

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL BENCIL ISOTIOCIANATO DE CARICA PUBESCENS (PAPAYA DE MONTE) FRENTE A HELICOBACTER PYLORY

Lisbeth Yesenia Rodríguez Tanta¹

RESUMEN

Introducción: El incremento de la malignidad gástrica por *Helicobacter pylori*, así como los inconvenientes propios del tratamiento convencional, conllevan a buscar alternativas naturales para su erradicación. **Objetivos:** Determinar la actividad antibacteriana del Bencil Isotiocianato (BITC) in vitro obtenido de las semillas de *Carica pubescens* (papaya de monte) frente a *Helicobacter pylori*. **Materiales y métodos:** El BITC se obtuvo mediante extracción diclorometánica. Se identificó, aisló y cuantificó por Cromatografía en Capa Fina (TLC), Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) y otros métodos espectrofotométricos. La actividad anti-*Helicobacter pylori* in vitro se realizó mediante la prueba de Susceptibilidad de la difusión en disco (Kirby Bauer), lo que permitió conocer el grado de Susceptibilidad en función al tamaño de halo. Por el Ensayo Colorimétrico en microplacas para la determinación de la Concentración Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). **Resultados:** La concentración de BITC obtenida a partir de la semilla de *Carica pubescens* fue 17,44%. La CMI del BITC promedio frente a las tres cepas de *Helicobacter pylori* aisladas fue 26µg/mL y la CMB 29µg/mL. **Conclusión.** - *Helicobacter pylori* presenta buena susceptibilidad al BITC obtenido a partir de las semillas de *Carica pubescens*. Se recomienda hacer investigaciones sobre su actividad in vivo.

Palabras claves. - Bencil isotiocianato, Caricaceas, *Helicobacter pylori*, halo de inhibición, Concentración mínima inhibitoria, Concentración mínima bactericida.

ABSTRACT

Introduction: The increase in gastric malignancy induced by *Helicobacter pylori* and the inconveniences of conventional treatment, leading to search for other natural alternatives for its eradication. **Objectives:** To determine the antibacterial activity in vitro of the Benzyl isothiocyanate (BITC) obtained from the seeds of *Carica pubescens* (mountain papaya) against *Helicobacter pylori*. **Materials and methods:** The BITC was obtained by dichloromethane extraction. Identified, isolated and quantified by Thin Layer Chromatography (TLC), liquid chromatography (HPLC) and other spectrophotometric methods. The anti-*Helicobacter pylori* activity in vitro was performed by testing susceptibility disk diffusion (Kirby bauer), allowing to determine the degree of susceptibility depending on the size of halo. A colorimetric microplate assay was developed for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). **Results:** The BITC concentration obtained from seeds of *Carica pubescens* was 17,44%. The average MIC of BITC against the three strains of *Helicobacter pylori* isolated was 26µg/mL and MBC was 29 µg/mL. **Conclusion.** *Helicobacter pylori* is very sensible to BITC obtained from seeds of *Carica pubescens*. It would be useful to do a research about its activity in vivo.

Key words: Benzyl isothiocyanate, caricaceas, *helicobacter pylori*, inhibition zone, MIC, MBC.

INTRODUCCIÓN

El rol patogénico que *Helicobacter pylori* cumple a nivel mundial es conocido(11).

En 1982 Warren y Marshal describieron un organismo espirilar Gram negativo al cual asociaron con la presencia de gastritis antral, úlcera gástrica y duodenal, llegando a la conclusión que su erradicación eliminaba las recurrencias (1).

Se sabe que la prevalencia de la infección en úlcera duodenal es de 90 a 95%. En úlcera gástrica, la infección ocurre con una prevalencia del 60% a 80% (4).

Estudios en la población peruana han demostrado que en nuestro medio la bacteria se presenta en el 91% de los casos de gastritis crónica activa, 73% de pacientes con úlcera gástrica y 87% en casos de úlcera duodenal (1,11).

