



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y
PROTEOLÍTICA DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS
ESPECIES VEGETALES PAPAYA (*Carica Papaya*), HIGO (*Ficus
carica*)”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para obtener el grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: KAREN ARACELLY TOBAR ARMENDARIZ

TUTOR: LCDO. GERARDO MEDINA, PhD

Riobamba - Ecuador

2018

©2018, Karen Aracelly Tobar Armendáriz

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de Titulación Tipo: Proyecto de investigación **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y PROTEOLÍTICA DE EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS ESPECIES VEGETALES PAPAYA (*Carica Papaya*), HIGO (*Ficus carica*)”**, de responsabilidad de la señorita Karen Aracelly Tobar Armendáriz, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Lcdo. Gerardo Medina Ramirez PhD

DIRECTOR DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. John Quispillo Moyota, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Karen Aracelly Tobar Armendáriz soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Karen Aracelly Tobar Armendáriz

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida, inteligencia y sabiduría para lograr esta meta, a mi madre por ser mi guía, mi apoyo, mi consejera incondicional que siempre estuvo ahí para mí, a mis abuelitos que han sido los pilares fundamentales de nuestra familia, a mis tíos y tías que son como unos segundos padres para mí y a los ángeles de mi vida mis primos.

A mis docentes que estuvieron durante todo este proceso impartíendome sus conocimientos y a mi segunda familia que forme durante mi carrera mis amigos.

Karen

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la vida, sabiduría e inteligencia necesaria para enfrentar y superar cada obstáculo que se presentó a lo largo de este proceso.

A mi Madre que es la razón de mi vida, mi ejemplo a seguir, gracias a ella por apoyarme, por brindarme todo lo necesario, aconsejarme y cuidarme. Gracias infinitas por todo lo que ha hecho por mí y gracias por no desampararme y por hacer el rol de papa y mama.

A mis abuelitos y tíos maternos que siempre han estado brindándome su apoyo incondicional, aconsejándome, dándome ánimos para seguir adelante y por nunca dejarme sola y estar para mí en todo momento.

A mis amigas y amigos por su apoyo incondicional prestada a lo largo de mi carrera, por compartir muchos momentos de satisfacción, tristeza y sobre todo por estar junto a mí en todo momento.

Agradezco de una forma muy especial a la Lcdo. Gerardo Medina PhD, BqF. John Quispillo M.Sc., por ayudarme a cumplir este sueño, gracias por su paciencia, consejos y sobre todo por los conocimientos impartidos durante la investigación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	
1. MARCO TEORICO	4
1.1. Agente antimicrobiano	4
1.1.1. <i>Clases de Antibióticos</i>	4
1.2. Resistencia a los antimicrobianos	8
1.2.1. <i>Mecanismos de resistencia bacteriana</i>	9
1.3. Métodos para la determinación de actividad antimicrobiana	10
1.3.1. <i>Método de difusión en disco o Kirby Bauer</i>	10
1.4. Proteínas	11
1.4.1. <i>Propiedades de las proteínas</i>	12
1.4.2. <i>Clasificación de las proteínas</i>	12
1.5. Péptidos	13
1.6.1. <i>Péptidos antimicrobianos</i>	13
1.7. Enzimas	14
1.7.1. <i>Propiedades de las enzimas</i>	14
1.7.2. <i>Nomenclatura</i>	14
1.7.3. <i>Clasificación</i>	15
1.8. Proteasas	16
1.8.1. <i>Actividad Proteasa</i>	16
1.8.2. <i>Clasificación</i>	16
1.10. Ficus Carica	19
1.10.1. <i>Taxonomía</i>	19
1.10.2. <i>Aplicaciones</i>	20
1.11. Carica papaya	20
1.11.1. <i>Taxonomía</i>	21
1.11.2. <i>Aplicaciones</i>	21

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	23
2.1. Lugar de Muestreo.....	23
2.2. Lugar de investigación	23
2.3. Materiales.....	23
2.3.1 <i>Cepas bacterias monitoras de la actividad bactericida</i>	25
2.4. Métodos.....	26
2.4.1. <i>Muestreo</i>	26
2.4.2. <i>Preparación de las muestras</i>	26
2.4.3. <i>Elaboración de extractos</i>	26
2.4.4. <i>Identificación de extractos</i>	29
2.4.5. <i>Determinación de la actividad proteasa</i>	31
2.4.6. <i>Determinación de la actividad antimicrobiana</i>	32
2.4.7. <i>Ensayo de sensibilidad: Difusión en agar</i>	32

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANALISIS	34
3.1. Obtención de extractos	34
3.2. Método estandar para la determinacion de la actividad proteasa	35
3.3. Resultados actividad proteasa.....	35
3.4. Resultados actividad antimicrobiana	37

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

INDICE DE ABREVIATURAS

°C	Centígrados
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection (ATCC)
Ca	Calcio
Fe	Hierro
g	Gramos
Km	Kilómetros
L	Litros
Lb	Libras
Mg	Magnesio
MH	Müller Hinton
mL	Mililitros
Mn	Manganeso
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidades formadoras de colonias
uL	Microlitros
Zn	Zinc

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Taxonomía de la especie <i>Ficus Carica</i>	19
Tabla 3-1: Taxonomía Carica Papaya.....	21
Tabla 4-2 Materiales de laboratorio.....	23
Tabla 5-2: Equipos de laboratorio	24
Tabla 6-2: Reactivos y medios de cultivo.....	24
Tabla 7-2: Cepas ATCC para la determinación de actividad bactericida	25
Tabla 8-2. Identificación de extractos	30
Tabla 9-2. Ensayos realizados para determinación de la actividad proteasa	31
Tabla 10-2. Antibióticos utilizados como control para las pruebas de sensibilidad	33
Tabla 11-3 Volumen obtenido de extractos alcohólicos y acuosos de Ficus carica y Carica papaya	34
Tabla 12-3. Resultados del ensayo de actividad proteasa	35
Tabla 13-3. Resultados actividad antimicrobiana para bacterias <i>Serratia marcescens</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Escherichia coli</i>	37
Tabla 14-3. Resultados actividad antimicrobiana para bacterias <i>Staphylococcus áureos</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1-3. Grafica de actividad proteasa diámetro del halo.....	36
--	----

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana y proteolítica de extractos obtenidos de las especies *Carica papaya* (Papaya) y *Ficus carica* (Higo): látex de los frutos, extractos acuosos y alcohólicos de las hojas, el fruto verde y maduro obtenidos mediante un proceso de homogenización en una licuadora, los extractos alcohólicos fueron centrifugados para obtener el sobrenadante y sedimento (pellet). La actividad proteasa se evaluó por el método de difusión en agarosa, evaluando diferentes concentraciones de esta (0,17gr, 0,25gr, 0,32gr) y de leche descremada en polvo (0,08gr, 0,12gr, 0,25gr) disueltas en solución salina (30ml, 40 ml) utilizando como blancos bromelina, suero fisiológico, etanol y agua destilada. Para determinar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en disco contra bacterias American type culture collection de las especies: *Staphylococcus áureos*, *Pseudomona aeuruginosa*, *Enterococcus fecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcences*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, empleándose como blanco etanol, suero fisiológico, bromelina y discos de los antibióticos: ampicilina, metronidazol, ceftazidima, meropenem, ciprofloxacino y amikacina. Los resultados obtenidos muestran que el látex de higo y papaya, los extractos: acuosos de fruto de higo, fruto de higo cocido, hoja de papaya, y etanolicos de fruto higo sobrenadante, hoja higo pellet, presentaron actividad proteolítica. Mientras que actividad antimicrobiana fue evidenciada en los extractos etanólicos hoja de higo, hoja de papaya sobrenadante y hoja de higo sobrenadante, los extractos acuosos solo mostraron actividad contra *Klebsiella pneumoniae*. Se recomienda realizar un estudio bioquímico del extracto de higo cocido debido a que los resultados obtenidos muestran que posee un factor termorresistente, el cual luego de ser sometido a una temperatura mayor de 90 °C por más de una hora mantiene su actividad proteolítica.

Palabras clave: <ENZIMA>, <FICINA>, <PAPAÍNA>, <*Ficus carica*>, <*Carica papaya*>, <ANTIMICROBIANO>, <ACTIVIDAD PROTEASA>, <ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA>.

SUMMARY

The present research work aimed to evaluate antimicrobial activity and proteolytic of extracts obtained from species *Carica papaya* (Papaya) and *Ficus carica* (Fig). The Latex of the fruits, aqueous and alcoholic extracts of leaves, green and ripe fruit obtained through a process of homogenization in a blender was used the alcoholic extracts were centrifuged to obtain the supernatant and sediment (Pellet). Protease activity was evaluated by diffusion method in agarose to evaluating different concentrations (0,17gr, 0,25gr, 0,32gr) and skim milk powder (0,08gr, 0,12gr, 0,25gr) dissolved in saline solution (30ml, 40ml) using as targets Bromelain saline, ethanol and distilled water. Diffusion method was used to determine the antimicrobial activity on drive against American type culture collection of species: *Staphylococcus aureos*, *Pseudomona aeruginosa*, *Enterococcus fecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcences*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, using white ethanol, saline, Bromelain and discs of antibiotics: ampicillin, metronidazole, ceftazidime, meropenem, ciprofloxacin and amikacin. The results show that the Latex of fig and papaya extracts: aqueous fig fruit, cooked fig fruit, papaya leaf and fruit ethanol-aqueous supernatant fig, fig pellet sheet, presented proteolytic activity. While antimicrobial activity was evidenced in the ethanol extracts fig left, supernatant papaya leaf and supernatant fig and supernatant fig leaf, aqueous extracts only showed activity against *Klebsiella pneumoniae*. A biochemical study of cooked fig extract is recommended since the results show that it has a heat-resistant, which after being subjected to one temperature higher than 90 °C for more than one hour maintains its activity proteolytic

Key words: <BIOCHEMESTRY>, <MICROBIOLOGY>, <PAPAIN (ENZYME)>, <FIG (*Ficus carica*)>, <PAPAYA (*Carica papaya*)>, <ANTIMICROBIAL>, <PROTEASE ACTIVITY>, <ANTIMICROBIAL ACTIVITY>

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son fármacos empleados para el tratamiento de infecciones bacterianas su efecto puede estar a nivel de la replicación del ADN, transcripción del RNA, síntesis de proteínas o pared celular. La obtención de estos se realiza a partir de microorganismos, plantas y síntesis química. A través del descubrimiento de la penicilina por Flemming, se dio lugar a la era y al auge de estos fármacos, durante los años 40 en la Segunda Guerra Mundial constituyeron un causal impresionante para salvar las vidas ocasionadas en el campo de batalla. (Organización Mundial de la Salud, 2017)

