica Papaya fruit on common wound organisms.
20. **Gallego, G. (1994).** Estadística Aplicada, Ediciones Lumen. 1era. Edición, Arequipa.
21. **Goodman and Gilman, (1996).** Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9na. Edición. Editorial Interamericano.
22. **Hila Cano, Anthony Anselmo; Lazo Fuentes, Fanny Kareila. (2006).** “Determinación del efecto antibacteriano de la *Ambrosia peruviana* L. (Altamisa) *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pygogenes* y *Klebsiella pneumoniae*”. Tesis presentada para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico U.C.S.M. Arequipa.
23. **Jave Marquez, Mercedes (2009).** “Prácticas de Microbiología Farmacéutica” Universidad Católica de Santa María, Arequipa.
24. **Jigna P, Sumitra C (2006).** In vitro antimicrobial activities of extracts of *Launaea procumbns* Roxb. (Labiatae), *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) and *Cyperus rotundus* L. (Cyperaceae). Afr. J. Biomed. Res. 9(2): 89-93.

25. **Koneman, Md. (1999).** Diagnostico Microbiológico, 5ta Edición, Editorial Medica Panamericana.
26. **Kuklinski, Claudia “Farmacognosia” (2000).** Barcelona, Ediciones Omega. S.A.
27. **Lelea G. (1993).** Evaluación de un nuevo método para determinar la sensibilidad antibiótico de los uropatógenos en el Hospital Regional Honorio Delgado de Arequipa. Tesis presentada para optar el Título Profesional de Biología U.N.S.A. Arequipa.
28. **Lock Ugaz, O. (1994).** Investigación Fitoquímica, 2da. Edición Pontificia Universidad Católica del Perú.
29. **Luna Ochoa, Teófilo (1999).** Las Frutas su Poder Curativo. Edición 1999. Editorial El Camino de Vida.
30. **M.S Hounzangbe – Adote, V. Paolini, I. Fouraste, K. Mountairou, H. Hoste (2005).** In vitro effects of four tropical plants on three life-cycle stages of the parasitic nematode, *Haemonchus Contortus*.
31. **Manual de Procedimientos. (2002).** Para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el Método de Disco- Difusión, Serie de Norma, técnica N°30, Lima.
32. **Manual El Cultivo del Papayo en el Perú (1992).** Ediciones Fundeagro. Fundación para el desarrollo del agro. 1º Edición.
33. **Nkuo-Akenji T, Ndip R, McThomas A, Fru EC (2001).** Antisalmonella activity of medicinal plants from Cameroon.
34. **Ore Mariátegui, Luzmila (1991).** Tratamiento de parasitosis por *Áscaris lumbricoides* con *Allium sativum* (ajo) y *Carica papaya* (papaya). Universidad

Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico.

35. **Osato JA., Santiago LA., Remo GM, Cuadra MS, Mori A. (1993).** “Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya.” Life Sci.

36. **Peñaranda Libia Mercedes, Sierra M. Martha E. (2003).** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera Simanba* y *Bursera Graveolens* contra algunos microorganismos patógenos. Carrera Microbiología. Facultad Ciencias. Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C.

37. **Prescott Lasing M. (1999).** “Microbiología”, IV edición, España, Editorial Mx Graw-Hill- Interamericana, S.A.U

38. **Propiedades funcionales de la papaya [en línea].**
<http://www.lapapaya.info/cat/la-papaya/1>. Mayo, 2011

39. **R. Kermanshai, Brian E. McCarry, Jack Rosenfeld, Peter S. Summers, Elizabeth A. Weretilnyk, George J. Sorger (2001).** Benzyl Isothiocyanete is the chief or sola antihelmintic in papaya seed extracts. Journal of Phytochemistry.

40. **Rodríguez V. Piedad M, Uribe Martínez Nelva E. (1995).** Efecto antagónico de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* frente *E. coli* y *Shiquella sp* aislados de materia fecal obtenida de un grupo de niños entre 1 y 7 años. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C.

41. **Ruiz Giraldo Martha C, Susunaga Susunaga Clara M. (2000).** Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens* (BURSERACEAS), frente a microorganismos como: *Agrobaclerium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*,

Trichoderma viride y *Botrytis cinerea*. Carrera Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo Pregrado. Bogotá D.C.

