

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE *Curcuma longa* (Guisador), MEDIANTE EL MÉTODO
DE MACRODILUCIÓN FRENTE A *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR:

Bachiller: Jonás Roberto Velasco Chong.

Bachiller: Pedro Aldo Navarro Navarro.

ASESOR:

Med Ciruj. Charles Ocampo Falcón.

IQUITOS – PERÚ

2013

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE FARMACÍA Y BIOQUÍMICA

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO
DE *Curcuma longa* (Guisador), MEDIANTE EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN
FRENTE A *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*”

PÁGINA DE APROBACIÓN

Ing. Reyna Gladys Cárdenas de
Reátegui

PRESIDENTA

Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong.

MIEMBRO

Q.F. Luis Alberto Vílchez Alcalá.

MIEMBRO

Méd. Ciruj. Charles Ocampo Falcón.

ASESOR

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE *Curcuma longa* (Guisador), MEDIANTE EL
MÉTODO DE MACRODILUCIÓN FRENTE A *Staphylococcus aureus* Y
Escherichia coli”**

Bachiller: Jonás Roberto Velasco Chong.

Bachiller: Pedro Aldo Navarro Navarro.

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* (Guisador), mediante el método de macrodilución. La muestra fue recolectada en la comunidad Nina Rumi – Provincia de Maynas, Distrito de San Juan, Departamento de Loreto, Perú, y se identificó taxonómicamente en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) y fue depositada para su conservación en el laboratorio de fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Alimentaria de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). El screening fitoquímico del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* evidenció la mayor presencia de fenoles, principios amargos, mucílagos y sustancias triterpénicas; además contiene almidón y aceite esencial, para el estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico mediante el Método de macrodilución, se utilizó cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Los resultados de la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* fue de 16 mg/ml para *Escherichia coli* ATCC 25922 y 8 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, considerándose como inactivo y poco activo con respecto a estas bacterias.

Palabras claves: Guisador, *Curcuma longa*, Método de macrodilución, actividad antibacteriana; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

**“*In Vitro* ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE HIDROALCOHOLIC
EXTRACT OF *Curcuma longa* (Guisador), MACRODILUTION METHOD FOR
Staphylococcus aureus AND *Escherichia coli*”**

Bachiller: Jonás Roberto Velasco Chong.

Bachiller: Pedro Aldo Navarro Navarro.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antibacterial activity *in vitro* by the macrodilution method for hidroalcoholic extracts of *Curcuma longa* (Guisador). The sample was collected in Nina Rumi community, Loreto - Peru, the sample was identified taxonomically in the Amazonian Herbarium, National University of the Peruvian Amazon (UNAP), and was deposited for preservation in the laboratory phytochemical of the Faculty Pharmacy and biochemistry and in the laboratory of Food Engineering Pilot Plant located in the UNAP. The phytochemical screening of hidroalcoholic extracts rhizome of *Curcuma longa* evidenced the presence of phenols, Bitter beginnings, mucilages and triterpenes; Besides he contains starch and acetite esencial for the study of antibacterial activity *in vitro* by the macrodilution method for hidroalcoholic extracts was used *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922 bacteria. Aftermaths of the minimum inhibitory concentrati3n of extracto hidroalcoholic extracts rhizome *Curcuma longa* he went of 16 mg/ml in *Escherichia coli* ATCC 25922 and 8 mg/ml compared with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Considering inactive and few antibacterial activities Regarding these bacterias.

Key words: Guisador, *Curcuma longa*, macrodilution method; Antibacterial activity; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

DEDICATORIA

“A Dios sobre todas las cosas”

Por llenar nuestros corazones de fe y esperanza

Jonás Roberto Velasco Chong:

Dedico este trabajo a mis padres FLOEDECIT y ROLANDO por brindarme su paciencia y cariño en toda situación de mi vida y en el proceso de mi formación profesional, a mis hermanos CARLOS y ORLANDO para que sigan firmes y perseverantes en la obtención de sus éxitos personales y profesionales, a mis abuelos MARIA LUISA, CELIA y ROBERTO y en el cielo mi abuelo JONÁS quien me sigue iluminado en este largo trayecto.

Pedro Aldo Navarro Navarro:

A mi adorada mamá LITA porque siempre está a mi lado y me orienta en todo campo de mi vida profesional.

A mi papá PEDRO, por haber dedicado su juventud en educarme y no descansar hasta verme convertido en un profesional.

A mis hermanos RONALD y KARINA, por compartir risas y llantos conmigo.

AGRADECIMIENTOS

“Que es indispensable para lograr el éxito?.....

.....PERSEVERAR”

Dedicamos este apartado especialmente a todas aquellas personas que de una u otra forma estuvieron compartiendo con nosotros, tanto en el ámbito profesional como en el personal, conocimientos, consejos, apoyo, experiencias, anécdotas e intercambios de opinión.

A todas esas personas con las que hemos compartido el día a día, como aquellas personas más queridas con las que no hemos podido compartir tan de cerca tantos meses cargados de esfuerzo y vivencias, porque están lejos o bien porque ya no están: A todos ellos muchas gracias.

La culminación de esta presente tesis no habría sido posible sin la ayuda de las siguientes personas:

- Al Dr. Charles Ocampo Fálcon, Asesor del proyecto de Tesis, por haber dedicado una importante parte de su tiempo en compartir sus conocimientos, durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.
- A la Dra. Blanca Díaz Bardales, por habernos apoyado de manera desinteresada en la búsqueda de información y en la parte microbiológica durante el desarrollo de la tesis.
- Al Ing. Julio Arce Hidalgo, por la información brindada en la recopilación de información y su gran apoyo en el trabajo de investigación.
- Al QF. Carlos Calloapaza Valladares, por sus consejos y apoyo en el desarrollo del trabajo.
- Al personal de trabajo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por su gran apoyo en brindarnos las instalaciones para hacer posible la realización de este trabajo de tesis.

Nuestro trabajo ha tenido el apoyo de muchas personas cuyos consejos y apoyo fueron decisivos a lo largo de estos meses y con todas ellas estamos en deuda. A nuestros amigos, por la ayuda ofrecida en la realización de los análisis bacteriológicos, fitoquímicos; por sus amistad y compañerismo.

A todas aquellas personas que de una y otra forma colaboraron en la realización de la presente tesis.

....Muchas gracias!!

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN	12
1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	14
1.2.1. Descripción del problema	14
1.2.2. Formulación del problema	17
1.3. OBJETIVOS	18
1.3.1. General	18
1.3.2. Específicos	18

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO	20
2.1.1. <i>Curcuma longa</i> L. (GUISADOR)	20
2.1.1.1. Clasificación taxonómica	20
2.1.1.2. Descripción botánica	20
2.1.1.3. Componentes químicos	21
2.1.1.4. Uso tradicional	23
2.1.1.5. Antecedentes	25

2.1.2. Características de las cepas en estudio	35
2.1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.1.2.2. <i>Escherichia coli</i>	46
2.1.2.3. Resistencia y Uso de antimicrobianos de Origen Vegetal.	52
2.1.3. Método de macrodilución.	54
2.1.4. Sensibilidad bacteriana a los antibióticos	55
2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES	57
2.2.1. Variable independiente	57
2.2.2. Variable dependiente	57
2.3. HIPÓTESIS	59
 <u>CAPÍTULO III</u> 	
3.1. MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	61
3.1.1. Método de investigación	61
3.1.2. Diseño de investigación	61
3.1.3. Flujograma de investigación	63
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	64
3.3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES	65
3.4. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	69
3.4.1. Procedimiento para la recolección del extracto vegetal	69
3.4.1.1. Recolección e identificación de la muestra vegetal	69
3.4.1.2. Molienda de la muestra vegetal	69

3.4.1.3. Obtención del extracto hidroalcohólico.	69
3.4.2. Procedimiento de los ensayos de actividad antibacteriana	71
3.4.2.1. Recuperación de cultivos conservados	71
3.4.2.1.1. Congelados.	71
3.4.2.1.2. Reactivación de bacterias.	71
3.4.2.1.3. Cultivo en agar.	71
3.4.2.1.4. Preparación del inóculo.	72
3.4.2.2. Determinación del CIM por método de macrodilución	73
3.4.2.2.1. Preparación de diluciones	73
3.4.2.2.2. Incubación.	75
3.4.2.2.3. Lectura de los resultados.	76
3.5. ANÁLISIS DE DATOS	77
3.6. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS Y DE LOS ANIMALES	78

CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS	
4.1.1. Tamizaje fitoquímico de la muestra vegetal	80
4.1.2. Resultados antibacterianos <i>in vitro</i> por el método de Macrodilución	81
4.2. DISCUSIÓN	83

4.3. CONCLUSIONES	90
4.4. RECOMENDACIONES	91
4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
4.6. ANEXOS	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Valores de referencia de sensibilidad a distintos antibióticos.	56
Tabla N°2: Operacionalización de variables	58
Tabla N°3: Clasificación de la actividad antimicrobiana según la Concentración inhibitoria mínima (CIM)	76
Tabla N°4: Tamizaje fitoquímico del extracto <i>Curcuma longa</i> "Guisador"	80
Tabla N° 5: Resultados obtenidos en el ensayo de concentración inhibitoria mínima del extracto hidroalcohólico de <i>Curcuma longa</i> "Guisador".	81
Tabla N° 6: Distribución de los grupos de trabajo por el método de macrodilución.	125
Tabla N° 7: Distribución de grupo de control positivo por el método de macrodilución.	126

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Concentración Mínima inhibitoria para <i>E. coli</i>	81
Gráfico N° 2: Concentración Mínima inhibitoria para <i>S. aureus</i>	82

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema N° 1: Flujograma de investigación	63
Esquema N° 2: Obtención del extracto hidroalcohólico del rizoma de <i>curcuma longa</i> (guisador)	70
Esquema N° 3: Procedimiento del método de macrodilución	74
Esquema N° 4: Procedimiento del Control positivo por macrodilución	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Principales curcuminoides presentes en la <i>Curcuma longa</i>	22
Figura N° 2: Especie bacteriológica de <i>Staphylococcus aureus</i> .	107
Figura N° 3: Especie bacteriológica de <i>Escherichia coli</i> .	107

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen N°1: Ubicación geográfica de la Zona Campesina de Nina Rumi.	104
---	-----

ÍNDICE DE FOTOS

Foto N° 01: Rizomas de <i>Curcuma longa</i>	113
Foto N° 02: Maceración del extracto hidroalcohólico	113
Foto N° 03: Proceso de extracción hidroalcohólica de los rizomas.	114
Foto N° 04: Obtención del extracto hidroalcohólico de los rizomas	114
Foto N° 05: Secado del extracto hidroalcohólico de los rizomas	115
Foto N° 06: Descongelamiento a T° ambiente de las cepas bacterianas	116
Foto N° 07: Reactivación de bacterias	116

Foto N° 08: Sembrío de las bacterias en forma de estrías	117
Foto N° 09: Preparación del inóculo bacteriano	118
Foto N° 10: Comparación de la turbidez con la escala de Mac Farland.	118
Foto N° 11: Preparación de suspensión bacteriana.	119
Foto N° 12: Solución madre del extracto vegetal	120
Foto N° 13: Aplicación a los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana	120
Foto N° 14: Volumen final mínimo en cada tubo fue de 2 ml	121
Foto N° 15: Control positivo empleado fue la ampolla gentamicina	122
Foto N° 16: Solución madre de la Ampolla de gentamicina	122
Foto N° 17: concentraciones comprendidas entre 512 µg/ml a 2 µg/ml.	123
Foto N° 18: Resultados del tamizaje	128
Foto N° 19: CIM de <i>Staphylococcus aureus</i> en 8mg/ml	129
Foto N° 20: CIM de <i>Escherichia coli</i> en 16 mg/ml	129
Foto N° 21: CIM del Control Positivo (Gentamicina).	130
Foto N° 22: Especie botánica <i>Curcuma longa</i> .	106

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas medicinales han sido utilizadas desde épocas primitivas en el tratamiento de enfermedades. Durante mucho tiempo los fármacos naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de especies vegetales con propiedades medicinales y se ampliara la investigación de los productos que de ella se extraen. ¹

La búsqueda cada vez más intensa de nuevas sustancias farmacológicamente útiles motiva a los científicos no sólo a sintetizar miles de nuevos compuestos, sino también a estudiar con más profundidad numerosas sustancias naturales, específicamente las obtenidas de plantas.^{2, 3} Con un enfoque naturista, las enfermedades infecciosas se pueden interpretar como crisis que desequilibran el estado de salud. La mayoría de las veces las crisis infecciosas se resuelven con rapidez, en días o semanas. Son pocas las ocasiones en que los microbios se comportan como gérmenes patógenos, con capacidad de producir enfermedades graves o persistentes en personas sanas. ⁴

Staphylococcus aureus, la más virulenta de las muy diversas especies de estafilococos, ha demostrado su versatilidad al seguir siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad a pesar de contarse con innumerables antibióticos antiestafilocócicos eficaces para combatirlo, origina la enfermedad por mecanismos tanto mediados como no mediados por toxinas. Este microorganismo origina infecciones nosocomiales y de origen comunitario que varían desde procesos relativamente menores de la piel y partes blandas hasta trastornos generalizados que pueden ser mortales. ⁵

Los rasgos de virulencia de *Escherichia coli* patógena intestinal difieren de los de *Escherichia coli* patógena extraintestinal y de otras GNB que producen enfermedades fuera del intestino. Esta diferencia refleja diversas diferencias en el ambiente del hospedador y de los mecanismos de defensa, que dependen de la ubicación. ⁶

La resistencia antimicrobiana es un problema de salud en creciente y de gran complejidad, que afecta a todos los individuos y poblaciones alrededor del mundo. Este problema también afecta al Perú siendo unas de las causas relevantes el mal uso y abuso de los antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales, comunidades, con los animales, en la agricultura que adicionan a las fuerzas del ambiente, a seleccionar y mantener cepas de bacterias resistentes.^{7, 8}

Inicialmente el problema fue resuelto con el descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias que eran capaces de controlar las bacterias con este fenómeno, y aparecen medicamentos como los aminoglucósidos, macrólidos, glicopéptidos, entre otros. Sin embargo, esto no es suficiente y cada vez aparecen nuevos mecanismos que son difíciles de controlar por estos medicamentos. Nuestra Amazonía Peruana constituye una de las más grandes dispensas y reservas de recursos terapéuticos utilizados por pobladores nativos y migrantes de la región formando parte de la medicina popular y herboristería actual.⁹

En nuestra Amazonía, la comunidad de Nina Rumi, cuenta con una identificación de un número de 79 plantas de uso medicinal, correspondiendo a 44 familias de índole diverso en la medicina tradicional.¹⁰ El extracto de los rizomas lo usan en el tratamiento de la hepatitis, enfermedades infecciones, cólicos, dolor de muela, analgésico y antiguamente en el tratamiento del Pián (cuchi o frambesia), una enfermedad infecciosa, contagiosa (no venérea).²¹

Teniendo en cuenta que el régimen de enfermedades infecciosas producidas por estas bacterias antes mencionadas presenta un alto grado de incidencia en la Región Amazónica, para lo cual nos planteamos realizar el presente estudio de investigación esperando confirmar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico del rizoma del Guisador (*Curcuma longa*), por tal motivo los resultados que obtendremos nos permitirán contar con la información científica validada, pudiendo utilizarse como una alternativa terapéutica, económica y eficaz para el tratamiento de las enfermedades producidas por las bacterias mencionadas anteriormente.

1.2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

1.2.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA:

La resistencia antibacteriana es un problema de carácter mundial que afecta a todos los grupos poblacionales, especialmente a los niños. El uso irracional de los antibióticos ha derivado en la emergencia y diseminación de microorganismos que son resistentes a drogas de primera línea, baratos y efectivos. Las principales enfermedades donde se expresa esto es en la enfermedad diarreica, infección del tracto respiratorio, meningitis, infecciones de transmisión sexual y las infecciones adquiridas en el hospital. Se estima que el consumo anual de antibióticos a nivel mundial es de 100 a 200 x 10⁶ kg.

A su vez, las tres cuartas partes de este consumo de antibacterianos en la comunidad está destinado al manejo de las infecciones respiratorias agudas, el 80% de las cuales son bronquitis, faringitis, laringitis y amigdalitis, enfermedades frecuentes en la infancia, que en su mayoría tienen un origen viral y por tanto no requieren antibióticos. Esto denota que el grupo poblacional más expuesto a la presión selectiva por el uso de antimicrobianos son los niños.¹¹

El aumento de la disponibilidad de agentes antibacterianos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en hospitales y en la comunidad produjo la aparición de resistencia de éstos patógenos a los antibacterianos, lo que constituye una preocupación para la salud pública, especialmente en los países menos desarrollados, debido a que existen menos opciones económicas y apropiadas de tratamiento. Así mismo, la pérdida de eficacia de ciertos tratamientos por causa de la resistencia de los antibacterianos aumenta el sufrimiento humano, contribuye a la pérdida de productividad y, a menudo, a la mortalidad.¹²

A nivel mundial el 70% de bacterias responsables de las infecciones nosocomiales son resistentes al menos a uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas. En el 2005 se reportó en los Estados Unidos a nivel de los centros hospitalarios, una incidencia de resistencia

bacteriana del 3% por parte de enterobacterias productoras de Beta-lactamasa de espectro extendido (BLEEs), como *Escherichia coli* y en comparación con Latinoamérica de un 9% - 62%. En Europa las bacterias Meticilino-resistentes como *Staphylococcus aureus* mostraron un 42% de resistencia en pacientes de UCI y 27% en pacientes de otras áreas de hospitalización, en comparación con los reportes de resistencia bacteriana en Latinoamérica del 35% y Estados Unidos 25%-51%.¹³

En el 2007 el Reino Unido reportó a *Escherichia coli* como la más frecuente en causar infecciones urinarias e intestinales presentando una resistencia a cefalosporinas de tercera generación en un 12%, comparado con un 2% observado en el año 2000. La resistencia a fluoroquinolonas en *Escherichia coli* se incrementó de 5% a 23% en el año 2007 y en el 2009 las Unidades de Cuidados Intensivos reportaron una incidencia de *Escherichia coli* a ceftazidima de 11% y a ciprofloxacino 23%.¹⁴

Staphylococcus aureus es una bacteria capaz de sobrevivir en condiciones adversas.⁷ Se ha reportado que *Staphylococcus aureus* es responsable del 32 al 47% de las infecciones de piel y tejido celular subcutáneo, su importancia radica en la extraordinaria capacidad para desarrollar resistencia a los antibacterianos y el potencial de causar Infecciones que pueden llegar a ser letales⁸. Posteriormente surgieron nuevas drogas antimicrobianas como la vancomicina y la teicoplanina, describiéndose ya para el año 1997 resistencia intermedia a vancomicina y para el 2000, alto nivel de resistencia a éste antibiótico.⁹ En el año 2008 se presentó resistencia de *Staphylococcus aureus* a oxacilina en un 37,5%.¹⁴ La situación hoy en día representa un problema de salud pública, tanto por el aumento de los costos del tratamiento como por el grado de las complicaciones infecciosas.⁹

En el Perú, la resistencia a antimicrobianos en diferentes regiones, en donde se utilizaron antibióticos como ampicilina, cotrimoxazol, cloramfenicol, ácido nalidíxico, nitrofurantoína, cefotaxima y gentamicina indican un 50 % mayor de resistencia de *Escherichia coli*. Así mismo, a mediados del año 2002 se reportó mediante la vigilancia de la resistencia antimicrobiana a 5 hospitales de

la ciudad de Lima, dando como resultado perfiles porcentuales de resistencia antimicrobiana a bacterias de origen hospitalario como *Staphylococcus aureus* resistente a penicilina 100%, gentamicina 60%, eritromicina 57%; *Escherichia coli* resistente a ampicilina 78%, ciprofloxacino 67%, gentamicina 32%.^{11, 15}

En la región de Loreto las enfermedades más frecuentes son las parasitosis e infecciones bacterianas. Actualmente, uno de los problemas que enfrentan los tratamientos médicos es la resistencia bacteriana, ocasionada por el uso indiscriminado de antibióticos, se reportaron datos de diferentes aislamientos bacterianos con una frecuencia del 3.9%, siendo *Escherichia coli* la bacteria más frecuente en nuestra localidad debido a los casos de diarrea que se presentan, indicándose según el tratamiento una resistencia en más del 50% para ampicilina y cotrimoxazol.¹⁴ La proporción de resistencia del *Staphylococcus aureus* a la oxacilina es del orden del 71.7% en pacientes hospitalizados. Niveles altos de resistencia también se observan a la eritromicina (73.1%) y gentamicina (67.4%).¹⁶

La especie *Curcuma longa* Linn, familia de la Zingiberaceae, posee innumerables estudios fármaco-toxicológicos a nivel internacional, pero aún las bases de datos y sistemas informativos están poco documentados al respecto. Con las nuevas investigaciones que existen sobre esta planta, se crean grandes posibilidades de obtener fitofármacos con acción antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antibacteriana, entre otras, con menor potencial de efectos adversos.¹⁶

Nuestra Amazonía Peruana constituye una de las más grandes dispensas y reservas de recursos terapéuticos.⁸ Los indígenas de la Amazonía y distribuidas en sus comunidades utilizan la especie *Curcuma longa* para el tratamiento de la malaria, hepatitis, infecciones diarreicas y heridas de la piel.¹⁷ En la Región Loreto existe escaso estudio científico referente al estudio antibacteriano de plantas medicinales, y no se ha reportado estudios la especie vegetal *Curcuma longa* (Guisador), en lo referente a su acción antibacteriana, por lo que nos planteamos el siguiente problema de investigación.