Uno de los motivos por el cual existen fallos terapéuticos al usar antibióticos para el tratamiento de pacientes con infecciones bacterianas es la aparición de bacterias con resistencia a estos medicamentos. La resistencia a los antimicrobianos, es una variable natural, en donde microorganismos como bacterias, hongos, parásitos o virus empezian a sufrir modificaciones en su estructura y el material genético que provoca tal resistencia, por lo tanto no presentan actividad a los efectos de dichos medicamentos los cuales anteriormente tenían eficacia para tratar infecciones. Un inadecuado uso y prescripción de los antibióticos, constituye un inconveniente en el campo de la salud pública, curando efectos negativos de morbi y mortalidad en la población. Por lo tanto, es importante que se vigile urgentemente la manera de prescribir y emplear los antibióticos; pese a que se desarrollen nuevos y mejores medicamentos, por así decirlo, de no cambiar las conductas y comportamientos actuales, la resistencia a los antibióticos seguirá figurando como una amenaza a nivel mundial. (Silva, 2006, pp. 1-8)

La utilización de sustancias obtenidas de especies vegetales para sanar enfermedades infecciosas en los últimos años ha sido una alternativa y un desafío para la medicina actual, se estima que en las diferentes partes de la planta existen compuestos que son capaces de inhibir o matar a los microorganismos. (Domingo & Lopez, 2003, pp. 1-5)

Osato, et al. estudian la actividad antimicrobiana y antioxidante de la papaya verde, demostrando que mediante de la utilización del método de difusión en agar, el extracto obtenido de la semilla de dicha especie es activo frente a cepas de enteropatógenos como *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, formando un halo de inhibición de hasta 15 mm. (Osato, et al., 1993, pp. 1-8)

Dos Anjos et al., en el 2016 realizaron un estudio sobre la actividad antibacteriana de la bromelina y la papaína determinando la concentración mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC) en cultivos de *Alicyclobacillus sp*, dando como resultado un MIC de 0.98 µg / ml y la MBC de 3.91 µg / ml para la papaína, mientras que la MIC de la bromelina fue de 62.5 µg / ml y la MBC fue de 250 µg / ml demostrando que la enzima papaína posee una mayor potencia frente a esta cepa de microbiana. (Dos Anjos, et al., 2016, pp. 121-126)

Por otro lado, Hamid Al-Yousuf en una evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Ficus carica L.* contra tres bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus megaterium*) y tres gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris*). Determino que dicho extracto fue más efectivo contra *B. megaterium* y *E. coli* formando halos de inhibición de hasta 18 mm. (Hamid Al-Yousuf, 2012, pp. 2861-2872)

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extractos alcohólicos y acuosos de las especies *Carica papaya* (Papaya), *Ficus carica* (Higo)
- Estandarizar un método para determinar la actividad proteasa
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales sobre microorganismos indicadores

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1. Agente antimicrobiano

El agente antimicrobiano es una sustancia que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos y protozoos. Son capaces de actuar de dos modos, ya sea inhibiendo la propagación del agente infeccioso (microbiostático) o matándolo directamente (microbiocida). (Montoya, 2008, pp. 230-231)

Los antimicrobianos han sido muy importantes ante la creciente presencia de enfermedades infecciosas a nivel mundial, sirven para el tratamiento de enfermedades infecciosas, provocando avances en la salud, disminuyendo la mortalidad por tuberculosis, malaria, sífilis congénita y VIH. (Organización Mundial de la Salud, 2017)

La actividad antimicrobiana se define como la capacidad de matar, inhibir o evitar el crecimiento de microorganismos, este término es utilizado ampliamente para referirse a los antibacterianos y su espectro de acción frente a microorganismos, evaluado principalmente con pruebas de sensibilidad para determinar la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida máxima. (Forbes, et al., 2007, p. 205)

1.1.1. Clases de Antibióticos

El término antibiótico proviene de la palabra "antibiosis" que literalmente significa "contra la vida". Los antibióticos son compuestos orgánicos producidos por un microorganismo capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Sin embargo, esta definición se ha modificado en la actualidad, para incluir antimicrobianos que también se producen en parte o totalmente a través de medios sintéticos. Mientras que algunos antibióticos pueden matar a las bacterias, otros solo pueden inhiben su crecimiento. (Etebu & Arikekpar, 2016, pp. 90-101)

Los antibióticos pueden ser clasificados de diversas formas, pero los esquemas más comunes se basan en sus estructuras moleculares, modo de acción y espectro de actividad. Otros incluyen la vía de administración, pudiendo ser inyectable, oral y tópica. Los antibióticos dentro de la misma clase estructural generalmente mostrarán un patrón similar de efectividad, toxicidad y efectos secundarios. Algunas clases comunes de antibióticos basados en estructuras moleculares incluyen Beta-lactámicos, Macrólidos, Tetraciclinas, Quinolonas, Aminoglucósidos, Sulfonamidas, Glucopéptidos y Oxazolidinonas. (Etebu & Arikekpar, 2016, pp. 90-101)

a) Betalactamicos

Los miembros de la familia de los betalactmicos contienen un anillo formado por tres carbonos y un nitrógeno que es altamente reactivo (Figura 1-1). Su mecanismo de accion es interferir con las proteínas esenciales para la síntesis de la pared celular bacteriana, y en el proceso matan o inhiben su crecimiento. Los representantes más destacados de la clase de betalactámicos incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos.

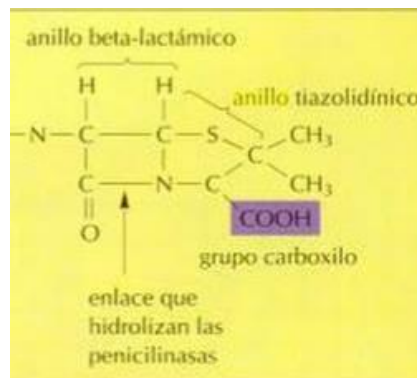


Figura 1-1. Estructura química del anillo betalactámico

Fuente: Ingraham, J 1998

- Penicilinas

Las penicilinas son compuestos estructuralmente formados por un núcleo de anillo de ácido 6-animopenicilánico (lactama más tiazolidina) (Figura 2-1) y otras cadenas laterales anulares. El primer antibiótico de esta clase fue descubierto por el científico Alexander Fleming en el año de 1929 a partir de la especie *Penicillium notatum*. Estos compuestos son activos para especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas y también puede ser usado como antídoto contra el envenenamiento con amatidina.

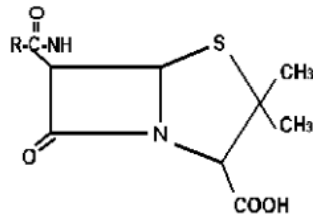


Figura 2-1. Estructura química Penicilina

Fuente: Etebu y Arikekpar (2016)

- Cefalosporina

Los miembros de este grupo de antibióticos son similares a la penicilina en su estructura y modo de acción. (Figura 3-2). Forman parte de los antibióticos más comúnmente recetados y administrados.

El primer miembro conocido de este grupo de antibióticos fue aislado por primera vez por Guisepe Brotzu en 1945 a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*. Las cefalosporinas se utilizan en el tratamiento de infecciones bacterianas y enfermedades derivadas de estafilococos y estreptococos susceptibles a la meticilina. (Zamora, et al., 1998)

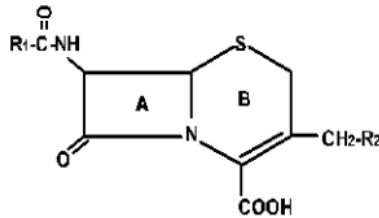


Figura 3-1. Estructura química Cefalosporina

Fuente: Etebu y Arikekpar (2016)

- Carbapenémicos

Esta clase de antibióticos, se descubrió en el año de 1976. Antes de este momento, a fines de la década de 1960, la efectividad de la penicilina estaba muy amenazada debido a la aparición de beta-lactamasas una enzima presente en las bacterias la cual confiere resistencia a las bacterias contra la penicilina. (Rivero, et al., 1998)

- Monobactámicos

El descubrimiento de los monobactámicos se produjo en el año de 1981, se obtuvo de la bacteria *Chromobacterium violaceum*. Son parte de los compuestos beta-lactámicos, pero a diferencia de estos, el anillo betalactámico es independiente y no está fusionado con otro anillo. Aztreonam es el único antibiótico monobactámico disponible comercialmente, con un espectro de actividad estrecho. Aztreonam es activo solo contra bacterias aerobias Gram-negativas, utilizado para tratar la neumonía, la septicemia y las infecciones del tracto urinario causadas por estos grupos de bacterias (Rivero, et al., 1998).

b) Tetraciclinas

La tetraciclina fue descubierta en 1945 a partir de una bacteria del suelo del género *Streptomyces* por Benjamín Duggar. El primer miembro de esta clase fue la clorotetraciclina (Aureomicina). Los miembros de esta clase tienen cuatro anillos de hidrocarburo y son conocidos por su nombre con el sufijo "-cycline". (Rodríguez, et al., 1998)

c) Macrólidos

El primer antibiótico perteneciente a esta clase fue descubierto y aislado por primera vez en 1952 por J.M. McGuire como producto metabólico de un suelo habitado por el hongo *Saccharopolyspora erythraea*. Estos fármacos ejercen su acción sobre la síntesis de proteínas específicamente se unen a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano evitando así la replicación de la bacteria, en este grupo se encuentran medicamentos como la azitromicina y claritromicina. (Gundian, et al., 1998)

d) Aminoglucósidos

Estos antibióticos fueron descubiertos en el año de 1944 obtenidos a partir de los actinomicetos (bacterias) *Streptomyces ssp.* y *Mycromonospora ssp.* Su actividad antibacteriana es fundamentalmente contra bacilos gramnegativos aerobios y micobacterias. Su espectro terapéutico es muy amplio, sin embargo, debido a su potencial nefrotoxicidad y ototoxicidad se limitó su uso, por lo que se han establecido recomendaciones para disminuir dichos efectos adversos, y seguir contando con estos importantes fármacos del arsenal antimicrobiano. (Rodríguez, 2002, pp. 20-30)

e) Glucopéptidos

Los glucopéptidos son antibióticos obtenidos de las especies *Streptomyces orientalis* y *Actinoplanes teichomyceticus* el primer fármaco perteneciente a esta familia fue la vancomicina descubierto en el año de 1956, actúan sobre la pared bacteriana, inhibiendo la síntesis del peptidoglucano, y se han empleado fundamentalmente para el tratamiento de infecciones por microorganismos grampositivos. (Pigrau, 2003, pp. 157-163)

f) Oxazolidinonas

Estos fármacos constituyen una nueva clase de antimicrobianos, su desarrollo comenzó en el año de 1987. Inhiben la síntesis proteica en una diana distinta a la de otros antimicrobianos. Se fijan a la subunidad 50S, en un lugar de fijación distinto al del cloranfenicol y lincosaminas, inhibiendo la formación del complejo de iniciación 70S. Se han introducido para hacer frente al creciente problema de la aparición de bacterias grampositivas multirresistentes a los antimicrobianos de los que se dispone en la actualidad (fundamentalmente *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecium*). (Pigrau, 2003, pp. 157-163)

1.2. Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos se refiere a la pérdida de sensibilidad de un microorganismo (hongos, bacterias, virus, parásitos) a un antibiótico al que inicialmente fue sensible. (Ausina & Moreno, 2005, pp. 25-60)

Esta se ve propiciada por el uso inadecuado de los medicamentos es decir consumirlos sin prescripción médica o no tomarlos de forma adecuada dejando el tratamiento a la mitad. (Beceiro, y otros, 2011).