42. **Sánchez, I. (1992).** Frutales andinos. Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. Colección FAO, Producción y Protección vegetal. Roma, Italia.
43. **Silva Delgado, Hernann (1997).** Plantas Medicinales de la Amazonia Peruana utilizados por curanderos y chamanes con fines, Anticonceptivos. Instituto Peruano de Seguridad Social, Instituto de Medicina Tradicional.
44. **Starley IF, Mohammed P, Schneider G, Bickler SW (1999).** The treatment of pediatric bumns using topical papaya.
45. **Tenover, Fred C.; Mohammed, M. Jasmine (2000).** Organización Mundial de las Salud. Resistencia Antimicrobiana en las Américas: Magnitud del problema y su contención. INS Washington Editorial Opción 3.
46. **Torres, C. M, (2004).** Investigación en la trasformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mulis - Subdirección Científica. Bogotá D. C.
47. **Torres Tovar, Humberto (2006).** “Guía de Prácticas de Farmacognosia” Arequipa, U.C.S.M
48. **Tovar Cerpa, Oscar (2001).** Plantas Medicinales del valle de Mantaro. Perú. CONCYTEC
49. **Tramil (1997).** Farmacopea Vegetal Caribeña. Primera Edición 1997. Ediciones Desormeaux.
50. **Uribe Claudia F. (2003).** Seguimiento epidemiológico de infección nosocomial por *Staphylococcus aureus* *meticilino resistente* mediante electroforesis de

campo pulsado. Carrera Microbiología. Facultad de Ciencias. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C.

51. **Vieria RH, Rodríguez DP, Goncalven FA, Pauls Menelen (2002).** Microbiology Effect of Medicinal Plants Extract (*Carica papaya*) upon Bacteria. English Journal of Rev-inst-med- trop.2002:4:82-86
52. **Villar del Fresno, Ángel María (2003).** “Farmacognosia General”. España.



ANEXOS



ANEXO N° 1

ESCALA DE MAC FARLAND

PREPARACIÓN DEL ESTANDAR N°5 DE LA ESCALA DE MAC FARLAND

a) Composición

BaCl₂	+	H₂SO₄	—————→	BaSO₄
0.5ml		99.5ml		Turbidez
0.05ml		9.95ml		10ml

b) Preparación

La escala de Mac Farland, equivale a una concentración de 10⁸ UFC/ml.

Se prepara añadiendo 0.5ml de BaCl₂ 0.048M a 99.5ml de H₂SO₄ 0.36N.

c) Cálculos

$$\text{H}_2\text{SO}_4 (0.36\text{N}) = \frac{0.36\text{eq}}{1\text{L}} \times \frac{98.08\text{g}}{2\text{eq}} \times \frac{1\text{ml}}{1.84\text{g}} \times \frac{100\text{g H}_2\text{SO}_4}{96\text{g}} = 9.99\text{ml/L}$$

Necesito 9.99ml de H₂SO₄cc. para preparar 1000ml de H₂SO₄ 0.36N.

$$\text{BaCl}_2 (0.048\text{M}) = \frac{0.048\text{mol}}{1\text{L}} \times \frac{208.3\text{g BaCl}_2}{1\text{mol}} \times \frac{1\text{L}}{1000\text{ml}} = 0.0099\text{g/ml}$$

Necesito 0.0099g de BaCl₂ para preparar 1ml de BaCl₂ 0.048M.

- En un tubo de ensayo colocar 10ml de H₂SO₄ 0.36N y retirar 0.05ml.
- Completar 0.05ml con BaCl₂ 0.048M; agitar.

- La turbidez de ese tubo de ensayo es similar al tubo N°5 de la Escala de Mac Farland, la que es equivalente a la concentración de 10^8 UFC/ml del inóculo.

ANEXO N° 2

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. MUELLER HINTON

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

1.1 FUNDAMENTO

En la preparación de este medio es fundamental que las concentraciones de timina, timidina y ácido 4-aminobenzoico, sean lo suficiente bajas para no inhibir la actividad antibacteriana de antibióticos y sulfamidas. Las dos primeras inhiben los antibióticos y el último las sulfamidas. El ensayo de sensibilidad de un microorganismo frente a un antibiótico se puede realizar sobre placas de agar Mueller-Hinton por procedimientos de difusión, por diluciones seriadas o por técnicas turbidimétricas en el Mueller-Hinton. En las técnicas de difusión se mide el halo de inhibición del crecimiento confluyente alrededor del depósito de antibiótico (discos, torrecillas, etc.).

1.2 COMPOSICIÓN

Fórmula (por litro)	
Almidón	1.5g
Infusión de Carne (a partir de 300g)	2.0g
Peptona de Caseína Hidrolizada	17.5g
Agar	17.0g
pH final: 7.4 ± 0.2	

1.3 PREPARACIÓN

Suspender 38g (Agar) en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

2. AGAR SANGRE

Se emplea, añadiendo sangre o sangre cocida, para el cultivo y aislamiento de microorganismos exigentes, sobre todo patógenos y para su determinación. Si no se añade sangre, es adecuado como base para la preparación de otros medios especiales.