Por otra parte, *Helicobacter pylori* implicado desde su aislamiento, en diversas afecciones gastrointestinales, fue clasificada en 1992 como agente carcinogénico (Agencia Internacional para la investigación del Cáncer IARC - 1994). Esta agencia,

ha categorizado a la infección por *Helicobacter pylori* como un carcinógeno clase I, notificando que la proporción de nuevos casos de cáncer gástrico atribuibles a la bacteria, asciende a más de 300,000 casos al año en todo el mundo (4).

Existen dos cánceres asociados con *Helicobacter pylori*: el carcinoma gástrico y el linfoma de la mucosa asociada con tejido linfóide (MALT). Los estudios de seguimiento sugieren que los mecanismos inmunes del organismo contra *Helicobacter pylori* inducen atrofia gástrica, una lesión avanzada asociada al posterior desarrollo de cáncer de estómago. Además, respecto a los mecanismos carcinogénicos, la intensa amonemia resultante de la actividad de la ureasa, puede promover la división celular (1,4).

Debido a la alta prevalencia de *Helicobacter pylori* a nivel mundial, ésta ha llegado a ocupar el segundo lugar de todas la enfermedades infecciosas que se conocen.

La presencia de *Helicobacter pylori*, es más frecuente en poblaciones de estrato social bajo y su prevalencia en niños incrementa el riesgo de transmisión a la población adulta. En el Perú hay prevalencia de la infección en todos los grupos socioeconómicos(13).

El Tratamiento para la infección de *Helicobacter pylori* se basa en el uso de inhibidores de bomba de protones y

¹ Químico Farmacéutico UNJBG – FACS - ESFB

antibióticos, que pueden producir efectos adversos indeseables para el paciente, lo que conlleva a la no adherencia al tratamiento. Por otro lado, el elevado costo de tratamiento representa un factor para no poder iniciarlo produciéndose el aumento de malignidad gástrica(11).

A nivel mundial se cuenta con diversas investigaciones sobre alternativas naturales para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Dentro de ellas se destaca el uso de los isotiocianatos⁶, siendo el máximo representante el Sulfurafano, obtenido del brócoli, quien tiene potente acción bactericida (8).

El trabajo que se presenta a continuación tiene como objetivo determinar la actividad antibacteriana in vitro del Bencil isotiocianato obtenido a partir de semillas de *Carica pubescens* frente a *Helicobacter pylori*, teniendo en cuenta que el bencil isotiocianato, es un isotiocianato aromático producto de la hidrólisis neutra de los glucosinatos⁽⁵⁾ presentes principalmente en las familias Caricaceae (12,14,16) y Tropolaceae, que presenta muchas propiedades farmacológicas, dentro de las que se destaca su potente actividad anticancerígena (17) y antibiótica frente a numerosas bacterias, hongos y parásitos (9), y que aún no ha sido investigada su acción antibiótica frente a *Helicobacter pylori*.

MATERIAL Y METODOS

Obtención del bencil isotiocianato

Se usaron semillas de *Carica pubescens* (papaya de monte) secadas bajo sombra y en estufa a temperatura de 42°C, finalmente fueron trituradas a polvo fino.

La obtención se realizó por el método de Steven F. Vaughn¹⁵, se desengrasó 30gr de polvo de semilla en un equipo Soxhlet utilizando 250ml de hexano, por ocho horas. Luego se produjo una hidrólisis, al añadir 30ml de buffer fosfato de potasio pH7, formándose una papilla a la que se agregó 80ml de CH₂CL₂ para la extracción del BITC, haciendo uso del Shaker por 48 horas. Para la saturación del extracto se añadió 10g de NaCl y 10g Na₂SO₄. El extracto obtenido se filtró con papel Whatman# 01. Finalmente, el extracto se llevó a la campana de gases por seis horas. El producto obtenido se guardó en un frasco ámbar hermético.