La capacidad que tienen algunas bacterias de evitar la acción antibacteriana es ilimitada, además existe la posibilidad de que aparezcan mutaciones que le confieren a la bacteria nuevos mecanismos de resistencia (OMS, 2011). Realizar nuevos estudios de fármacos antibacterianos tiene un alto costo y algunos gobiernos no se encuentran involucrados, es de suma importancia continuar con los estudios de la resistencia antimicrobiana para disminuir la tasa de mortalidad.

En el año 2011, el Parlamento Europeo desarrolló una estrategia para disminuir la resistencia antimicrobiana que tiene una duración de cinco años. Este plan tiene como propósito la reducción de los riesgos de resistencia a los antibióticos, además, implementa el uso prudente de los antibióticos contribuyendo de una manera responsable de reducir el riesgo.

1.2.1. Mecanismos de resistencia bacteriana

Se define como el mecanismo que utiliza la célula bacteriana para resistir a la acción de los antimicrobianos. (Figura 4-1). (Centrón, s.f.)

El uso indiscriminado e irracional de los fármacos antibacterianos ha promovido el desarrollo de bacterias resistentes, el descubrimiento de nuevos antibióticos no es la solución del problema porque aparecen nuevos mecanismos de resistencia que son dificultosos de controlar, estos pueden ser de manera natural y adquirida. (Perez & Robles, 2013, p. 187)

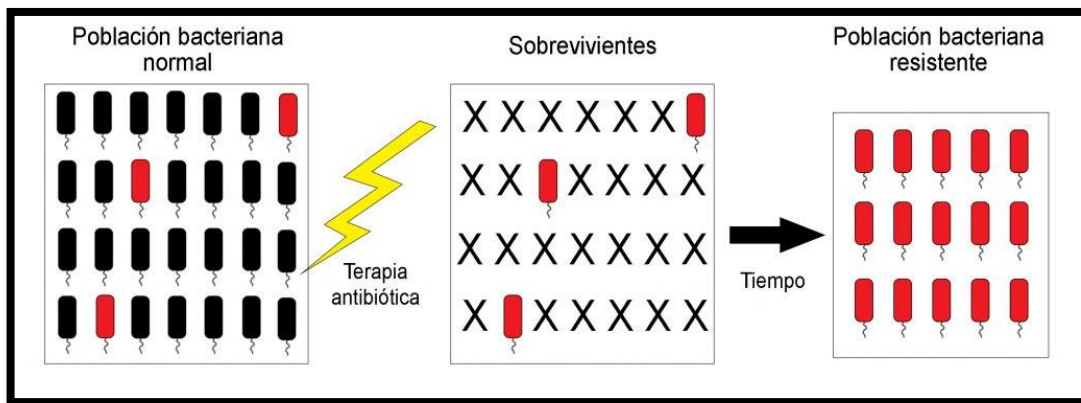


Figura 4-1. Representación del proceso de selección bacteriana por presión selectiva, generada por el uso inadecuado de un antibiótico.

Fuente: Revista Médica MD, 2013

- Resistencia natural: es propia de cada especie o grupo bacteriano, este tipo de resistencia es intrínseca del microorganismo. (Forbes, et al., 2007, pp. 180-181)
- Resistencia adquirida: se produce cuando el microorganismo ha sido alterado fisiológica o genéticamente por la acción de factores externos como por ejemplo los antibióticos. (Forbes, et al., 2007, pp. 180-181)

La resistencia bacteriana se puede abordar desde una perspectiva molecular o bioquímica pudiendo diferenciarse tres mecanismos: (Perez & Robles, 2013, pp. 188-191)

- Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química: se caracteriza por la producción de enzimas que destruyen la estructura química, por ejemplo, las beta-lactamasas.
- Alteración del sitio blanco del antibiótico: modificaciones en los sitios específicos de la célula bacteriana sobre los cuales va a actuar el antibiótico por ejemplo la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad: esto se produce cuando hay cambios de los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por cambios estructurales en los componentes de la envoltura de la célula bacteriana.

1.3. Métodos para la determinación de actividad antimicrobiana

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se utilizan para determinar la sensibilidad que posee el microorganismo a la presencia de un factor ya sea antimicrobiano, extracto de plantas, enzimas, etc.

Existen varios métodos para determinar la actividad antimicrobiana:

- Dilución de agar: este método se usa con microorganismos aeróbicos o microaerófilos, esta técnica se basa en colocar diferentes concentraciones de las muestras en el medio de cultivo, después de que solidifique se siembra el microorganismo y se incuba por 18 horas a 37°C.
- Dilución y micro-dilución en caldo: es una técnica realizada utilizando tubos o pocillos con medios líquidos, que contiene diferentes concentraciones, en el cual se inoculan los microorganismos y se mide la presencia de turbidez.
- Difusión en agar: es la técnica probablemente más utilizada para determinar la actividad antimicrobiana, en el agar solidificado se siembran los microorganismos y posteriormente se colocan discos en la superficie del agar con concentraciones conocidas de muestra, se incuba por 18 horas a temperatura de 37°C (Reyes, et al., 2015, pp. 68-71)

1.3.1. Método de difusión en disco o Kirby Bauer

Es el ensayo clásico utilizado para determinar la susceptibilidad a los antibióticos, en este método clásico, se utilizan discos de antibióticos de concentración conocida o discos en blanco que posteriormente son inoculados con soluciones a diferentes concentraciones (Begum, 2014)

Las soluciones de concentración conocida de las muestras de prueba se preparan disolviendo la cantidad medida en el volumen calculado de disolventes. Los discos de papel de filtros secos y esterilizados (6 mm de diámetro) que contienen las muestras de prueba de cantidades conocidas se colocan en medio de agar nutritivo sembrado uniformemente con los microorganismos de prueba. Los discos antibióticos estándar (por ejemplo, kanamicina) y los discos en blanco (impregnados con disolventes) se usan como control positivo y negativo. Estas placas se mantienen a temperatura ambiente durante unos minutos para permitir la máxima difusión de los materiales de prueba a los medios circundantes. Durante este tiempo, los discos secos absorben agua de los medios circundantes y luego los materiales de prueba se disuelven y se difunden fuera del disco de muestra. La difusión ocurre de acuerdo con la ley física que controla la difusión de moléculas a través del gel de agar.

Como resultado, hay un cambio gradual en la concentración de los materiales de prueba en los medios que rodean los discos. Las placas se invierten y se incuban a 37 ° C durante 24 horas para un crecimiento óptimo de los organismos. Los materiales de ensayo que tienen propiedades antimicrobianas inhiben el crecimiento microbiano en los medios que rodean los discos y de ese modo producen un área clara y distinta definida como zona de inhibición. La actividad antimicrobiana del agente de prueba se determina midiendo el diámetro de la zona de inhibición expresada en milímetros. (Picazo, 2000, pp. 1-54)

Este test debe ser rigurosamente estandarizado dado que el tamaño de la zona también depende del tamaño del inóculo, la composición del medio, la temperatura de incubación, el exceso de humedad y el espesor del agar. Si estas condiciones son uniformes, se pueden obtener pruebas reproducibles y el diámetro de la zona es solo una función de la susceptibilidad del organismo de prueba. El diámetro de la zona puede correlacionarse con la susceptibilidad medida por el método de dilución. (Picazo, 2000, pp. 1-54)

El método de Kirby Bauer tiene muchas ventajas como método de prueba de susceptibilidad a los antibióticos: es barato, simple y fácil de interpretar. Sin embargo, debido al requisito de tiempo práctico asociado con este método, los métodos automatizados basados en técnicas de fluorescencia están reemplazando al Kirby Bauer como el modo primario de prueba de susceptibilidad a antibióticos en muchos laboratorios clínicos. Una característica exclusiva de los métodos basados en la difusión, como Kirby-Bauer, es la capacidad de detectar colonias internas que pueden indicar subpoblaciones más resistentes. Se desconoce si los métodos automatizados pueden detectar subpoblaciones resistentes que se representan visualmente como colonias internas. (Luc, 2015, pp. 17-20)

1.4. Proteínas

Las proteínas son polímeros lineales constituidos por aminoácidos, los cuales se pliegan de manera tridimensional dando como resultado las diferentes funciones de estas moléculas. Se pueden distinguir de los lípidos y los hidratos de carbono por que contienen nitrógeno. (Lehninger, 1995, pp. 59-60)

Estos polímeros son un macronutriente presente en los alimentos, es un elemento primordial del cuerpo, una de las funciones principales es la estructural, esto quiere decir que contribuye a la formación, desarrollo y transformación de todos los órganos, ejecutando funciones en las células de los seres vivos; su estructura está formada por carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno, además, contiene minerales como azufre, hierro y fósforo. (Lehninger, 1995, p. 59)

Las proteínas están conformadas por unidades monoméricas denominadas aminoácidos los cuales están estructurados por un grupo amino y un grupo carboxílico. Los aminoácidos juegan un papel importante en la regulación de múltiples procesos relacionados con la expresión génica, incluida la modulación de la función de las proteínas mediando la traducción del ARN mensajero (ARNm) (Teijon & Blanco, 2001, pp. 54-55)

1.4.1. Propiedades de las proteínas

Propiedades físico- químicas:

- Punto isoeléctrico: es el pH en el cual la proteína tiene carga neta igual a 0
- Solubilidad: se produce en función de la composición iónica del medio, de la fuerza iónica, de la distribución de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. En soluciones apolares la disolución de las proteínas es menor.
- Capacidad amortiguadora: esta propiedad se debe a que las proteínas pueden comportarse como ácido o base dependiendo el medio en el que se encuentren.

Propiedades biológicas:

- Especificidad: cada proteína lleva a cabo una determinada función la cual está determinada por la estructura primaria y una conformación espacial propia; por lo que un cambio en la estructura de la proteína puede significar una pérdida de la función.
- Desnaturalización: Consiste en la pérdida de la estructura terciaria y cuaternaria, esto debido a la ruptura de los enlaces que forman dicha estructura, se puede producir por cambios de temperatura, variaciones del pH, drásticos cambios en la solubilidad. En algunos casos, si las condiciones se restablecen, una proteína desnaturalizada puede volver a su anterior plegamiento o conformación nativa, proceso que se denomina renaturalización.