2.1 FUNDAMENTO

Dada la excelente base nutritiva, permite el crecimiento de prácticamente todos los microorganismos que pudieran estar presentes. Si se añade sangre se pueden determinarlas distintas formas de hemólisis que pudieran tener lugar. Si se calienta se obtiene el Agar Chocolate, también muy empleado. Por la adición de distintos antibióticos se obtienen medios con caracteres selectivos.

2.2 COMPOSICIÓN

Fórmula (por litro)	
Infusión del Musculo Cardiaco (a partir de 375g)	10.0g
Peptona de Carne	10.0g
Sodio Cloruro	5.0g
Agar	15.0g
pH final: 7.3±0.2	

2.3 PREPARACIÓN

Suspender 40g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 30 minutos (para cantidades de más de 1L). Para preparar placas de Agar Sangre incorporar 5 a 8% de sangre desfibrinada antes de distribuir en placa.

3. AGAR MANITOL SALADO

Se emplea para el aislamiento selectivo y recuento de Estafilococos patógenos en productos lácteos, cármicos, marinos y otros productos alimenticios. También se emplea con el mismo fin en productos farmacéuticos y cosméticos.

3.1 FUNDAMENTO

El efecto inhibidor se debe a la alta concentración de Sodio Cloruro del medio. Con la fermentación de la D(-)-Manita se genera ácido que ocasiona el viraje del rojo de fenol al amarillo, permitiendo así una mayor claridad en el momento de establecer el diagnóstico, ya que la mayoría de los Estafilococos patógenos fermentan este azúcar.

3.2 COMPOSICIÓN

Fórmula (por litro)	
Sodio Cloruro	75.0g
D(-)-Manita	10.0g
Extracto de Carne	1.0g
Mezcla de Peptonas	10.0g
Rojo de Fenol	0.025g
Agar	15.0g
pH final: 7.4±0.2	

3.3 PREPARACIÓN

Suspender 111g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

4. EMB (Eosina Azul de Metilo)

Se emplea para la investigación y diferenciación de bacilos entéricos y microorganismos coliformes. Con este medio se puede identificar *Escherichia coli* y *Enterobacter*. También permite la identificación *Candida albicans*.

4.1 FUNDAMENTO

La eosina y el azul de metileno son productos que inhiben parcialmente el crecimiento de microorganismos gram-positivos, entre ellos los *Streptococcus* fecales. Además la combinación de azul de metileno y la eosina permite diferenciar los gérmenes lactosa positivos de los lactosa negativos.

4.2 COMPOSICIÓN

Fórmula (por litro)	
Eosina Amarillenta	0.4g
Azul de Metilo	0.065g
Lactosa	10.0g
Peptona de Gelatina	10.0g
di- Potasio Hidrogeno Fosfato	2.0g
Agar	15.0g
pH final: 7.1±0.2	

4.3 PREPARACIÓN

Suspender 37.4g en 1L de agua destilada; calentar y agitar hasta ebullición y hervir durante 1 minuto. No sobre calentar. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

5. TSB (Caldo Tripticasa Soya)

Se emplea como medio de uso general para el cultivo de todo tipo de microorganismo.

5.1 FUNDAMENTO

Se ajusta a la formulación de la USP y a la Ph. Eur. Por el contenido de peptona de soja y peptona de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes. Se utilizan como tales o como base para preparar medios especiales (Agar Sangre, Agar Proteus).

5.2 COMPOSICIÓN

Fórmula (por litro)	
Peptona de Soja	3.0g
D(+)-Glucosa	2.5g
Peptona de Caseína	17.0g
di- Potasio Hidrógeno Fosfato	2.5g
Sodio Cloruro	5.0g
pH final: 7.3±0.2	

5.3 PREPARACIÓN

Suspender 30g en 1L de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

6. CALDO PEPTONADO

Se emplea como diluyente en muestras alimentarias, aguas y materiales diversos. Para la realización de la prueba del Indol en aquellos microorganismos capaces de producirlo.

6.1 FUNDAMENTO

La peptona tiene una elevada concentración de Triptófano, el cual es degradado a Indol por un cierto número de micro-organismos entre ellos *E. coli*. La detección de este producto se hace añadiendo el reactivo de KOVACS después de la incubación. Este medio es adecuado para determinar los organismos Indol-positivos y puede utilizarse en lugar de los Caldos Triptófano. En usos generales se puede emplear para el cultivo de una gran variedad de microorganismos, siempre y cuando no presenten exigencias particulares.