Aislamiento del BITC

Se realizó mediante CCF (Cromatografía en Capa Fina). Se realizó 2 cromatogramas, usando placas de silicagel de 15 x 6 cm. Cada placa fue dividida en 3 puntos equidistantes. En un punto se sembró 20µl del BITC 98% estándar y en los dos siguientes 20µl del BITC extraído. El eluyente utilizado fue Hexano:CH₂CL₂ (4:2) dejando desarrollarse la placa por 40 minutos aproximadamente. El primer cromatograma se reveló por Luz UV7.

El segundo se esprayó con nitrato de plata amoniacal, se llevó a la estufa a 110°C hasta la aparición de manchas marrón oscuro y se esprayó con HNO₃ 0,5N Finalmente se determinó el Rf.

Luego de revelar la presencia de BITC por las

manchas presentes en los cromatogramas, se delimitó la zona a la cual aparecen y se aisló el BITC.

Identificación del BITC

Para identificar el BITC se utilizó BITC 98% estándar (Sigma-Aldrich), para ello se realizó una solución madre de 551,25ug/mL. El punto de la curva de calibración que se utilizó para la identificación por el Espectro UV y HPLC fue 110,25 ug/mL.

Espectrofotometría Uv, El compuesto aislado se diluyó con 4mL de MeOH. Se tomó 1ml de la dilución y se procedió a leer por Espectrofotómetro-UV.

HPLC.- La muestra N° 1 fue diluida en una fiola de 10mL con MeOH. Y se desarrolló la lectura por HPLC con las siguientes condiciones Cromatográficas:

Columna	: Eclipse XDB C8 4,6 x 50mm
Fase Móvil	: MeOH: Acetonitrilo (50:50)
Diluyente	: MeOH
Longitud de Onda	: 254nm
Flujo	: 1mL/min
Vol. de Inyección	: 20uL
Tiempo de corrida	: 3 minutos
Equipo	: HPLC Agilent serie 1200

Cuantificación del bencil isotiocianato.-

Luego de obtener las áreas de los picos presentes en las muestras por HPLC, se procedió a determinar la concentración de BITC, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{A.Mp}{A.St} \times B \times C \times 100\%$$

A. Mp	: Área Muestra problema
A. St	: Área del Estándar
B	: Concentración del Estándar
C	: Dilución del Estándar

Muestra biológica

Se empleó tres cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de biopsias de antro a partir de pacientes¹⁰ del Servicio de Gastroenterología del Hospital Edgardo Rebagliati Martins- ESSALUD, las cuales se sembraron en agar Columbia con 5% de sangre de carnero (obtenida de INS), más suplemento Dent (Vancomicina 10mg/l, Trimetoprim 5mg/l, Cefsulodina 5mg/l, Amfotericin B 5mg/l), las placas se incubaron en microaerofilia con 5% CO₂, 10% O₂ y 85% N₂ a 37°C durante siete días. Las colonias obtenidas se identificaron por coloración Gram, prueba oxidasa, catalasa y ureasa, siendo positivas a todas ellas.

Determinación de la actividad antibacteriana

Método de difusión

Para determinar cualitativamente la actividad antibacteriana del BITC obtenido de las semillas de *Carica pubescens*, se empleó el método de difusión de discos, usando el medio EYE (agar Columbia y yema de huevo al 15%), al que se le añadió suplementos al 1% de IsoVitalax (BBLTM-Becton Dickinson and Co), anfotericin B y 2,3,5 cloruro trifenilo de tetrasodium (TTC)(3).

Se inoculó las cepas a partir de una suspensión en suero fisiológico con turbidez equivalente al tubo N° 0.5 de la escala de Mac Farland (1.5 X 10⁸UFC/ml) sobre la superficie del medio, se colocaron discos de papel filtro estériles de 6mm de diámetro, a los que se embebió 20µL de dilución de DMSO de las concentraciones de 5, 10, 20 y 40, 60 y 100µg/mL del BITC obtenido de las semillas de *Carica pubescens* a partir de la solución madre con una concentración de 174µg/ml. Cada concentración se realizó por triplicado.

Las placas se incubaron a 37°C en condiciones de microaerofilia por 96h, luego se midieron los halos de inhibición alrededor del disco. Para el control positivo se utilizaron discos de amoxicilina 10µg y para el control negativo DMSO3.