1.4.2. Clasificación de las proteínas

Por su composición:

- Simples u Holoproteínas: son aquellas que por hidrólisis dan como resultado solo alfa aminoácidos entre ellas están las albuminas, globulinas, colágeno, elastina y queratina. (Teijon & Garrido, 2006, pp. 91-98)

- **Conjugadas o Heteroproteínas:** son aquellas que por hidrólisis producen aminoácidos y otros componentes orgánicos e inorgánicos, esta porción que no es aminoacídica se denomina grupo prostético y según este se clasifican en: nucleoproteínas, lipoproteínas, fosfoproteínas, cromoproteínas, metaloproteínas, hemoproteínas. (Teijon & Garrido, 2006, pp. 91-98)

Por su forma tridimensional se clasifican en:

- **Globulares:** se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica apretada o compacta dejando grupos hidrófobos hacia adentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia afuera, lo que hace que sean solubles en disolventes polares como el agua. Son ejemplos de proteínas globulares las prolaminas, gluteninas y albúminas
- **Fibrosas:** Las proteínas fibrosas presentan cadenas polipeptídicas largas y una estructura secundaria atípica. Son insolubles en agua y en disoluciones acuosas. Algunos ejemplos son: colágeno, queratinas y elastinas.

1.5. Péptidos

Los péptidos son compuestos de cadenas lineales formados por uno o más aminoácidos unidos por enlaces químicos de tipo amínico a los que se denomina enlace Peptídico. Así pues, para formar péptidos los aminoácidos se van enlazando entre sí formando cadenas de longitud y secuencia variable. Para denominar a estas cadenas se utilizan prefijos convencionales como: oligopéptidos, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y polipéptidos. (Cabildo, et al., 2011, p. 758)

1.6.1. *Péptidos antimicrobianos*

Los péptidos antimicrobianos son moléculas producidas por las células de las membranas mucosas y fagocitos formando parte del sistema inmune innato, están constituidos por más de una docena de aminoácidos, estos se unen a las membranas citoplasmáticas bacterianas causando así la lisis celular. (Tortora, et al., 2007, p. 496)

Son una familia de aminoácidos con complejos mecanismos de acción relacionados con la interacción con el patógeno a través de su membrana, o afectando blancos internos, como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas, e interactuando con el huésped con funciones inmunomoduladoras de la regulación del proceso inflamatorio y de la cicatrización. Los primeros péptidos descubiertos llevan así el nombre del ser vivo del que provienen: en bacterias por ejemplo han sido nombrados bacteriocinas. (Tellez & Castaño, 2010, pp. 55-67)

1.7. Enzimas

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que aceleran la velocidad de reacción hasta alcanzar un equilibrio. Constituyen el tipo de proteínas más numeroso y especializado y, actúan como catalizadores de reacciones químicas específicas en los seres vivos o sistemas biológicos. Muchas de las enzimas no trabajan solas, se organizan en secuencias, también llamadas rutas metabólicas, y muchas de ellas tienen la capacidad de regular su actividad enzimática. (Lehninger, 1995, p. 191)

1.7.1. *Propiedades de las enzimas*

Las enzimas tienen propiedades de especificidad, eficacia, gran poder catalítico y no se consume en las reacciones.

Especificidad: Se categorizan en 2 tipos:

- a) Absoluta: Cuando la enzima limita su acción sobre un cierto tipo de sustrato.
- b) De grupo: Cuando la enzima, acciona sobre un conjunto de moléculas que disponen de un cierto enlace.

Reversibilidad: Una determinada enzima acciona de la misma manera sobre una reacción química, independientemente del propósito de la reacción.

Eficacia: Una molécula de enzima es capaz de actuar como catalizador sobre la reacción de varias moléculas de sustrato, en vista de que la enzima no se desgasta en el proceso, por el contrario, se recupera al finalizar.

Gran poder catalítico: Es capaz de multiplicar la velocidad de las reacciones químicas por un millón de veces o más.

1.7.2. *Nomenclatura*

Las enzimas son nombradas de variadas maneras:

- a) De acuerdo al sustrato sobre el que acciona se nombra utilizando el sufijo -asa como por ejemplo la lactasa, amilasa, hidrolasa.
- b) Según al sustrato sobre coenzimas que acciona o el nombre de la reacción sobre en qué acciona utilizando el sufijo en -asa: Piruvato deshidrogenasa.

1.7.3. Clasificación

Las enzimas se clasifican en 6 tipos: Oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, Isomerasas, ligasas. (Battaner, 2015, pp. 413-526)

- **Oxidorreductasas:** Son enzimas que tienen la función de catalizar las reacciones de oxidación o reducción, y que en el entorno biológico se desarrollan mediante la transmisión de electrones o átomos de hidrógeno de un emisor, siendo en este caso el reductor hasta un receptor el cual constituye el oxidante. En otras instancias, la reacción consta de la introducción de átomos de oxígeno en el sustrato.
- **Transferasas:** Actúa en reacciones, en donde se transfiere un grupo funcional de un sustrato a otro. En este proceso sobresalen las quinasas, que transfieren grupos de fosfato posibilitando el desarrollo del Trifosfato de adenosina (ATP).
- **Hidrolasas:** Son enzimas que actúan en reacciones de hidrólisis, en la cual ocurre una ruptura de molécula por la incorporación de una molécula de agua fragmentada en sus integrantes: OH y H⁺. Entre las principales enzimas hidrolasas están las estererasas o peptidasas.
- **Liasas:** Caracterizadas por ser un tipo de enzima que catalizan acciones de rotura, por ello, dan como resultado el surgimiento de moléculas que tienen dobles enlaces o liberación de grupos químicos. En este grupo están las desaminasas.
- **Isomerasas:** Actúan como catalizadores, en la cual una molécula se convierte en su isómero. Intervienen en reagrupamientos en una misma molécula; pues pese a ser enzimas, en varias ocasiones las reacciones accionadas por estas enzimas resultan un tanto complejas.
- **Ligasas:** Son enzimas que catalizan reacciones en donde dos o más moléculas se enlazan para dar origen a otras más compleja. Interviene en el desarrollo de enlaces y delimitan energía que emerge del trifosfato de adenosina (ATP).

1.8. Proteasas

Las enzimas proteolíticas también denominadas proteasas, proteinasas o peptidasas representan alrededor del 2% de todos los productos génicos. Estas enzimas se caracterizan porque catalizan específicamente la hidrólisis del enlace peptídico. (Araujo, 2014, pp. 1-57)

Se han utilizado desde tiempos muy antiguos en un gran número de procesos biotecnológicos. Entre los más conocidos pueden citarse: la tiernización de carnes, la elaboración de cerveza, la panificación, la elaboración de quesos y la obtención de proteínas modificadas en la industria alimentaria.

1.8.1. Actividad Proteasa

La acción de las enzimas proteolíticas es esencial en varios procesos fisiológicos, por ejemplo, en la digestión de proteínas alimentarias, recambio proteico, división celular, cascada de coagulación de la sangre, transducción de señales, procesamiento de hormonas polipeptídicas, apoptosis, síntesis de péptidos, digestión de proteínas no deseadas durante la purificación de ácidos nucleicos, uso de proteasas en experimentos de cultivo celular y en disociación de tejidos, preparación de fragmentos de anticuerpos recombinantes para investigación, diagnóstico y terapia. Debido a su papel clave en el ciclo de vida de muchos huéspedes y patógenos, tienen una gran importancia médica, farmacéutica y académica. (Araujo, 2014, pp. 1-57)

1.8.2. Clasificación

Según la ubicación de los enlaces hidrolizados, las peptidasas a su vez se dividen en dos grandes grupos: las endopeptidasas, que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína y las exopeptidasas, que remueven uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino. (Tellez & Castaño, 2010, pp. 55-67)

Las endopeptidasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a Hartley en 1960 a proponer una clasificación de las mismas basada en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos, constituyendo en la actualidad siete-subgrupos en la clasificación internacional: endopeptidasas serínicas, endopeptidasas cisteínicas, endopeptidasas aspárticas, metaloendopeptidasas, endopeptidasas treonínicas, endopeptidasas glutámicas y endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido. (Araujo, 2014, pp. 1-57)

Un tipo de proteasas con mayor actividad son las proteasas cisteínicas tipo papaína que han sido identificadas como claves en patologías relacionadas con desórdenes degenerativos, invasivos y del sistema inmune. (Araujo, 2014, pp. 1-57)

1.8.2.1. Cisteinoproteasas

Son proteínas con una masa molecular de aproximadamente 21-30 kDa. Muestran la actividad hidrolítica más alta a un pH 4-6.5. Las cisteinoproteasas están presentes en todos los organismos vivos. Hasta ahora, se han descubierto 21 familias de CP. Muchas de estas enzimas se encuentran en bacterias, hongos, protozoos, virus y plantas. Dos grupos principales de cisteína proteasas son: calpaínas citosólicas y catepsinas lisosómicas. (Grzonka et al., 2001).

Recientemente se ha desarrollado un creciente interés en el rol de las proteasas cisteínicas en un amplio rango de enfermedades parasitarias como la malaria, la enfermedad de Chagas y la esquistosomiasis. Las proteasas cisteínicas tipo papaína impiden en microorganismos como parásitos roles indispensables como el crecimiento, diferenciación celular, señalización e invasión al huésped y actúan frecuentemente como factor de virulencia, atacando al sistema inmune del huésped. Si bien las proteasas que participan en cada una de las enfermedades mencionadas son específicas, el hecho de que muchas de ellas compartan un mismo mecanismo catalítico facilita el diseño de moléculas que puedan interferir en su actividad y convertirse, en consecuencia, en potenciales fármacos para el tratamiento terapéutico de estas enfermedades. (Carrasco, 2003, pp. 1-6)

- Bromelina

Un ejemplo de cisteinoproteasas constituye la bromelina presente en diferentes partes de la planta de piña (*Ananás Comosus*). Es una enzima de alto interés comercial debido a las amplias aplicaciones terapéuticas e industriales que posee. (Kumar & Sahoo, 2017, p. 6). Por lo general, se obtiene bromelina de fruto o bromelina de tallo en función de su fuente, siendo la más importante desde el punto de vista comercial. (Dalgo, 2012, pp. 15-40)

La bromelina está constituida por aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre. Esta biomolécula se utiliza como ablandadora de carnes, complemento alimenticio y se ha descrito que muestra varias acciones farmacológicas, por ejemplo, aumenta la absorción de medicamentos, se ha utilizado en tratamientos de desórdenes digestivos, en enfermedades virales y en la formulación de vacunas. Tiene potencialidades como antiedematosa, antiinflamatoria, antitrombótica y fibrinolítica. (Gallardo, et al., 2008, pp. 1-7)

Recientemente, se demostró la posible actividad antitumoral de cisteíno-proteasas como la bromelina en 5 tumores trasplantables de ratón: Leucemia p-388, carcinoma pulmonar de Lewis, adenocarcinoma-755, sarcoma-37 y tumor ascítico de Ehrlich, así como la inhibición en la proliferación de tumores cerebrales. (Gallardo, et al., 2008, p. 6)

- Papaína

Es una cisteínoproteasa que se encuentra naturalmente en la papaya (*Carica papaya L.*) obtenida a partir del látex de frutas de papaya sin procesar, es capaz de descomponer las proteínas en aminoácidos, por lo que juega un papel crucial en diversos procesos biológicos en estados fisiológicos y patológicos. (Garces, 2011, p. 2).