6.2 COMPOSICIÓN

Fórmula (por litro)	
Peptona	10g
Sodio Cloruro	5g
pH final: 7.2±0.2	

6.3 PREPARACIÓN

Suspender 15 g en 1L de agua destilada; agitar hasta disolución total. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO N° 3

PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN

1. PRUEBA DE COAGULASA

La coagulasa se halla presente en dos formas “libre y fija”, cada una de ellas posee propiedades que requieren el uso de técnicas separadas.

La coagulasa fija (portaobjetos): Conocida como factor de aglutinación está unida a la pared celular bacteriana y no está presente en los filtrados de cultivo. Los hilos de fibrina formados entre las células bacterianas suspendidas en el plasma (fibrinógeno) provocan su aglutinación. La cual se indica por la aparición de agregados visibles en el portaobjetos.

La coagulasa libre (Prueba en tubo): Es una sustancia semejante a la trombina, que se halla presente en los cultivos de filtrados. Cuando una suspensión de bacterias productoras de coagulasa se mezclan con partes iguales de plasma, se forma un coagulo visible como consecuencia de los factores de coagulación del plasma.

Técnica

1. Coagulasa Fija:

- Con un asa de kolle en punta, coger del centro de la placa una colonia a investigar.
- Agregar 1 o 2 gotas de plasma humano o de conejo a un portaobjeto.
- Suspender el organismo e inclinar el portaobjeto hacia uno y otro lado y observar si hay la aparición de grumos.

Interpretación

- o La rápida aparición de un precipitado granular o la formación de grumos aparece a los 30seg. Y se considera una reacción positiva.

2. Coagulasa Libre:

- o En un tubo colocar 0.5ml de plasma.
- o Con el asa de kolle en punta coger el centro de la placa una colonia a investigar.
- o Mezclar por rotación suave del tubo, evitando remover o agitar el contenido.
 - o Colocar el tubo en la estufa a 37°C por 4 horas, hasta observar la formación de un coagulo visible. En caso de ser negativo deberá dejarse por 18-24 horas y observar.

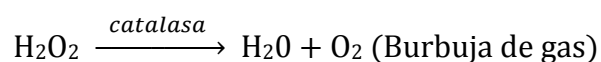
Interpretación

- o La reacción se considera positiva ante cualquier grado de coagulación visible dentro del tubo. Las bacterias fuertemente positivas pueden producir un coagulo en 1-4 horas. Por lo tanto pruebas negativas a las 4 horas, deben observarse después de 18-24 horas de incubación.

2. PRUEBA DE CATALASA

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrogeno en oxígeno y agua. Químicamente la catalasa es una hemoproteína de estructura similar a la hemoglobina, excepto que los cuatro átomos de hierro de la molécula están en estado oxidado (Fe^{+3})

El peróxido de hidrogeno se forma como uno de los productos finales del metabolismo oxidativo o aeróbico de los hidratos de carbono.



Técnica

- o Con un asa de kolle en punta colocar en el centro de la placa una colonia a investigar.
- o Agregar 1 o 2 gotas de peróxido de hidrogeno.
- o Suspender el organismo y observar si hay aparición de burbujas debido al desprendimiento del oxígeno.

