

“AÑO DEL BUEN SERVICIO AL CIUDADANO”



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

TÍTULO

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LOS
RIZOMAS DE *Zingiber officinale* (JENJIBRE) FRENTE A
Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, y
Pseudomona aeruginosa”**

TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

ASTRID STEPHANY URIBE GONZALES

ASESORES:

**Q.F. HENRY VLADIMIR DELGADO WONG
BLGA. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE
ING. ALENGUER ALVA ARÉVALO**

IQUITOS – PERÚ

2017

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LOS RIZOMAS DE *Zingiber officinale* (JENJIBRE) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa*”

PAGINA DE APROBACIÓN

JURADO CALIFICADOR

.....
M.C. Charles Ocampo Falcón
PRESIDENTE

.....
Q.F. Luis Alberto Vilchez Alcalá, Mgr
MIEMBRO

.....
ING. Reyna Gladys Cárdenas Cárdenas, Dra
MIEMBRO

ASESORES:

.....
Q.F. Henry Vladimir Delgado Wong
ASESOR

.....
BLGA. Jessy Patricia Vasquez Chumbe
ASESOR

.....
ING. Alenguer Alva Arévalo
ASESOR



UNAP

Facultad de Farmacia y Bioquímica

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

ACTA DE SUSTENTACIÓN

En la ciudad de Iquitos, Provincia de Maynas, Departamento de Loreto, a los 20 días del mes de JUNIO del dos mil diecisiete, siendo las 13 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 155-FFB-UNAP-2016, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- ✓ MÉD. CIRUJ. CHARLES OCAMPO FALCÓN PRESIDENTE
- ✓ Q.F. LUIS ALBERTO VILCHEZ ALCALÁ, Mgr. MIEMBRO
- ✓ ING. REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS, Dra. MIEMBRO



Se constituyeron en la Decanatura de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada : "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In Vitro DE LOS RIZOMAS DE Zingiber officinale (JENJIBRE) FRENTE A Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Pseudomona aeruginosa", presentado por la Bachiller ASTRID STEPHANY URIBE GONZALES, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a la Ley N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de la sustentante, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

Adecuadamente

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.- La Tesis ha sido Aprobado por unanimidad
- 2.- Observaciones Ninguna



Siendo las 14:10 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándole a la sustentante por su disertación

MÉD. CIRUJ. CHARLES OCAMPO FALCÓN. PRESIDENTE

Q.F. LUIS ALBERTO VILCHEZ ALCALÁ, Mgr. MIEMBRO

ING. REYNA GLADYS CÁRDENAS CÁRDENAS, Dra. MIEMBRO

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *In Vitro* DE LOS RIZOMAS DE *Zingiber officinale* (JENJIBRE) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa*”

Uribe Gonzales, A.S¹

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

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de ***Zingiber officinale*** “Jengibre” mediante los métodos de Macrodilución y Difusión en agar. Las cepas utilizadas fueron: ***Pseudomona aeruginosa*** ATCC 27833, ***Escherichia coli*** ATCC 25922 y ***Staphylococcus aureus*** ATCC 25923. Como control positivo se usó Gentamicina y como control negativo una solución de etanol/agua a concentración 1:1. Los resultados demuestran que con el método de difusión en agar, el extracto etanólico de ***Zingiber officinale*** procedente de Iquitos y Lamas, no presentaron actividad antibacteriana frente a ***E. coli*** y ***P. aeruginosa*** a concentraciones de 12mg y 6mg, por no evidenciarse el halo de inhibición; frente a ***Staphylococcus aureus***; la muestra procedente de Lamas presentó un halo de inhibición de 9.3 ± 0.6 mm y 8.7 ± 1.2 mm a la concentración de 12mg/ml y 6mg/ml respectivamente, mientras que para el extracto etanólico de Iquitos, a concentración 12mg/ml tuvo un halo de inhibición 10.7 ± 1.2 y a concentración 6mg/ml presento un halo 9.0 ± 1.0 . Mediante el método de macrodilución, el extracto procedente de Lamas demostró ser poco activo frente a ***S. aureus*** (CMI: **8mg/ml**) mientras que para ***E. coli*** y ***P. aeruginosa*** demostró ser inactivo. El extracto etanólico procedente de Iquitos frente a ***Staphylococcus aureus*** (CMI: 16mg/ml) demostró ser inactivo.

Se concluye que el extracto etanólico de ***Zingiber officinale***, no presenta actividad antibacteriana a las concentraciones de 6 y 12mg/ml.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, *Zingiber officinale*, macrodilución, kirby- Bauer..