En relación con otras enzimas naturales la papaína posee ventajas como: calidad y actividad enzimática, estabilidad en condiciones desfavorables de temperatura, humedad, y presión atmosférica. (De Jesus & Benitez, 2012, pp. 18-22)

En la industria se usa como ablandador de carnes y en el tratamiento de cueros. En la industria farmacéutica interviene como ingrediente en una serie de formulaciones o preparados que facilitan la digestión; como antihelmíntico; para el tratamiento de la obstrucción de esófago, difteria, lesiones de la piel, incluyendo eccema, soriasis, ciertas heridas y para prevenir adherencias peritoneales. (Garces, 2011, p. 2).

Esta enzima es usada en formulaciones tópicas para el tratamiento de quemaduras, heridas, cicatrices, exfoliación de la piel, así como agente depilatorio progresivo y para incrementar la absorción cutánea también en la industria de productos lácteos y para la elaboración de quesos sustituye al cuajo. La actividad enzimática de papaína puede determinarse por medida de la hidrólisis de proteínas naturales o sustratos sintéticos, como ésteres o amidas de bajo peso molecular. (Pinto & Green, 2007, pp. 771-775)

- Ficina

Otra enzima perteneciente al grupo de las cisteinoproteasas es la ficina obtenida de la planta de higo (*Ficus carica*), tiene un peso molecular de 50 kDa, un pH óptimo de 6,0. (Lopez, et al., 1994, pp. 123-131)

Es una pepsina vegetal, funciona en medio ácido, se usa tanto en la digestión de proteínas como ablandamiento de carnes y en la producción de queso (Bertoluzzo, 2008). La ficina se emplea en la elaboración de productos farmacéuticos por sus propiedades antihelmínticas mediante las cuales combate todo tipo de parásitos intestinales; actúa principalmente como purgante por ingestión, sin embargo, a diferencia de las otras enzimas estudiadas anteriormente no son aprovechadas industrialmente y comercialmente. (Chew, 2016, pp. 10-21).

1.10. Ficus Carica

Es un arbusto nativo de la zona mediterránea oriental, donde ha sido usado hace 7000 años durante la edad neolítica. Su altura va desde los 5 m y puede alcanzar los 10m, con un diámetro que puede oscilar los 18cm aproximadamente. (Barolo, Ruiz y López, 2014). En cuanto a sus hojas, son simples y de forma oval, acorazonadas e irregularmente dentado, sus hojas miden de 10 a 20 cm de longitud y de ancho. Su tronco estipula varias ramas algo gruesas y se ramifica a una altura considerable desde su base.

La planta de higo es considerada como un alimento rico en fibra dietética, minerales y proteínas, azúcares y ácidos orgánicos, con un alto contenido en aminoácidos. Los análisis fitoquímicos de *Ficus Carica*, indican la existencia de fenoles totales, flavanoides, saponinas y alcaloides; así como otras moléculas metabólicas secundarias que posibilitan su función de antioxidante. (Montes, 2014, pp. 1-11)

1.10.1. Taxonomía

Tabla 1-1. Taxonomía de la especie *Ficus Carica*

Reino	Vegetal
Clase	Dicotiledoneas
Orden	Urticidas
Familia	Moraceae
Género	Ficus
Especie	Picus carica L
Phyllum	Plantae
Subphyllum	Spermatophyta

Clase.	Magnoliophytina
Subclase.	Magnoliopsida
Orden.	Dilenidas
Familia	Urticales
Subfamilia.	Moraceas

Fuente: Comisión Nacional Forestal, 2014 (*Ficus carica L.*)

Realizado por: Tobar Karen, 2018

1.10.2. Aplicaciones

Varias partes de la planta, como frutas, raíces y hojas tienen numerosos beneficios terapéuticos y se utilizan en la medicina tradicional para tratar diferentes patologías como por ejemplo: trastornos gastrointestinales (cólicos, indigestión, pérdida de apetito y diarrea), trastornos respiratorios (dolor de garganta, tos y problemas bronquiales) y trastornos cardiovasculares, también se utiliza como remedio antiinflamatorio y antiespasmódico. (Duke, et al., 2003, pp. 347-357).

1.11. Carica papaya

La papaya (*Carica papaya*) es una planta herbácea de crecimiento rápido y de vida corta, La duración de su vida es de 7 a 15 años, de porte singular, puede llegar a 7,5 metros o más de altura y tiene el aspecto de un pequeño árbol de tronco simple, sin ramificar, de consistencia más carnosa que leñosa, con las cicatrices de las hojas desprendidas a lo largo de él y con un penacho o cogollo de hojas perennes de color verde intenso en su ápice. Las hojas, de gran tamaño y provistas de un largo peciolo, son palminervias y están divididas en siete grandes lóbulos en disposición palmada, que a su vez se encuentran divididas en forma pinnada. Las flores son actinomorfas, pentámeras, unisexuales hermafroditas. El fruto es en baya.

Las diferentes partes de la papaya contienen varias sustancias químicas constituyentes como: proteína, grasa, fibra, carbohidratos, minerales: calcio, fósforo, hierro, vitamina C, tiamina, riboflavina, niacina y caroteno, aminoácidos, ácidos cítrico y málico. Los análisis fitoquímicos dan a conocer que esta especie vegetal posee flavonoides, saponinas, taninos, glucósidos y antraquinonas.

El fruto, las hojas, el tallo y las raíces de la papaya contienen un jugo lechoso o látex, donde se encuentra la papaína, que emana con facilidad cuando se hiere superficialmente cualquier parte del árbol. Este es más abundante en las partes tiernas de la planta; en la cáscara de la fruta, con solo tocar ligeramente con la punta de un lápiz se puede provocar la salida de tenues chorros de látex. (Jimenez, 2002 , pp. 23-24)

1.11.1. Taxonomía

Tabla 2-1: Taxonomía Carica Papaya

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Dilleniidae
Orden	Parentales
Familia	Caricaceae
Genero	Carica
Especie	Papaya
Nombre Científico	Carica papaya L

Fuente: Biology of Carica Papaya (2013)

Realizado por: Tobar Karen, 2018

1.11.2. Aplicaciones

En América Latina y en el Caribe se utiliza el látex para combatir los parásitos intestinales. El cocimiento de las raíces también sirve de vermífugo. Las flores del árbol hervidas y concentrada la decocción en forma de jarabe, sirven para aliviar la tos en los estados catarrales y además es expectorante. Las flores pueden usarse en los estados febriles y también para facilitar la menstruación. La decocción de hojas ha sido usada para aliviar a los asmáticos. Las semillas de papaya son usadas como antihelmínticas, emenagogas, febrífugas y carminativas.

Algunos nativos de las Antillas Menores y Sur América las mascan para calmar la sed y las consideran estimulantes, ya que les gusta el sabor algo picante, parecido al de la mostaza. El sirope, vino o elixir hecho con la pulpa de la fruta madura es excelente como expectorante, sedativo y por su acción tonificante. La leche o látex se usa en muchos lugares para curar la nigua, llagas y úlceras rebeldes. Desde que se conoció la papaya, puede decirse que hay un remedio eficaz, agradable y nutritivo contra la dispepsia. Así pues, el consumo de esta fruta alivia las afecciones digestivas debidas a deficiencias hepáticas o de otro origen. El hecho simple de que la papaya facilite la digestión y asimilación de grandes cantidades de proteína, abre una excelente oportunidad a los afectados de tuberculosis, de acuerdo con la opinión de que una dieta rica en proteínas y pobre en carbohidratos ayuda, aún en los casos avanzados, a la curación rápida y a la cicatrización de las lesiones producidas por este mal. (Jimenez, 2002 , pp. 24-26)

CAPITULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de Muestreo

Las muestras de la planta de *Ficus carica* (higo) fueron obtenidas en la Provincia de Tungurahua, cantón Ambato parroquia Huachi Loreto, calles Colorados y Av. Los Shyris; y las muestras de *Carica papaya* (papaya) se obtuvieron en la Provincia de Tungurahua, cantón Baños parroquia Rio negro, Km 16.

2.2. Lugar de investigación

La investigación se realizó en el laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.

2.3. Materiales

Los materiales, equipos y reactivos utilizados en la parte experimental de la investigación se muestran en las Tablas 3-2, 4-2 y 5-2.

Tabla 3-2 Materiales de laboratorio

<ul style="list-style-type: none">• Tubos estériles• Tubos HACH• Asa de platino• Cofia• Mascarilla• Guantes• Mechero	<ul style="list-style-type: none">• Probeta de 100 mL• Hisopos• Frascos de vidrio• Discos de sensibilidad• Micropipeta gradual de 100 a 200 uL• Tijera• Fundas rojas
--	--

<ul style="list-style-type: none"> • Pera • Pipeta volumétrica 10 mL • Cajas Petri • Placas portaobjetos • Erlenmeyer de 500 mL y 150 mL • Gradillas • Frascos de plástico estériles 	<ul style="list-style-type: none"> • Puntas azules • Puntas amarillas • Plancha de calentamiento • Vaso de precipitado de 250 mL • Gasa • Papel aluminio • Algodón
---	---

Realizado por: Tobar Karen, 2018

Tabla 4-2: Equipos de laboratorio

<ul style="list-style-type: none"> • Estufa bacteriológica • Centrifuga • Autoclave • Cámara de Flujo Laminar • Licuadora • Balanza Analítica

Realizado por: Tobar Karen, 2018

Tabla 5-2: Reactivos y medios de cultivo

<p>Reactivos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agua destilada • Etanol • Suero fisiológico • Hipoclorito de sodio
--

Medios de cultivo

- Agar Müller Hinton
- Caldo Müller Hinton (DIPCO)
- Agarosa

Realizado por: Tobar Karen, 2018

2.3.1 Cepas bacterias monitoras de la actividad bactericida

Las cepas bacterianas American Type Culture Collection (ATCC) utilizadas como monitor para la determinación de actividad antibacteriana se muestran en la tabla 6-2.