Para la interpretación de los resultados se utilizó el Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR) que compara la actividad antimicrobiana de los extractos frente al control positivo del antibiótico, obteniéndose un porcentaje de inhibición.

$$PIR = \frac{a \times 100}{b}$$

Donde:

PIR	=	Porcentaje de Inhibición Relativa
a	=	Promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto.
b	=	Promedio del diámetro del halo de inhibición del antibiótico estándar.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Se determinó el método de Dilución en Microplacas, para lo cual se empleó una microplaca de 96 pocillos (8 filas x 12 columnas) para cada cepa aislada.

En diez tubos de pruebas graduadas se preparó, por separado, suplemento de Isovitalax 10µL, Anfoterecin B 2µL, TTC 4µL y yema de huevo 100µL, a cada tubo se agregó 100µL de BITC a las concentraciones de 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48µg/mL a partir de la concentración madre 174µg/mL utilizando como diluyente a DMSO, y se enrasó a 1mL con agar Columbia. En otros dos tubos, se preparó la misma solución, uno para el control negativo (sin aceite esencial, ni cepa) y el otro como control positivo (con cepa). A partir de cada uno de los doce tubos, se colocaron 200µL a cada pocillo de la microplaca, por cuatro repeticiones, dejando solidificar. Los tres inóculos fueron preparados en un tubo de prueba con solución salina al 0,9% hasta una turbidez equivalente al tubo N° 0,5 de la escala de Mac. Farland (1.5 X10⁸UFC/mL), se colocó 5µL de inóculo sobre cada pocillo, las placas se taparon y se incubaron en condiciones de microaerofilia con 5% CO₂, 10% O₂ y 85% N₂ a 37 °C por 48h.

La lectura se realizó mediante la Técnica Colorimétrica con 2,3,5 Cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) (incoloro)³. Cuando hay presencia de la bacteria, la microplaca muestra una coloración rojiza por la formación de formazán, al no haber presencia de ésta la microplaca mantiene su coloración

amarilla. Por lo tanto, la microplaca con la menor concentración de BITC que presentó coloración rosa pálido contuvo la Concentración Mínima Inhibitoria, que indica la muerte del 50% de bacterias. Se corroboró con la prueba de la ureasa.

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Dejando un día más en las mismas condiciones de microaerofilia, se volvió a realizar la lectura.

La microplaca con la menor concentración de BITC que presentó coloración amarilla contuvo la Concentración Mínima Bactericida, que indica la muerte del 100% de bacterias. Se corroboró con la prueba de ureasa, para determinar CMB.

RESULTADOS

Cuantificación de BITC

La concentración de BITC obtenida a partir de 30g de semilla de *Carica pubescens* fue 174 534,23µg/mL. Se obtuvo 1,72ml de extracto diclorometánico, Por lo tanto, 30g de semillas contienen aproximadamente 300mg de BITC y en 100g hay 997mg.. El porcentaje de BITC presente en cada semilla según el método realizado fue 17,44%.

Aislamiento del BITC

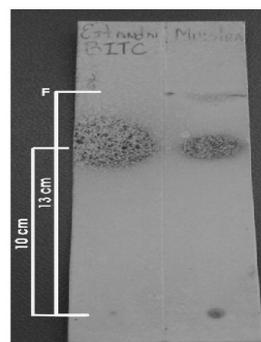


FIGURA 1.- Cromatografía en capa fina del BITC obtenido de las semillas de *Carica pubescens*

Cromatograma N° 2		
St : 2µL	Estándar BITC	Rf: 0.73
Muestra: 20 µL	E-BITC	Rf: 0.72
Sistema Solvente		
Hexano:CH ₂ CL ₂ (4:2)		
Placa : 5 x 14cm		
Frente : 13cm		
Tiempo: 40 min		
Revelador: AgNO ₃ amoniacal		
HNO ₃ diluido		

Identificación del BITC

Por HPLC- El tiempo de retención entre los picos de BITC obtenido de las semillas de *Carica pubescens* y el BITC 98% estándar fue 1,72min. y 1,75min.