“In vitro ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE RHIZOMES OF *Zingiber officinale* (JENJIBRE) AGAINST *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa*”

Uribe Gonzales, A.S¹

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

ABSTRACT

This study determined the in vitro antibacterial activity of the *Zingiber officinale* ethanolic extract "Ginger" by Macrodilution and Diffusion in agar methods. *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27833, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were the strains used. On the one hand, as a positive control, Gentamicin 10mg was used. On the other hand, it was used as negative control, a 1:1 ethanol / water solution. The results show that, with the agar diffusion method, the ethanolic extract of *Zingiber officinale* from Iquitos and Lamas did not present antibacterial activity in regard to *E. coli* and *P. aeruginosa* at concentrations of 12mg and 6mg, since the halo of inhibition did not show up; Compared to *Staphylococcus aureus*, the sample from Lamas presented a halo of inhibition of 9.3 ± 0.6 mm and 8.7 ± 1.2 mm at the concentration of 12 mg / ml and 6 mg / ml respectively, whereas for the ethanolic extract from Iquitos, a concentration of 12 mg / ml had a halo of inhibition of 10.7 ± 1.2 and a concentration of 6mg / ml submitted a halo of 9.0 ± 1.0 . Through the macrodilution method, the extract from Lamas proved to be poorly active in comparison with *S. aureus* (MIC: 8mg / ml) in regard to *E. coli* and *P. aeruginosa* which showed up to be inactive. The ethanolic extract from Iquitos in contrast with *Staphylococcus aureus* (MIC: 16mg / ml) showed to be inactive.

To sum up, the ethanolic extract of *Zingiber officinale* does not present antibacterial activity at concentrations of 6 and 12mg / ml.

Key words: Antibacterial activity, *Zingiber officinale*, macrodilution, kirby- Bauer

DEDICATORIA

A mis padres, Carlos Federico Uribe Rengifo y Elizabeth Gonzales Del Aguila, porque son el motor y motivo para mi vida, por su apoyo constante e incondicional y sobre todo porque siempre creyeron en mí.

A mis hermanos Tatiana, Slim, Ender, Randy, Ray, Yafet, Joysi y Ali que siempre están ahí dándome fuerzas para seguir adelante con mis metas y siempre seguir mirando con positivismo todos los obstáculos que se me presentan en la vida.

A mis sobrinos queridos Darío, Miyha, Carlos, Mikeyla, Luana y Amir que son la alegría de mis días y un motivo más para seguir saliendo adelante por un mundo mejor.

A mi tía Eva Gonzales Del Aguila por su apoyo, a mi abuelito Ricardo Gonzales Garcia y a mi tío Elías Gonzales Del Aguila que desde el cielo me cuida.

A todos ellos que son importantes en mi vida, porque de ellos aprendí y crecí no solo físicamente sino espiritualmente porque sé que, aunque todos se marchen serán ellos y solo ellos quienes se mantendrán siempre a mi lado en las buenas y en las malas aun cuando no estemos físicamente juntos nuestros corazones lo estarán eternamente.

Astrid Stephany Uribe Gonzales

AGRADECIMIENTOS

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

A mis Asesores:

- *Al Q.F Henry V. Delgado Wong; por apoyarme con sus conocimientos referentes al trabajo y siempre estar ahí con dedicación y esmero.*
- *Al Ing. Allenguer Gerónimo Alva Arévalo; por brindarme el laboratorio el cual está a cargo, para realizar la obtención de los extractos para nuestro trabajo.*
- *A la Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, por hacer posible la realización de los ensayos del estudio, brindándome el laboratorio de microbiología.*
- *Al Bach. Alexander Javier Iman Torres por haberme apoyado de manera desinteresada en la parte microbiológica durante el desarrollo de la ejecución de la parte experimental de la tesis.*

A mis jurados:

- *Ing. Reyna Gladys Cárdenas Cárdenas, Dra., por su aporte y ayuda en la corrección de mi proyecto de tesis.*
- *Q.F. Luis Alberto Vélchez Alcalá, Mgr por la tolerancia y tiempo que me brindó*
- *M.C. Charles Ocampo Falcón, por el tiempo y ayuda en las correcciones de mi proyecto de tesis.*

A mis amigos que siempre estuvieron ayudándome para la realización de mi proyecto de tesis y a una de las personas que siempre supo estar ahí para mí, Javier Felipe Zagaceta Garcia, por su apoyo incondicional en las buenas y malas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
<i>DEDICATORIA</i>	iii
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE ANEXOS	x
CAPITULO I	1
1.1 INTRODUCION	2
1.2 OBJETIVOS	4
1.2.1 GENERAL:	4
1.2.2 ESPECÍFICO:	4
CAPÍTULO II	5
2.1 MARCO TEÓRICO:	6
2.1.1 ANTECEDENTES:	6
2.1.2 Marco Conceptual	11
<i>Zingiber officinale</i> (JENGIBRE)	11
2.1.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	14
2.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA EN ESTUDIO	17
2.2 VARIABLES OPERACIONALES	20
2.2.1 Independiente	20
2.2.2 Dependiente	20
2.3 INDICADORES	20
2.3.1 Para el método de macrodilución	20
2.3.2 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY BAUER)	21
2.4 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	22
2.5 HIPOTESIS	24
CAPÍTULO III	25
3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION	26
3.1.1 Tipo de investigación	26
3.1.2 Flujograma de la Investigación	27
3.2 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS	28
3.2.1 Procedimiento Experimental	28