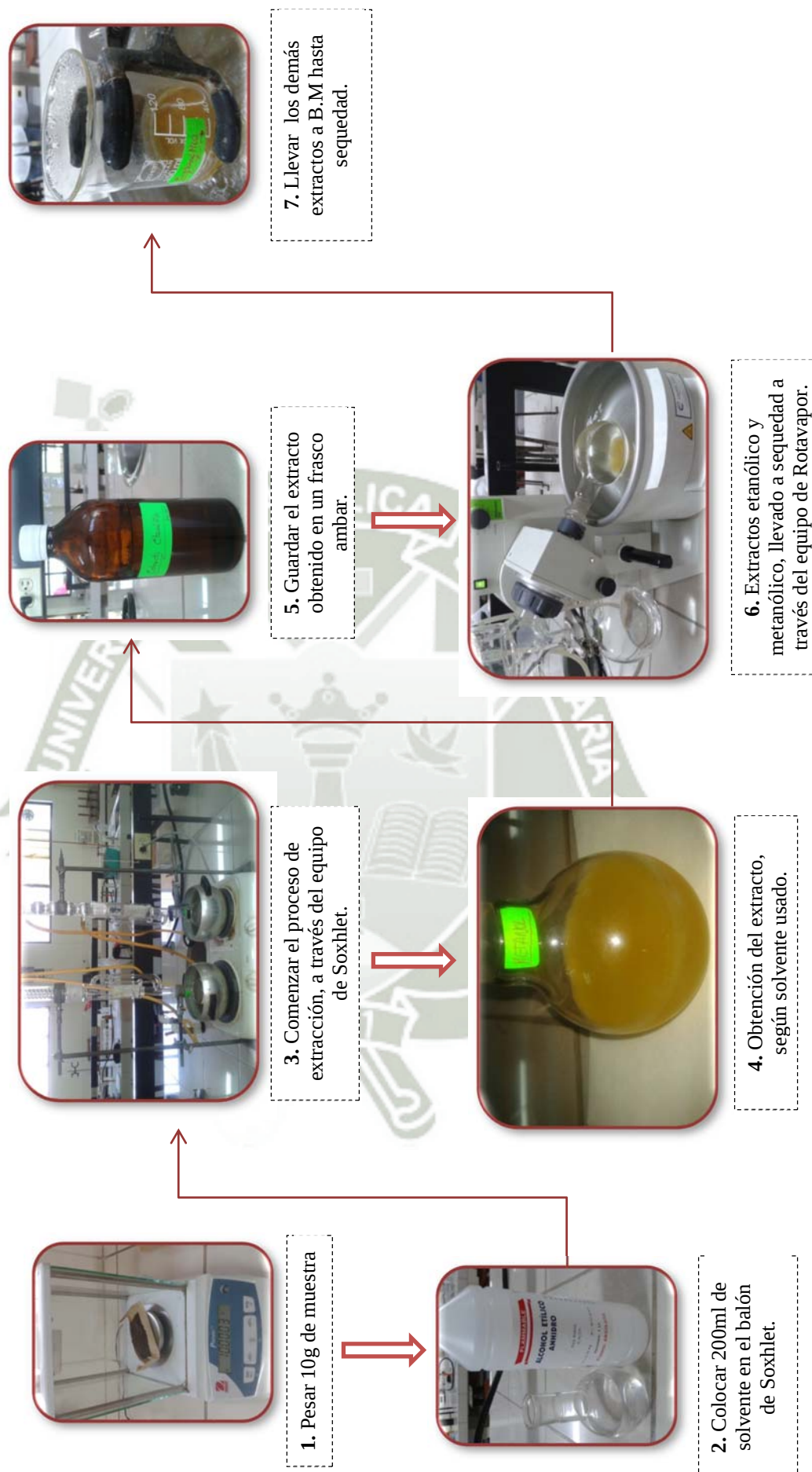
Interpretación

- o La rápida aparición y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva.