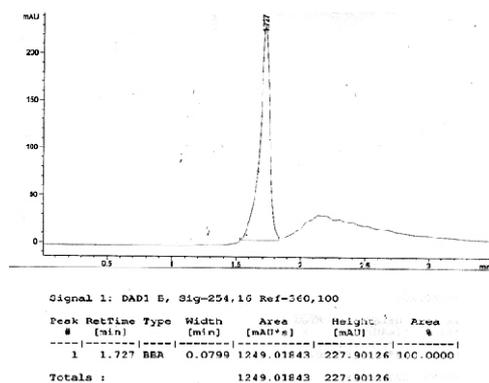


FIGURA 2.- Cromatograma obtenido mediante HPLC para la muestra BITC a tiempo

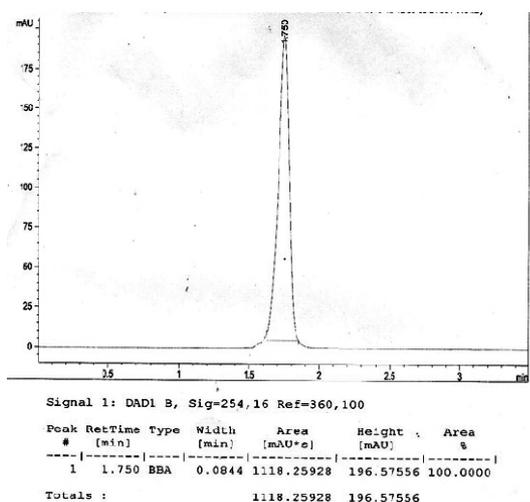


FIGURA 3.- Cromatograma obtenido mediante HPLC para el BITC 98% estándar (solución de referencia)

El cromatograma obtenido mediante HPLC, el estándar y la muestra inicial a tiempo 0, evidencian un pico cromatográfico bien definido y resuelto a un tiempo de retención de 1,7 correspondiente al ingrediente activo de interés (Fig. 2 y 3)

Espectro : BENCIL ISOTIOCIANATO (BITC)
 Descripción:
 Operario: YERENIA
 Creado: 25/10/2010 10:03:00 p.m.
 Espectrofotómetro: SPSA
 Número de serie: 164501
 Firmware: v8.00 v4.80

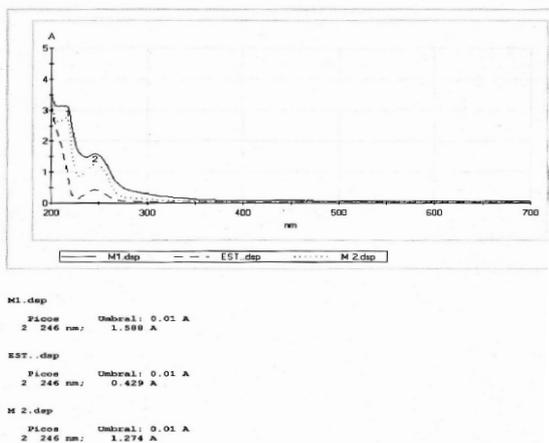


FIGURA 4. Identificación de BITC por Espectrofotómetro-UV

La longitud de onda para las dos muestras y el estándar de BITC es 246nm, con lo cual se evidencia la presencia de BITC en las muestras analizadas

Tabla 1.- Prueba de la actividad antibacteriana in vitro del BITC obtenido de Carica pubescens frente a Helicobacter pylori