3.3	POBLACION Y MUESTRA	29
3.3.1	POBLACIÓN	29
3.3.2	MUESTRA	29
3.4	CRITERIOS DE INCLUSIÓN:.....	30
3.5	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:.....	30
3.6	PROCEDIMIENTOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	30
3.6.1	Método de macrodilución.....	30
3.6.2	MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO.....	33
3.7	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	37
3.7.1	Reactivos	37
3.7.2	Materiales	38
3.7.3	EQUIPOS	40
3.8	PLAN DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS	40
3.9	NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.....	40
3.10	CUESTIONES ETICAS EN LA EXPERIMENTACION	41
	CAPÍTULO IV	42
4.1	RESULTADOS:.....	43
4.1.1	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.....	43
4.1.2	IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS: TAMIZAJE FITOQUÍMICO.....	44
4.1.3	ANTIBACTERIANA DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i>	45
4.2	DISCUSION	56
	CAPÍTULO V.....	61
5.1	CONCLUSIONES	62
5.2.	RECOMENDACIONES.....	64
	CAPÍTULO VI	65
6.1	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXOS.....	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la Muestra Vegetal en estudio.....	11
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	17
Tabla 3: Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	18
Tabla 4: Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Tabla 5: Método de Macrodilución	22
Tabla 6: Método de Difusión en Disco	23
Tabla 7: Categorización	36
Tabla 8: Rendimiento del extracto etanólico de los rizomas de <i>Zingiber officinale</i> procedentes de Lamas	43
Tabla 9: Rendimiento del extracto etanólico de los rizomas de <i>Zingiber officinale</i> procedentes de Iquitos	43
Tabla 10: Tamizaje Fitoquímico de <i>Zingiber officinale</i> (JENGIBRE).....	44
Tabla 11: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Iquitos, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según diámetro de la zona de inhibición.....	45
Tabla 12: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , según diámetro de la zona de inhibición.....	50
Tabla 13: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Zingiber officinale</i> procedente de Lamas según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>	55
Tabla 14: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Zingiber officinale</i> procedente de Iquitos según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: <i>Zingiber officinale</i> (JENGIBRE).....	11
FIGURA 2: Obtención del extracto Etanólico de <i>Zingiber officinale</i>	27
Figura 3: Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de <i>Zingiber officinale</i>	43
Figura 4: Categorización del extracto etanólico de rizomas de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Iquitos, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según Diámetro de la zona de inhibición.	46
Figura 5: Categorización del extracto etanólico de rizomas de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Iquitos, frente a <i>Escherichia coli</i> según Diámetro de la zona de inhibición....	47
Figura 6: Categorización del extracto etanólico de rizomas de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Iquitos, frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> según Diámetro de la zona de inhibición	48
Figura 7: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de rizomas de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” según Porcentaje de inhibición.....	49
Figura 8: Categorización del extracto etanólico de rizomas de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según Diámetro de la zona de inhibición.	51
Figura 9: Categorización del extracto etanólico de rizomas de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, frente a <i>Escherichia coli</i> según Diámetro de la zona de inhibición.	52
Figura 10: Categorización del extracto etanólico de rizomas de <i>Zingiber officinale</i> “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> según Diámetro de la zona de inhibición.	53

Figura 11: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de rizomas
de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad
de Lamas, según Porcentaje de inhibición. 54

LISTA DE ANEXOS

ANEXO N° 1: <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) Iquitos	72
ANEXO N° 2: <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) Lamas	72
ANEXO N° 3: Filtración de los extractos	73
ANEXO N° 4: Concentración de los extractos Mediante el rotavapor.	73
ANEXO N° 5: Extracto Etanolico (Lamas) Y Extracto Etanolico (Iquitos)	74
ANEXO N° 6: Cepas bacterianas con las que se realizó el estudio	74
ANEXO N° 7: Microtubos, tips para micropipetas, matraz con agar mueller hinton, tubos de CINA antes de ser llevados al autoclave.	75
ANEXO N° 8: AUTOCLAVE.....	75
ANEXO N° 9: Placas para los ensayos después de esterilizarlos en la estufa.	76
ANEXO N° 10: Preparación de las placas con Agar Mueller Hinton.....	76
ANEXO N° 11: Siembra de las bacterias en las placas con agar Muller Hinton	77
ANEXO N° 12: Crecimiento de las bacterias.....	77
ANEXO N° 13: Patrón de Mac farland.....	77
ANEXO N° 14: Procedimientos realizados del ensayo de Macrodilución.....	78
ANEXO N° 15: Resultados de Difusión en Disco.	79
ANEXO N° 16: Resultados de Difusión en Disco.	79
ANEXO N° 17: Resultados de Difusión en Disco.	80
ANEXO N°18 : Constancia del Herbarium Amazonense.....	81

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCION

“Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado hoy, por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos; para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo”. [1]

Las bacterias y hongos están entre los organismos de mayor importancia en el mundo, no solo por su rol vital en las funciones del ecosistema sino también por su influencia en los humanos y en sus actividades relacionadas, son de gran importancia en actividades cruciales tales como la descomposición, el ciclo de nutrientes, el transporte de nutrientes y son indispensables para lograr el desarrollo sostenible. [2] Por ejemplo, en el tracto digestivo proliferan unas mil especies bacterianas. Sintetizan vitaminas tales como ácido fólico, vitamina K y biotina. También fermentan los carbohidratos complejos indigeribles y convierten las proteínas de la leche en ácido láctico (por ejemplo, *Lactobacillus*). [3], [4], [5] Además, la presencia de esta flora intestinal inhibe el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (generalmente por exclusión competitiva). Muchas veces estas bacterias beneficiosas se venden como suplementos dietéticos probióticos. [6]

En las últimas tres décadas humanos y animales han adquirido microorganismos polirresistentes a fármacos. La resistencia a los fármacos constituye un problema de salud pública extremadamente grave [7], [8] casi tanto como las propias enfermedades que justifican su demanda [9].