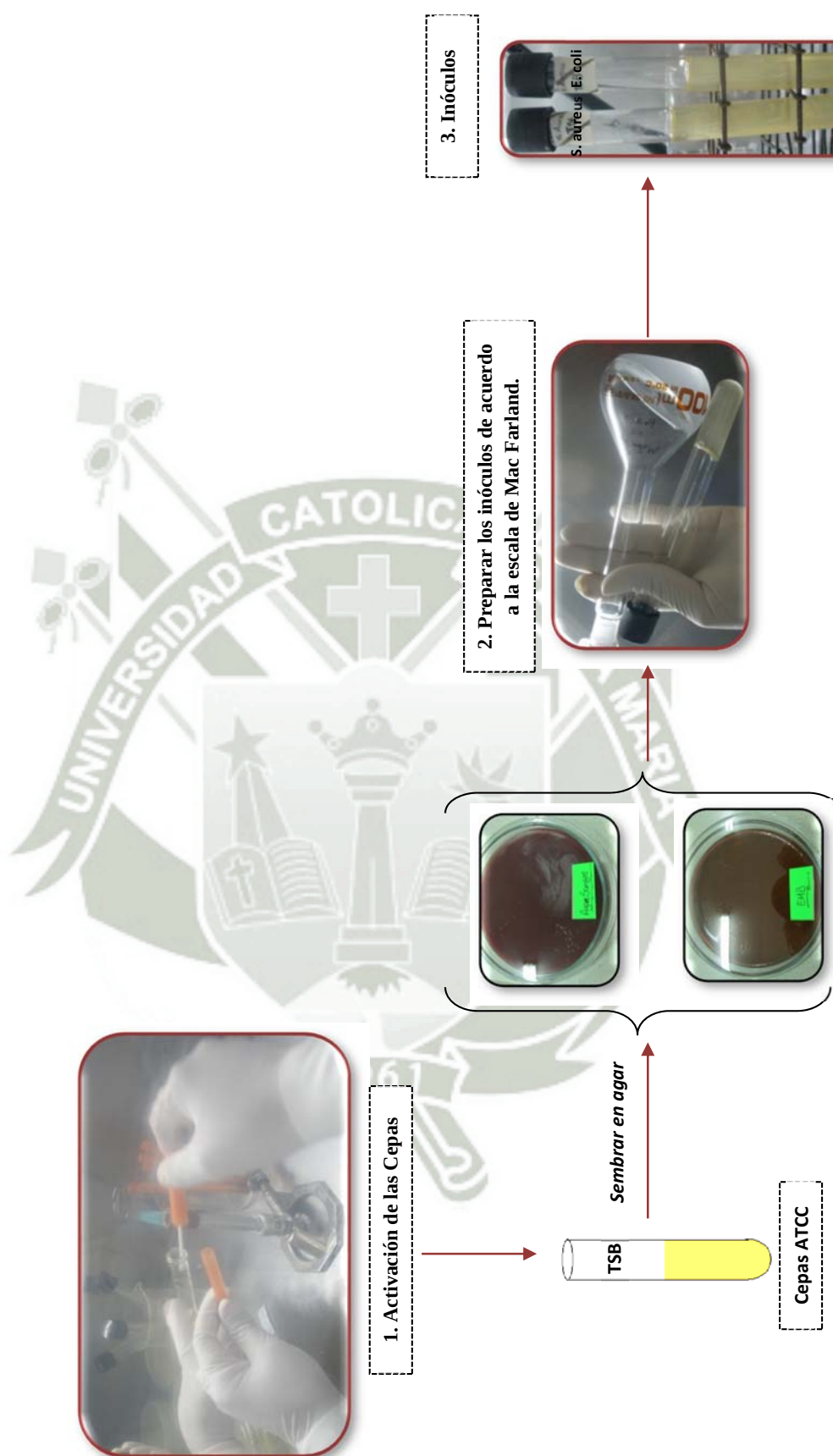
ANEXO N°4

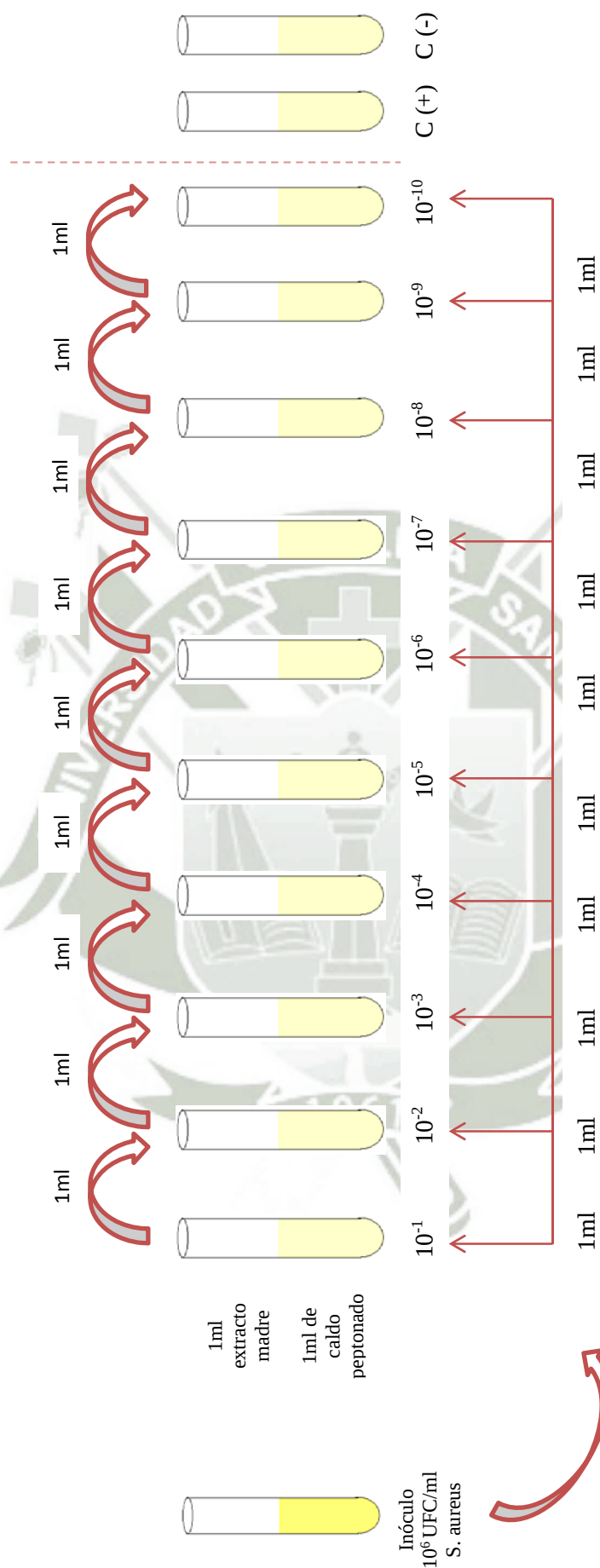
OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE SEMILLAS DE *CARICA PAPAYA L.*