1.2.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Presentará actividad antibacteriana *in vitro* el extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* (Guisador), mediante el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. GENERAL:

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* (Guisador), mediante el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.3.2. ESPECÍFICOS:

- Evaluar y determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) del extracto hidroalcohólico de *curcuma longa* (Guisador), mediante el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar y determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) del extracto hidroalcohólico de *curcuma longa* (Guisador), mediante el método de macrodilución frente a *Escherichia coli*.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO.

2.1.1. *Curcuma longa* L. “Guisador”

2.1.1.1. Clasificación Taxonómica: ¹⁸

Reino	:	PLANTAE
División	:	MAGNOLIOPHYTA
Clase	:	LILIOPSIDA
Subclase	:	ZINGIBERIDAE
Orden	:	ZINGIBERALES
Familia	:	ZINGIBERACEAE
Género	:	Cúrcuma
Especie	:	<i>Curcuma longa</i> L.
Origen	:	ASIA TROPICAL.

NOMBRE VULGAR: Se conoce también como: azafrán de la India, rizoma de curcuma, raíz de cúrcuma, turmeric, azafrán cimarrón; yuquilla (Cuba), turmérico, jengibrillo (Puerto Rico), palillo cholón, palillo chuncho, guisador, azafrán (Perú). ¹⁹

2.1.1.2. Descripción botánica:

Curcuma longa Linneo, pertenece a la familia de las zingiberáceas, tiene unos rizomas subterráneos que son los que desde hace siglos se emplean como condimento, tinte y estimulante medicinal. ²⁰

Es una planta herbácea vivaz, también es considerada como una hierba incluida dentro de las denominadas especies aromáticas por contener aceites volátiles en las hojas y rizomas, posee hojas alternas oblongas o elípticas de 30-50 cm de largo, venación pinnada, brácteas ovoides verde pálidos, espigas cilíndricas, flores amarillas pálidas, cáliz tubular corola 2-3 veces mayor, ovario villosa. Tallo subterráneo formado por dos tipos de rizomas, el central conocido como bulbo y los brotes de color naranja amarillento,

coloración dada por el ácido turmérico. Flores bisexuales con 3 sépalos, 3 pétalos imbricados, un estambre con granos de polen monosulcados, ovario ínfero con placentación axilar. El fruto es una cápsula con semillas ariladas donde se halla presente endosperma y perisperma; se reproduce a través de los rizomas. El rizoma es cilíndrico su diámetro oscila entre 1.5 – 2.5 cm.⁸⁶

Se le conoce como “Azafrán de la India”, siendo el principal productor mundial la India (80%), existiendo cultivos en Países tropicales de Asia y América.²³

Distribución Geográfica.

Proviene del Asia pero se ha expandido a Latinoamérica donde es apreciado por su uso en el arte culinario y medicinal. Se ha naturalizado en la Amazonía creciendo semi-silvestre en selva alta y baja respectivamente.

En selva alta crece con mayor profusión debido a la fertilidad del suelo, los rizomas son más grandes y poseen mayor contenido de ácido turmérico. En la selva baja crece en terrenos arcillo-limosos (playas) que fueron abonadas durante la etapa de creciente del río, dejando habilitado el terreno durante la vaciante.⁸⁶

2.1.1.3. Componentes químicos y actividad biológica:

Rica en almidón (40 – 55%), contienen un aceite esencial (3-6%) con sesquiterpenos monocíclicos, siendo los componentes más abundantes e importantes el zingibereno y derivados oxigenados, como la S-(+)- ar-turmerona y otros.²³

Curcuma longa L. contiene aceites esenciales en forma de:

- a) Monoterpenos tales como: 1.8- Cineol, a dosis de 87 n1/ml es acaricida, es anestésico, antihelmíntico, anticitarral, antireumático, antiséptico, candidicida, colerético, miorelajante, tricomonocida.
- b) α - pineno: tiene propiedades anti-acné, antibacterial, antiestafilococico, como preventivo de cáncer.
- c) α -terpineol: anti-acné, anti cancerígeno, bactericida y cicatrizante.

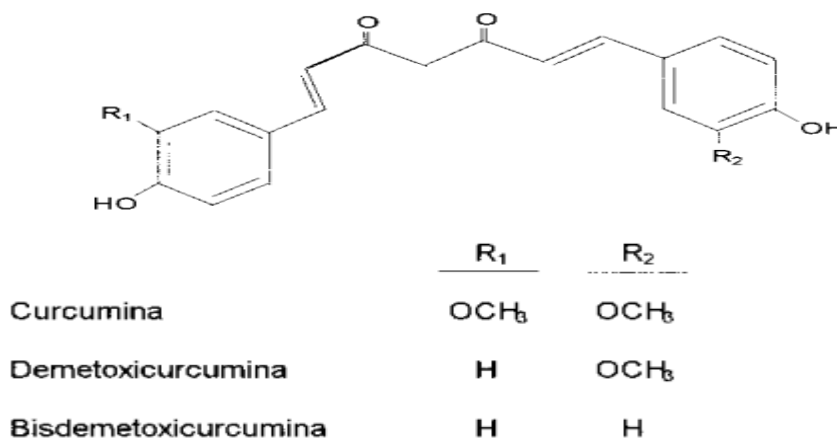
- d) β -pineno: antiinflamatorio, antiséptico, antiespasmódico, candidicida.
- e) Borneol: monoterpeno bicíclico, antibacterial, antibronquítico, hepatoprotector.
- f) Cariofileno: analgésico, anti-acné, anticancerígeno, anti-leishmaniasico, antiespasmódico.
- g) Curcumerol: anti-tumoral, anti-cáncer.
- h) Sustancias fenólicas: Ácido cinámico. Se halla en el rizoma, es antibacterial, antiinflamatorio, preventivo de cáncer. ²¹

Además de los ya citados según Evans-Trease, se puede hallar los curcuminoides dicafeilmetano y cafeilferuloilmetano y aceites esenciales sesquiterpenos tales como: zingibereno. ⁸⁸ Esta especie contiene, proteína, principios amargos D-Sabineno, terpenos, turmerona, xineol, zingiberonas y resinas. ⁸⁷

Los principales colorantes son curcuminoides, compuestos relacionados con diarilheptano, en cantidad variable (3-5%) pero que pueden alcanzar hasta el 8 %, siendo el compuesto mayoritario (hasta el 60%) la curcumina que es el principal constituyente activo (diferuloilmetano), acompañada de monodemetoxicurcumina, bisdemetoxicurcumina y dihidrocurcumina. ^{23, 24}

Representación Figura N° 1.

FIGURA 1: Principales curcuminoides presentes en la *Curcuma longa*.



2.1.1.4. Uso tradicional.

En la Amazonía peruana además de su uso como condimento el extracto de los rizomas se usa en el tratamiento de la hepatitis, infecciones, cólicos, dolor de muela, analgésico y antiguamente en el tratamiento del Pián (cuchiye o frambesia proveniente del África occidental y que se difundió en la Amazonía), una enfermedad infecciosa, contagiosa y crónica (no venérea) que forma en la piel una pápula o una ulceración rosada, seguida de una erupción papulomatosa, seguido de adenopatías, dolor de cabeza y extremidades, fiebre moderada, causado por el *Treponema pertenue*.

En el estadio terciario se presentan modificaciones destructivas en la piel y en el sistema esquelético con una evolución parecida a la sífilis, antiguamente se trataba médicamente con salvarsán, un fármaco con efectos secundarios nocivos. En la actualidad solo se observa raramente esta enfermedad en aves de corral.²¹

Actualmente esta planta es muy usada por la población como antiinflamatorio (para tratar a pacientes con afecciones reumáticas, por su constituyente principal que es la curcumina), como antioxidante (los rizomas frescos, por los componentes de su aceite esencial y la oleoresina). En la medicina tradicional asiática se emplea para mejorar la indigestión por comidas grasosas y mejorar los problemas de úlceras gastroduodenales; también es de aplicación tópica para los que presentan úlceras en la piel, escabiosis, antiespasmódico, antimicrobiano, antimicótico (tiña), antitrombótico, Anticonceptivo, hipoglucemiante, hepatoprotector, cardioprotector frente a la doxorubicina, es estimulante del apetito y de la lactancia. Es útil, además, para tratar a pacientes con enfermedad de Alzheimer, hipertensión arterial, epilepsia, hepatitis, asma bronquial, fibrosis quística, cálculo renal, catarata, lepra y esclerodermia; reduce edemas, hematomas y aumenta el número/motilidad de espermatozoides.²⁵

También a esta planta se le aplica en otros usos como colorante de curcumina que es empleado en la industria alimentaria, así como en la fabricación de cosméticos, pinturas, ceras para trabajo de artesanía y en raciones alimenticias para aves.²⁶

Formas de uso:

Síntoma/malestar/enfermedad	Forma de Uso:
Cicatrizante	Aplicar los rizomas triturados.
Hepatoprotector	Tomar el cocimiento de los rizomas con sal.
Hepatitis infecciosa	Tomar el jugo de los rizomas.
Herpes (Riwi)	Aplicar los rizomas rallados en forma de emplastos.
Reumatismo	Aplicar los rizomas rallados en forma de emplastos.

Se prepara la infusión sumergiendo de 1 a 1,5 gramos de raíces secas en 150 ml de agua, durante 15 minutos (tomarla 2 veces al día), indicado para tratar problemas del hígado y riñón.²² Previene el envejecimiento prematuro y muchas enfermedades degenerativas (diabetes mellitus, cáncer, etc.), lo que está relacionado con su propiedad antioxidante, con marcada incidencia en los órganos de la parte inferior: útero, próstata. En forma tópica, se utiliza formando una pasta para verrugas, callos.²⁷

2.1.1.5. Antecedentes.

2.1.1.5.1. Estudios Antimicrobianos.

Ramani et al. (2012). Determinaron la actividad antibacteriana de plantas como: *Azadirichta indica*, *Mangifera indica*, *Curcuma longa*, *Cinnamomum verum*, *Musa paradisiaca*, *Capsicum annum*, siendo popularmente utilizados en muchos remedios caseros por los últimos siglos. Las partes de estas plantas tomadas para el estudio fueron las hojas, cáscaras, tallos y frutos, contra bacterias como *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*. En los extractos se encontraron taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas, fenoles, almidón, glucósidos generales y principios amargos. Por lo que se establece que la actividad de las plantas se debe a la presencia de taninos, flavonoides y alcaloides. Utilizando el método de difusión en agar el extracto metanólico de la *Curcuma longa* mostró actividad antibacteriana máxima en zona de inhibición de 25mm frente a *Escherichia coli* y 35 mm contra *Micrococcus luteus*. El resto de plantas mostró actividad antibacteriana mínima.²⁸

Falco et al. (2011). Evaluaron la capacidad antibacteriana y antifúngica de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y de los rizomas de cúrcuma (*Curcuma longa*) frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces sake* y *Aspergillus oryzae*, mediante el método de contacto en tubos. Concluyendo según los resultados obtenidos, que el extracto hidroalcohólico de cúrcuma mostró actividad contra *Escherichia coli* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1,55 mg/ml de extracto y para *Staphylococcus aureus* 0,75 mg/ml de extracto. Para *Saccharomyces sake* los extractos de cúrcuma presentaron actividad fungistática y para *Aspergillus oryzae* se inhibió con la concentración de 5,65 y 3,11 mg /ml. El extracto hidroalcohólico de limoncillo no presentó actividad antimicrobiana.²⁹

Pratap et al (2011). Evaluaron la actividad antimicrobiana del contenido de aceite volátil y curcuminoides totales extraídos del rizoma de la *Curcuma longa*, contra las bacterias médicamente importantes: *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*. Dos especies de hongos fueron seleccionadas: *Aspergillus Níger* y *Candida albicans*. Se utilizó Kanamicina como droga estándar para la actividad antibacteriana y Fluconazol como estándar para la actividad antifúngica. Concluyendo que los curcuminoides mostraron una elevada actividad antibacteriana así como también antifúngica contra todas las tensiones de microorganismos en comparación con el aceite volátil extraído de la cúrcuma.³⁰

Kiran et al. (2011). Realizaron la evaluación *in vitro* de seis aceites esenciales extraídos de las hojas, tallos y rizomas de plantas como: *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Curcuma longa*, *Capsicum annum* y *Cassia fistula* que se ensayaron contra diez especies de hongos como la *Pyricularia oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Alternaria alternata*, *Tricoconis padwickii*, *Drechslera tetramera*, *Drechslera halodes*, *Curvularia lunata*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum* *F. solani* y cinco bacterias patógenas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae* y *Streptococcus pneumoniae* en 500,1000,1500 y 2000 ppm de concentración entre los seis aceites esenciales. *Allium sativum* registró una inhibición completa en ocho hongos en comparación con el control. *Allium sativum* es seguida de *Coriandrum sativum*, *Cuminum cyminum*, *Curcuma longa*, de las plantas que presentaron actividad. Ninguna actividad significativa de *Capsicum annum* y *Cassia fistula* contra todos los hongos de ensayo. En el ensayo antibacteriano, *A. sativum* registró una inhibición máxima de todas las bacterias de prueba en el intervalo de 10.9 mm a 36.9, seguido de *C. longa* de 5.6 – 25.6 mm, *C. cyminum* de 10.9 – 30.2 mm. Al menos se observó inhibición en *Capsicum annum* y ninguna actividad antibacteriana se observó en *C. fistula*.³¹

Aslam et al. (2010). Evaluaron la actividad antibacteriana del contenido de aceite esencial y de curcuminoides totales extraídos de los rizomas de la *Curcuma asiática* “*Curcuma longa*” contra 4 tensiones bacterianas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus macerans*, *Bacillus licheniformis* y *Azotobacter*, utilizando el método de difusión en agar y de macrodilución. Como solventes para la extracción de curcuminoides se utilizó el metanol y etanol. El aceite esencial fue extraído por hidrodestilación y diluido en metanol por el método de macrodilución. El valor de la actividad antibacteriana según los resultados fueron de 20 mm y 18 mg/ml, los curcuminoides y el aceite esencial mostraron una total inhibición contra todas las tensiones probadas de bacterias. Entre todas las tensiones bacterianas *Bacillus subtilis* era el más sensible a los extractos de cúrcuma (curcuminoides) y al aceite esencial.³²

Lawhavit et al. (2010). Evaluaron el extracto del rizoma de *Curcuma longa* en etanol y hexano y de los curcuminoides para su efecto inhibitorio contra 24 tensiones de bacterias patógenas aisladas de camarón y pollo. El extracto de cúrcuma del etanol y hexano presentó efectos inhibitorios en contra de trece bacterias patógenas: *Vibrio harveyi*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermidis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Edwardsiella tarda*. Los curcuminoides demostraron un efecto inhibitorio en contra de ocho bacterias: *Bacillus cereus*, *Aeromona hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermidis*, *Bacillus subtilis*, *Edwardsiella tarda*. A concentraciones de 2.5-50 mg/ml solo inhibe *Staphylococcus aureus*. Los resultados concluyeron que el extracto de cúrcuma del etanol tiene un alto potencial inhibitorio para las bacterias patógenas de camarón y pollo en mayor grado que el extracto del hexano y de curcuminoides.³³

Pranay et al (2010). En este estudio determinaron la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de las hojas de *Mentha arvensis* (menta), *Piper nigrum* (pimienta Negra), *Azadirachta indica* (Neem), *Curcuma longa* (cúrcuma) y *Zingiber officinale* (jengibre), que fueron evaluadas contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. La máxima actividad antibacteriana se mostró por parte del extracto acuoso de *Zingiber officinale* seguido de *Curcuma longa* y *Azadirachta indica*. Sin embargo, el extracto acuoso de *Piper nigrum* fue eficaz sólo contra *B. subtilis* y *Mentha arvensis* no mostró ninguna actividad contra los organismos de prueba.³⁴

Sangvanich et al. (2010). Determinaron la actividad antifúngica y antibacteriana del extracto acuoso del rizoma de *Curcuma longa* proveniente del estado asiático de la India, por lo que a una concentración de 47 y 94 mg/0.3 cm² de disco mostró actividad antifúngica contra *Turicicum exserohilum*, *Fusarium oxysporum*, *Cassicola colectrotrichum* y *Candida albicans*. La concentración inhibitoria mínima de la actividad antibacteriana fue de 0.002, 0.005, 0.011, 0.09, y 0.046mg /ml para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.³⁵

Choi et al. (2009). Evaluaron la actividad antimicrobiana del rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa* L.) en extracto metanólico y sus fracciones en hexano, cloroformo, acetato de etilo, butanol y agua. La actividad antimicrobiana de cinco fracciones en crudo se examinó usando disco de papel impregnado de difusión en agar, por lo que la fracción de acetato de etilo mostró el mayor efecto inhibitor sobre los microorganismos tales como *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* en 1.000 ug /disco. La fracción de acetato de etilo se trabajó adicionalmente en columna de sílica gel de cromatografía en capa fina (TLC). El compuesto antimicrobiano fue aislado de sus fracciones y su estructura química se identificó como un 2,3-dihidrobenzofuran por GC-MS y RMN-H.³⁶

Obire et al. (2009). Determinaron el efecto inhibitorio antimicrobiano de los extractos acuosos y etanólicos de rizomas de las plantas como *Zingiber officinale* Rosc, *Curcuma longa* L. y *Dioscorea bulbifera* L. frente a bacterias patógenas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Se utilizó el método de dilución en caldo de ensayo antimicrobiano y el tamizaje fitoquímico de las plantas se llevó a cabo utilizando diferentes métodos estándar. El extracto etanólico demostró ser más potente que el extracto acuoso. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de etanólico varió entre 0.5 - 1.0 mg/ml en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Para el extracto acuoso, la MIC fue de 1,0 mg / ml en *E. coli* y osciló entre 0.5-1.0 mg / ml en *S. aureus* y *C. albicans*. El disolvente utilizado para la extracción varió significativamente ($P < 0,05$) a los tres microorganismos de prueba. *Staphylococcus aureus* fue más susceptible al extracto. En total, la concentración de 1,5 mg/ml dio la inhibición máxima a los tres microorganismos de ensayo. El tamizaje fitoquímico (cualitativo) de detección de las plantas reveló la presencia de compuestos químicos biológicamente activos tales como taninos, fenoles, saponinas, alcaloides, flavonoides y esteroides / triterpenos.³⁷

Sunilson et al. (2009). En el estudio evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos del rizoma *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* y *Alpinia galanga* que se analizaron contra las bacterias transmitidas por los alimentos comunes tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* y hongos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala*, *Mucor mucedo*, *Candida albicans*. Todos los extractos mostraron importantes propiedades antibacterianas y antifúngicas. *Zingiber officinale* y *Curcuma longa* poseían actividad considerablemente mayor que *Alpinia galanga*.³⁸

Mozioglu et al. (2008). Evaluaron la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa*, presentándose una gran actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Al mismo tiempo se presentó una débil actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y antifúngica contra *Candida albicans* en función de la extracción etanólica de la cúrcuma. De igual manera con las especies del *Mycobacterium* no se presentó actividad antibacteriana.³⁹

Péret et al. (2008). Evaluaron y determinaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico del rizoma de *Curcuma longa* y de sus componentes como curcumina, curcuminoides purificados, pigmentos y aceites esenciales, por el método de difusión en agar utilizando discos estériles impregnados con los extractos. No se presentó actividad antimicrobiana para el extracto etanólico de cúrcuma en polvo y menos de la curcumina. En cuanto a los pigmentos purificados de la curcumina y demetoxicurcumina en concentraciones de hasta 10 mg / ml tampoco se presentó actividad antimicrobiana. Sin embargo, la bisdesmetoxicurcumina mostró actividad inhibitoria para *Bacillus subtilis* a una concentración de 10 mg / ml. El aceite esencial de cúrcuma no presentó actividad inhibitoria para *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, pero si mostró actividad antimicrobiana para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Salmonella choleraesuis*, aumentando la actividad con la concentración creciente. Al aumentar la concentración de aceite esencial de 45 a 90 mg / disco, los diámetros de los halos se han incrementado, con 60% de inhibición para *E. coli* y 131% para *B. subtilis*, lo que indica que el aceite esencial de cúrcuma es un agente potencial antimicrobiano.⁴⁰

Kang et al. (2005). Investigaron la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo, metanol y agua del rizoma de *Curcuma longa* L. contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). El extracto de acetato de etilo de la *C. longa* demostró una mayor actividad antibacteriana que el extracto de metanol y el extracto de agua, siendo el extracto de acetato de etilo

más activo que los demás extractos. En la prueba el extracto de acetato de etilo de la *C. longa* fue bajado notablemente a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CIM) de ampicilina y oxacilina contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA). En el ensayo de invasión bacteriana, por *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), la actividad del extracto se presentó fue de 2 mg / ml de *C. longa* al extraer en comparación con el grupo control. Estos resultados sugieren que el extracto de acetato de etilo de *C. longa* puede tener actividad antibacteriana y el potencial para restaurar la eficacia de las β -lactamas contra MRSA. ⁴¹

Gul et al. (2004). Demostró que el extracto alcohólico del rizoma de cúrcuma, inhibe el crecimiento *in vitro* de algunas bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, sin embargo, no inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*, este resultado puede estar relacionado con el hecho de que estas bacterias no poseen la membrana externa capaz de restringir la penetración de la sustancia química exógena. ⁴²