Entre las bacterias más patógenas están *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y otros causantes de muchas enfermedad y mortalidad humana, causando infecciones tales como el tétanos, la fiebre tifoidea, la difteria, la sífilis, el cólera, intoxicaciones alimentarias, etc.

La generación de nuevos antimicrobianos sólo ha demostrado la rápida capacidad bacteriana de adaptarse a ellos, por usar un término conservador.

La Amazonía peruana es una de las zonas del planeta con mayor diversidad vegetal: conviven en la zona el 8% del total de especies vegetales, de las cuales menos del

1% han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico o farmacológico, por lo tanto, su estudio podría conducir al descubrimiento de un gran número de nuevas moléculas bioactivas con posible aplicación terapéutica. Los indígenas de la amazonia peruana disponen de conocimientos transmitidos de generación en generación sobre las aplicaciones medicinales de las plantas que pueblan la zona.

[13]

*“Actualmente se destacan muchas plantas que contienen flavonoides, polifenoles, glucósidos, taninos, triterpenos y otros compuestos con marcada acción, antiinflamatorios y antifúngicos Una de ellas es la especie *Cúrcuma longa* Linn, familia Zingiberácea, que posee innumerables estudios farmacotoxicológicos a nivel internacional, pero aún las bases de datos y sistemas informativos nacionales como FITOMED están poco documentados al respecto”.* [14]

Es por ello que, según antecedentes de la familia zingiberácea, se decidió investigar la especie *Zingiber officinale* conocido comúnmente como jengibre, el cual es originario de las zonas tropicales del sureste asiático, exactamente del área Indomalaya al sur de Asia [15]. La cual presenta rizomas subterráneos gruesos, que representan la parte comercial de la planta Se usa como especia, en la preparación de bebidas, perfumería, por su aroma delicado y sabor ardiente y en farmacia por sus propiedades medicinales, tales como, afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, falta de apetito, indigestión, flatulencia, náusea) y respiratorias (amigdalitis, asma, bronquitis, catarro, fiebre, gripe, inflamación de la garganta, pleuresía, pulmonía, resfrió, ronquera, tos, tos refina), malaria, gota, dismenorrea y reumatismo[16]. Esta investigación se llevó a cabo por dos métodos el de difusión en disco en la cual se midió los halos de inhibición para posteriormente evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Pudiendo determinar sobre cual bacteria tiene mayor efecto antibacteriano la especie en estudio. Con el propósito de buscar los genes que forman la defensa de la planta hacia el ataque de los Fitopatógenos de bacterias, que pueden estar en diversas partes de la misma para así llegar a saber que metabolito secundario cumple con la función antibacteriana, y así poder tener nuevas alternativas de tratamientos frente a bacterias resistentes a fármacos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 GENERAL:

Evaluar la actividad antibacteriana *In Vitro* del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale*, por el método de macrodilución y difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.2 ESPECÍFICO:

- Obtener el extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale*
- Realizar un screening fitoquímico de los rizomas de *Zingiber officinale*
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale*, por el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*
- Determinar el diámetro de las zonas de inhibición del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale* utilizando pruebas de difusión en agar *in vitro* frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

CAPÍTULO II

2.1 MARCO TEÓRICO:

2.1.1 ANTECEDENTES:

- ✚ **Malu, Obochi, Tawo y Nyong (2009)**, comprobaron la actividad antibacteriana de extractos del jengibre obtenidos por diferentes métodos. Ellos utilizaron diferentes métodos de extracción empleando el aparato soxhlet usando como solvente el etanol, agua, n- hexano, acetato de etilo. Los resultados de los extractos mostraron que tienen actividad antibacteriana sobre *Bacillus colliform*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus viridians*, excepto el extracto acuoso que no presenta inhibición de la actividad bacteriana. ^[17]

- ✚ **Nada K, Zainab A, Zainab G. (2014)**, estudio la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Zingiber officinale* contra bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus fecalis*, *Streptococcus mutans* y Gram negativo *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter spp.* *Acinetobacter*, *Serratia spp.* Cuatro productos de jengibre se utilizaron para determinar la actividad antibacteriana de extracto acuoso de jengibre fresco, se utilizó extracto acuático de jengibre en polvo, aceite crudo de jengibre en extracto de vinagre de manzana del método de difusión en Agar de jengibre fresco utilizado en este estudio. ^[18]