Tabla 6-2: Cepas ATCC para la determinación de actividad bactericida

- ATCC 8100 – *Serratia marcescens*
- ATCC 10231 – *Candida albicans*
- ATCC 14028 – *Salmonella typhimurium*
- ATCC 25922 – *Escherichia coli*
- ATCC 29213 – *Staphylococcus aureus*
- ATCC 27853 – *Pseudomonas aeruginosa*
- ATCC 29212 – *Enterococcus faecalis*
- ATCC 700603 – *Klebsiella pneumoniae*

Realizado por: Tobar Karen, 2018

2.4. Métodos

2.4.1. Muestreo

Para obtener muestras de calidad se observó el estado de la planta que no tengan daños por el ambiente, insectos, golpes, etc. De la especie *Ficus carica* se tomaron muestras de fruto verde y maduro, hojas, tallo y látex que se obtiene al sacar el fruto del árbol, por otra parte, de la planta *Carica papaya* se recolectaron muestras de fruto verde, hojas, tallo y látex obtenido a partir de cortes en la cascara del fruto verde. Las hojas en mejores condiciones se recogieron en fundas plásticas limpias y el látex es almacenado en tubos de vidrio estériles. Todas las muestras son transportadas a temperatura ambiente y después colocadas en refrigeración hasta su posterior uso.

2.4.2. Preparación de las muestras

Las diferentes partes de la planta una vez recolectadas son lavadas con abundante agua potable hasta que queden totalmente limpias. Las muestras de fruto se separan en dos partes, a una parte de fruto se le retira la cascara y a la otra se coloca de manera completa. Todas las partes de la planta una vez limpias de residuos son colocadas en bolsas de papel aluminio y posteriormente son guardadas en congelación hasta el momento de ser utilizadas.

2.4.3. Elaboración de extractos

Para obtener los extractos de las especies vegetales (planta fresca) se utilizó el método de homogenización, colocando un peso y volumen específico para cada una de las partes de la planta como se describe a continuación. La conservación de muestras y extractos se realiza en congelación a -4°C .

Especie: *Ficus carica*

Extracto alcohólico fruto maduro

- Pesar 100 gr de fruto previamente cortado
- Colocar en la licuadora el fruto y 100 mL de etanol
- Licuar y filtrar con tela nylon
- El extracto obtenido es colocado en frascos de plástico estéril

Extracto alcohólico fruto verde

- Pesar 55gr de fruto previamente cortado
- Colocar en la licuadora el fruto y 80 mL de etanol
- Licuar y filtrar con tela nylon
- El extracto obtenido es colocado en frascos de plástico estéril

Extracto alcohólico microondas cascara

- Pesar 100 gr de cascara y cortar en trozos pequeños
- En un Erlenmeyer introducir los 100 gr de cascara y 65 mL de etanol.
- Colocar en el microondas de 3500 W por 25 segundos
- Decantar y trasvasar el líquido en un frasco de plástico estéril

Extracto alcohólico hoja

- Pesar 50gr de hojas cortadas en trozos pequeños
- Colocar en la licuadora las hojas y 25 mL de alcohol
- Licuar y filtrar con tela nylon
- Colocar el extracto en frascos estériles

Extracto acuoso de fruto

- Pesar 100 gr de fruto previamente cortado en trozos
- Introducir en la licuadora el fruto y 125mL de agua destilada
- Licuar y filtrar en tela nylon
- Colocar el extracto en frascos estériles

Extracto acuoso fruto verde

- Pesar 60 gr de fruto previamente cortado
- Colocar en la licuadora el fruto y 75 mL de agua destilada
- Licuar y filtrar con tela nylon
- El extracto obtenido es colocado en frascos de plástico estéril

Extracto acuoso de hoja

- Pesar 50 gr de hojas previamente cortadas en trozos pequeños
- Colocar en la licuadora las hojas y 25 mL de agua destilada
- Licuar y filtrar en tela nylon
- Almacenar el extracto en frascos de plástico estéril

Extracto higo cocido

- Pesar 500 gr de fruto de higo pelado
- Colocar en una olla con 1L de agua
- Hervir por aproximadamente 3 horas
- Decantar y trasvasar el líquido a un frasco estéril.

Especie: *Carica papaya*

Extracto alcohólico fruto

- Pesar 100 gr de fruto previamente cortado
- Introducir en la licuadora el fruto y 70 mL de etanol
- Licuar y filtrar con tela nylon
- El extracto obtenido es colocado en frascos de plástico estéril

Extracto alcohólico microondas cascara

- Pesar 100 gr de cascara y cortar en trozos pequeños
- En un Erlenmeyer colocar los 100 gr de cascara y 65 mL de etanol.
- Colocar en el microondas de 3500 W por 25 segundos
- Decantar y trasvasar el líquido a un frasco estéril.

Extracto alcohólico hoja

- Pesar 50gr de hojas cortadas en trozos pequeños
- Colocar en la licuadora las hojas y 25 mL de alcohol
- Licuar y filtrar con tela nylon
- Almacenar el extracto en frascos estériles

Extracto acuoso de fruto

- Pesar 100 gr de fruto previamente cortado en trozos
- Colocar en la licuadora el fruto y 80mL de agua destilada
- Licuar y filtrar en tela nylon
- Almacenar el extracto en frascos estériles

Extracto acuoso de hoja

- Pesar 50 gr de hojas previamente cortadas en trozos pequeños
- Colocar en la licuadora las hojas y 25 mL de agua destilada
- Licuar y filtrar en tela nylon
- Almacenar el extracto en frascos de plástico estéril

Los extractos son colocados en alícuotas en tubos estériles, y según son necesitados son retirados del congelador, en el caso de los extractos alcohólicos son centrifugados a 3500 rpm por 3 minutos obteniendo el sobrenadante y precipitado los cuales son separados en diferentes tubos. El precipitado es re suspendido con 1mL de suero fisiológico para ser utilizado.

2.4.4. Identificación de extractos

Cada uno de los envases que contienen los extractos fueron rotulados como se muestra en la tabla 7-2.

Tabla 7-2. Identificación de extractos

Identificación	Extracto
1A	Acuoso fruto de higo
1B	Acuoso hoja de papaya
2A	Acuoso hoja de Higo
2B	Acuoso fruto de papaya
AA	Acuoso fruto higo verde
AB	Etanol fruto higo verde
1C	Etanol fruto higo sobrenadante
2C	Etanol fruto papaya sobrenadante
3C	Etanol hoja de higo sobrenadante
4C	Etanol hoja papaya sobrenadante
5C	Extracto microondas papaya sobrenadante
6C	Extracto microondas higo sobrenadante
1	Etanol fruto higo pellet
2	Etanol fruto papaya pellet
3	Etanol hoja higo pellet
4	Etanol hoja papaya pellet
5	Extracto microondas papaya pellet
6	Extracto microondas higo pellet
21	Extracto higo cocido
LP	Látex Papaya
LH	Látex Higo

Realizado por: Tobar Karen, 2018

2.4.5. *Determinación de la actividad proteasa*

Para estandarizar y determinar la actividad proteasa se procedió a evaluar tres mezclas diferentes con cambios en la concentración de los compuestos como se describen en la tabla 5-2

Tabla 8-2. Ensayos realizados para determinación de la actividad proteasa

Ensayo/Concentración	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Agarosa	0,17gr	0,25gr	0,32gr
Leche en polvo descremada	0,08gr	0,12gr	0,25gr
Suero fisiológico (buffer)	30 ml	30 ml	40 ml

Realizado por: Tobar Karen, 2018

Procedimiento:

- En un Erlenmeyer colocar los gramos de agarosa con la mitad de los mililitros de suero fisiológico
- Esterilizar en la autoclave por 25 minutos
- En un segundo Erlenmeyer colocar la leche descremada en polvo y disolver en los mililitros restantes de suero fisiológico
- Adicionar la leche disuelta en la agarosa y homogenizar
- Con una pipeta volumétrica previamente caliente, colocar 3 mL en placas porta objetos
- Esperar hasta que solidifique y con un sacabocados realizar 9 agujeros para colocar los extractos
- Con una micropipeta colocar en los agujeros 20 uL de extracto por triplicado y controles en cada placa suero fisiológico, etanol y extracto de piña.
- Colocar las placas en una cámara cerrada y llevarla a la estufa a 36.5°C por 1 hora.
- Observar los resultados

2.4.6. *Determinación de la actividad antimicrobiana.*

Reactivación de colonias de microorganismos (bacterias)

Para la determinación de actividad antimicrobiana se utilizaron cepas ATCC pertenecientes al Laboratorio Clínico de la Universidad Técnica de Ambato. La reactivación se realizó por triplicado a partir de cultivos de microorganismos sembrados en pico de flauta de agar Müller Hinton de acuerdo al siguiente protocolo:

- Preparar Caldo Müller Hinton, agar Dextrosa Sabouraud y colocarlo en tubos estériles
- En la campana de flujo laminar realizar la siembra de cada una de las bacterias con un asa de metal
- Incubar a temperatura 36.5 °C por 18 horas
- Retirar de la incubadora y colocarlos en refrigeración para conservar las cuñas y garantizar un respaldo de las mismas.

Reactivación de colonias de levaduras

- Preparar agar Dextrosa Sabouraud y colocarlo en tubos estériles
- En la campana de flujo laminar realizar la siembra con un asa de metal
- Realizar la activación por triplicado
- Incubar a temperatura 36.5 °C por 18 horas
- Retirar de la incubadora y colocarlos en refrigeración

2.4.7. *Ensayo de sensibilidad: Difusión en agar*

El ensayo de sensibilidad se realizó por duplicado para cada extracto, colocando como controles suero fisiológico, etanol, jugo de piña, agua destilada y un antibiótico específico para cada bacteria.

Tabla 9-2. Antibióticos utilizados como control para las pruebas de sensibilidad

Bacteria	Antibiótico
ATCC 8100 – <i>Serratia marcescens</i>	Ampicilina
ATCC 10231 – <i>Candida albicans</i>	Metronidazol
ATCC 14028 – <i>Salmonella typhimurium</i>	Ampicilina
ATCC 25922 – <i>Escherichia coli</i>	Ceftazidima
ATCC 29213 – <i>Staphylococcus áureos</i>	Meropenem
ATCC 27853 – <i>Pseudomona aeuruginosa</i>	Ciprofloxacino
ATCC 29212 – <i>Enterococcus faecalis</i>	Ciprofloxacino
ATCC 700603 – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amikacina

Realizado por: Tobar Karen, 2018

Protocolo:

- Con un hisopo estéril realizar la siembra de cada una de las bacterias reactivadas en las cajas con medio agarizado.
- Con la ayuda de una pinza flameada previamente colocar los discos de sensibilidad en blanco, los controles y un antibiótico específico para cada bacteria.
- Con una micropipeta colocar 15 uL de extracto en los discos de sensibilidad desde el centro del mismo.
- Colocar en la incubadora por 18 horas a 36.5 °C de temperatura.
- Posterior al tiempo de incubación, se observan cada una de las placas y con la ayuda de una regla se miden los halos de inhibición de cada disco.

CAPITULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANALISIS

3.1. Obtención de extractos

El volumen final de los extractos se muestra en la tabla 7-3; mediante el método microondas se obtuvo la mayor cantidad de los extractos alcohólicos de higo y papaya, obteniendo un volumen similar al solvente añadido inicialmente en la preparación.