Braga et al. (2003) y Mata et al.(2004). Demostraron que el aceite esencial del rizoma de cúrcuma es un potencial agente antimicrobiano, y dieron a conocer que varios componentes podrían ser responsables de esta actividad como fenoles, terpenos, aldehídos y cetonas, ya que varios de ellos han sido identificados junto con el aceite esencial de cúrcuma. ^{43, 44}

Lee et al. (2003) y Negi et al. (1999). Demostraron que la fracción de aceite esencial contenido en el rizoma de cúrcuma que presenta mayor porcentaje de α -turmerona mostró una mayor actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Sin embargo, establecieron que se necesitan más estudios para identificar los compuestos responsables de la actividad biocida o bioestática en el aceite esencial de cúrcuma y las posibles interacciones. ^{45, 46.}

Singh et al. (2002). Demostró que el extracto alcohólico del rizoma de cúrcuma presentó una débil actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, y *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, los extractos utilizados en etilenglicol, que contiene 2000 mg de aceite/disco, solo

inhibió el crecimiento de *S. aureus*. La actividad antimicrobiana se puede detectar sólo a altas concentraciones o en concentraciones más bajas cuando se expone a la radiación en el visible.⁴⁷

2.1.1.5.2. Estudios Fitoquímicos.

Alvis et al. (2012). Extrajeron los compuestos fenólicos del rizoma de la cúrcuma (*Curcuma longa*) empleando como disolvente etanol al 75%. Los compuestos fenólicos presentaron una concentración de 176 B.B mg/L expresados como ácido gálico y se adicionaron a una matriz lipídica. Se determinó la actividad y el potencial antioxidante del producto natural y se comparó con el potencial antioxidante del hidrotolueno butilado (BHT), encontrándose que el extracto de cúrcuma mostró un potencial antioxidante similar al del BHT evaluado a las mismas condiciones.⁴⁸

Kumar et al. (2010). Evaluaron la extracción del aceite esencial de las hojas y el rizoma de un cultivo de importancia comercial como la *Curcuma longa* L. por el método de hidrodestilación y la identificación de sus componentes a través de cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). El aceite esencial de los rizomas frescos mostraron ar-tumerone (49,76%) como un constituyente principal. Sin embargo, el aceite esencial de hojas mostró alfa-felandreno (57,8%) como un constituyente principal.⁴⁹

Enríquez et al. (2008). Identificaron por medio de reacciones de coloración y precipitación obtenidas por medio del tamizaje fitoquímico la presencia de alcaloides, lactonas, aceites, glicósidos cardiotónicos, triterpenos, quinonas, resinas, taninos, flavonoides, azúcares reductores, antocianidinas, mucílagos y aminoácidos; además no se evidenció saponinas, esteroides, cumarinas y catequinas, realizadas a una de las especies como es el jengibre perteneciente a la familia de las Zingiberaceae.⁵⁰

Barrero et al. (2000) Evaluaron los aceites esenciales contenidos en los rizomas de la *Curcuma longa* L., cultivada en Venezuela. La determinación del

contenido de aceites totales se realizó por extracción con diclorometano durante 20 horas, obteniéndose un contenido de 7,54%, aceites esenciales volátiles 3,5% y aceites esenciales no volátiles 4,5%. También fueron caracterizados los aceites esenciales de la cúrcuma por extracción con fluidos supercríticos y analizados por cromatografía de gases. Químicamente se identificaron como una mezcla de cetonas y alcoholes sesquiterpenos, además de otros terpenos de bajo peso molecular como α -felandreno, cineol y borneol, los cuales aparecen en los primeros 30 minutos del cromatograma; y una mezcla de los sesquiterpenos, zingibereno, ar-curcumeno, sesquifelandreno, turmerona y la ar-turmerona de alto peso molecular que aparecen a partir de los 30 minutos de la inyección, el aroma de la cúrcuma es debido al contenido de aceites esenciales de los rizomas.⁵¹

Barrero *et al.* (1999). Caracterizaron los pigmentos de la *Curcuma longa* L., cultivada en localidades de Acarigua en el estado Portuguesa, Venezuela. El contenido total de pigmentos expresados como curcumina fue 3,6%, constituidos por tres componentes amarillos con valores de R_f de 0,92; 0,82 y 0,81 en cromatografía en capa fina, e identificados como curcumina, desmetoxicurcumina y bisdesmetoxicurcumina, respectivamente. Por cromatografía líquida de alta presión se obtuvieron tres picos con tiempos de retención de 3,11 minutos para la curcumina; 3,16 minutos para la desmetoxicurcumina y 3,45 minutos para la bisdesmetoxicurcumina. Comparando la cúrcuma nacional producida en el estado Portuguesa con respecto a los productos de la India y Colombia; la nacional presentó un menor contenido de humedad (9,77%) que las muestras importadas (India 11,18%, Colombia 11,47%), mayor contenido de aceites esenciales (11,68%, India 6,17%, Colombia 9,96%) y materia colorante (3,18%, India 1,85%, Colombia 1,99%), lo cual es muy ventajoso como pigmentante y saborizante en formulaciones de productos alimenticios. La Cromatografía en capa fina de un extracto de pigmento presentó los mismos resultados para las tres muestras.⁵²

Barrero *et al.* (1999). Por medio del estudio localizaron por análisis histoquímico los constituyentes principales de la cúrcuma *Curcuma longa* L.

que definen su calidad, como son; pigmentos, aceites esenciales y almidón. Para ello se realizaron cortes del rizoma, los cuales se sometieron a diferentes tratamientos y se observaron en el microscopio óptico con luz normal y de luz polarizada. Así también se evaluaron su composición química; presentando los rizomas de cúrcuma una humedad de 72%, cenizas 1,4%, fibra cruda 8,35%, almidón 31,21%, aceites no volátiles 7,54% y curcumina 3,6%. Al microscopio de luz se observó una clara identificación del pigmento de la cúrcuma, los aceites esenciales y el almidón contenido en las células parénquimas, también se observó una mayor concentración de almidón en las células de los parénquimas internos, a los aceites y materia colorante uniformemente distribuidos tanto en las internas como en las externas.⁵³

2.1.2. Características de las cepas en estudio:

2.1.2.1. *Staphylococcus aureus*

2.1.2.1.1. Taxonomía.

Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes.
Clase:	Cocci
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococaceae
Género:	Staphylococcus Rosenbach 1884
Especie:	<i>Staphylococcus aureus</i> .

2.1.2.1.2. Características.

Conocido comúnmente como estafilococo áureo o dorado, en su agrupación se presenta en racimos (ocasionalmente cadenas cortas o diplococos), son capsulados, inmóviles y no esporulados, presenta colonias con pigmentación amarilla (dorada). (**Ver Figura Nº 02 en Anexo Nº 4**). Es una bacteria anaerobia gram-positiva productora de coagulasa y catalasa que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, que no infectadas, por ella.

Puede producir una variedad de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de la mucosas relativamente benignas, tales como como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además también puede afectar el aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.

En la actualidad, este microorganismo se rige como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado, o incluso, con otro paciente.

Son resistentes a la penicilina, siendo los antibióticos más eficaces para combatirlos los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina. Además de la administración del tratamiento antimicrobiano correspondiente, puede ser conveniente, en función del caso, la eliminación de puertas de entradas como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos.⁵⁴

2.1.2.1.3. Aspectos epidemiológicos y Patogénicos.

Staphylococcus aureus forma parte de la flora normal del ser humano. El sitio más frecuente de colonización es la zona anterior de las vías nasales, aunque también puede colonizar la piel (en particular si está lesionada), la vagina, las axilas, el perineo y la bucofaringe. Se sabe que 25 a 50% de los sujetos sanos pueden estar colonizados por *Staphylococcus aureus* de manera persistente o transitoria. La frecuencia de colonización es mayor entre los diabéticos insulino dependientes, los sujetos infectados por el VIH, los usuarios de drogas inyectables, los pacientes sometidos a hemodiálisis y los individuos con lesiones cutáneas. Los sitios de colonización actúan como reservorios de cepas para futuras infecciones por *Staphylococcus aureus* y las personas colonizadas están expuestas a un mayor riesgo de nuevas infecciones (por la especie colonizadora) que las no colonizadas.⁵⁶

En general, *Staphylococcus aureus* es una causa importante de infecciones nosocomiales. Es la causa más frecuente de infección en las incisiones quirúrgicas y ocupa el segundo lugar, después de los CoNS, como causa de bacteriemia primaria. Los aislados nosocomiales son cada vez más resistentes

a múltiples fármacos. A nivel comunitario, *Staphylococcus aureus* sigue siendo una causa importante de infecciones cutáneas y de partes blandas, de infecciones respiratorias y (en las personas que consumen drogas inyectables) de endocarditis infecciosa. El número de infecciones de tipo comunitario por estafilococos se ha incrementado al aumentar los pacientes sometidos a infusiones terapéuticas domiciliarias.⁵⁹

Varios informes han descrito infecciones comunitarias (en medios tanto rurales como urbanos) causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) en sujetos sin exposición previa de tipo médico. A diferencia de las cepas de MRSA de origen nosocomial, estos microorganismos aislados en la comunidad han seguido siendo sensibles a muchos antibióticos no betalactámicos. Un aspecto preocupante ha sido la aparente capacidad que poseen las cepas comunitarias de MRSA para causar cuadros graves en personas inmunocompetentes; tal facultad quizá dependa de la presencia de diferentes genes toxígenos en estas especies, y también del empleo de agentes betalactámicos como tratamiento empírico de los pacientes infectados por ellas. Casi todas las personas que terminan por padecer infecciones por *Staphylococcus aureus* lo hacen a partir de sus propias cepas colonizadoras. Sin embargo, *Staphylococcus aureus* también puede adquirirse de otras personas o por exposición ambiental. Por lo general, la transmisión se origina en una colonización transitoria de las manos del personal sanitario, que así transfieren estas cepas de un paciente a otro. También se ha señalado la propagación de estafilococos en aerosoles procedentes de las secreciones respiratorias o nasales de individuos intensamente colonizados.⁵⁵

Staphylococcus aureus es un patógeno piógeno conocido por su capacidad de formar abscesos en los focos de infección tanto locales como metastásicos. Esta respuesta patológica clásica a *Staphylococcus aureus* define el marco dentro del que evolucionará la infección. Las bacterias de este tipo desencadenan una reacción inflamatoria que se caracteriza al principio por una respuesta intensa de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y una infiltración

ulterior de macrófagos y fibroblastos. Si la respuesta celular del hospedador (incluido el depósito de fibrina y colágena) no frena la infección, ésta se propaga a los tejidos vecinos o al torrente circulatorio.⁵⁵

En la enfermedad por estafilococos mediada por toxinas no siempre surge una infección clínica. Por ejemplo, si, después de secretada, la toxina pasa a formar parte de algún alimento, puede surgir una intoxicación alimentaria por estafilococos en ausencia de bacterias viables. En el síndrome de choque tóxico (toxic shock syndrome, TSS) por estafilococos bastan condiciones que permitan la síntesis de la toxina en los sitios de colonización (p. ej., la presencia de un tampón súper absorbente) para que surja la enfermedad clínica.⁵⁵

2.1.2.1.4. Síndromes clínicos.

Infecciones de piel y partes blandas.

Staphylococcus aureus origina infecciones cutáneas de diversa índole. Entre los factores predisponentes más frecuentes están las dermatosis, los daños de la piel (como el causado por picaduras de insectos o traumatismos menores), las inyecciones (como en el caso de la diabetes o el consumo de drogas inyectables) y la falta de aseo personal. Las infecciones en cuestión se caracterizan por la formación de vesículas pustulosas que suelen comenzar en los folículos pilosos y se propagan a los tejidos vecinos. La foliculitis es una infección superficial que afecta el folículo piloso en la que existe una zona central de purulencia (pus) rodeada de induración y eritema. Los forúnculos son lesiones más extensas y dolorosas que suelen aparecer en las regiones pilosas y húmedas del cuerpo, y que se extienden desde el folículo piloso hasta transformarse en un absceso verdadero con una zona de purulencia central. El ántrax se sitúa con mayor frecuencia en la mitad inferoposterior del cuello y es todavía más doloroso y grave, porque surge de la coalescencia de otras lesiones que abarcan la capa más profunda del tejido subcutáneo. En términos generales, los forúnculos y el ántrax se identifican fácilmente porque de ellos mana pus al comprimirlos o espontáneamente. En 1 a 3% de las mujeres que amamantan a sus hijos surge mastitis. El cuadro infeccioso, que suele aparecer

a las dos a tres semanas después del parto, se caracteriza por manifestaciones que van desde la celulitis hasta la formación de abscesos. En los casos más graves suelen surgir signos de tipo general, como fiebre y escalofríos. Otras infecciones cutáneas por *Staphylococcus aureus* son el impétigo, la celulitis y la hidradenitis supurada (infecciones foliculares repetitivas en regiones como la axila). *Staphylococcus aureus* es uno de los microorganismos patógenos más frecuentes en las infecciones de las incisiones quirúrgicas.⁵⁵

Infecciones de tejidos músculo esqueléticos.

Staphylococcus aureus es uno de los microorganismos que con mayor frecuencia origina infecciones óseas (por diseminación hematógena y también por propagación de una parte blanda vecina).⁵⁶

En los niños, la osteomielitis hematógena afecta muy a menudo a los huesos largos. El cuadro inicial incluye fiebre y dolor óseo o aversión del pequeño a soportar pesos. Suele aumentar el número de leucocitos y la tasa de eritrosedimentación. Los cultivos de sangre son positivos en cerca de 50% de los casos. En caso necesario, normalmente resultan diagnósticos los cultivos y el estudio histopatológico de muestras óseas. Las radiografías corrientes pueden resultar normales incluso 14 días después de comenzar los síntomas. La gammagrafía con fosfonato de ^{99m}Tc suele identificar los primeros signos de la infección. La resonancia magnética es más sensible que las otras técnicas para confirmar el diagnóstico radiológico.⁵⁵

En los adultos, la forma mencionada de osteomielitis que afecta los huesos largos es menos frecuente. Sin embargo, uno de los cuadros clínicos iniciales más comunes es la osteomielitis vertebral. Este trastorno suele observarse en personas con endocarditis, en las sometidas a hemodiálisis, en los diabéticos y en los adictos a drogas inyectables. Las infecciones de las vértebras pueden debutar con dorsalgia y fiebre intensas, pero su presentación también puede ser menos grave, con dorsalgia crónica y febrícula. *Staphylococcus aureus* es el patógeno que con mayor frecuencia causa abscesos epidurales, complicación que puede originar una afección del sistema nervioso. La persona se queja de dificultad para orinar o caminar, y de dolor radicular, además de los

síntomas propios de la osteomielitis. La intervención quirúrgica en estos casos suele constituir una urgencia médica. Por medio de la resonancia magnética se confirma con bastante certeza el diagnóstico.⁵⁶

Las infecciones óseas que son producto de la propagación desde tejidos vecinos tienden a surgir de infecciones de partes blandas, como en el caso de las úlceras diabéticas o vasculares, las operaciones y los traumatismos. El hecho de que el hueso quede al descubierto, de que haya una fístula húmeda, de que no cicatrice la lesión o de que de ella mane ininterrumpidamente algún tipo de secreción sugiere afección del hueso subyacente. La afección ósea se puede corroborar mediante el cultivo de fragmentos de hueso y el estudio histopatológico. La contaminación del material de cultivo por microorganismos de los tejidos vecinos dificulta el diagnóstico de osteomielitis cuando no se ha logrado la confirmación por métodos histopatológicos. Además, con los medios radiográficos resulta a veces difícil distinguir la osteomielitis de la infección de las partes blandas suprayacentes, con osteítis subyacente.⁵⁰

Staphylococcus aureus es la causa más frecuente de artritis séptica en los niños. La infección evoluciona rápidamente y puede acompañarse de destrucción articular extensa si no se trata. El cuadro se presenta con fiebre, hinchazón articular y dolor intenso al mover la articulación afectada.⁵⁷

En los adultos, la artritis puede deberse a traumatismos, operaciones o diseminación hematógena. Las articulaciones afectadas con mayor frecuencia son las rodillas, los hombros, las caderas y las interfalángicas. El cuadro suele comenzar en articulaciones que ya estaban dañadas por una artrosis o una artritis reumatoide. También se observan infecciones yatrógenas secundarias a aspiraciones o a la inyección de agentes en la articulación. En dichas situaciones la persona siente mayor dolor e hinchazón en la articulación afectada, junto con fiebre.⁵⁰

La piomiositis es una infección poco común de los músculos de fibra estriada que se observa más bien en los climas tropicales. Además de afectar a personas con inmunodeficiencias graves, en fecha reciente se ha señalado su

presencia en sujetos afectados por el VIH. El cuadro inicial incluye fiebre, hinchazón y dolor sobre el músculo afectado. La aspiración de líquido del tejido lesionado indica la presencia de pus, que contiene innumerables leucocitos y bacterias grampositivas en cúmulos. A veces existe algún antecedente de traumatismo vinculado a la infección, pero en estos casos la patogenia no se conoce en detalle.⁵⁶

Infecciones de vías respiratorias.

Las infecciones de vías respiratorias causadas por *Staphylococcus aureus* se observan en algunas situaciones clínicas precisas. *Staphylococcus aureus* es la causa de infecciones graves en neonatos y lactantes; estas infecciones se manifiestan al principio por disnea, fiebre e insuficiencia respiratoria. En las radiografías de tórax se advierten neumatoceles (cavidades de pared delgada y contornos filamentosos). El neumotórax y el empiema son complicaciones conocidas de este tipo de infección.

En los adultos, las infecciones pulmonares de tipo nosocomial por *Staphylococcus aureus* suelen surgir en las personas intubadas (tráquea) o en las atendidas en unidades de cuidados intensivos. El cuadro inicial es similar al que se observa en las infecciones pulmonares por bacterias de otro tipo. Los pacientes generan volúmenes crecientes de esputo purulento y terminan por mostrar un cuadro disneico con fiebre y nuevos infiltrados pulmonares. Distinguir la neumonía bacteriana de las otras causas de insuficiencia respiratoria o nuevos infiltrados pulmonares en los enfermos críticos suele resultar difícil y depende de toda una constelación de datos clínicos, radiológicos y de laboratorio. Las infecciones de vías respiratorias por *Staphylococcus aureus* contraídas en la comunidad suelen surgir después de cuadros víricos o por efecto de émbolos pulmonares sépticos (p. ej., en usuarios de drogas inyectables). La influenza es la causa más común del primer tipo de cuadro inicial. Las manifestaciones iniciales son la fiebre, la generación de esputo sanguinolento y la presencia de neumatoceles en 50% de los campos pulmonares o de múltiples infiltrados pulmonares irregulares. El diagnóstico se hace por tinción de Gram y cultivo del esputo. Los cultivos de

sangre, a pesar de resultar útiles, por lo regular no arrojan resultados positivos según la prueba.⁵⁵

Bacteriemia, sepsis y endocarditis infecciosa.