- ✚ **Baskaran S, Baradwaj R. G (2016)**, El presente estudio se llevó a cabo para determinar las actividades antimicrobianas, antioxidantes e in vitro contra el cáncer utilizando los rizomas del extracto de *Zingiber officinale*. Se ensayó la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Excherichia coli* *Entero toxigénica (ETEC)* y *Salmonella typhi* por ensayo de difusión en disco. La actividad antioxidante se determinó mediante ensayo de barrido de radicales libres de DPPH y ensayo de barrido de radicales libres de

ABTS. El extracto etanólico mostró más actividad contra *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *ETEC* y *Salmonella typhi* a 5-25 mg / pocillo. El extracto también mostró la eliminación dependiente de la dosis de los radicales DPPH y ABTS. La depuración de los radicales DPPH fue más eficiente que la de los radicales ABTS, como lo revela el bajo valor de IC50. Se usaron células de cáncer de mama MCF-7 para investigar la actividad anticancerígena in vitro de extractos etanólicos de jengibre. La actividad inhibidora de los extractos contra MCF-7 se llevó a cabo utilizando el ensayo de sal de tetrazolio colorimétrico (MTT). Los resultados mostraron una actividad anticancerígena considerable en células de cáncer MCF-7, con un valor IC50 de 10 µg / ml. El extracto de jengibre inhibe eficazmente la proliferación de células MCF-7 de una manera dependiente de la dosis durante 24 h. Así, los compuestos de jengibre mostraron un potencial para agentes antioxidantes, antibacterianos y anticancerosos. [19]

✚ **Konning G.H., Agyare C, Enninson B (2004)**, Presentan los resultados antimicrobiano preliminar del screening de los extractos de metanol de *Aframomum melegueta*, *Piper guineense*, *Xylopia aethiopica*, *Zingiber officinale*, plantas medicinales de Ghana. Los extractos de metanol de las plantas fueron significativamente activos contra las bacterias Gram (+) y Gram (-) y los hongos estudiados. Los extractos fueron menos activos contra *P. aeruginosa*, que es naturalmente resistente a agentes antibacterianos. [20]

✚ **Khalid A, et al. (2011)**, Encontraron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Los extractos metanólicos, de agua caliente y agua fría de *Pistacia Integerrima (Gall)*, *Polygonum Bistorta (raíz)*, *Swetia Charita (tallo)* y *Zingiber officinale (raíz)* fueron examinados contra bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Salmonella typhi* (ATCC 14028) por su

eficacia antibacteriana. Se utilizó técnica de difusión de discos de agar. Se observó la máxima zona de inhibición de 19 mm de extracto metanólico de *Zingiber officinale* contra *Staphylococcus aureus*, mientras que la máxima zona de inhibición de 15 mm de extracto de agua fría de *Zingiber officinale* contra *Pseudomonas aeruginosa* y 15 mm de agua fría de *Swetia Charita* contra *Bacillus subtilis*. También se usaron contra estas bacterias fármacos estándar con acción antibiótica como ceftriaxona, ceftriaxona sódica, cefuroxina, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, metronidazol y ácido tranexámico y compararon sus resultados con los extractos de plantas a concentraciones de 10, 20 y 30 ul/ml del extracto metanólico y acuoso. [21]

✚ **Kaushik P, Goyal P.(2011)**, Estudió la actividad antibacteriana in vitro de extractos acuosos y orgánicos en bruto de rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (jengibre) tanto en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*) como en Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) cepas bacterianas. El presente estudio revela que el patrón de inhibición varió con el disolvente utilizado para la extracción y el organismo analizado. Los extractos de plantas preparados en disolventes orgánicos proporcionaron una actividad antibacteriana más consistente en comparación con los extractos acuosos. El extracto de metanol fue el más activo frente al número máximo de especies bacterianas ensayadas. Las bacterias Gram-positivas fueron las más sensibles en comparación con las bacterias Gram-negativas. *Staphylococcus aureus* fue significativamente inhibido por casi todos los extractos, incluso en MIC muy baja seguida de otros Gram-positivos. *Escherichia coli* (una bacteria Gram-negativa) mostró la menor inhibición con valores más altos de MIC, mientras que *Salmonella typhi* se encontró completamente resistente. El extracto de metanol produjo la presencia de terpenoides, flavonoides, alcaloides y taninos en el cribado fitoquímico. Los resultados del

presente estudio firman la interesante garantía de diseñar un agente antibacteriano potencialmente activo de *Zingiber officinale*.^[22]