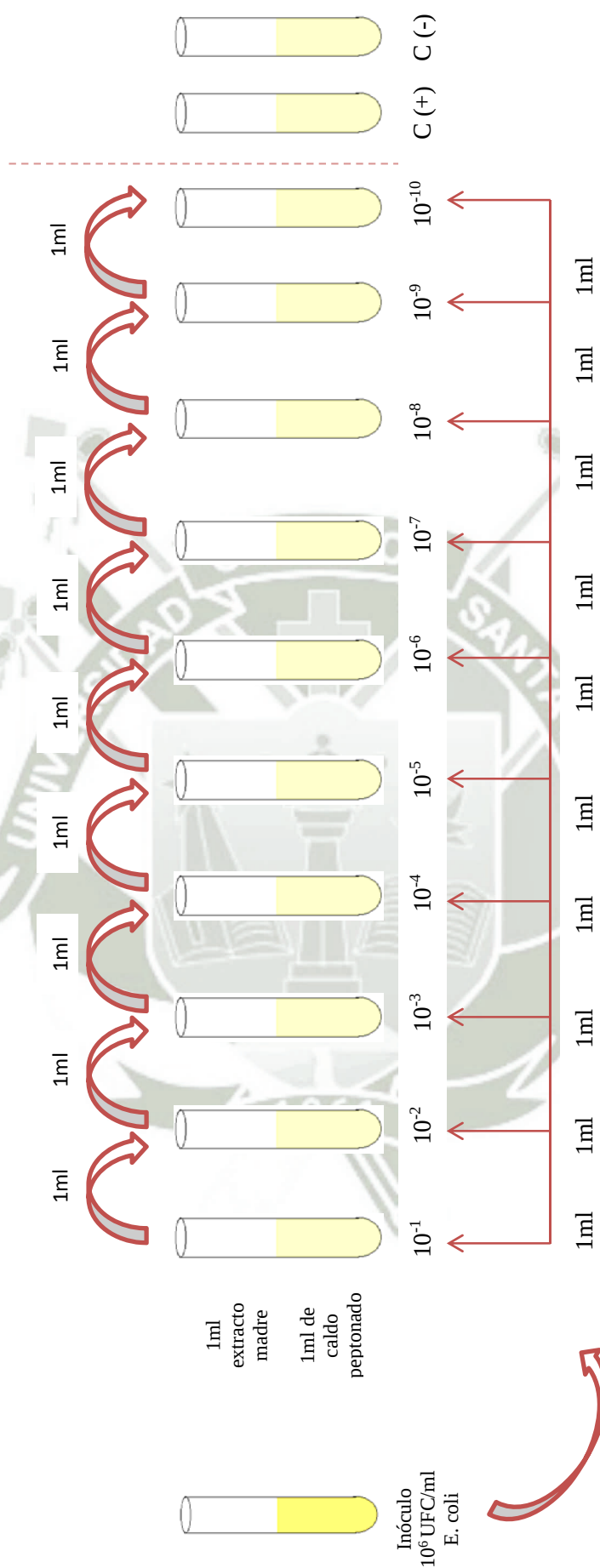


ANEXO N° 5

PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN BACTERIANA







ANEXO N° 6

EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Tabla ANOVA para Halos por ETANOL S. AUREUS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	559,6	3	186,5	1119,17	0,0000
Intra grupos	1,333	8	0,1667		
Total (Corr.)	560,9	11			

La tabla ANOVA, la Razón-F, que en este caso es igual a 1119,17 es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el Valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de halos entre un nivel de ETANOL S. AUREUS y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halos por ETANOL S. AUREUS

Método: 95, 0 porcentaje Tukey HSD

<i>ETANOL S. AUREUS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media (mm)</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	13,0	X
200	3	20,67	X
600	3	28,67	X
1500	3	30,0	X

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Por ello, podemos decir que la concentración de 1500 tiene mayor efecto frente a las demás concentraciones debido al tamaño del halo de inhibición.

ANEXO N° 7

EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS EN *ESCHERICHIA COLI*

Tabla ANOVA para Halos por ETANOL E. COLI

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	55,58	3	18,53	111,17	0,0000
Intra grupos	1,333	8	0,1667		
Total (Corr.)	56,92	11			

La tabla ANOVA, la Razón-F, que en este caso es igual a 111.2, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el Valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de halos entre un nivel de ETANOL E. COLI y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halos por ETANOL E. COLI

Método: 95, 0 porcentaje Tukey HSD

<i>ETANOL E. COLI</i>	<i>Casos</i>	<i>Media (mm)</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	10,0	X
200	3	12,67	X
600	3	13,67	X
1500	3	16,0	X

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Por ello, podemos decir que las concentraciones 200 y 600 no hay mucha diferencia significativa en comparación con las otras concentraciones, siendo la concentración de 1500 el que tiene mayor efecto debido al tamaño del halo de inhibición.