La bacteriemia por *Staphylococcus aureus* puede complicarse con cuadros como sepsis, endocarditis, vasculitis o siembra metastásica (aparición de acumulaciones de pus o supuración en tejidos de otras localizaciones). Se ha calculado que la frecuencia de siembras metastásicas durante la bacteriemia llega incluso a 31%. Entre los tejidos afectados con mayor frecuencia están los huesos, las articulaciones, los riñones y los pulmones. La identificación de las complicaciones mencionadas suele ser difícil cuando se usan sólo métodos de diagnóstico clínico y pruebas de laboratorio. Entre los trastornos coexistentes que suelen aparecer junto con la bacteriemia por *Staphylococcus aureus* y que agravan el riesgo de complicaciones están la diabetes, la infección por VIH y la insuficiencia renal. Otros factores del hospedador que implican un mayor riesgo de complicaciones son el cuadro inicial con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* de origen comunitario (excepto en los consumidores de drogas inyectables), la ausencia de algún foco primario identificable y la presencia de dispositivos protésicos.⁵⁸

Desde el punto de vista clínico, el cuadro inicial de la sepsis por *Staphylococcus aureus* es semejante al observado en las sepsis por otras bacterias. Normalmente se observa la secuencia de cambios hemodinámicos clásicamente descrita (que comienza con alcalosis respiratoria y manifestaciones clínicas como hipotensión y fiebre). El diagnóstico microbiológico se corrobora por la positividad de los cultivos de sangre. En los últimos 20 años ha aumentado la incidencia global de endocarditis por *Staphylococcus aureus*. Según la serie publicada, en la actualidad *Staphylococcus aureus* origina un 25 a 35% de todos los casos de endocarditis bacteriana; este incremento se debe, por lo menos en parte, al empleo creciente de dispositivos intravasculares; la incidencia de la endocarditis infecciosa en individuos con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* y catéteres intravasculares fue de 25% en un estudio mediante ecocardiografía

transesofágica. Otros factores vinculados con un mayor riesgo de endocarditis son el consumo de drogas inyectables, la hemodiálisis, la presencia de prótesis intravasculares y la inmunodepresión. A pesar de contar con antibióticos eficaces, la mortalidad por estas infecciones sigue estando en torno a 20-40%, dependiendo del hospedador y de la naturaleza de la infección. Entre las complicaciones de la endocarditis por *Staphylococcus aureus* están la insuficiencia valvular cardíaca, los émbolos periféricos, la siembra metastásica y la afección del sistema nervioso central. El absceso cerebral por *Staphylococcus aureus* es una complicación conocida de la endocarditis de la mitad izquierda del corazón.⁵⁹

La endocarditis por *Staphylococcus aureus* se observa en cuatro situaciones clínicas:

- 1) endocarditis de la mitad derecha del corazón, vinculada con el consumo de drogas inyectables;
- 2) endocarditis de las válvulas originales de la mitad izquierda;
- 3) endocarditis de las prótesis valvulares, y
- 4) endocarditis nosocomial. En cada una de las situaciones mencionadas, el diagnóstico se confirma al identificar los estigmas clínicos que sugieren endocarditis, que comprenden manifestaciones cardíacas, como soplos nuevos o cambiantes en las válvulas del corazón; manifestaciones cutáneas de la endocarditis, como lesiones vasculíticas, nódulos de Osler o lesiones de Janeway; manifestaciones de la enfermedad embólica, y antecedentes que sugieran riesgo de bacteriemia por *Staphylococcus aureus*.⁵⁸

En caso de que no se identifique el antibiótico terapia previa, casi siempre son positivos los cultivos de sangre. La ecocardiografía transtorácica, que es menos sensible que la transesofágica, es menos invasiva y suele señalar la presencia de vegetaciones valvulares.⁵⁷

La endocarditis aguda derecha de la válvula tricúspide por *Staphylococcus aureus* suele observarse en los adictos a drogas inyectables. El cuadro clásico

inicial consiste en fiebre alta, aspecto clínico de intoxicación, dolor pleurítico y generación de esputo purulento (a veces sanguinolento). Las radiografías de tórax muestran datos indicativos de émbolos pulmonares sépticos (lesiones circulares pequeñas y periféricas que con el tiempo pueden mostrar cavidades). Un alto porcentaje de personas afectadas carece de antecedentes de daño valvular.⁵⁸

En el comienzo de la enfermedad, el individuo puede mostrar sólo fiebre, sin signos cardiovasculares o de cualquier otra localización. Como consecuencia, resulta esencial para el diagnóstico un índice alto de sospecha clínica. Las personas con antecedentes de daño valvular cardíaco suelen mostrar al principio una endocarditis valvular izquierda previamente dañada. Tienden a ser de más edad que los que presentan endocarditis del lado derecho, su pronóstico es peor y la incidencia de complicaciones es mayor (émbolos periféricos, descompensación cardíaca y siembra metastásica). *Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos que con mayor frecuencia origina endocarditis en las prótesis valvulares. La infección causada por este microorganismo es especialmente fulminante en el posoperatorio temprano y conlleva un alto índice de mortalidad. En casi todos los casos, las medidas médicas no son suficientes por sí solas y es necesario sustituir la válvula urgentemente. Los enfermos tienden a presentar insuficiencia valvular o abscesos de miocardio que nacen de la Región del implante valvular.⁵⁵

La mayor frecuencia de endocarditis nosocomial (15 a 30% de los casos, según el estudio) refleja en parte el uso cada vez más frecuente de dispositivos intravasculares. La endocarditis causada por ellos suele depender de *Staphylococcus aureus*; los pacientes están en estado crítico, reciben antibióticos por otras indicaciones y tienen otros cuadros coexistentes, razón por la cual no se identifica fácilmente el trastorno original objeto del diagnóstico.⁵⁷

Infecciones de vías urinarias.

Las infecciones de las vías urinarias pocas veces son causadas por *Staphylococcus aureus*. A diferencia de muchos otros patógenos en esas vías,

la presencia de *Staphylococcus aureus* en la orina sugiere diseminación hematológica. Las infecciones ascendentes por ese microorganismo suelen ser consecuencia de la manipulación instrumental de las vías genitourinarias.⁵⁵

Intoxicación alimentaria.

Staphylococcus aureus constituye una de las principales causas de brotes de infección de origen alimentario en Estados Unidos; en estos casos, si el microorganismo patógeno es *Staphylococcus aureus*, proviene de la inoculación de una cepa toxigénica en los alimentos por manipuladores colonizados. La toxina queda después incluida en productos promotores del crecimiento, como natillas, ensaladas de patata o carnes preparadas. Aunque se destruya la bacteria por calentamiento, la toxina termoestable se conserva. La enfermedad comienza en forma rápida y "explosiva", y sus manifestaciones surgen en el plazo de 1 a 6 h después de la ingestión del alimento contaminado. El cuadro se caracteriza por náusea y vómito, aunque también pueden surgir diarrea, hipotensión y deshidratación. Entre las entidades a incluir en el diagnóstico diferencial está la diarrea por otras causas, en particular la causada por toxinas similares (como las elaboradas por *Bacillus cereus*). La rapidez del comienzo, la ausencia de fiebre y la naturaleza epidémica del cuadro inicial deben hacer sospechar la presencia de esta entidad. Los síntomas por lo común se resuelven en un plazo de 8 a 10 h. El diagnóstico se puede corroborar al demostrar la presencia de bacterias o de la enterotoxina en el alimento al que se atribuye el brote. El tratamiento incluye sólo medidas de sostén.⁵⁵

2.1.2.2. *Escherichia coli*

2.1.2.2.1 Taxonomía.

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria.
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	Escherichia
Especie:	<i>Escherichia coli</i> Migula, 1895.

2.1.2.2.2. Características

También conocida por la abreviación de su nombre *E. coli*, es quizás el microorganismo procariota más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, por ende en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre *Escherichia coli*, en honor a su descubridor. Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (gramnegativo), es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. **(Ver Figura N° 03 en Anexo N° 4)**. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular. ⁶⁰

2.1.2.2.3. Patogenia.

La *Escherichia coli* puede causar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía gram-negativa.

La *Escherichia coli* tóxica está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de los alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70 °C.

Son más comunes en mujeres por la corta longitud de la uretra (25 a 50 mm, o bien 1 a 2 pulgadas) en comparación con los hombres (unos 20 cm, o unas 8 pulgadas). Entre los ancianos, las infecciones urinarias tienden a ser de la misma proporción entre hombres y mujeres. Debido a que la bacteria invariablemente entra al tracto urinario por la uretra (una infección ascendente), los malos hábitos sanitarios pueden predisponer a una infección, sin embargo, otros factores cobran importancia, como el embarazo, hipertrofia benigna o maligna de próstata, y en muchos casos el evento iniciante de la infección es desconocido. Aunque las infecciones ascendentes son las causantes de infecciones del tracto urinario bajo y cistitis, no es necesariamente ésta la causa de infecciones superiores como la pielonefritis, que puede tener origen hematógeno.⁶¹

2.1.2.2.4. Síndromes infecciosos.

Infecciones urinarias.

Las vías urinarias constituyen el sitio más infectado por ExPEC. Es una infección frecuente en pacientes ambulatorios; motiva cerca de 1% de las consultas en Estados Unidos y sólo le aventajan las infecciones respiratorias como causa de hospitalización. La mejor manera de estudiar las infecciones urinarias es por síndrome clínico (p. ej., cistitis no complicada, infección por sonda) en el contexto de cada hospedador (p. ej., mujeres pre-menopáusicas, pacientes inmunodeprimidos). *Escherichia coli* es el microorganismo patógeno más aislado en todas las combinaciones de síndromes-grupos de hospedadores de infecciones urinarias. Por ejemplo, en Estados Unidos, cada año *Escherichia coli* causa entre 85 y 95% de los seis a ocho millones de casos de cistitis no complicada en mujeres premenopáusicas, con un coste directo de mil millones de dólares. Además, 20% de las mujeres que sufren una infección inicial presentan recurrencias frecuentes (de 0.3 a más de 20% por año). Con excepción del primer año de vida, el diagnóstico de infección urinaria en el varón necesita pruebas muy claras, puesto que es una enfermedad rara en ausencia de alguna instrumentación o coito anal.⁶²

Son más frecuentes la uretritis o las cistitis no complicadas, y se caracterizan por síntomas de disuria, polaquiuria y dolor suprapúbico. La presencia de fiebre, dolor de espalda, o de ambos, sugieren avance hacia pielonefritis. Las embarazadas tienen un riesgo inusualmente alto de padecer esta complicación, que puede afectar negativamente al desenlace del embarazo. Por este motivo, la detección sistemática de bacteriuria, con tratamiento cuando los resultados son positivos, forma parte de los cuidados estándar. La fiebre puede tardar de cinco a siete días en resolverse por completo en pacientes tratados adecuadamente de pielonefritis, pero debe descender a lo largo del tiempo. La fiebre y el recuento de neutrófilos persistentemente alto o creciente deben propiciar una valoración rápida buscando un absceso intrarrenal o perirrenal y obstrucción. La lesión parenquimatosa renal y la pérdida de función renal se dan fundamentalmente en presencia de

obstrucción. La infección prostática es en general una complicación de las infecciones de vías urinarias (urinary tract infections, UTI) en varones con antecedentes de manipulación instrumental, de hipertrofia prostática, o en todo caso ambas ⁵⁵.

Infección abdominal y pélvica.

El abdomen y la pelvis son el segundo espacio más frecuente de infección extraintestinal por *Escherichia coli*.

Esta Región alberga una gran variedad de síndromes clínicos, como peritonitis aguda por contaminación fecal, peritonitis bacteriana espontánea, peritonitis por diálisis peritoneal, diverticulitis, apendicitis, abscesos intraperitoneales o viscerales (hepáticos, pancreáticos, esplénicos), pseudoquistes pancreáticos infectados y colangitis séptica o colecistitis. En las infecciones intraabdominales, *Escherichia coli* puede aislarse solo o (como suele suceder) acompañado de otros miembros facultativos o anaerobios de la flora intestinal del estómago. ⁶²

Neumonía.

Por lo común no se suele considerar *Escherichia coli* como causa de neumonía. Los GNB entéricos son responsables de tan sólo 2 al 5% de los casos de neumonía adquirida en la comunidad (community-acquired pneumonia CAP), en parte porque estos microorganismos sólo colonizan transitoriamente la bucofaringe en una minoría de individuos sanos. Por lo contrario, la colonización de la boca por *Escherichia coli* y otros GNB aumenta con la gravedad de la enfermedad y el empleo de antibióticos. Por tanto, los GNB son una causa frecuente de neumonía adquirida por los residentes en centros de cuidado prolongados y son la causa más frecuente (60 a 70% de los casos) de neumonía hospitalaria, en especial en post operados y en pacientes de cuidados intensivos. Comúnmente la infección se adquiere aspirando un volumen pequeño, pero en ocasiones ocurre por vía hematógena, en cuyo caso se observan infiltrados nodulares multifocales. También conlleva necrosis de los tejidos, probablemente por las citotoxinas que producen las GNB. A pesar

de las variaciones entre las diversas instituciones, *Escherichia coli* suele ser el tercer o cuarto bacilo gramnegativo aislado con mayor frecuencia en estos contextos y causa entre 5 y 8% de casos en los estudios tanto estadounidenses como europeos. Independientemente del hospedador, la neumonía por GNB intestinal es una enfermedad grave, con un índice alto de mortalidad bruta y atribuible (de 20 a 60% y de 10 a 20%, respectivamente).⁶²

Meningitis.

Escherichia coli es una de las dos causas principales de meningitis neonatal (la otra es *Streptococcus* del grupo B). La mayor parte de las cepas causales posee el serotipo capsular K1. Fuera de este contexto, la meningitis por *Escherichia coli* es bastante rara y ocurre principalmente cuando se dañan las meninges por una craniectomía o un traumatismo o en presencia de cirrosis. En estos casos, las meninges supuestamente se contaminan por episodios de bacteriemia mal tratados por vía porta o por extensión directa desde el oído o los senos paranasales.⁶²

Celulitis o infección músculo esquelética.

Las infecciones de úlceras de decúbito y de las extremidades inferiores en diabéticos (u otros hospedadores con afección neurovascular) suelen ser polimicrobianas. *Escherichia coli* contribuye con frecuencia a la infección de las úlceras de decúbito y en ocasiones a las infecciones de las extremidades inferiores de estos pacientes. A veces puede causar celulitis en quemaduras o infecciones de herida quirúrgica, en especial cuando la infección se origina cerca del perineo. En estos contextos se puede producir osteomielitis por contigüidad. La osteomielitis hematógena, en particular de los cuerpos vertebrales, es más frecuente de lo que se piensa, y representa 10% de los casos en algunas series. *Escherichia coli* es en ocasiones la causa de infecciones vinculadas a aparatos ortopédicos, y es causa rara de miositis hematógena. La miositis o fascitis de la parte superior de las extremidades inferiores debe motivar la valoración de un posible origen abdominal con diseminación por contigüidad.⁶²

Infección intravascular.

A pesar de ser una de las causas más frecuentes de bacteriemia, es raro que *Escherichia coli* colonice válvulas cardíacas nativas y es una causa infrecuente de endocarditis sobre prótesis valvulares. De forma similar, son infrecuentes las infecciones de aneurismas e injertos vasculares por *Escherichia coli*⁵⁵.

Infecciones varias.

Escherichia coli es capaz de infectar casi cualquier órgano o Región. Es causa de 8% de las infecciones quirúrgicas (de tejidos superficiales y profundos o de órganos y espacios; por ejemplo, mediastinitis), algunos casos complicados de sinusitis y unos cuantos casos raros de endoftalmitis o absceso cerebral⁵³.

2.1.2.3. Resistencia y Uso de antimicrobianos de Origen Vegetal.

Los antimicrobianos forman parte de la familia de los fármacos más comúnmente prescritos en el mundo. Desde que la FDA (Food and Drug Administration) aprobó la aparición de versiones genéricas de drogas “pioneras” en 1984, la accesibilidad a la mayoría de las drogas prescritas en el mercado ha aumentado para las personas de bajos recursos. En contraparte, el incremento de las tasas de resistencia bacteriana a los antibacterianos conforma una de las mayores amenazas. En países en vías de desarrollo, a diferencia de los países desarrollados, los relativamente altos niveles de disponibilidad y consumo de antibacterianos han conducido a un aumento desproporcionado de la incidencia del uso inapropiado de estos fármacos.⁶⁵

El aumento de la resistencia bacteriana y uso irracional de antibacterianos no es un fenómeno reciente, por lo que se plantea en la actualidad, la discusión sobre la capacidad de los nuevos antibacterianos para combatir efectivamente a los microorganismos, impulsando a la comunidad científica a la investigación en las áreas de químicas, farmacología y microbiología para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos.⁶⁶

Se han desarrollado con éxito líneas de investigación, muchas de ellas basadas en las propiedades antiinfecciosas y antiinflamatorias de plantas utilizadas en la medicina popular, pudiendo así contribuir innovadoramente en la terapia antimicrobiana.⁶⁷

La presencia de sustancias antimicrobianas y antibacterianas en los vegetales superiores no es un dato reciente, solamente que a partir del descubrimiento de la penicilina, es que esta búsqueda tiene gran impulso. Las plantas producen gran número de metabolitos secundarios en diversas en diversas partes (hojas, raíces, flores, semillas) que son liberados al medio ambiente, muchos de ellos presentan acción antimicrobiana y antibacteriana. Estos metabolitos secundarios dan origen a diversos como alcaloides, flavonoides,

isoflavonoides, taninos, cumarinas, terpenos, que son específicos de determinadas familias, géneros o especies, y cuyas funciones, hace poco tiempo, eran desconocidas.

En 1970, la OMS reconoció los beneficios de la medicina china (a base de extractos de plantas), donde surgen investigaciones y desarrollo de medicamentos obtenidos de fuentes naturales. Estudios realizados en el periodo de 1981 a 2002 por la *Anual Reports of Medicinal Chemistry* demostraron que de entre 90 nuevas sustancias con potencial farmacológico analizadas, 61 de ellas eran derivados semisintéticos de plantas y eran oriundas de productos naturales.⁶⁸

La medicina popular es rica en plantas utilizadas para los más diversos fines, que sustituyen muchas veces, la prescripción médica. Esto se justifica, en parte, por el alto grado de accesibilidad de las plantas medicinales, debido a la gran disponibilidad de estos, muy diferente del que ocurre con los medicamentos industrializados que en la mayoría, dependen de la tecnología y materia prima externa.⁶⁹

La cantidad de plantas existentes en el planeta, reconocida sobre el punto de vista científico, se sitúa entre 250 a 500 mil especies, de las cuales, solamente cerca del 5% han sido estudiadas fitoquímicamente y un menor porcentaje han sido validadas sobre los aspectos biológicos.⁷⁰ El valor de la biodiversidad de la Amazonía ha sido muy discutido por la industria farmacéutica, obteniéndose considerar que los tratamientos basados en productos naturales son utilizados por el 80% de la población mundial.

La investigación de nuevos agentes farmacológicamente activos, obtenidos de plantas ha permitido descubrir muchos fármacos clínicamente útiles para tratar muchas enfermedades.

2.1.3. Método de Macrodilución.

Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales serán realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la National Commitee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS), publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como macrodilución en caldo.

Fundamentos: Consiste en exponer a las cepas a estudiar a diferentes concentraciones de antimicrobianos, en diluciones a la mitad y observar el crecimiento de los microorganismos para luego definir la CIM (Concentración mínima inhibitoria). En el método de macrodilución se emplea por cada combinación de microorganismo con antimicrobiano, un juego de tubos. Habitualmente se prepara el juego de tubos con 1ml de caldo MH (Miuller Hilton) suplementado con Ca^{++} y Mg^{++} estéril sin antimicrobiano.

Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente. Se colocan 2 ml de solución de antibiótico en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo MH. Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo.

El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml, que se descarta. El último tubo no recibe solución de antibiótico y sirve de control decrecimiento. Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una

concentración igual de inóculo en el caldo. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga 10^5 a 10^6 UFC/ml ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Añadir a cada tubo 1ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35°C entre 16 y 20 horas. ⁷¹

2.1.4. Sensibilidad bacteriana a los antibióticos

La determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas.

Ejemplo: Equivalencia entre la cefalotina ensayada y las restantes cefalosporinas de 1ª generación que no es necesario probar, ya que el resultado puede deducirse del obtenido en la cefalotina). Este hecho permite ensayar un número reducido de antibióticos, sin limitar por ello las posibilidades terapéuticas.

Hay diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de rutina, y de manera semicuantitativa, las CIM (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Estos diferentes métodos de rutina permiten categorizar una cierta cepa bacteriana en función de su sensibilidad frente al antibiótico probado. Esta cepa se denomina Sensible (S), Intermedia (I) o Resistente (R) al antibiótico.

Para un determinado antibiótico, una cepa bacteriana es, según la NCCLS:

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.

- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología).

Ciertas moléculas son representativas de un grupo de antibióticos. Los resultados (S, I, R) obtenidos con estas moléculas pueden ser ampliados a los antibióticos del grupo, que en ese caso no es necesario ensayar.⁷⁴

Los ensayos realizados por la técnicas microbiológicas de disco difusión en agar Müller-Hinton y macrodilución en caldo Müller-Hinton, siguiendo las normas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS),⁷⁵ establecen controles de antibióticos probados que fueron los siguientes: tetraciclina (Tet), ceftriaxona (Ctx), ciprofloxacina (Cip), cefoxitina (Fox), ampicilina (Amp), trimetoprim-sulfametoxazol (Stx), cloranfenicol (Cm), ácido nalidíxico (Na), gentamicina (Gm) y nitrofurantoína (Fu) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England, UK), dando como resultado valores de CIM en ug/ml referenciales de algunos antibióticos según los estándares de controles:⁷⁶

Tabla 1: Valores de referencia de sensibilidad a distintos antibióticos.

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922						<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
	Diametro de inhibición (mm)			CMI del estándar (µg/mL)			Diametro de inhibición (mm)			CMI del estándar (µg/mL)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ampicilina ^a	≥ 17	14-17	≤ 13	≥ 8	16	≤ 32	≥ 29	—	≤ 28	≥ 0.2	—	≤ 0.5
Ciprofloxacino ^a	≥ 21	16-20	≤ 15	≥ 1	2	≤ 4	≥ 21	16-20	≤ 15	≥ 1	2	≤ 4
Gentamicina ^a	≥ 15	13-14	≤ 12	≥ 4	8	≤ 16	≥ 15	13-14	≤ 12	≥ 4	8	≤ 16

^a Valores tomados de CLSI 2010

2.2. DEFINICIONES OPERACIONALES.

2.2.1. Variable Independiente:

- Extracto hidroalcohólico del rizoma de *curcuma longa*.

2.2. 2. Variable Dependiente:

- Actividad antibacteriana.

TABLA Nº 2: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE		DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ÍNDICES	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
INDEPENDIENTE	Extracto hidroalcohólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> "Guisador".	Producto que se obtendrá mediante el método de extracción por maceración con etanol/agua (70:30).	El solvente en contacto con la especie vegetal arrastrará los metabolitos secundarios solubles en él.	Concentración del extracto hidroalcohólico del rizoma de <i>Curcuma longa</i> "Guisador".	<p>Método de Macrodilución:</p> <p>CMI : De 32 mg/ml a 0.25 mg/ml</p>	Nominal	Cuantitativa
DEPENDIENTE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo.	El grado de turbidez que presentarán los medios de cultivos inoculados con <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> expuesta al extracto en estudio	Grado de Turbidez	<p>Método de Macrodilución:</p> <p>Mínima Concentración que no presenta turbidez</p>	Nominal	Cualitativa

2.3. HIPÓTESIS.

El extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* (Guisador), presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

CAPÍTULO III

3.1. MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

3.1.1. Método de investigación:

Se empleó el ***Diseño experimental, descriptivo, prospectivo y Longitudinal.***

- **Experimental:** Porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.
- **Descriptivo:** Porque el estudio describió e interpretó en forma clara y detallada los hechos obtenidos en la investigación.
- **Prospectivo:** Porque se desarrolló a través del tiempo.
- **Longitudinal:** Porque permite realizar la recolección sistemática de las variables involucradas en función del tiempo.