✚ **Acosta de la Luz Lérica. (2003)**, En su estudio explica que uno de los aspectos más importantes en la producción de plantas medicinales es alcanzar altos rendimientos de material vegetal y elevados contenidos de principios activos, lo que depende tanto de factores internos de la planta como son aquellos relacionados con el adecuado crecimiento de la especie en cuestión, los referidos a la recolección y conjuntamente también las condiciones climáticas, pues como seres vivos que son, las plantas están en constante interacción con el medio que las rodea; esencialmente el clima influye en un momento determinado en su crecimiento y desarrollo y en especial en la producción de sus metabolitos secundarios. Por ejemplo por ejemplo, *Matricaria recutita* L.(manzanilla), *Caléndula officinalis* L. (caléndula), *Mentha piperita* L.(toronjil de menta) entre otras, demandan época específica de siembra o plantación porque requieren determinadas condiciones climáticas (más bajas temperaturas e intensidad solar), en tanto que numerosas especies tienen otras exigencias y climáticas (más bajas temperaturas e intensidad solar), en tanto que numerosas especies tienen otras exigencias y deben plantarse en la primavera (marzo-abril) porque su follaje desaparece en la temporada invernal y han alcanzado la madurez necesaria para ser recolectadas. Ejemplo de ello son: *Passiflora incarnata* L. (pasiflora), *Zingiber officinale* Roscoe (jengibre), etc. y muchas pueden cultivarse durante todo el año como sucede con *Lippia alba* (Mill.) N. E. Burn (quitadolor), *Piper auritum* Kunth (caisimón de anís), *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (orégano francés).^[23]

✚ **Enríquez A, Prieto E, De Los Ríos E, Ruiz S. (2008)**, “En su estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe “Jengibre” Se determinó índices menores a los máximos establecidos, mostrando la calidad y pureza de nuestra droga. La

especie fue identificada en el Herbarium Truxillensis de la Universidad Nacional de Trujillo, siendo nuestra especie la misma de la cual se conocen sus efectos terapéuticos publicados a nivel mundial. El estudio químico cualitativo se realizó mediante tamizaje fitoquímico según técnicas de la Universidad de la Habana que emplea el método de extracción discontinua: maceración con agitación constante y solvente de polaridad creciente; éter dietílico, etanol 70°GL y agua. Las reacciones de coloración y precipitación obtenidas en el tamizaje fitoquímico nos indicó 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”.[24]

2.1.2 Marco Conceptual.

Zingiber officinale (JENGIBRE)



FIGURA 1: *Zingiber officinale* (JENGIBRE)

El jengibre, es originario de las zonas tropicales del sureste asiático, exactamente del área Indomalaya al sur de Asia. Naturalizada en Jamaica, África, en las Indias occidentales, México y en la Florida. Requiere de un clima tropical húmedo, con precipitaciones superiores a los 2000 mm anuales, distribuidas regularmente a lo largo del período vegetativo, con una temperatura superior a los 30° C durante dos tercios del año, humedad de 80% a 95%, y una altitud de 0 a 1500 (m.s.n.m.) La provisión de sombra favorece su producción, pero rico en materia orgánica, con un pH de 5,5 – 7,0. [25]

2.1.2.1 Clasificación Taxonómica.

División	Angiosperma
Clase	Monocotiledónea
Orden	Scitaminea
Familia	Zingiberaceae
Genero	Zingiber
Especie	Officinale

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la Muestra Vegetal en estudio

2.1.2.2 Sinonimia.

Ajengibre (Cuba), jengibre dulce (Puerto Rico), gengembre, gengibre (Antillas Francesas), ingwer (Alemania), gengembre (Francia), ginger (Inglaterra), gengibre, gengivre, mangaratiá (Portugal), kiong (China) y kión (Perú). [26]

2.1.2.3 Origen

El jengibre es una hierba originaria de la India o Malasia, de hasta 1 m de altura, con rizomas subterráneos gruesos, que representan la parte comercial de la planta cultivada en regiones tropicales y subtropicales de clima caliente y húmedo. Naturalizada y cultivada en Centro y Sudamérica, donde se cultivan en huertos caseros, en macetas y arriates con facilidad. Se usa como especia, en la preparación de bebidas, perfumería, por su aroma delicado y sabor ardiente y en farmacia por sus propiedades medicinales. [27]

2.1.2.4 Descripción botánica

Hierba perenne, rizoma ruberoso, rastrero, tallos erectos de 1 m de alto. Hojas aromáticas, lanceoladas o delgado lanceoladas, hasta 20 cm de alto. Flores tubulares, 3 segmentos externos amarillo – verdosos, labio de tres lóbulos, púrpura con marcas amarillas, 2.5 cm de largo, en las axilas de bracteos de 15 a 25 cm de largo abiertos de hojas verdes sobrepuestas. Requiere clima caliente y húmedo, lluvia bien distribuida, 1500 msnm. [26] Para la preparación del terreno, la cama de siembra debe estar bien suelta, si son áreas pequeñas se puede preparar con azadón, incorporando al momento de la preparación abono orgánico. Su propagación es asexual, sembrando los rizomas los cuales se colocan en cadena en el fondo del surco; a un distanciamiento de 5 - 10 cm entre rizoma y 25 cm entre el surco. [28]

2.1.2.5 Usos medicinales atribuidos

Los rizomas son picantes y tienen amplia venta en mercados. La decocción del rizoma se usa para tratar afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, falta de apetito, indigestión, flatulencia, náusea) y respiratorias (amigdalitis, asma, bronquitis, catarro, fiebre, gripe, inflamación de la garganta, pleuresía, pulmonía, resfrió, ronquera, tos, tos refina), malaria, gota, dismenorrea y reumatismo. El polvo, infusión y tintura se usa para preparar jarabes con las mismas aplicaciones medicinales. [27]