ANEXO N° 8

EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE SEMILLAS EN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Tabla ANOVA para Halos por DICLOROMETANO S. AUREUS

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	224,3	3	74,78	448,67	0,0000
Intra grupos	1,333	8	0,1667		
Total (Corr.)	225,7	11			

La tabla ANOVA, la Razón-F, que en este caso es igual a 448.7, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el Valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de halos entre un nivel de DICLOROMETANO S. AUREUS y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halos por DICLOROMETANO S. AUREUS

Método: 95, 0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media (mm)</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	8,333	X
200	3	15,0	X
600	3	17,33	X
1500	3	20,0	X

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Por ello, podemos decir que la concentración de 1500 tiene mayor efecto frente a las demás concentraciones debido al tamaño del halo de inhibición.

ANEXO N° 9

EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE SEMILLAS EN *ESCHERICHIA COLI*

Tabla ANOVA para Halos por DICLOROMETANO E. COLI

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	79,58	3	26,53	159,17	0,0000
Intra grupos	1,333	8	0,1667		
Total (Corr.)	80,92	11			

La tabla ANOVA, la Razón-F, que en este caso es igual a 159.2, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el Valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de halos entre un nivel de DICLOROMETANO E. COLI y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halos por DICLOROMETANO E. COLI

Método: 95, 0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media (mm)</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	5,0	X
200	3	7,333	X
600	3	9,333	X
1500	3	12,0	X

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Por ello, podemos decir que la concentración de 1500 tiene mayor efecto frente a las demás concentraciones debido al tamaño del halo de inhibición.

ANEXO N° 10

EXTRACTO ETANÓLICO CON LOS DIFERENTES ANTIBIÓTICOS FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Tabla ANOVA para Halos por EXTRACTO ETANÓLICO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1006,2	2	503,1	4528,00	0,0000
Intra grupos	0,6667	6	0,1111		
Total (Corr.)	1007,0	8			

La tabla ANOVA, la Razón-F, que en este caso es igual a 4528.00, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el Valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de halos entre un nivel de EXTRACTO ETANÓLICO y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para halos por EXTRACTO ETANÓLICO

Método: 95, 0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media (mm)</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 µg	3	12,67	X
Eritromicina 15 µg	3	30,0	X
Lincomicina 2 µg	3	38,0	X

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Por ello, podemos decir que el antibacteriano de mejor elección sería la Lincomicina ya que presenta mayor tamaño del halo de inhibición pero nuestro extracto a una concentración de 100 también presenta halo de inhibición.

ANEXO N° 11

EXTRACTO ETANÓLICO CON LOS DIFERENTES ANTIBIÓTICOS FRENTE A ESCHERICHIA COLI

Tabla ANOVA para Halos por EXTRACTO ETANÓLICO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	218,0	2	109,0		
Intra grupos	0,0	6	0,0		
Total (Corr.)	218,0	8			

La tabla ANOVA, la Razón-F, que en este caso es igual a 109.0, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el Valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de halos entre un nivel de EXTRACTO ETANÓLICO y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Halos por EXTRACTO ETANÓLICO

Método: 95, 0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media (mm)</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100 µg	3	10,0	X
Neomicina 30 µg	3	17,0	X
Lincomicina 200 µg	3	22,0	X

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

Por ello, podemos decir que el antibacteriano de mejor elección sería la Lincomicina ya que presenta mayor tamaño del halo de inhibición seguido de la Neomicina, pero nuestro extracto a una concentración de 100 también presenta halo de inhibición.

ANEXO N° 12

HALLAR LAS CONCENTRACIONES DE LOS NUEVOS EXTRACTOS MADRES PARA DETERMINAR LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

❖ **CONCENTRACIÓN 5%: 50 mg/mL**

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 (25\%) = (10\text{ml}) (5\%)$$

$$V_1 = 2\text{ml del extracto madre}$$

❖ **CONCENTRACIÓN 10%: 100 mg/mL**

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 (25\%) = (10\text{ml}) (10\%)$$

$$V_1 = 4\text{ml del extracto madre}$$

❖ **CONCENTRACIÓN 15%: 150 mg/mL**

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V_1 (25\%) = (10\text{ml}) (15\%)$$

$$V_1 = 6\text{ml del extracto madre}$$