3.1.2. Diseño de la investigación:

Ensayo *in vitro*, realizada Bajo condiciones fisicoquímicas controladas, manteniendo siempre el control de muchos factores entre ellos la esterilización de los materiales utilizados en las diferentes pruebas realizadas como se detallan:

- ◆ Esterilización del laboratorio antes y después de las pruebas realizadas para dar mayor seguridad.
- ◆ Medios de cultivo con pH adecuado para no tener interferencia en los resultados.

- ◆ Autoclavado de los medios de cultivos, cloruro de sodio 0.9 % y de los materiales utilizados antes, durante y después de las pruebas realizadas, para no crear falsos positivos.
- ◆ Conservación de los medios de cultivo y de la cepa bacteriana en refrigeración óptima.
- ◆ Siembra del cultivo en condiciones de esterilidad para no crear interferencias en el trabajo.
- ◆ Incubación de las placas y baterías de tubos en incubadoras a 37 °C por 24 horas.

La distribución del grupo en estudio fue según el siguiente esquema:

Método de Macrodilución en medio líquido (Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria).

Grupo experimental: Tubo contenido del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* (Guisador) a concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mg/ml. **(Ver tabla Nº 6 en Anexo 13)**

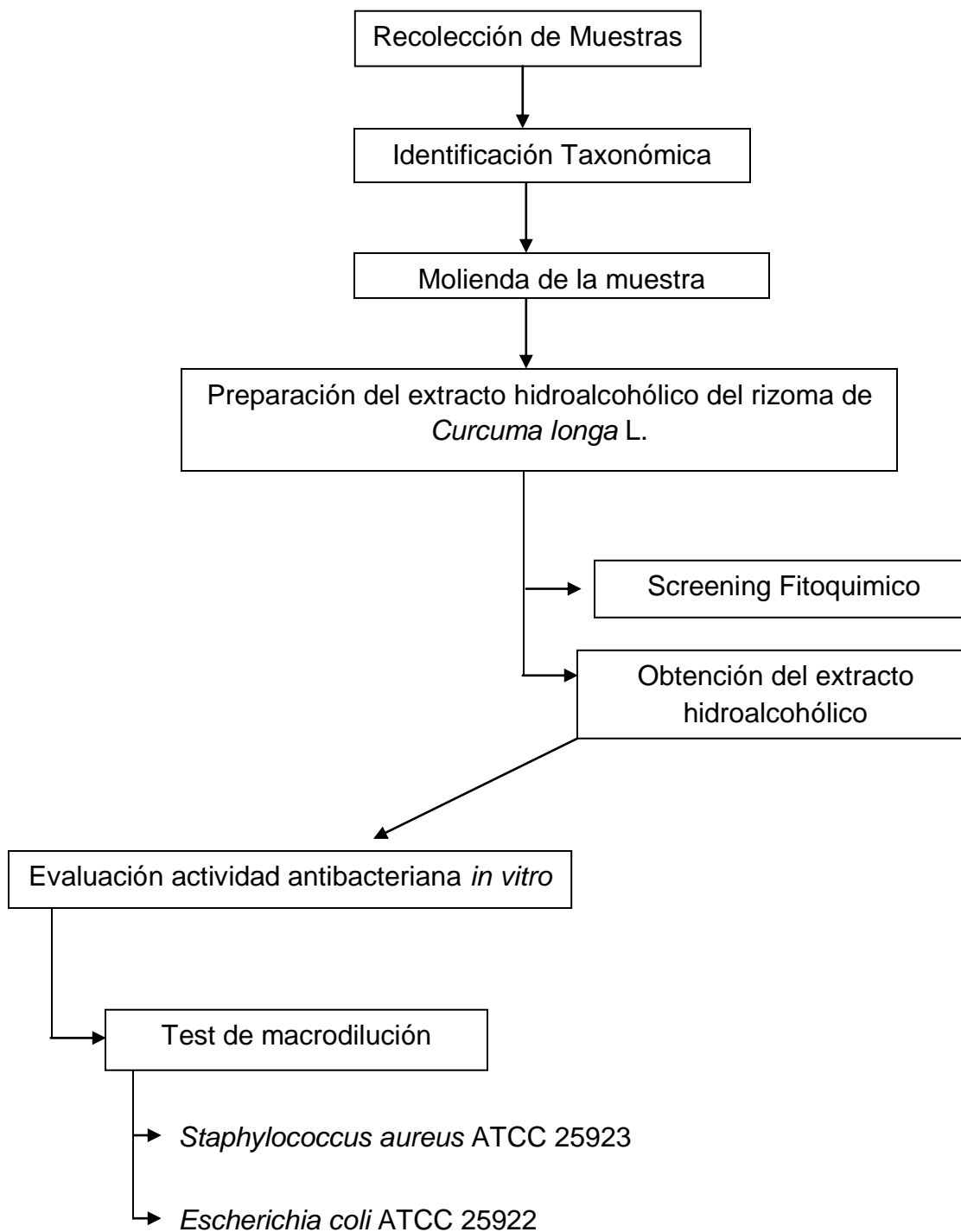
Grupo control positivo: Gentamicina 160 mg/2ml. **(Ver tabla Nº 7 en Anexo 13)**

Grupo control Negativo: Tubo contenido solo de medio de cultivo.

Se determinará por observación directa de la turbidez de los medios de cultivo, la mínima concentración de extracto que inhibió el crecimiento visible de los microorganismos. Esta observación se realizará tomando como referencia el tubo control negativo.

3.1.3. FLUJOGRAMA DE INVESTIGACIÓN.

ESQUEMA N° 1: Extracto hidroalcohólico de la muestra vegetal



3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.

3.2.1. Población vegetal:

La población estuvo constituida por la especie vegetal de *Curcuma longa* L. (Guisador o Palillo) que tenían rizomas maduros. Estos se obtuvieron de las plantaciones de la Comunidad de Nina Rumi, distrito de San Juan, provincia de Maynas, Departamento de Loreto a 122 msnm. (**Ver Imagen N° 01 y Foto N° 22 en Anexo N° 1 y 3**).

3.2.2. Muestra vegetal:

Se recogió 2 kg de muestra fresca (rizomas) en forma de dedos de 10 cm de longitud promedio y 2 cm de diámetro. Después de las operaciones de lavado, picado y secado. (**Ver Foto N° 01 en Anexo N° 07**).

Criterios de inclusión:

Material vegetal en buen estado de conservación.

Criterios de exclusión:

Material vegetal que se encuentre en mal estado de conservación y que presente signos visibles de descomposición microbiana.

3.2.3. Población microbiológica.

La población estará conformada por 02 microorganismos tipificados: *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* los mismos que serán ensayados frente a diferentes concentraciones de cada uno de los extractos vegetales obtenidos. Estará conformado por el número de colonias que se emplearán para la preparación del inóculo bacteriano, que oscilará entre 3 a 5 colonias de tamaño y morfología similar.

3.2.4. Muestra Microbiológica.

Las muestras microbiológicas fueron constituidas por las bacterias:

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

Criterios de inclusión

Las bacterias fueron morfológicamente iguales

Sólo fueron empleadas bacterias jóvenes

Criterios de exclusión

Las bacterias no fueron morfológicamente iguales

Cepas que presentó contaminantes.

3.3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES.

3.3.1. Instrumentos.

- Formato de recolección de datos (**Anexo N° 2**).

3.3.2. Material vegetal.

- Extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa*.

3.3.3. Materiales biológicos.

- Cepa de *Staphylococcus aureus*.
- Cepa de *Escherichia coli*.

3.3.4. Material general de laboratorio

3.3.4.1. Material de vidrio:

- Embudos.
- Erlenmeyer de 250 y 500 ml.
- Frasco ámbar con tapa rosca.

- Matraz 1000 ml.
- Micropipeta Pasteur.
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Probetas de 10, 100, 250 y 1000 ml.
- Tubos ensayo con tapa rosca (75 x 120 mm)
- Tubos de ensayo de 5 y 7 ml.
- Vasos de precipitado de 5, 10, 20, 50 y 100 ml.
- Bagueta.
- Placas petri

3.3.4.2. Material de metal:

- Asa de Kolle para siembra bacteriológica.
- Cuchillo mediano.
- Escobillas lava tubos.
- Espátulas medianas.
- Gradilla metálica.
- Pinza estéril.
- Regla Vernier

3.3.4.3. Otros materiales y materiales de seguridad:

- Algodón.
- Detergente.
- Guantes quirúrgicos.
- Hisopos para medios de cultivos.
- Mascarillas.
- Papel aluminio.
- Papel de despacho.
- Papel secante.
- Papel tissue.

- Parafilm 2'x 250'
- Plumón marcador.
- Soportes para tubos
- Mandiles
- Mascarilla N° 78
- Guantes quirúrgicos descartables N° 7 ½
- Lentes de protección

3.3.5. Medios de cultivo y soluciones utilizadas

3.3.5.1. Medios de cultivo:

- Agar Mueller Hinton.
- Caldo Nutritivo
- Caldo Mueller Hinton.

3.3.5.2. Reactivos:

- Ácido clorhídrico (HCl)
- Solución de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)
- Agua destilada
- Etanol 70°
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Fehling.
- Reactivo de Molish.
- Reactivo de Ninhidrina.
- Cloruro de Bario ($BaCl_2$), para la preparación de Estándar 0.5 de Mc.Farland
- Ácido Sulfúrico (H_2SO_4), para la preparación de Estándar 0.5 de Mc. Farland
- Caldo Trypticase soya.

3.3.6. Equipos:

- Autoclave AUTESTER MOD. 437 – P
- Balanza analítica (Mettler Todelo AG 204)
- Baño termostataado SELECTA PRECISTERM
- Cámara de flujo laminar. (Magnehelic “Forma Cientific Model: 13089-799.
- Cámara fotográfica profesional SONY DSC – S3000
- Centrifuga CHRIST
- Potenciómetro - pHmeter CORNING PR 15
- Cocina eléctrica. (PRACTICA/Modelo: Cocina eléctrica HP1)
- Estufa de cultivo a 35 °C. (Merck / Model: 1235-2).
- Incubadora. JSB. MOD-ST 22 QV
- Pipeteador automático LABMATE SOFT
- Cabina de bioseguridad NUAIRE CLASS II
- Mechero de bunsen
- Micropipetas de 10, 20, 30 y 40 uL.
- Refrigerador de 2-8 °C (MABE Colombia / Modelo: RML10WHPN50).
- Rotavapor BÜCHI. Modelo R-3000 (equipo completo). 120V 60 Hz
- Vórtex MIXER MODEL VM-1000

3.4. PROCEDIMIENTO PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.

3.4.1. Procedimiento para la recolección de los extractos vegetales.

3.4.1.1. Recolección de la muestra vegetal.

Los rizomas de la *Curcuma longa* L., fueron recolectadas de las plantaciones de la Comunidad de Nina Rumi - carretera Zungarococha - san Juan – Iquitos, tomándose en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.

3.4.1.2. Identificación de la muestra vegetal.

La identificación de la muestra vegetal se realizó en el “Herbarium Amazonense” por el profesional botánico responsable, obteniéndose el documento de certificación de muestra emitido por el *Herbarium Amazonense*. (**Anexo N° 6**).

3.4.1.3. Molienda de la muestra vegetal.

Una vez identificada y seleccionada la materia prima, está fue depositada en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Industrias Alimentarias y cortada en trocitos lo suficientemente pequeños, secada y fue envasada en recipientes adecuados y conservadas en lugares secos y frescos. (**Ver Foto N° 2 en Anexo 7**).

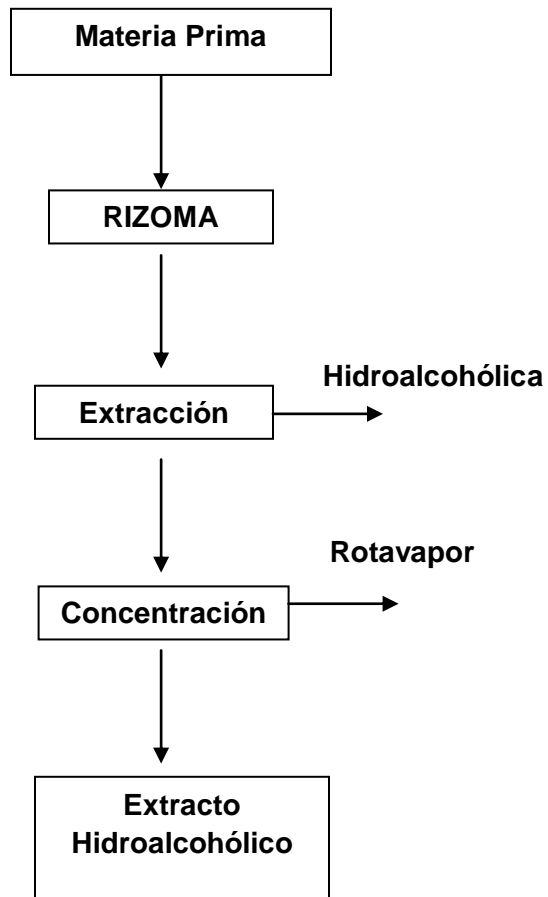
3.4.1.4. Obtención del extracto Hidroalcohólico.

El extracto hidroalcohólico se obtuvo por maceración de la muestra con etanol / agua (70:30), durante 7 días.

Para la extracción fueron macerados 2000 gramos de materia prima “Guisador”, en 3000 ml de etanol / agua (70:30), durante 7 días. La concentración del extracto se realizó por eliminación del disolvente a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 60° C y a una presión de 690 mmHg por espacio de 3 horas aproximadamente, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por

espacio de 3 a 5 días aproximadamente (Ver esquema N° 2) (Ver Foto N° 3, 4 en Anexo 8).

**ESQUEMA 2: ESQUEMA DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LA RIZOMA DE *Curcuma longa* (Guisador).**



3.4.2. Procedimiento de los ensayos de la actividad antibacteriana.

3.4.2.1. Recuperación de cultivos conservados

3.4.2.1.1. Congelados: ⁷²

Descongelar los tubos con las bacterias petrificadas a temperatura ambiente o en baño de agua a 36°C – 37°C, por una hora y Transferir a con el asa bacteriológica una pequeña muestra (bacterias en estudio), y mezclando por agitación en los tubos que contienen caldo nutritivo como medio apropiado para ejercer la reactivación de las bacterias. **(Ver Foto Nº 6 en Anexo 9).**

3.4.2.1.2. Reactivación de bacterias:

Los tubos que contienen a las bacterias con caldo nutritivo se incubaron a la temperatura de 36 °C a 37 °C por 24 horas, para ejercer una buena condición y reactivación bacteriológica. **(Ver Foto Nº 7 en Anexo 9).**

3.4.2.1.3. Cultivo en agar:

Dejar enfriar las placas que fueron retiradas de la estufa a 180 °C x 1 hora, retirando el papel de despacho en la cual estaban envueltas, para proceder a plaqu coastar con Agar Mueller Hinton, luego incubar en la estufa a 37 °C por 24 horas, para usarlo como control positivo (No debe crecer microorganismos en el Agar Mueller Hinton luego de las 24 horas).

Al extraer las placas del interior de la estufa, observar que no exista ningún tipo de crecimiento de microorganismos, de no ser así la placa será descartada para el experimento.

De los dos tubos (contienen Caldo nutritivo y bacterias incubadas por 24 horas), se extrae la muestra y se siembra por estrías con el asa bacteriológica esterilizada en las placas con contenido de agar Mueller Hinton que se incubaron de 35 - 37 °C durante 24 horas. **(Ver Foto Nº 8 en Anexo 9).**

3.4.2.1.4. Inoculación

Preparación del inóculo

Método de desarrollo previo:

- a. De las placas sembradas con bacterias se extrajo con el asa bacteriológica un aproximado de tres a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en agar Mueller Hinton. **(Ver Foto Nº 9 en Anexo 10).**
- b. Se transfirió a los tubos que contiene 10 ml de Cloruro de sodio 0.9 % (NaCl), hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mac. Farland y para un mejor homogenizado se utilizó el vortex. Por comparación visual se usó una luz apropiada y se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. **(Ver Foto Nº 10 en Anexo 10).**
- c. La suspensión del inóculo preparado contuvo aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL.
- d. La suspensión bacteriana se preparó agregando en los tubos 9.9 ml de Caldo Mueller Hinton, se utiliza 2 tubos para el estudio de cada bacteria. Luego de los tubos con cloruro de sodio 0.9 % que contiene las bacterias en estudio y con una determinada turbidez comparada con el Mac Farland, extraer 0.1 ml de los tubos y pasarlo a los tubos de la suspensión bacteriana que contienen 9.9 ml de Caldo Mueller Hinton, conteniendo un total en total 10 ml cada tubo. **(Ver Foto Nº 11 en Anexo 10).**
- e. La inoculación con la suspensión estandarizada debe hacerse dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación.

3.4.2.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima por el método de dilución en caldo (macrodilución).

3.4.2.2.1. Preparación y almacenamiento de las diluciones

Método de Macrodilución en caldo. (Ver esquema N° 3)

- Se pesó 640 mg del extracto en viales tipo eppendorf estériles, diluidos en 1 ml de disolución metanol/agua (1:1) para alcanzar una concentración de prueba de 640 mg/ ml (Solución madre o Stock).
- De la solución madre se sacó 0.2 ml y fue añadido al tubo N° 01 que contuvo 1.8 ml de caldo Mueller Hinton. **(Ver Foto N° 12 en Anexo 11)**
- Del tubo N° 01 se sacó 1 ml para ser añadido al Tubo N° 02 y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 08.
- Del tubo N° 08 se sacó 1 ml que fue desechado.
- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana. **(Ver Foto N° 13 en Anexo 11)**
- El volumen final mínimo, en cada tubo, fue de 2 ml. **(Ver Foto N° 14 en Anexo 11)**
- Las concentraciones fueron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml.
- Los extractos que no se disolvieron por agitación fueron mantenidos por algunos minutos en baño maría (temperatura de 40°C) y colocados nuevamente en el vórtex.

3.4.2.2.3. Lectura de los resultados

- La CIM fue la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo.
- El punto final quedó definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo.
- Para determinar el punto final de desarrollo, debió compararse cada tubo con el tubo control de crecimiento. **(Ver Foto 19, 20 y 21 en Anexo 17).**

Tabla N° 03: Clasificación de la actividad antimicrobiana según la concentración inhibitoria mínima (CIM)

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA
Inactivo	> 16 mg/ml
Poco activo	6 – 15 mg/ml
Moderado activo	1 – 5 mg/ml
Buena actividad	< 1 mg/ml

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007.⁷³

3.5. ANÁLISIS DE DATOS

El procesamiento de datos con respecto a las variables de estudio se realizó mediante el software estadístico SPSS 19.0 para Windows y Minitab versión en español, los cuales nos permitió elaborar cuadros de distribución de frecuencia, gráficos y calcular los datos estadísticos necesarios para el estudio.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN.

Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa*, son presentadas en tablas y gráficos que facilitan su visualización y clasificados de acuerdo a las especificaciones de la tabla N°3. Los resultados se evaluaron por el método de análisis de varianza (ANVA) utilizando el programa estadístico SPSS v 19.0 y las diferencias entre medidas fueron analizadas mediante el test de comparaciones. Valor $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

3.6. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS HUMANOS Y DE LOS ANIMALES

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

CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Tamizaje fitoquímico de la muestra vegetal *Curcuma longa* “Guisador”

TABLA N° 04: Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* “Guisador”.

<i>Curcuma longa</i> “Guisador”	
ENSAYOS PARA	RESULTADOS
Alcaloides	-
Taninos	-
Fenoles	+++
Aldehídos	-
Flavonoides	-
Saponinas	-
Mucílagos	+++
Lactonas	-
Cumarinas fijas	-
Azúcares Reductores	-
Esteroides	-
Triterpenos (carotenoides)	+++
Principios amargos	+++

Leyenda: (-) Ensayo Negativo; (+) Ensayo positivo

Contenido: (+++) Abundante; (++) mediano; (+) poco.

4.2.2. Resultados antibacterianos *in vitro* por el método de macrodilución

TABLA N° 05: Resultados obtenidos en el ensayo de concentración inhibitoria mínima del extracto hidroalcohólico de *Curcuma longa* “Guisador”.