Tabla 10-3 Volumen obtenido de extractos alcohólicos y acuosos de Ficus carica y Carica papaya

Extracto	Cantidad inicial	Volumen obtenido
Alcohólico fruto higo	100 gr en 100 mL etanol	35 mL
Alcohólico fruto higo verde	55 gr en 80 mL etanol	30 mL
Alcohólico microondas cascara higo	100gr en 65mL etanol	50 mL
Alcohólico hoja higo	50 gr en 25 mL etanol	18 mL
Acuoso fruto higo	100 gr en 125 mL agua destilada	45 mL
Acuoso fruto higo verde	60 gr en 75 mL agua destilada	30 mL
Acuoso hoja higo	50 gr en 25 mL agua destilada	20 mL
Alcohólico fruto papaya	100 gr en 70 mL etanol	30 mL
Alcohólico microondas cascara papaya	100 gr en 65mL etanol	60 mL
Alcohólico hoja papaya	50 gr en 25 mL etanol	20 mL
Acuoso fruto papaya	100 gr en 80 mL agua destilada	40 mL
Acuoso hoja papaya	50 gr en 25 mL agua destilada	20 mL

Realizado por: Tobar Karen, 2018

3.2. Método estandar para la determinacion de la actividad proteasa

Según los ensayos probados para determinar la actividad proteasa, la formulación con el que se obtuvieron resultados óptimos fue la formulación tres que contiene 0,32gr de agarosa, 0,25gr de leche descremada en polvo disueltos en 40 ml de buffer.

3.3. Resultados actividad proteasa

Los resultados obtenidos en la Tabla 8-3 y Grafica 1-3 muestran que tanto el látex de papaya como de higo presentan la mayor actividad proteasa evidenciada por la formación de los halos de 11.5 mm y 12 mm respectivamente, el control colocado fue extracto de piña el cual formó un halo de 9 mm suponemos que esto se debe a que contiene bromelina en su composición. También se observó actividad en el extracto de fruto y hoja de ambas especies, es importante hacer notar que el extracto obtenido de la cocción del fruto de higo por más de una hora, mostro actividad similar a la del látex, esto indica la presencia de un factor con actividad proteolítica estable a las condiciones de extracción (temperatura superior a 90° C por mas de una hora)

Tabla 11-3. Resultados del ensayo de actividad proteasa

I.D.	Extracto / número de ensayo	Resultado	Diámetro del halo (mm)
1A	Acuoso fruto de higo	+	8 mm
1B	Acuoso hoja de papaya	+	6 mm
2A	Acuoso hoja de Higo	-	
2B	Acuoso fruto de papaya	-	
AA	Acuoso fruto higo verde	-	
AB	Etanol fruto higo verde	-	
1C	Etanol fruto higo sobrenadante	+	6 mm
2C	Etanol fruto papaya sobrenadante	-	
3C	Etanol hoja de higo sobrenadante	-	
4C	Etanol hoja papaya sobrenadante	-	
5C	Extracto microondas papaya sobrenadante	-	
6C	Extracto microondas higo sobrenadante	-	

1	Etanol fruto higo pellet	-	
2	Etanol fruto papaya pellet	-	
3	Etanol hoja higo pellet	+	6,5 mm
4	Etanol hoja papaya pellet	-	
5	Extracto microondas papaya pellet	-	
6	Extracto microondas higo pellet	-	
21	Extracto higo cocido	+	11,5 mm
LP	Látex Papaya	+	11,5 mm
LH	Látex Higo	+	12 mm
	Suero Fisiológico	-	
	Etanol	-	
	Piña	+	9 mm

Realizado por: Tobar Karen, 2018

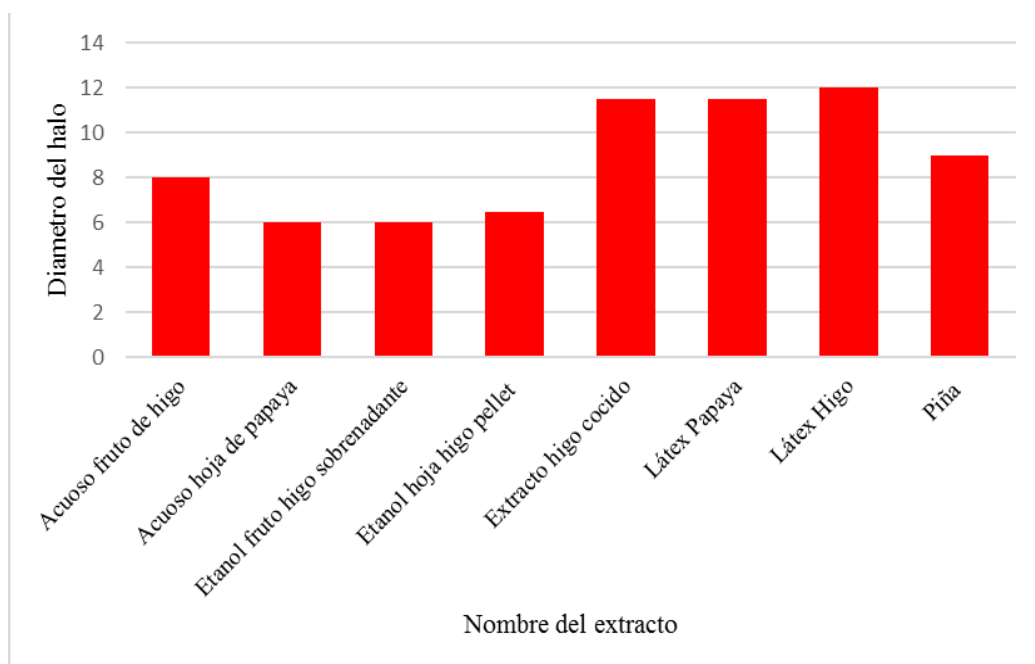


Gráfico 1-3. Determinación de la actividad proteasa

Realizado por: Tobar Karen, 2018

3.4. Resultados actividad antimicrobiana

En las tablas 12-3, 13-3, se muestran los resultados de actividad antimicrobiana para cada cepa monitora siendo la más sensible a la mayoría de los extractos la cepa de *Klebsiella pneumoniae* obteniendo halos de 5 a 11 mm de diámetro.

La cepa de *E. coli* presento halos de inhibición frente a los extractos de hoja y fruto de *Ficus carica*, con halos de inhibición mayores a los obtenidos por Hamid Al-Yousuf en el 2012 en un estudio de evaluación antimicrobiana frente a esta cepa. (Hamid Al-Yousuf, 2012)

Es importante mencionar que el control de etanol presenta actividad antibacteriana en todos los microorganismos monitores, pero a su vez no todos los extractos etanólicos forman halos de inhibición, indicando así que los extractos que resultaron positivos poseen componentes específicos provenientes de las especies vegetales que les otorgan esta actividad.

El extracto con mayor actividad fue el etanólico de fruto de higo verde (AB), el cual mostro actividad frente a todas las cepas monitoras.

Tabla 12-3. Resultados actividad antimicrobiana para bacterias *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*

I.D	Extracto	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
1A	Acuoso fruto de higo	-	-	-	-
1B	Acuoso hoja de papaya	-	-	-	-
2A	Acuoso hoja de Higo	-	-	-	-
2B	Acuoso fruto de papaya	-	-	-	-
AA	Acuoso fruto higo verde	-	-	-	-
AB	Etanol fruto higo verde	+ (8mm)	+ (10mm)	+ (10mm)	+ (12mm)
1C	Etanol fruto higo sobrenadante	-	-	-	-
2C	Etanol fruto papaya sobrenadante	-	-	-	-
3C	Etanol hoja de higo sobrenadante	-	+ (11mm)	+ (12mm)	+ (12mm)

4C	Etanol hoja papaya sobrenadante	-	+(9mm)	+ (12mm)	+(12mm)
5C	Extracto microondas papaya sobrenadante	-	-	-	-
6C	Extracto microondas higo sobrenadante	-	-	-	-
1	Etanol fruto higo pellet	-	-	-	-
2	Etanol fruto papaya pellet	-	-	-	-
3	Etanol hoja higo pellet	-	-	-	-
4	Etanol hoja papaya pellet	-	-	-	-
5	Extracto microondas papaya pellet	-	-	-	-
6	Extracto microondas higo pellet	-	-	-	-
21	Extracto higo cocido	-	-	-	-
LP	Látex Papaya	-	-	-	-
LH	Látex Higo	-	-	-	-
	Suero Fisiológico	-	-	-	-
	Etanol	+ (9mm)	+ (11mm)	+ (11mm)	+ (17mm)
	Piña	-	-	-	-

Realizado por: Tobar Karen, 2018

Tabla 13-3. Resultados actividad antimicrobiana para bacterias *Staphylococcus aureos*, *Pseudomona aeuruginosa*, *Enterococcus fecalis* y *Klebsiella pneumoniae*

I.D	Extracto	<i>Staphylococcus aureos</i>	<i>Pseudomona aeuruginosa</i>	<i>Enterococcus fecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
1A	Acuoso fruto de higo	-	-	-	+ (7mm)
1B	Acuosa hoja de papaya	-	-	-	+ (7mm)

2A	Acuoso hoja de Higo	-	-	-	+ (6mm)
2B	Acuoso fruto de papaya	-	-	-	+ (6mm)
AA	Acuoso fruto higo verde	-	-	-	+ (8mm)
AB	Etanol fruto higo verde	+ (8mm)	-	+(11mm)	+ (9mm)
1C	Etanol fruto higo sobrenadante	-	-	-	+ (5mm)
2C	Etanol fruto papaya sobrenadante	-	-	-	+ (5mm)
3C	Etanol hoja de higo sobrenadante	+ (13mm)	+ (8mm)	+ (13mm)	+ (8mm)
4C	Etanol hoja papaya sobrenadante	+ (12mm)	+ (8mm)	+ (12mm)	+ (8mm)
5C	Extracto microondas papaya sobrenadante	-	-	-	+ (8mm)
6C	Extracto microondas higo sobrenadante	-	-	-	+ (7mm)
1	Etanol fruto higo pellet	-	-	-	-
2	Etanol fruto papaya pellet	-	-	-	-
3	Etanol hoja higo pellet	-	-	-	+ (7mm)
4	Etanol hoja papaya pellet	-	-	-	-
5	Extracto microondas papaya pellet	-	-	-	-
6	Extracto microondas higo pellet	-	-	-	-
21	Extracto higo cocido	-	-	-	-
LP	Látex Papaya	-	-	-	-
LH	Látex Higo	-	-	-	-

	Suero Fisiológico	-	-	-	-
	Etanol	+ (7mm)	+ (9mm)	+ (7mm)	+ (7mm)
	Piña	-	-	-	-

Realizado por: Tobar Karen, 2018

CONCLUSIONES

Mediante técnicas de homogenización y microondas se obtuvieron extractos acuosos y alcohólicos de hojas, fruto y cascara de las especies *Ficus carica* (higo) y *Carica papaya* (papaya), los extractos preparados por método microondas presentaron mayor volumen.