Pruebas Realizadas	Réplicas	Diámetro (mm) de la zona de inhibición a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		5	10	20	40	60	100	
Cepa N°1	Rep. N° 1	No existe halo de inhibición				10	14	17
	Rep. N° 2	No existe halo de inhibición				11	13	18
	Rep. N° 3	No existe halo de inhibición				10	14	20
	Promedio	No existe halo de inhibición				10	14	18
Cepa N°2	Rep. N° 1	No existe halo de inhibición				8	10	15
	Rep. N° 2	No existe halo de inhibición				8	11	15
	Rep. N° 3	No existe halo de inhibición				7	10	14
	Promedio	No existe halo de inhibición				8	10	15
Cepa N°3	Rep. N° 1	No existe halo de inhibición				10	15	19
	Rep. N° 2	No existe halo de inhibición				10	14	18
	Rep. N° 3	No existe halo de inhibición				11	14	18
	Promedio	No existe halo de inhibición				10	14	18

TABLA 2.- Evaluación de la actividad antibiótica a diferentes concentraciones del BITC obtenido de Carica pubescens frente a Helicobacter pylori. (CMI)

Helicobacter pylori		CONCENTRACIONES BITC (µg/mL)													
		20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	CN	CP		
Cepa N° 1	R.1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	R.2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	R.3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	R.4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	PROMEDIO	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Cepa N°2	R.1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	R.2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	R.3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	R.4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	PROMEDIO	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	
Cepa N°3	R.1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R.2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R.3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R.4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	PROMEDIO	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CP: Control Positivo CN: Control Negativo
 (-): Sin Crecimiento Microbiano
 (+): Con Crecimiento Microbiano

La tabla 2 ilustra los resultados de la actividad antibacteriana a diferentes concentraciones del BITC, frente a las tres cepas de Helicobacter pylori aisladas, observándose rangos promedios de CMI del BITC entre 22 - 30µg/mL.

TABLA 3.- Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) del BITC obtenido de Carica pubescens, frente a las tres cepas de Helicobacter pylori

Helicobacter pylori	CMI DEL BITC(µg/mL)	CMB DEL BITC(µg/mL)
Cepa N°1	22	26
Cepa N° 2	30	34
Cepa N° 3	26	28
PROMEDIO	26	29

La tabla N° 03 muestra los promedios de Concentración Mínima inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) del BITC obtenido de las semillas de Carica pubescens frente a las tres cepas aisladas, evidenciándose que a una CMI promedio de 26 µg/ml se logró inhibir el crecimiento de las tres cepas y a 29 µg/ml tuvo efecto bactericida.

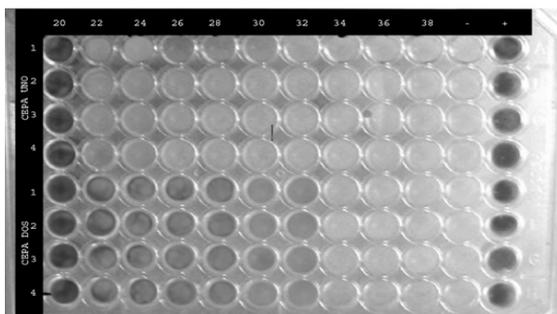


FIGURA 4 Método colorimétrico de dilución en microplacas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de BITC frente a *Helicobacter pylori*

Concentraciones: 20; 22; 24; 26; 28; 30; 32; 34; 36;
38µg/ml
(-): control sin cepa (+): control con cepa

Los Pozos color rojo indican la reducción del 2,3,5 Cloruro de trifetil tetrazolium a formazán por *Helicobacter pylori*. En los Pozos amarillos, no hay reducción del indicador lo que corresponde a una muerte del 99.9% de *Helicobacter pylori*. Los Pozos Rosa claro indican que existe una muerte del 50% del total de bacterias.

DISCUSIÓN

Para la obtención de Bencil isotiocianato se eligió trabajar con semillas de *Carica pubescens* madura porque la literatura reporta que hay mayor concentración de glucosinolatos en éstas en comparación con la pulpa, cáscara, hojas y látex (9, 12, 14,16).

La extracción de bencil isotiocianato se realizó con diclorometano, ya que el bencil isotiocianato resulta muy soluble en este solvente, además gracias a su bajo punto de ebullición no es necesario llevarlo a altas temperaturas evitando la descomposición de bencil isotiocianato. Además es necesario el uso de un buffer fosfato de sodio con pH 7, porque a este pH la hidrólisis de glucosinolatos por acción de la mirosinasa produce isotiocianatos(16).