	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	CIM	Clasificación	CIM	Clasificación
C1	32 mg/ml	Inactivo	32 mg/ml	Inactivo
C2	16 mg/ml	Inactivo	16 mg/ml	Inactivo
C3	8 mg/ml	Poco activo	8 mg/ml	Poco activo
C4	4 mg/ml	Moderado activo	4 mg/ml	Moderado activo
C5	2 mg/ml	Moderado activo	2 mg/ml	Moderado activo
C6	1 mg/ml	Moderado activo	1 mg/ml	Moderado activo
C7	0.5 mg/ml	Buena actividad	0.5 mg/ml	Buena actividad
C8	0.25 mg/ml	Buena actividad	0.25 mg/ml	Buena actividad

Gráfico N° 1: Concentración inhibitoria mínima para *Escherichia coli*

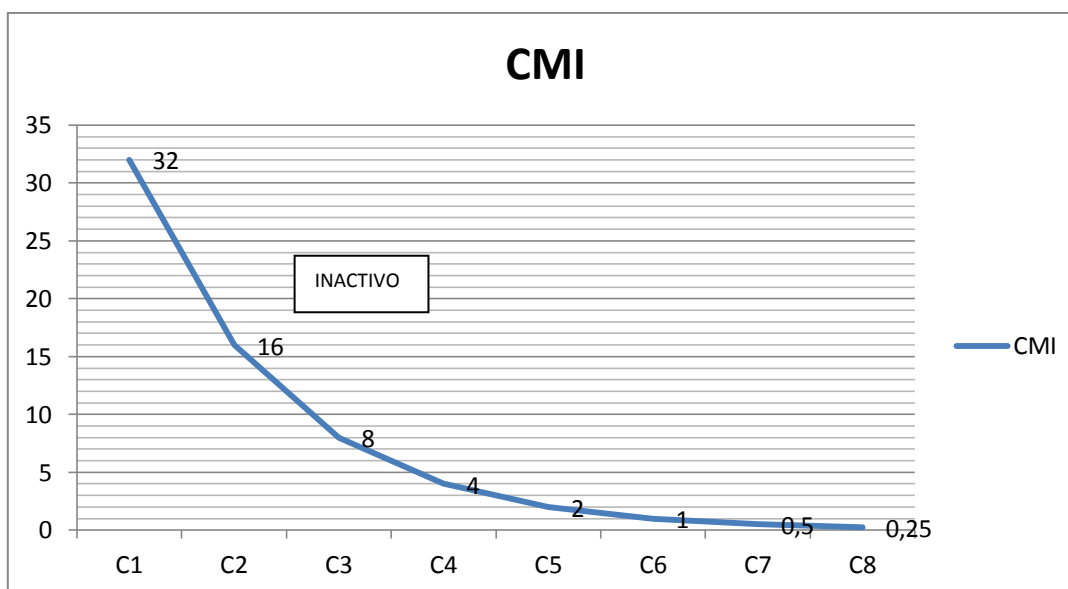
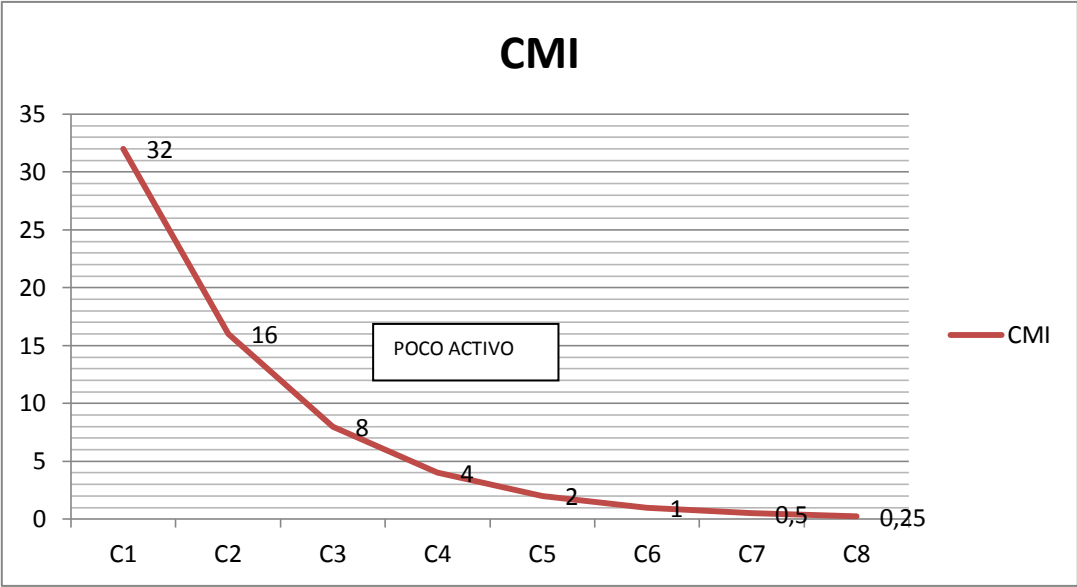


Gráfico N° 2: Concentración inhibitoria mínima para *Stahylococcus aureus*.



4.2. DISCUSIÓN

La especie vegetal *Curcuma longa* “Guisador” crece y se desarrolla en climas tropicales como de nuestra Amazonía. Esta es una planta foránea cuyo origen se establece en los países Asiáticos. Las condiciones de humedad y temperatura de los climas tropicales posibilitan el desarrollo de esta planta y de sus nutrientes.⁸⁶

La cúrcuma procedente de la India se considera una de las principales fuentes medicinales. Esta especie contiene un elevado contenido en curcumina. La curcumina que es su principal constituyente activo, posee un amplio abanico de efectos terapéuticos, incluyendo potentes propiedades antitumorales, antioxidantes y antiinflamatorias.⁸⁵

En la Amazonía peruana además de su uso como condimento el extracto de los rizomas se usa en el tratamiento de la hepatitis, cólicos, dolor de muela, analgésico y antiguamente en el tratamiento del Pián (cuchiye o frambesia proveniente del África occidental y que se difundió en la Amazonía), una enfermedad infecciosa, contagiosa y crónica (no venérea) que forma en la piel una pápula o una ulceración rosada, seguida de una erupción papulomatosa, seguido de adenopatías, dolor de cabeza y extremidades, fiebre moderada, causado por el *Treponema pertenue*.

En el estadio terciario se presentan modificaciones destructivas en la piel y en el sistema esquelético con una evolución parecida a la sífilis, antiguamente se trataba médicamente con salvarsán, un fármaco con efectos secundarios nocivos. En la actualidad solo se observa raramente esta enfermedad en aves de corral.²¹

Estudios realizados por diferentes autores, con respecto a la actividad antibacteriana, difieren un poco de los resultados obtenidos en el estudio de investigación y haciendo la comparación con los resultados de estas investigaciones se observa que tiene mucha importancia el lugar, condiciones ambientales, nutrientes del suelo, temperatura y el tipo de suelo, etc., los cuales influyen considerablemente en la obtención de los metabolitos de esta especie vegetal *Curcuma longa*.

El tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* "Guisador", dio como resultado la presencia de fenoles, mucílagos, principios amargos y triterpenos (sesterterpeno, carotenoide). (Ver tabla N° 4). Esta especie también contiene principalmente almidón y aceites esenciales que posibilitan su actividad antibacteriana,²¹ así como los curcuminoides.³²

Estos resultados obtenidos son similares a los reportados por Ramani et al. (2012), identificando la presencia de saponinas, fenoles, principios amargos y almidón.²⁸ Obire et al. (2009), refiere que las especies de la familia de las zingiberaceae revelan la presencia de fenoles, saponinas, triterpenoides, taninos.³⁷

Braga et al. (2003) y Mata et al. (2004), demostraron que el aceite esencial de cúrcuma es un potencial agente antimicrobiano, y dieron a conocer que varios componentes podrían ser responsables de esta actividad como fenoles, terpenos, aldehídos y cetonas, ya que varios de ellos han sido identificados junto con el aceite esencial de cúrcuma.^{43, 44}

Se utilizó el método de macrodilución (dilución en caldo) para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias en referencia a la actividad antimicrobiana que pueden presentar los extractos frente a microorganismos que presentan sintomatología común en nuestro medio interponiéndose el régimen de resistencia por parte de estos microorganismos. La técnica ensayada fue realizada según los procedimientos establecidos en el Protocolo del 2007 por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI por su

sigla en inglés, anteriormente conocido como NCCLS)⁸⁰, los resultados de la concentración mínima inhibitoria fueron clasificadas según el Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007.⁷³

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración bactericida mínima⁸¹ y la concentración inhibitoria mínima^{82, 83}, la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede ser inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 20 horas⁸⁴.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* mediante el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en un intervalo de concentración de 0.25 mg/ml hasta 32 mg/ml.

En lo referente a los resultados obtenidos queda demostrado que el extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* “Guisador” presenta poca actividad antibacteriana *in vitro* a concentración de 8 mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*, pero al mismo tiempo el extracto fue inactivo a concentración de 16 mg/ml frente a *Escherichia coli*. Esto en comparación con el antibiótico gentamicina (160 mg/2ml) que se usó como control positivo para comparar la actividad del extracto.

Estos resultados contradicen lo reportado por Ramani et al. (2012), que establece el hecho de que el extracto metanólico del rizoma de *Curcuma longa* mostró una máxima actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* que en relación con otras bacterias.²⁸ También este hecho fue contradecido por Sunilson et al. (2009), donde estableció que la actividad antimicrobiana del extracto metanólico del rizoma de *Curcuma longa* y de las demás especies de la familia de las zingiberáceas mostraron actividad antimicrobiana contra las bacterias y hongos más comunes transmitidas por los alimentos comunes tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus* y hongos como

Saccharomyces cerevisiae, *Hansenula anomala*, *Mucor mucedo*, *Candida albicans*.³⁸

Kiran et al. (2011) y Péret et al. (2008), coincidieron en que la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* de los extractos del rizoma de *Curcuma longa* se encuentra en el aceite esencial, aumentando está según la concentración.^{31, 40} Braga et al. (2003) y Mata et al. (2004). afirmaron que el aceite esencial de cúrcuma es un potencial agente antimicrobiano, dando a conocer que varios componentes también podrían ser responsables de esta actividad como fenoles, terpenos, aldehídos y cetonas, ya que varios de ellos han sido identificados juntos con el aceite esencial de cúrcuma.^{43, 44} En cambio Lee et al. (2003) y Negi et al. (1999), refieren que la fracción de aceite esencial de cúrcuma presenta mayor porcentaje de α -turmerona mostrando una mayor actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y bacterias como *Bacillus subtilis*.^{45, 46.}

La actividad antibacteriana del extracto acuoso del rizoma de *Curcuma longa* según Pranay et al (2010), es muy eficaz frente a bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli* y otras Gram-positivas como *Bacillus subtilis*.³⁴ En referencia a esto Sangvanich et al. (2010), haciendo estudios del extracto acuoso del rizoma de la misma especie *Curcuma longa* proveniente del estado asiático de la India, determinó que la actividad antibacteriana estaba en función creciente según el tipo de cepa utilizada para la concentración inhibitoria mínima, dando como resultado valores de 0.002, 0.005, 0.011, 0.09, y 0.046 mg/ml para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*.³⁵

Según a esto Choi et al. (2009), estableció que la extracción con el solvente adecuado determina los componentes y la actividad de la especie vegetal en estudio repercutiendo en la inhibición favorable o desfavorable de las bacterias. Al mismo tiempo demostró la actividad antimicrobiana del rizoma de *Curcuma longa* "cúrcuma" en fracciones del extracto de acetato de etilo en microorganismos tales como *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, en 1.000 ug /disco.³⁶

Lo mismo coincidió Kang et al. (2005), donde demostró que la actividad antibacteriana del extracto de acetato de etilo del rizoma de la *Curcuma longa*, fue mayor en relación a la actividad antibacteriana del extracto de metanol y el extracto de agua frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), la actividad del extracto fue de 2 mg/ml de en comparación con el grupo control.⁴¹

Gul et al. (2004), demostró que el extracto alcohólico del rizoma de la cúrcuma, inhibe el crecimiento *in vitro* de algunas bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, sin embargo, no inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*, este resultado puede estar relacionado con el hecho de que estas bacterias no poseen la membrana externa capaz de restringir la penetración de la sustancia química exógena.⁴² Singh et al. (2002), en referencia a esto contradice lo afirmado por otros autores donde demuestra que el extracto alcohólico del rizoma de cúrcuma presenta una débil actividad antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, los extractos que fueron utilizados en etilenglicol, solo inhibieron el crecimiento de *S. aureus*.⁴⁷

Se confirma lo establecido por Mozioglu et al. (2008), donde evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico del rizoma de la *Curcuma longa*, presentándose una gran actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Al mismo tiempo se presentó una débil actividad antibacteriana contra *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli* y antifúngica contra *Candida albicans* en función de la extracción etanólica de la cúrcuma. De igual manera con las especies del *Mycobacterium* no se presentó actividad antibacteriana.³⁹

El extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* según Falco et al. (2011), mostro actividad antibacteriana y antifúngica contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces sake* y *Aspergillus oryzae*, mediante el

método de macrodilución. Concluyendo según los resultados obtenidos, que el extracto hidroalcohólico de cúrcuma mostró actividad contra *Escherichia coli* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 1,55 mg/ml de extracto y para *Staphylococcus aureus* 0,75 mg/ml de extracto. Para *Saccharomyces sake* los extractos de cúrcuma presentaron actividad fungistática y para *Aspergillus oryzae* se inhibió con la concentración de 5,65 y 3,11 mg /ml. El extracto hidroalcohólico de limoncillo no presentó actividad antimicrobiana.²⁹

Pratap et al (2011). Evaluó la actividad antimicrobiana del contenido de aceite volátil y curcuminoides totales extraídos del rizoma de *Curcuma longa*, contra las bacterias médicamente importantes: *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*. Dos especies de hongos fueron seleccionadas: *Aspergillus Níger* y *Candida albicans*. Se utilizó Kanamicina como droga estándar para la actividad antibacteriana y Fluconazol como estándar para la actividad antifúngica. Concluyendo que los curcuminoides mostraron una elevada actividad antibacteriana así como también antifúngica contra todas las tensiones de microorganismos en comparación con el aceite volátil extraído de la cúrcuma.³⁰

Según Aslam et al. (2010), hace referencia que la actividad antibacteriana de la cúrcuma asiática "*Curcuma longa*" fue en base al contenido de aceite esencial y de curcuminoides totales.³²

Además se estableció que el extracto de cúrcuma en etanol tiene un alto potencial inhibitorio para las bacterias patógenas de camarón y pollo que también invaden al ser humano, en mayor grado que el extracto del hexano y de curcuminoides, siendo más sensible *Staphylococcus aureus* a concentración de 2.5 mg/ml, según lo demuestra Lawhavinit et al. (2010).³³

Pranay et al (2010), hace referencia que las hojas del extracto acuoso de la *Curcuma longa* (cúrcuma) y *Zingiber officinale* (jengibre), tuvieron una mejor actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Y que la máxima actividad antibacteriana se mostró por parte del extracto acuoso de *Zingiber officinale* seguido de *Curcuma longa*³⁴

El extracto etanólico demostró ser el más potente que el extracto acuoso con respecto a la actividad inhibitoria antimicrobiano de plantas pertenecientes a la familia de las zingiberaceae, siendo la más importante *Curcuma longa*, frente a bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y hongos como *Candida albicans*, utilizándose el método de macrodilución la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de etanólico varió entre 0.5 - 1.0 mg/ml en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Para el extracto acuoso, la MIC fue de 1,0 mg/ml en *E. coli* y osciló entre 0.5- 1.0 mg/ml en *S. aureus* y *C. albicans*. Por lo que en total, la concentración de 1,5 mg/ml dio la inhibición máxima a los tres microorganismos de ensayo, esto lo refiere Obire et al. (2009).³⁷ Por lo tanto es necesario evaluar la actividad antimicrobiana en otros solventes como etanólico, agua, clorofómico o con acetato de etilo debido a que una planta puede contener centenares de metabolitos secundarios de diferente polaridad y que su concentración aumentaría al extraerlos con otros solventes.

4.3. CONCLUSIÓN

El extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* "Guisador", presentó los siguientes metabolitos secundarios: Fenoles, triterpenos (carotenoide, sesterterpenos), principios amargos y mucílagos.

El extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* "Guisador", evaluado mediante el método de macrodilución, se obtuvo como resultado una concentración inhibitoria mínima de 8 mg/ml para *Staphylococcus aureus* clasificándolo como poco activo y 16 mg/ml para *Escherichia coli*, que se clasificó como inactivo, esto en comparación con el control positivo (Gentamicina).

La concentración inhibitoria mínima de la gentamicina fue de 4 µg/ml tanto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

4.4. RECOMENDACIONES

- Ya que la información etnofarmacológica muestra importancia en esta especie vegetal en diferentes tipos de infecciones, se recomienda realizar estudios de actividad antiparasitaria frente a parásitos y otros tipos de patógenos.
- Controlar adecuadamente los factores como temperatura y tiempo de incubación durante el desarrollo de la evaluación de sensibilidad antimicrobiana para evitar la contaminación de otros hongos ambientales que puedan interferir en el ensayo.
- Desarrollar estudios farmacológicos y toxicológicos que validen su uso en base a su probada inocuidad y su importante actividad farmacológica en el tratamiento de enfermedades como: cáncer de piel, hepatitis, artritis reumatoidea e infecciones de diferente índole.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

1. Butterfield D. et. Al., (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. J Nut Biochem. 444-61 pp.
2. Kuklinski C. (2000) Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona, España
3. Brack A. (2000). Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas. Cuzco, Perú.
4. Marcen Letosa J. Antimicrobianos naturales. Medicina Naturista. 2000; N° 2, 104 – 108 Pp.
5. Kasper, Dennis L.; Braunwald, E.; Fauci, A.S.; Hauser, S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L.; Isselbacher. (2005). Eds. Harrison principios de medicina interna. 16ª Edición. Sección 5. Capítulo 120.
6. Kasper, Dennis L.; Braunwald, E.; Fauci, A.S.; Hauser, S.L.; Longo, D.L.; Jameson, J.L.; Isselbacher. Eds. (2005). Harrison Principios de medicina interna. 16ª Edición. Sección 6. Capítulo 134.
7. Obregón L. (2003). Fitoterapia: Importancia de su desarrollo al servicio de salud. FITO 2003. Lima, Perú.
8. Machado L. (2003). Materia primas vegetales para la industria de fitofármacos FITO 2003 Lima- Perú.
9. Mejia K, Rengifo E. (2000). Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana. Segunda edición AECI-GRL-IIAP. Pag 7 - 8

10. Gutiérrez W. Vílchez L. Pinto H. Alva A. Isuiza O. Pinedo E. Grández C. García G. Identificación y formas de uso de plantas medicinales por los pobladores de las comunidades aledañas a la facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNAP, Nina - Rumi, San Juan Bautista. Conocimiento (Iquitos). 2010; 9(1): 42-62.
11. Instituto Nacional de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en Hospitales del Perú: Ministerio de Salud; 2008.
12. Maldonado F. Llanos F. Zavaleta J. Uso y prescripción de medicamentos antimicrobianos en el Hospital Apoyo de la Merced. Revista Médica Peruana. 2002; N° 19, 181-185.
13. Espinoza V. Muñoz F. Gérmenes bacterianos más frecuentes y su patrón de sensibilidades y resistencias en un Hospital Pediátrico de tercer nivel. [Tesis para obtener el título de Pediatría Médica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2011.
14. Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20. Secretaria Distrital de Salud. Bogotá: Grupo para el control de la resistencia bacteriana de Bogotá. 2010.
15. Vallejos C. Calderón J. Dongo V. Yarasca P. Vásquez L. Estrategias y metodologías de intervención para mejorar el uso de los antimicrobianos en el ámbito hospitalario. DIGEMID. 2006; N° 1000, 15.
16. Instituto Nacional de Salud. Informe de la resistencia antimicrobiana en Hospitales del Perú: Ministerio de Salud; 2007.

17. Rengifo E. Estudio preliminar etnofarmacológico en la Comunidad Nativa Bora de Brillo Nuevo, en el Distrito de Pevas-Loreto. Proyecto: prospección y evaluación de sustancias bioactivas y productos naturales en la Amazonía. IIAP. 2010; 2-18.
18. García C. Benítez P. Pacheco I. Chávez B. Cerezo O. Alternativa de Desarrollo Tecnológico para la recuperación de las fracciones extractables y caracterización de los componentes claves Curcumina y Cariofilino contenidos en el Rizoma de la Curcuma (*Curcuma longa*) para su agro-industrialización en Guatemala. DIGI. 2001; N°1, 1-49.
19. Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas. Cultivo: Plantas medicinales y aromáticas. Curcuma (*Curcuma longa*), estevia (*Stevia rebaudiana*), jengibre (*Zingiber officinale*), anamú (*Petiveria alliacea*), limonaria (*Cymbopogon citratos*), ruda (*Ruta graveolens*). Fundación Chemonics Colombia; 2003, Pág.11.
20. Montaña C. Montes L. Evaluación Sistémica de Potencialidades Empresariales a partir de la *Curcuma Longa* en el Departamento de Caldas. ESPE. 2004; N° 1, 5.
21. Ducke A. 2009. Phytochemical and Ethnobotanical. DATABASES. USA. Pág 1 – 19.
22. Laffita O. Castillo A. Avances en la caracterización farmacotóxica de la planta medicinal *Curcuma longa* Linn. MEDISAN. 2012; Vol.16 N° 1,1- 29.
23. Bravo, L. Marbuendo, E. 2006. Farmacognosia de las Drogas Naturales. Rizoma de *Curcuma longa* L. Zingiberaceae. Publicación Elsevier. España. Pág. 130 – 131.