Tópicamente se aplica cataplasma y ungüentos del rizoma para menstruación difícil y cefalea, en el dolor de muelas, induraciones, inflamaciones, tumores, reumatismo, úlceras y cáncer. Con el jugo del rizoma se hace masaje a los niños como tonificante. [28]

Se le atribuye propiedad analgésica, antihistamina, antiséptica, antitusiva, aperitiva, aromática, astringente, carminativa, digestiva, estimulante, espasmolítico, expectorante, rubefaciente, sudorífica y tónica. [27]

2.1.2.6 Usos terapéuticos populares

Por su actividad carminativa, diaforética y espasmolítico está indicado en el tratamiento de cólico, inapetencia y dispepsia flatulenta; se recomienda administrar dos o tres veces al día en dosis de 1 a 3 gramos de infusión o decocción, de 1.5 a 3 ml de tintura débil de 0.25 a 0.5 ml de tintura fuerte, una a dos gotas de aceite en una cucharada de miel, 10 gotas de extracto fluido. [27]

Por su actividad expectorante y sudorífica está indicado en el tratamiento de gripe, faringitis, angina y dolores reumáticos; se recomienda administrar tres veces al día en dosis de 2 a 3 gramos por tasa de decocción, 3 a 10 gotas al día de esencia y 20 a 30 gotas al día de extracto fluido.

Tópicamente está indicada la decocción en compresas, la tintura para fricciones o gargarismos y el aceite esencial incorporado a un aceite de

masaje como almendra o zapuyul para gota, reumatismo y dolores musculares. [27]

Para la digestión se ocupa el rizoma del jengibre tomando un dedo de la raíz machacado con anterioridad y administrado por vía oral en las comidas. Para dolores de vientre en la mujer se utiliza 1 ó dos pedacitos machacados bien lavados del rizoma el cual se administra por vía oral tres tazas al día. [28]

2.1.2.7 Composición química

El rizoma contiene cetonas (zingerona), gingerol, aceite esencial (13%) y materia resinosa (5 – 8 %), asparagina y ácido pipécólico. El aceite esencial está compuesto de sesquiterpenos (farneseno (9 – 10%); metilheptenona, α – curcumeno (17 %), cíñelo, bisaboleno, borneol, camfeno, geraniol, linalol, mircenol, zingibereno (30 – 36 %) y zingiberol. La oleoresina contiene gingerol, shogaol, dihidrogingerol, hexahidrocumarina, gingerdiol, paradol, zingerona y gingerdisona. La hoja y tallo contiene aceite esencial, alcaloides, flavonoides, sesquiterpenlactonas, taninos y triterpenos. [29]

2.1.2.8 Farmacognosia

La materia médica es el rizoma fresco o seco. Macroscópicamente es un polvo blanco amarillento, olor aromático agradable y sabor picante característico. Microscópicamente son abundantes gránulos de almidón, fibras en grupos, paredes delgadas, vasos grandes con ligera reacción a lignina, células de oleoresina color amarillo intenso en pequeños grupos en el parénquima compuesto de células de pared delgada arrugada. No debe contener más de 6 % de ceniza total, no menos de 10 % de extraíble en agua y no menos de 1.7 % de ceniza insoluble en ácido. [27]

2.1.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Las bacterias son microorganismos presentes en el mundo capaces de causar infecciones, produciendo diversas enfermedades.

Una de las actividades más relevantes que se realiza en un laboratorio de microbiología clínica es la de determinar la sensibilidad o la resistencia de los microorganismos a los diferentes antimicrobianos, para orientar el tratamiento antibiótico. [30]

Sin embargo, en la práctica este término se aplica a los procedimientos para el estudio de la sensibilidad de las bacterias. Las técnicas para el estudio de la sensibilidad de los hongos se conocen como antifungigrama. Para los virus estas técnicas suelen denominarse pruebas o estudios de sensibilidad a los antivíricos.

2.1.3.1 Método difusión en disco

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a agentes antimicrobianas expresada como CMI, se puede ensayar mediante varios métodos; uno de ellos es conocido como test de Kirby – Bauer, este método fue estandarizado por Bauer *et al.* En 1996, es el ensayo más usado en la separación de plantas con actividad antimicrobiana en la práctica clínica y está recomendado por la Clinical and Laboratory Institute (CLSI). Este método, consiste en colocar un reservorio impregnado con la muestra en contacto con un medio de cultivo inoculado y, al final del periodo de incubación, medir el diámetro de la zona clara (zona de inhibición de crecimiento) alrededor del reservorio. La medida del diámetro es un buen indicador de la actividad antimicrobiana. [31]

Antes de incubar el sistema inoculado, puede ser mantenido a temperaturas más bajas por algunas horas con el objetivo de facilitar la difusión de la muestra y, consecuentemente, aumentar el diámetro de inhibición, mejorando el límite de detección. Algunos estudios consideran suficiente mantener las placas a 4°C durante 1 a 2 horas. [32]