Como se ha indicado, la identificación se ha realizado cuali y cuantitativamente con la finalidad de asegurar la presencia y el aislamiento del BITC. Fue necesario el uso del HPLC, técnica mediante la cual se evidenciaron los picos de la muestra en 1,72 min. y 1,75min. correspondientemente, la diferencia entre ambos es de 0,03 min que es menor al 5% según lo establecido por la USP como criterio de aceptación para la investigación de extractos vegetales, por lo que se toma como el mismo compuesto(12).

Según el método empleado se concluye que 30g de semillas contienen aproximadamente 300mg de BITC y en 100g hay 997mg, éste resultado se acerca al establecido por Duke, quien considera que la cantidad de BITC máximo para 100g de semilla de *Caricaceas* es 960mg18, ésta variación pudo deberse al método utilizado para la extracción de BITC y/o al tipo de papaya que se utilizó para la

realización de esta investigación. El porcentaje de BITC presente en cada semilla según el método realizado es 17,44%, con lo que se afirma que este resultado es bueno ya que lo reportando en la literatura es 1 a 37% de BITC por cada semilla en las *Caricaceas* (16).

Se aislaron tres cepas de *Helicobacter pylori* a partir de pacientes con diversas patologías gástricas que presentaban dispepsia como denominador común. Fue necesario tomar dos biopsias de antro para lograr el aislamiento de *Helicobacter pylori*. Se seleccionaron las biopsias positivas al Test de la Ureasa y se procesaron para el aislamiento de *Helicobacter pylori*(10).

Se observaron colonias pequeñas, transparentes y brillantes que presentaron positividad a las tres pruebas bioquímicas realizadas ureasa, oxidasa y catalasa (3), para luego ser vistas al microscopio, estableciendo que las tres cepas aisladas son cepas de *Helicobacter pylori*. La actividad anti-bacteriana del BITC frente a *Helicobacter pylori* fue establecida cuali y cuantitativamente3. Por el método de Kirby Bauer, se observó a partir de 40µg/mL la formación de halos. La cepa N°1 y N°3 presentaron un promedio de 10mm de diámetro de halo. La cepa N°2, un promedio de 8mm de diámetro, esta diferencia en los resultados podría deberse a que el paciente de quien fue aislada la cepa N°2 ya había iniciado un previo tratamiento de primera línea, al cual había

generado resistencia. Los otros dos pacientes recién fueron diagnosticados infección por *Helicobacter pylori*, por lo tanto recién iniciarían tratamiento farmacológico. Con estos resultados ya se puede inferir cualitativamente que el Bencil isotiocianato tiene efecto anti-helicobacter pylori.

Se determinó el PRI, promedio relativo inhibitorio, usando como control positivo a la amoxicilina3. El PRI del BITC a una concentración de 100µg/mL en relación a la amoxicilina 10µg es 52%, este porcentaje sólo indica la relación entre ambas sustancias antibióticas por la medida del diámetro del halo de inhibición, sin considerar las concentraciones. Por lo tanto se establece que la amoxicilina es 20 veces más potente que el BITC.

El resultado promedio de CMI para las tres cepas fue 26µg/mL. Para la CMB se obtuvo como promedio entre las tres cepas de 29µg/mL. Con este resultado se establece que el bencil isotiocianato tiene buena actividad antihelicobacter-pylori, tomando como base al estudio realizado por Fahey sobre la CMB de Isotiocianatos frente a *Helicobacter pylori*, donde indica que el rango de concentraciones de los isotiocianatos para eliminar más del 90% de *Helicobacter pylori* va desde 4 32µg/ml6, no superando al sulfurafano, quien continúa siendo el isotiocianato como mayor poder antibiótico frente a esa bacteria (8).