24. Mesa D. Ramírez C.; Aguilera M. Ramírez A. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* y curcuminoides. *Ars Pharmaceutica*. 2000; Vol. 41, N° 3, 307-321.
25. Bengmark S. Mesa M. Gil A. Efectos saludables de la cúrcuma y de los curcuminoides. Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos. 2001;1-26.
26. Aplicaciones cosméticas de los aceites esenciales y compuestos naturales en el cuidado de la piel. Unidad de vigilancia tecnológica. CENIVAN. 2008; 2-77.
27. Vistel M. *Curcuma longa* L. Un estudio integrador. INFOGEST; 2003.
28. Ramani K. Satpal B. Mishra R. Amrita P. Praveen B. Antimicrobial properties of few plants used in traditional system of medicine. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*. 2012; Vol. 3, N° 4, 563-564.
29. Falco A. Martínez W. Rodríguez J. Sevillano, E. Actividad antimicrobiana de extractos hidroetanólicos de limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y cúrcuma (*Curcuma longa*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2011; Vol. 2, N° 1, 85 - 93.
30. Pratap R. Jain D. Evaluation of Antimicrobial activity of Volatile Oil and total Curcuminoids extracted from Turmeric. *International Journal of Chem Tech Research*. 2011; Vol. 3, N° 3, 1172-1178.
31. Kiran B. Lalitha V. Raveesha. Antifungal and antibacterial potentiality of six essential oils extracted from plant source. *International Journal of Engineering Science and Technology*. 2011; Vol. 3, N° 4, 3029-3038.

32. Aslam F. Naz S. Jabeen S. Ilyas S. Manzoor F. Antibacterial activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of bacteria. Pak. J. Bot. 2010; Vol. 1, N°42, 455 – 462.
33. Lawhavinit O. Kongkathip N. Kongkathip B. Antimicrobial Activity of Curcuminoids from *Curcuma longa* L. on Pathogenic Bacteria of Shrimp and Chicken. Kasetsart J. (Nat. Sci.). 2010; N° 44, 364 – 371.
34. Pranay J. Dinesh B. Pragya B. Antibacterial activity of aqueous plant extracts against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Drug Invention Today. 2010; Vol. 2, N° 4.
35. Sangvanich P. Petnual P. Karnchanatat A.A Lectin from the Rhizomes of Turmeric (*Curcuma longa* L.) and Its Antifungal, Antibacterial, and α -Glucosidase Inhibitory Activities. Food Science and Biotechnology. 2010; Vol. 19, N° 4, 907-916.
36. Choi H. Sookmyung Y. Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from UIGeum (*Curcuma longa* L.). Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition. 2009; Vol. 38, N° 9, 1202-1209.
37. Obire O. Okigbo R. Anuagasi C. Potential inhibitory effects of some African tubereous plant extracts on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. International Journal of Integrative Biology. 2009; Vol. 6, N° 2, 91-98.
38. Sunilson J. Suraj R. Rejitha G. Anandarajagopal K. Gnana A. Promwichit P. In vitro Antimicrobial Evaluation of *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* and *Alpinia galanga* Extracts as Natural Food Preservatives. American Journal of Food Technology. 2009; Vol. 4, N° 5, 192-200.

39. Mozioglu E. Cikrikci S. Yilmaz H. Biological Activity of Curcuminoids Isolated from *Curcuma longa*. Rec. Nat. Prod. 2008; Vol 2, Nº 1, 19-24.
40. Péret L. Cunha C. De Aguiar E. Goncalves R. Junqueira. Abreu M. Actividad antimicrobiana in vitro del rizoma en polvo, pigmentos curcuminoides y aceites esenciales *Curcuma longa* L. Ciencia y Tecnología de los alimentos. AGROTEC. 2008; Vol. 32, Nº 3.
41. Kang-Ju K. Hyeon-Hee Y. Jung-Dan C. Se-Jeong S. Na-Young C. Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Phytotherapy Research. 2005; Vol.19, Nº7, 604.
42. Gul N. Mujahid, Y. Jehan N. Ahmad S. Estudios sobre el efecto antibacteriano de las diferentes fracciones de *Curcuma longa* contra aislamientos urinarios de infección de las vías. Pakistán Diario de Ciencias Biológicas. 2004; Vol. 7, Nº 12, 2055 - 2060.
43. Braga M. Leal P. Carvalho E. Meireles M. Comparación de la actividad antioxidante, composición y rendimiento de los extractos de cúrcuma (*Curcuma longa* L.) obtenidos mediante diversas técnicas. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton. 2003; Vol.51, 6604 - 6611.
44. Mata R. Nelson L. Afonso R. Junqueira G. Identificación de compuestos volátiles de cúrcuma usando microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Ciencia y Tecnología de Alimentos, Campinas. 2004; Vol. 24, Nº 1, 151-157.

45. Lee S. Choi J. Cho Y. Ahn J. Actividad fungicida de α -turmerona identificada en el rizoma de *Curcuma longa* contra seis hongos fitopatógenos. *Biotecnología Agrícola y Química*, [PSA]. 2003; Vol. 46, Nº 1, 25-28.
46. Negi S. Jayaprakasha L. Rao M. Sakariah K. Actividad antibacteriana del aceite de cúrcuma: un subproducto de la fabricación de la curcumina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 1999; Vol. 47, 4297-4300.
47. Singh R. Chandra R. Bose M. Luthra, M. Actividad antibacteriana del extracto del rizoma de *Curcuma longa* sobre las bacterias patógenas. *Current Science*, Bangalore. 2002; Vol. 83, Nº. 6, 737-740.
48. Alvis A. Arrazola G. Martinez W. Evaluación de la Actividad y el Potencial Antioxidante de Extractos Hidro-Alcohólicos de Cúrcuma (*Cúrcuma longa*). *Inf. tecnol.* 2012; Vol. 23, Nº 2.
49. Kumar M. Singh S. Subudhi E. Nayak N. Chemical Composition of Leaf and Rhizome Oil of an Elite Genotype *Curcuma longa* L. from South Eastern Ghats of Orissa. *Pub Med.* 2010; Vol. 3, Nº 7.
50. Enríquez A. Prieto E. De Los Ríos E. Ruiz S. Estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe "Jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú. *Rev. Med. Vallejana.* 2008; Vol.5, Nº 1.

51. Barrero M. Carreño R. Evaluación de los aceites esenciales de la cúrcuma cultivada en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 2000; 50(1): 67-81.
52. Barrero M. Carreño R. Evaluación de los pigmentos de cúrcuma cultivada en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 1999; 49 (4): 491-504.
53. Barrero M. Carreño R. Evaluación histoquímica de los rizomas de cúrcuma cultivada en Venezuela. *Agronomía Tropical*. 1999; Vol. 49, N° 3, 349-359.
54. Iglewski B. 1996. *Pseudomonas*. In: Baron`s Medical Microbiology 4^{ta} edición. Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
55. Kasper Dennis L. Braunwald E. Fauci A.S. Hauser S.L. Longo D.L. Jameson J.L. Isselbacher. Eds. HARRISON Principios de medicina interna. 16^a Edición. Sección 5. Capítulo 120.
56. <http://www.educa2.madrid.org/web/educamadrid/principal/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/16.-%20Estafilococos.pdf> acceso día 26 de febrero de 2013, 17:15.
57. <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v17n2/art10.pdf> acceso día 26 de febrero de 2013, 17:20.
58. <http://seq.es/seq/0214-3429/21/4/mensa.pdf> acceso día 26 de febrero de 2013, 18:30.

59. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/patogNOMStaphylococcus_aureus_17365.pdf acceso día 28 de enero de 2013, 17:43
60. Rotger R. 1997. Microbiología Sanitaria y Clínica, Editorial Síntesis España. 297-231 PP.
61. Brook G. Carroll K. Butel J. Morse S. Microbiología médica. 19ª Edición. Editorial Manual moderno. Bogotá – Colombia. 2008, 235 - 275.
62. Kasper Dennis L. Braunwald E. Fauci A.S. Hauser S.L. Longo D.L. Jameson J.L. Isselbacher. Eds. HARRISON Principios de medicina interna. 16ª Edición. Sección 5. Capítulo 134.
63. <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v44n5/14036.pdf> acceso día 26 de febrero de 2013, 19:18
64. http://bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf acceso día 28 de febrero de 2013, 19:58
65. Maldonado F. Llanos F. Zavalaga J. 2002. Uso y prescripción de medicamentos antimicrobianos en el Hospital de Apoyo de la Merced. Revista Peruana Médica. Lima- Perú. Vol. 19. Pág. 181-185.
66. Cechinel V. Yunes A. 1998. Estrategias para obtener compuestos farmacológicamente activos a partir de plantas medicinales. Información sobre modificación estructural para optimizar las actividades. Quím. Nova, São paulo. Vol. 21, Nº1, 99-105 pp.
67. Phillipson D. 2001. Fitoquímica y plantas medicinales. Phytochemistry. Vol. 56, 237-243.

68. Newman J. Gragg M. Snader M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. *J. Nat. Prod.* Vol. 66, 1022-1037 pp.
69. Amorim C. Lima A. Higino S. Silva S. 2003. Fitoterapia: Instrumento para una mejor calidad de vida. *Infarma*. Albuquerque, U.P. Vol. 15, Nº 1-3, Pp 66-69.
70. Gul N. Mujahid, Y. Jehan N. Ahmad S. Estudios sobre el efecto antibacteriano de las diferentes fracciones de *Curcuma longa* contra aislamientos urinarios de infección de las vías. *Pakistán Diario de Ciencias Biológicas*. 2004; Vol. 7, Nº 12, 2055 - 2060.
71. Taroco V. Seija R. Vignoli C. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Procedimientos de Microbiología Clínica*. 2001; 663 - 670.
72. Sacsquispe, R. Velásquez, J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002.
73. Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007.
74. Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Sensibilidad antibacteriana a antibióticos. http://www.danival.org/microclin/antibiot/madre_antibiot.html. 2008.
75. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard.

NCCLS Document M2-A7. 7th ed. Villanova: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2000.

76. Valera A. Souza V. Cerritos R. Cruz A. Susceptibilidad microbiana a antibióticos y extractos naturales. Manual de prácticas laboratorio de biología de procariontes. Valores referenciales estándares de Concentración Mínima Inhibitoria de gentamicina. 2010.
77. Schabra S.C., Ulso F.C., Mshin E. N. (1984) Phytochemical screening of Tanzanian medical plants. *Ethnopharmacol.*
78. Wagner, H., Bladt, S. y Zgainski, E.M. (1984). *Plant Drug Analysis*. Springer-verlag. Berlín Heidelberg New York Tokyo.
79. Ruiz M., Wilfredo y Sáenz S., César. (2000). Screening Fitoquímico de Productos Naturales. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (LIPNAA).
80. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement. January. M100-S17. Vol. 27, Nº1. Replaces M100-S16. Vol. 26, Nº3.
81. National Committee for Clinical Laboratory. Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, in press. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa
82. Isada, C.M., Bernard, L.K., Goldman, M.P., Gray, L.D., Aberg, J.A. *Infectious diseases handbook including antimicrobial therapy and diagnostic test/procedures*, pp. 163, 2001.

83. McDermott, P.F., Bodeis-Jones, S.M., Fritsche, T.R., Jones, R.N., Walker, R.D. Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 43, pp. 6136, 2005.
84. Andrews, J.M. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *J. Antimicrob Chemother*, Vol. 48(31), pp.5, 2001.
85. Wexler B. Propiedades de la cúrcuma a nivel mundial. Woodland Publishing Inc. 2008; N° 9, 3.
86. Judd, Campbell, Kellogg, Stevens, Donoghue. *Plant Systematic* 2002. Editorial. Sinauer. Associates Inc. USA. Pág. 292 – 295.
87. Pinheiro, M. S. de; Oliveira, M. M. E., Abreu, F. J. de, Lacerda, M. M. I.; Aragao, C. A. 1991 *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza (Brasil): E.U.F.C. Laboratorio de produtos naturais. 416 pp.
88. Evans-Trease. 1991. *Farmacognosia* 113a edición. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México. Pág 504 – 505.

4.6. ANEXOS

ANEXO 1

IMAGEN SATELITAL DE LA UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LA COMUNIDAD DE NINA-RUMI.

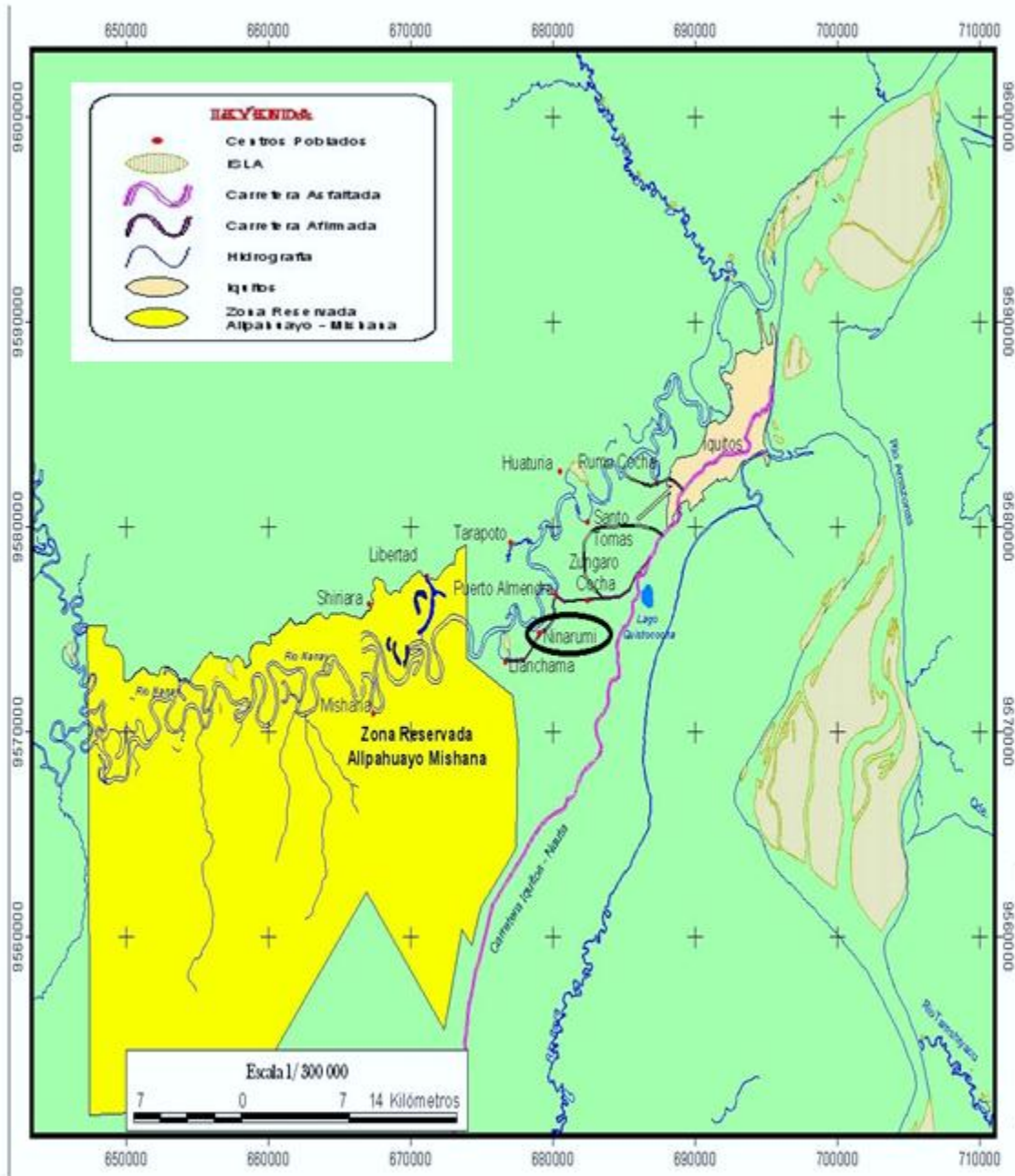


IMAGEN N° 01: Ubicación geográfica de la Zona Campesina de Nina Rumi.

ANEXO 2

FORMATO DE RECOLECCIÓN DE LOS DATOS DE LA ESPECIE *Curcuma longa*.

Nº de Ficha:	
<u>FICHA DE CAMPO</u>	
DATOS GENERALES:	
Lugar de colección:.....	Distrito:.....Provincia:.....
Fecha:.....	Tipo de Bosque:.....
Coordenadas UTM: (X).....	(Y).....
Tipo de Suelo:.....	Otras características:.....
Nombre del Colector:.....	Nº Colección:.....
TAXONOMÍA:	
Familia Vegetal:.....	Nombre Científico:.....
Nombre Vulgar:.....	
CARACTERÍSTICAS VEGETALES:	
Habitat:.....	Estadío Productivo:.....
Posición de Hojas:.....	Presencia de Órganos Accesorios en Hojas:.....
Forma del Tallo:.....	Órganos Accesorios en Tallo:.....
Características de la Corteza:.....	Látex:.....Color de Látex:.....
Tipo de Inflorescencia:.....	Posición de Inflorescencia:.....
Tipo de Flor por Sexo:.....	Nº de Pétalos:.....Unión de Sépalos:.....
N de Estambres:.....	Posición de Estambres:.....
Posición de Ovarios:.....	Nº de Carpelos:.....
Tipo de Fruto:.....	Consistencia:.....Dehiscencia:.....
DATOS ETNOFARMACOLÓGICOS:	
Uso Medicinal 1:.....	Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....	Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 2:.....	Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....	Forma de Preparación:.....
Uso Medicinal 3:.....	Parte Usada:.....
Cantidad Usada :.....	Forma de Preparación:.....
COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO:	
Peso:.....	
Parte Colectada:.....	
Observaciones:.....	
.....	

ANEXO 3.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE VEGETAL *Curcuma longa*



FOTO N°22: Especie botánica *Curcuma longa*

ANEXO 4

MUESTRAS BACTERIOLÓGICAS DEL ESTUDIO.



Figura 2: Especie bacteriológica de *Staphylococcus aureus*. a) Representación de la visión por medio del microscopio de las colonias *Staphylococcus aureus* b) Medio de cultivo sólido Agar sangre utilizado para el crecimiento bacteriológico c) Características fenotípicas de los cocos Gram-positivo presentando la forma de racimos de uvas.

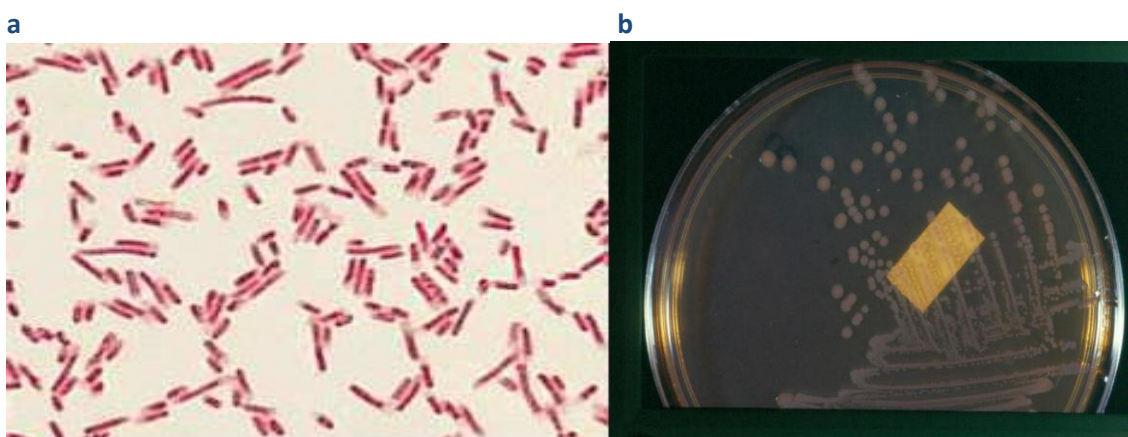


Figura 3: Especie bacteriológica *Escherichia coli*. a) Representación de las características microscópicas de la especie Gram-negativa *Escherichia coli*, siendo una bacteria virulenta, inmóvil, presentando forma de cilíndrica de bacilo alargado. b) Representación del cultivo específico agar sangre utilizado para el crecimiento de las colonias de *escherichia coli* que presenta brillo metálico.

ANEXO 5

TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Obtención de los extractos a partir de la droga cruda

Se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico, los cuales presentaron mayor actividad en el ensayo antibacteriano. A continuación se detalla cada uno de los ensayos fitoquímicos para la identificación de metabolitos secundarios.

- **Identificación de Alcaloides: Ensayo de Dragendorff.**
La fracción se disolvió en 1ml de ácido clorhídrico al 1% en ausencia de solvente orgánico, se mezcla con 1 gota de reactivo, si hay opalescencia se considera (+), turbidez (++) , precipitado (+++) de color rojo ladrillo.

- **Identificación de Aminoácidos y Aminas: Ensayo de Ninhidrina.**
Se tomó una alícuota del extracto en etanol, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, este se evapora a sequedad en ambos casos se mezcla con 2ml en solución de Ninhidrina en alcohol. La mezcla se calentó de 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un azul violáceo.

- **Identificación de aldehídos: Ensayo de Fehling.**
El residuo se disolvió en 1-2 ml de agua, en caso que la fracción no sea acuosa, se adiciona 2 ml del reactivo, se calienta la mezcla en baño de agua durante 10-30 min. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

- **Identificación de cumarinas: Ensayo de Baljet.**
Permitió reconocer en un extracto la presencia de compuestos de agrupamientos lactónidos, en particular cumarinas, aunque estos compuestos lactónidos pueden dar positivo al ensayo: como lactonas

sesquiterpénicas, etc. Por ello si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol debe evaporarse el solvente en baño de agua, y redisolverse en la menor cantidad de alcohol.