Al realizar los ensayos para determinar la actividad proteasa con diferentes concentraciones de leche descremada en polvo y agarosa, el procedimiento optimo fue el de 0.34 gr de agarosa y 0.25 gr de leche descremada en polvo en 40 mL de buffer (suero fisiológico) y colocado en la autoclave por 25 min para su total disolución, obteniendo así placas de consistencia uniforme sin grumos y apariencia homogénea.

La actividad proteasa fue positiva para los extractos acuoso fruto de higo, acuoso hoja de papaya, etanol fruto higo sobrenadante, etanol hoja higo pellet, extracto higo cocido, látex papaya, látex higo formándose halos claros de 6 a 11 mm, los extractos con más actividad fueron los látex de ambas frutas suponemos que esta actividad se debe a la presencia de las enzimas ficina y papaína respectivamente.

Los extractos de etanol fruto higo verde, etanol hoja de higo sobrenadante, etanol hoja papaya sobrenadante presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias monitoras *Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimuriun*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureos*, *Pseudomona aeuruginosa*, *Enterococcus faecalis* , *Klebsiella pneumoniae* formándose halos de inhibición de 8 a 11 mm. La cepa bacteriana más sensible frente a todos los extractos fue la de *Klebsiella pneumoniae* formando halos de 5 a 11 mm de diámetro.

El extracto de higo sometido a cocción durante más de una hora, presenta una inesperada actividad proteasa, lo que induce la presencia de un factor proteolítico termoestable.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio bioquímico del extracto de higo cocido debido a que los resultados obtenidos muestran que posee un factor termorresistente, el cual luego de ser sometido a temperatura por encima de 90 °C por más de una hora sigue presentando actividad.

Determinar la composición fitoquímica de las especies *Ficus carica* y *Carica Papaya*, para conocer los metabolitos secundarios presentes que pueden ser partícipes en la inhibición bacteriana.

Cuantificar las enzimas presentes en los distintos extractos que formaron halos de inhibición.

BIBLIOGRAFÍA

Abreu, O; et al. *Tratamiento de las enfermedades infecciosas.* Washington : s.n., 2011. pp 110-160

Araujo, A. *Introduccion al mundo de las prroteasas .* 2014, Repositorio Universidad Internacional de la Plata , pp 1-57.

Ausina, Vicente y Moreno, Santiago. *Tratado de Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica .* Buenos Aires : Panamericana , 2005, pp 25-60.

Battaner, Enrique. *Introducción a la bioquímica.* Madrid : Pearson Education, 2015. Pp 413-526

Begum, Mahmuda. *A dissertation submitted to the department of pharmacy.* Aftabnagar : Esar West, 2014.

Bertoluzzo, S. *Estudio cinetico de la actividad proteolítica de la enzima ficina.* 2008. pp 243-245

Betts, Matthew y Russell, Robert. *Amino Acid Properties and Consequences of Substitutions.* Heidelberg : John Wiley & Sons, 2015, pp 26-68.

Boston Public Health Commission. Infectious Disease Bureau. *Boston Public Health Commission .* [En línea] Junio de 2014. [Consulta el: 25 de Junio de 2018.] Disponible en: www.bphc.org.

Cabildo, Maria del Pilar; et al . *Quimica Organica.* Primera. Madrid : UNED, 2011. pp 750-759

Carbajal, Ángeles. *Manual de Nutrición y Dietética.* Madrid : Facultad de Farmacia, 2013. pp 30-78

Carrasco, R. *Las cisteino proteasas y los compuestos tipo aceptores.* Revista Cuba Medic , 2003, pp. 1-6.

Centrón, Daniela. *Microbiología Clínica.* Facultad de Medicina Universidad de Buenos Aires. [En línea] Mayo 2015 [Consultado el: 28 de Julio de 2018.] Disponible en: <http://www.fmed.uba.ar/depto/microbiologia/c9m1.pdf>.

Chew, Alejandra. *Extracción y purificación de la enzima ficina proveniente del látex del higo.* [En línea] Mayo de 2016. [Consulta: 12 de Julio de 2018.] Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/4824/1/Alejandra%20Mar%C3%ADa%20Chew%20Aldana.pdf>.

Cremsi, P. *L'uso degli enzimi nella pulitura di oprer policrome.* París : Padova, 2002. pp 317.

Dalgo, Violeta. *Obtención de un concentrado de bromelina a partir de piña.* 2012, Repositorio UTA, pp. 15-40. [En línea] [Consulta: 12 Julio 2018]. Disponible en: <repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3061/1/SBQ.27.pdf>

De Jesus, Maria Teresa y Benitez, Karen. *Actividad Antimicrobiana del papacarie contra el Streptococo mutans aislado .* 2012, Odonto Pediatría. pp. 18-22

Diario El Comercio. *La resistencia a los antibióticos provoca mayor preocupación.* 2017 [En línea] [Consulta: 15 Julio 2018]. Disponible en :<https://www.elcomercio.com/tendencias/estudio-superbacterias-salud-latinoamerica-antibioticos.html>

Domingo, D y Lopez, M. *Plantas con accion antimicrobiana,* Madrid : Prous Scieencie, 2003, Vol. 16, pp 1-5.

Dos Anjos, M; et al. *Actividad antibacteriana de papaína y bromelina en Alicyclobacillus spp.* 6, s.l. : MEDLINE, 2016, Vol. 121, pp. 121-126.

Duke, J ; et, al. *Handbook of medital herbs.* Segunda. USA : s.n., 2003. pp 347-357

Errastri, María Eugenia. Estudio de posibles aplicaciones farmacológicas de extractos de especies de bromeliáceas y su comparación con la bromelina. [En línea] 20 de Enero de 2018. [Consulta: 25 de Junio de 2018.] Disponible en :

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/31727/Documento_completo__Errasti.pdf?sequence=1.

Etebu, Ebimiewei y Arikekpar, Ibemologi. *Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives.* 2016, International Journal of Applied Microbiology, Vol. IV, pp. 90-101.

Forbes, Betty, Sahm, Daniel y Trevino, Ernest. *Diagnostico Microbiologico .* Buenos Aires : Panamericana, 2007. pp 180-190

Gallardo, Linda, Sanchez, Alfredo y Montalvo, Claudia. *Piña, extracción de bromelina a partir de residuos de piña.* 2008, Ciencia y Tecnología de Alimentos, pp 1-7.

Garces, Monica. *Effect of proteolytic enzyme and fiber of papaya fruit on human digestive health.* Urbana : University of Illinois, 2011. pp 2-5

Gibson, Michael. Wiki Doc. *Wiki Doc.* [En línea] 10 de Abril de 2015. [Consulta: 25 de Junio de 2018.] Disponible en: <http://www.wikidoc.org/index.php/Chymopapain>.

Gundian, J; et, al. *Macrolidos*. 1998 [En línea] [Consulta: 12 de Junio del 2018]. Disponible en: [//bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act10198.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act10198.htm)

Hamid Al-Yousuf, Hiba Hazim. *Antibacterial activity of Ficus carica L. extract against six bacterial strains*. 4, Bagdad : International Journal of Drug Development and Research, 2012, Vol. 4, pp. 2861-2872.

Jimenez, Jose. *Manual Practico para el cultivo de la papaya* . 2002 , EARTH. pp 23-24

Kumar, Pratyush y Sahoo, Ratikanta. *Bromelain: Applications and Purification Strategies*. 11, Odisha : s.n., 2017, Vol. 5, pp. 6.

Lehninger, Nelson. *Principios de la Bioquímica*. Segunda. Barcelona : Omega, 1995. pp 59-191

Lopez, Laura ; et al. *Proteasas de Plantas Superiores FICINA*. 1994, Acta de Farmacia, pp. 123-131.

Luc, Matthew. *Comparison of Disc Diffusion and Microbroth Dilution Methods for the Detection of Antibiotic Resistant Subpopulations in Gram Negative Bacilli*. Washington : Laboratory Medicine, 2015. pp. 17-20.

Luque, Victoria. Universidad de Valencia. *Estructura y Propiedades de las Proteínas*. [En línea] 2010.[Consultado: 22 de Julio del 2018] Disponible en:
https://www.uv.es/tunon/pdf_doc/proteinas_09.pdf.

Michel, Anne. *A la decouverte des peptides antimicrobiens*. Nancy : Faculté de Pharmacie, 2010.

Ministerio de Agricultura y Riego Perú . Papaína . [En línea] [Consultado: 20 de Enero de 2018] Disponible en:

<http://minagri.gob.pe/portal/download/pdf/sectoragrario/agricola/lineasdecultivosemergentes/PAPAINA.pdf>.

Ministerio de Agricultura y Riego Perú. Ficina. [En línea] [Consulta: 20 de Enero de 2018.].Disponible en:

<http://www.minagri.gob.pe/portal/download/pdf/sectoragrario/agricola/lineasdecultivosemergentes/FICINA.pdf>.

Montes, Johana. *Efecto antidiabético del fruto del higo (Ficus Cariaca L.), sometido a altas presiones hidrostáticas.* Querétaro : Universidad Autónoma de Querétaro, 2014. pp. 1-11.

Montoya, Hugo. *Microbiología Basica para el area de la salud y afines .* Segunda. Colombia : Editorial Universidad de Antioquia , 2008. pp. 230-231.

Organización Mundial de la Salud. OMS. *Resistencia a los antibioticos.* [En línea] [Consultado: Octubre de 2017]. Disponible en:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>.

Osato, J; et al. *Antimicrobial and antioxidant activities of unripe papaya.* Washington : Elsevier, 1993, Vol. 53, pp. 1-8.

Perez, J ; et al . *Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana .* Revista Medica. 2013. pp. 186-191.

Pinto, Claudinéia y Green, Dennise. *Determination of Papain Activity in Topical Dosage Forms:Single Laboratory Validation Assay.* Latin American Journal of Pharmacy. 2007. pp. 771-775.

Reyes, F., Palou, E. & Lopez, A. *Metodos de evaluacion de actividad antimicrobiana y determinacion de los componentes quimicos en aceites esenciales.* Temas selectos en ingenieria de alimentos. 2015. pp. 68-78.

Silva, Jesus. *Resistencia Antibióticos.* 2006, Revista Latinoamericana de Microbiologia, pp. 1-8.

Tellez, German y Castaño, John. *Péptidos antimicrobianos.* 2010, Scielo, pp. 55-67.

Teijon, Jose Maria y Blanco, Dolores. *Bioquimica Estructural Conceptos y Test.* Primera. s.l. : Tebar, 2001. pp. 54-55..

Tortora, Gerard, Funke, Berdell y Case, Christine. *Introduccion a la Microbiologia.* Novena. Buenos Aires : Panamericana , 2007. pp 496-500