La información sobre mecanismo por el cual los Isotiocianatos producen efecto bacteriostático y bactericida aún es escasa. Pero hay autores que indican que inactivan varias enzimas intracelulares del patógeno, lo hacen por medio de la ruptura oxidativa de los puentes disulfuro presentes en las enzimas (2, 9). Por otro lado, bloquean la síntesis del ATP en las células bacterianas por medio de la acción desacopladora de la fosforilación oxidativa en mitocondria. Cabe mencionar,

la presencia de azufre en la estructura química de los isotiocianatos, el que podría ser el responsable del efecto antibiótico del bencil isotiocianato (2, 5).

Los datos obtenidos en esta investigación reflejan que el BITC obtenido de las semillas de *Carica pubescens* representa una buena alternativa natural para el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Sería conveniente realizar estudios de su actividad bactericida in vivo a fin determinar la efectividad, dosis y seguridad del BITC.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Boixeda D, Martín C, Gisbert JP. Patogenia de la infección por *Helicobacter Pylori* ¿Dónde está el límite? Barcelona: JR Prous SA, 1996; 35-47.
2. Bones M. Y Rossiter J. The Myrosinase - Glucosinolate System, Its Organisation and Biochemistry. *Physiologia Plantarum*, 1996; 97: 194 - 208.
3. Carhuapoma Yance, Mario. Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling "urqu muña. Tesis Doctoral en Farmacia. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, Lima, 2007.
4. EUROGAST Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 1994; 341: 1359-62.
5. Fahey, J.W. Talalay, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 2001; 56: 551.
6. Haristoy X, Fahey JW. Evaluation of the antimicrobial effects of several isothiocyanates on *Helicobacter pylori*. *Planta Med*. 2005 Apr; 71(4): 326-30.
7. Hildebert Wagner, Sabine Bladt, V. Rickl. *Plant Drug Analysis- A thin layer chromatography Atlas* 2009. Segunda edición. Pág 293-294
8. Jed W. Fahey y otros. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 May 28; 99(11): 7610-5.
9. Kamii E, Isshiki K. "Antimicrobial efficacy of benzyl isothiocyanate" *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2009 Dec; 50(6): 311-4.
10. Katy Yuliana Chillihua Dorado y otros "Aislamiento de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas de pacientes con gastritis en el hospital regional del Cusco, Perú" *SITUA - VOL. 13 N° 1*. Pág 15 -19.
11. López Brea M. y Col., Correa P, Skirrow MB, Marshall BJ. *Helicobacter Pylori*. Retos para el siglo XXI. Sep. 2004.
12. Nakamura Y, Yoshimoto M, Murata Y, Shimoishi Y, Asai Y, Park EY, Sato K, Nakamura Y. Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate. *J Agric Food Chem*. 2007 May 30; 55(11):4407-13.
13. Ramírez-Ramos, León-Barúa R, Gilman RH, et al. *Helicobacter pylori* and gastritis in Peruvian patients: relationship to socioeconomic level, age and sex. *Am J Gastroenterol* 1990; 85(7): 819-823.
14. Rolf Gmelin and Anders Kjær "Glucosinolates en *Caricaceae*" *Phytochemistry* 1970 March; 9(3): 591-593.
15. Steven F. Vaugh, Mark A. Berhow. Glucosinolate hydrolysis products: pH effects, isolation, and purification. *Industrial Crops* 2005; 21: 193-202.
16. Tang, C. -S., M. M. Syed, and R. A. Hamilton. Benzyl isothiocyanate in the *Caricaceae*. *Phytochemistry*. 1972; 11:2531-2533.
17. Xiang WU, Qing-hua Zhou, Ke Xu. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs?. *Acta Pharmacol Sin* 2009 May; 30 (5): 501512
18. www.raintreenutrition.com, Tropical Plant Database- Papaya [sede web]. Carson City: Raintreenutrition.com; 1996- [actualizada 3 de Marzo de 2010; acceso 18 Setiembre de 2010]. Disponible en : <http://www.raintreenutrition.com/papaya.htm>

CORRESPONDENCIA:

Lisbeth Yesenia Rodríguez Tanta
facs@principal.unjbg.edu.pe

Recibido: 03/05//2011

Aceptado: 01/06/2011