En estas condiciones se adiciona 1 ml de reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo respectivamente.

➤ Identificación de glicósidos: Ensayos de Molish.

2 ml del extracto se mezcla en un tubo de ensayo y se le añade 3 gotas de solución o-naftol al 5% en etanol. Se mezcla y por la pared del tubo se adiciona 1ml de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de anillo violáceo en la interface indica reacción positiva.

➤ Identificación de glicósidos cardiotónicos: Ensayo de Kedde.

La fracción se disueltió en 1 ml de alcohol etílico se mezcla con 1 ml de reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos. Un ensayo positivo es aquel en el que se desarrolla una coloración violácea persistente durante 1-2 horas.

➤ Identificación de flavonoides: Ensayo de Shinoda.

A 5 ml de la fracción ácida se le adicionó 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y una alícuota de magnesio metálico o zinc. Cuando la reacción termina, se añade 1 ml de alcohol amílico y se agita.

El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, anaranjado, carmelita o rojo intenso en todos los casos.

➤ Identificación de fenoles y/o taninos: Ensayo de Cloruro Férrico.

A la fracción disuelta en 1 ml de etanol, se le añadió 0.5 ml de una solución de Cloruro Férrico al 5% en solución salina. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o

taninos. El extracto acuoso se adiciona acetato de sodio previo al ensayo.

➤ Identificación de mucílagos: Ensayo de mucílagos.

Permitió reconocer en los extractos vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un alcaloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua cuando se extrae.

Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gomosa al tacto el ensayo es positivo.

➤ Identificación de quinonas: Ensayo de Bornträger

La fracción se disolvió en 1ml de cloroformo, se agita con 1ml de solución de NaOH al 5% en agua. Si la fase acuosa alcalina (superior), se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo (naftoquinona y antraquinona).

➤ Identificación de saponinas: Ensayo de espuma.

Permitió reconocer la presencia de saponinas tanto del tipo esferoidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla frecuentemente durante 2 mint. El ensayo se considera positivo si aparece espuma de más de 2 mm de altura en la superficie y persiste por más de 2 minutos.

➤ Identificación de Triterpenos: Ensayo de Liebermann-Buchard.

A 2g de la muestra disolver en 1ml de anhídrido acético y mezclar bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan correr 2 ó 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado, sin agitar: Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- Rosado a azul muy rápido
- Verde intenso a visible aunque rápido
- Verde oscuro a negro final de la reacción

A veces el ensayo queda en fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio ocurre generalmente cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Esta reacción se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los Triterpenoides; las primeras producen coloración azul o azul verdosa, mientras que en las segundas se observa rojo, rosado o púrpura.

Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que pueden estar presentes.

- Identificación de Principios amargos: Ensayos de principios amargos y astringentes.

El ensayo se realizó probando el sabor a una gota del extracto del vegetal y reconociendo el mismo al paladar

ANEXO 6

CONSTANCIA DE MUESTRA BOTÁNICA.



UNAP

Herbarium Amazonense - AMAZ

Centro de Investigación de Recursos Naturales

Constancia

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, HACE

CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por Velasco Chong, Jonás Roberto y Navarro Navarro, Pedro Aldo; pertenece al proyecto "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA in vitro DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Curcuma longa* L. (guisador), MEDIANTE EL METODO DE MACRODILUCION FRENTE A *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*"; el cual fue identificado en este Centro de Enseñanza e Investigación AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indican:

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMÚN
ZINGIBERACEAE	<i>Curcuma longa</i> L.	guisador

Se expide la presente constancia a los interesados para los fines que se estime conveniente.

Iquitos, 30 de Noviembre del 2012

Atentamente,


Blga. FELICIA DÍAZ JARAMA
Coordinadora, AMAZ-CIRNA-UNAP


ANEXO 7.

MUESTRA DE ESTUDIO: RIZOMAS DE *Curcuma longa*



Foto 1: Se separó 2 kg de los rizomas de *Curcuma longa* y se cortó en fragmentos pequeños.



Foto 2: Maceración del extracto hidroalcohólico de la muestra vegetal.

ANEXO 8

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS RIZOMAS DE *Curcuma longa* L.



FOTO 3: Proceso de extracción hidroalcohólica de los rizomas de *Curcuma longa* L. “Guisador” mediante extracción en rotavapor realizado en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP).



FOTO 4: Obtención del extracto hidroalcohólico de los rizomas de la *Curcuma longa* “Guisador” realizado en el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP).



FOTO 5: Secado del extracto hidroalcohólico de los rizomas de *Curcuma longa* “Guisador”, en placas por espacio un espacio de 3 días aproximadamente. Obtención del extracto seco en polvo de *curcuma longa* “guisador”.

ANEXO 9.

RECUPERACIÓN DE CULTIVOS CONSERVADOS CON REFERENTE A SU REACTIVACIÓN E INCUBACIÓN PARA OBTENER BACTERIAS JÓVENES Y MÓVILES.



FOTO N° 6: Descongelamiento a temperatura ambiente de las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

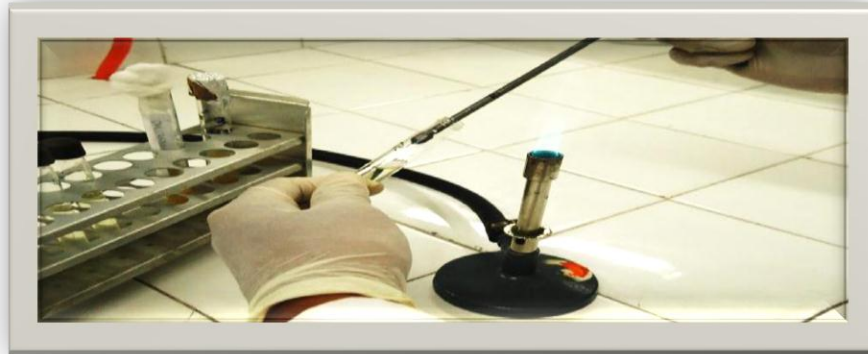


FOTO N° 7: Reactivación de bacterias en el tubo con caldo nutritivo propiciándole una mejor condición en el medio.



FOTO N° 8: Sembrío de las bacterias en forma de estrías y su incubación de 36 a 37 °C por 24 horas

ANEXO 10.

SEMBRÍO E INCUBACIÓN DE BACTÉRIAS PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO EM MEDIO DE CULTIVO ESPECÍFICO DE CALDO MIULLER HINTON.



FOTO N°9: Preparación del inóculo bacteriano.

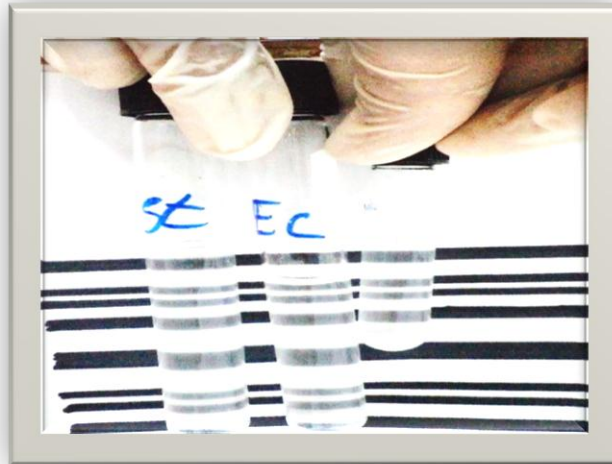


FOTO 10: Comparación de la turbidez con la escala de Mac Farland.

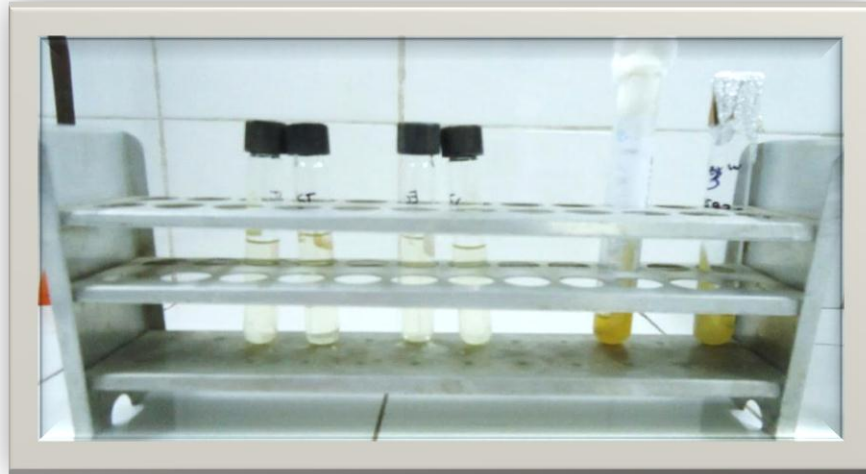


Foto N° 11: Preparación de suspensión bacteriana.

ANEXO 11

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS DILUCIONES



FOTO N° 12: De la solución madre se sacó 0.2 ml y fue añadido al tubo N° 01 que contuvo 1.8 ml de caldo Mueller Hinton



FOTO N° 13: Después de este proceso se añadió a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana



FOTO N° 14: El volumen final mínimo, en cada tubo, fue de 2 ml

ANEXO 12

PREPARACIÓN DEL CONTROL POSITIVO



FOTO 15: El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico gentamicina (160 mg/2ml), del cual se utilizó 0.64 ml y se enrasó hasta 5 ml de agua destilada en un tubo estéril para obtener una solución madre o stock de 10240 $\mu\text{g/ml}$



FOTO 16: De la solución madre se sacó 0.2 ml y fue añadido al tubo N° 01 que contuvo 1.8 ml de caldo Mueller Hinton

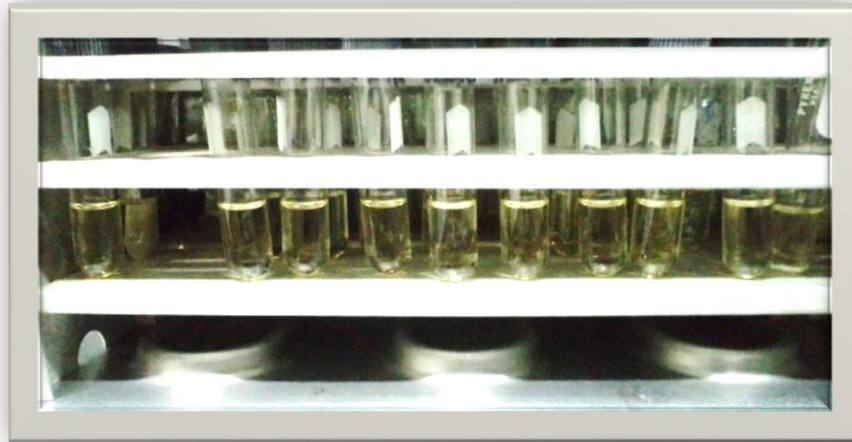













FOTO 17: El volumen final mínimo, en cada tubo, fue de 2 ml, las concentraciones fueron comprendidas entre los rangos de 512 $\mu\text{g/ml}$ a 2 $\mu\text{g/ml}$.

ANEXO 13

REPRESENTACIÓN DEL METODO DE MACRODILUCIÓN

TABLA 6: DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS DE TRABAJO POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.

TUBOS CON EL EXTRACTO VEGETAL HIDROALCOHÓLICO.

Tubo												C
Caldo MH (ml)	1.8	1	1	1	1	1	1	1	1			1
Extracto 640 mg/ml: Solución Madre (ml)	0.2	1	1	1	1	1	1	1	1			
Concentración inicial (mg/ml)	64	32	16	8	4	2	1	0.5				
Inóculo bacteriano (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1
Concentración final (mg/ml)	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25				
Control (-): Caldo MH+Inóculo (ml)												2

(*) FUENTE: ELABORADO POR LOS AUTORES

Dónde: (1) concentración de 32 mg/ml; (2) concentración de 16 mg/ml; (3) concentración de 8 mg/ml; (4) concentración de 4 mg/ml; (5) concentración de 2 mg/ml; (6) concentración de 1 mg/ml; (7) concentración de 0.5 mg/ml; (8) concentración de 0.25 mg/ml; (C) concentración de 0 mg/ml

TABLA 7: DISTRIBUCIÓN DEL GRUPO CONTROL POSITIVO POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.

TUBO CONTROL POSITIVO: Gentamicina 160 mg/ml.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C
Caldo MH (ml)	1.8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solución de Gentamicina 10240 ug/ml: Solución Madre (ml)	0.2	1	1	1	1	1	1	1	1	
Concentración inicial (ug/ml)	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	
Inóculo bacteriano (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Concentración final (ug/ml)	512	256	128	64	32	16	8	4	2	
Control (-): Caldo MH+ Inóculo bacteriano (ml)										2

(*) FUENTE: ELABORADO POR LOS AUTORES

Dónde: (1) concentración de 512 ug/ml; (2) concentración de 256 ug/ml; (3) concentración de 128 ug/ml; (4) concentración de 64 ug/ml; (5) concentración de 32 ug/ml; (6) concentración de 16ug/ml; (7) concentración de 8ug/ml; (8) concentración de 4ug/ml; (9) concentración de 2 ug/ml; (C) concentración de 0 ug/ml

ANEXO 14

PREPARACIÓN DEL AGAR MUELLER HINTON

1. Preparar el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
2. Autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45°C - 50°C.
3. Una vez esterilizado y solidificado, medir el pH del agar. El valor del mismo debe encontrarse entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente. Esta medición puede realizarse:
 - a. Utilizando un electrodo de superficie
 - b. Macerando el medio en agua destilada y utilizando un electrodo de inmersión
 - c. Solidificando el agar con el electrodo del potenciómetro
4. Repartir el medio en placas petri (60 ml – 70 ml o 25 ml – 30 ml, para placas de 150 mm o 100 mm de diámetro interno respectivamente), de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.
5. Realizar las pruebas de esterilidad para cada lote de Mueller Hinton, incubando una o dos placas de cada lote a 30°C – 35°C durante 24 horas o más. Estas placas utilizadas deben ser, luego, descartadas.

Fuente: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud ⁷².

ANEXO 15

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR (0,5 MC. FARLAND) PARA EL INÓCULO

1. Para estandarizar la densidad del inóculo se usa una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar.
2. Preparación del estándar de turbidez.
 - a. Agregar 0,5 ml de una solución de BaCl_2 0,048 M ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 1,175% P/V) a 99,5 mL de una solución de H_2SO_4 0,18 M (0,36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.
 - b. Verificar la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro o espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.
 - c. Distribuir de 4 ml a 6 ml en tubos con tapa de rosca o tapón de jebes, similares a los que se usarán para preparar el inóculo.
 - d. Ajustar bien las tapas o tapones y conservarlos en la oscuridad a temperatura ambiente y anotar la fecha de preparación.
 - e. Antes de ser usado agitar vigorosamente dicho estándar de preferencia, en un agitador mecánico.
 - f. Verificar mensualmente la densidad de los estándares de sulfato de bario, y reemplazarlo cuando sea necesario.

Fuente: Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud ⁷².

ANEXO 16
RESULTADOS DEL TAMIZAJE

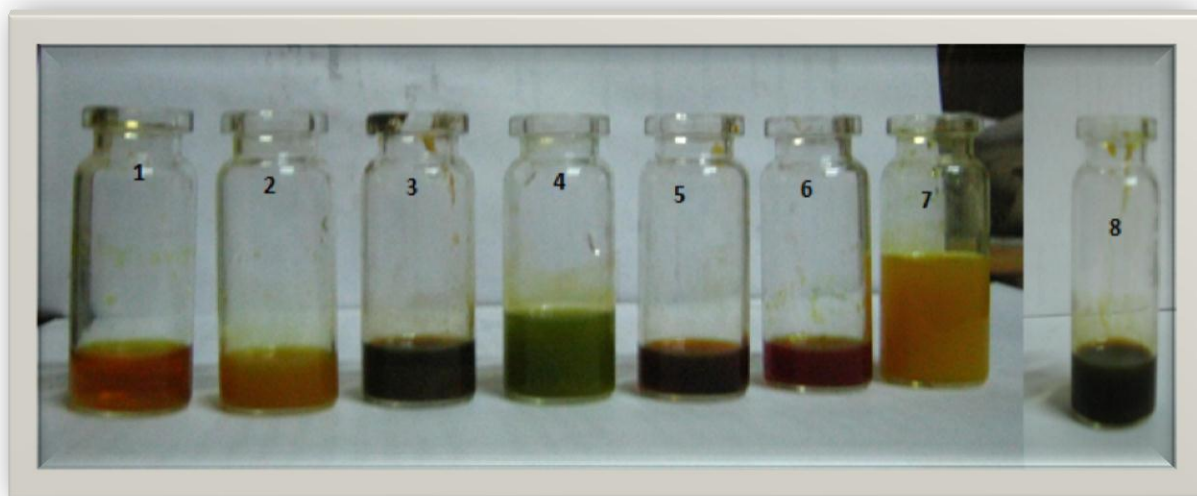


FOTO N° 18: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa*. “Guisador” realizado según protocolos estandarizados en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía (LIPNAA) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Cuyas metodologías están descritas en la referencias bibliográficas 77, 78 y 79

ANEXO 17

LECTURA DE LOS RESULTADOS.

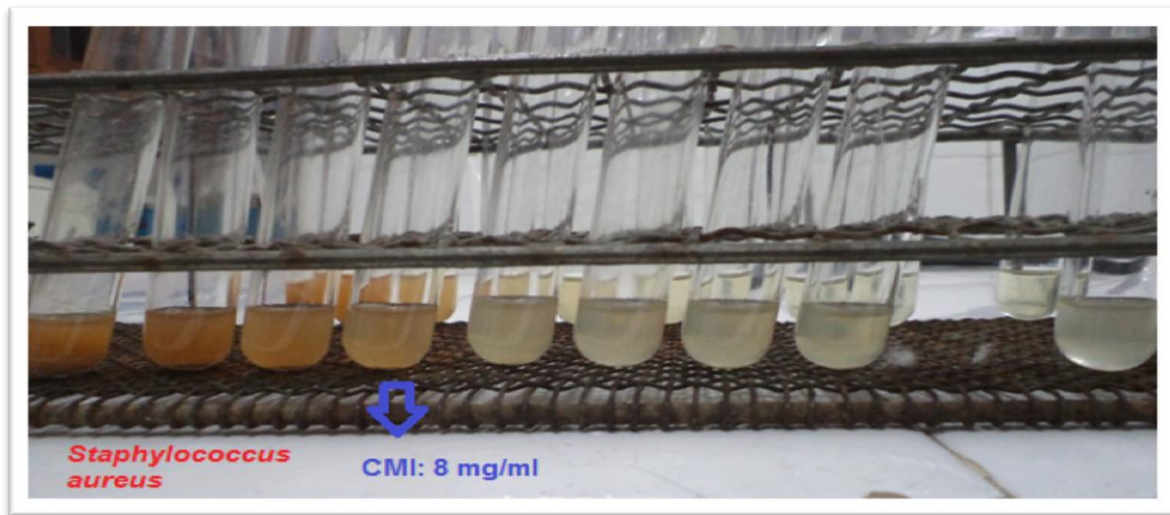


FOTO N° 19: Resultado de la Concentración Inhibitoria Mínima de *Staphylococcus aureus* en 8 mg/ml.

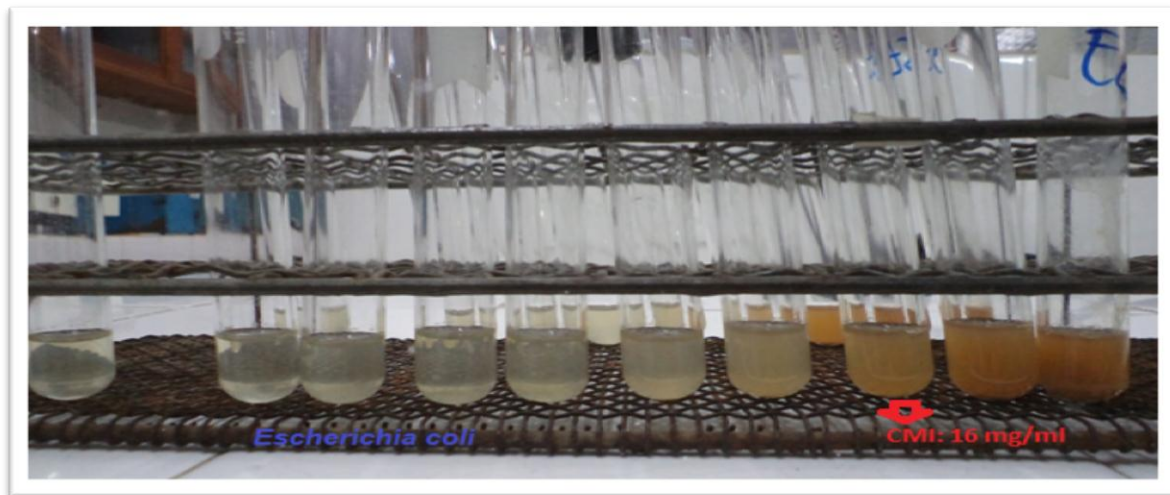


FOTO N° 20: Resultado de la Concentración Inhibitoria Mínima de *Escherichia coli* en 16 mg/ml.



FOTO N° 21: Resultado de la Concentración Inhibitoria Mínima del Control Positivo (Gentamicina), que fue de 4 ug/ml.