No existe ningún valor patrón que determina que la muestra es activa o no. Es frecuente expresar los resultados como un criterio para determinar el grado de susceptibilidad o sensibilidad y la resistencia. En estos casos, son creadas escalas basadas en el tamaño de las

zonas de inhibición. Cuanto mayor sea el halo, más sensible es el microorganismo. [31]

Algunos autores solo consideran una muestra activa si la razón del halo de la muestra por el halo del control fuera mayor que cero; o sea, el halo de la muestra es igual o mayor que el del control. [31]

2.1.3.2 Método de macrodilución

Existen diferentes métodos para conocer la **CMI** de un antibiótico para una bacteria u hongo y saber, por tanto, si el microorganismo es sensible o resistente. Las técnicas utilizadas para cuantificar directamente la **CMI** son las de dilución y la más utilizada en la práctica es la de macrodilución en medio líquido. Además de estos métodos que determinan la **CMI** también existen métodos cualitativos indirectos como el de disco-difusión (disco-placa). Este método solo permite categorizar al microorganismo como sensible o resistente pero no determina la **CMI**. [33]

La difusión en gradiente (Etest o Epsilon test) es una prueba que combina la sencillez de las pruebas de disco-difusión con las de dilución ya que permite determinar la **CMI**. [33] Estas pruebas pueden complementarse con otras que detectan mecanismos específicos de resistencia como la producción de betalactamasas, carbapenemasas y otras. [34]

En los virus, el estudio de la concentración inhibitoria mínima de los antivíricos es muy complejo. Por ello para detectar la resistencia tiende a sustituirse las técnicas de dilución que determinan la **CMI** por la detección de las mutaciones en el genoma del virus que condicionan su resistencia. [33]

Esto se hace utilizando técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (PCR) o técnicas de secuenciación. [30]

El estudio de la sensibilidad de los protozoos y helmintos a los antiparasitarios es muy complejo y no se efectúa en los laboratorios de microbiología clínica. [30]

2.1.4 CARACTERÍSTICAS DE LA CEPA EN ESTUDIO

2.1.4.1 *Staphylococcus aureus*.

2.1.4.1.1 clasificación taxonómica

<u>Taxonomía</u>	
Reino:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>S. aureus</i> ROSENBACH 1884

2.1.4.1.2 Características

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston en 1883 introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego staphyle que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. [35], [36]

2.1.4.2 *Escherichia coli*

2.1.4.2.1 Clasificación taxonómica

<u>Taxonomía</u>	
Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Escherichia</i>
Especie:	<i>E. coli</i> (ESCHERICH, 1885)

Tabla 3: Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

2.1.4.2.2 Características

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. [37]

Las cepas de *E.coli* verotoxigénica (ECVT) sobreviven durante meses en el estiércol contaminando las aguas superficiales (bebida y riego), las verduras y frutas y la superficie de las tierras de cultivo. Estas bacterias se multiplican a temperaturas entre 6 y 50° C, con una temperatura óptima alrededor de 37° C. También, pueden crecer en presencia de un 6% de NaCl, ya que son más resistentes a estos compuestos que otras bacterias, como la Salmonella. [38]

2.1.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.4.3.1 Clasificación Taxonómica

<u>Taxonomía</u>	
Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gamma Proteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	<i>Pseudomonas</i>
Especie:	<i>P. aeruginosa</i> (SCHROETER 1872) MIGULA 1900

Tabla 4: Clasificación taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.4.3.2 Características

Schroeter (1872) le dio nombre de *Bacterium aeruginosum*, posteriormente en el año de 1894 el botánico alemán Wallter Migula da el nombre de un nuevo género llamado *Pseudomonas*, las describió como “células con órganos polares de la motilidad”. *Pseudomonas aeruginosa* (o *Pseudomonas pyocyanea*) es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas. [39]

Tiene un metabolismo aerobio estricto-oxidativo, no fermenta carbohidratos, sus requerimientos nutricionales son sencillos prácticamente crece en agua. Secreta sustancias coloridas hidrosolubles. [40] *Pseudomonas aeruginosa* puede causar diversos tipos de infecciones, pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. [41]

2.2 VARIABLES OPERACIONALES

2.2.1 Independiente

Extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale*

2.2.2 Dependiente

Actividad Antimicrobiana

2.3 INDICADORES

2.3.1 Para el método de macrodilución

2.3.1.1 Independiente (X):

Concentración de los extractos:

✚ Concentración baja: 0.25 mg/ml

✚ Concentración media: 4 mg/ml

✚ Concentración alta: 32 mg/ml

2.3.1.2 Dependientes (Y):

Grado de turbidez:

3 (no inhibición),

4 (ligera inhibición, inhibición del 25%),

5 2 (inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50%),

6 1 (ligera turbidez del medio, inhibición del 75%)

7 0 (100% de inhibición)

2.3.2 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO (KIRBY BAUER)

2.3.2.1 Independiente (X):

Concentración del extracto

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

2.3.2.2 Dependiente (Y):

Grado de sensibilidad

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

2.4 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Variable		Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
INDEPENDIENTE	Extracto etanólico de Zingiber officinale	Producto que se obtendrá mediante el método de maceración	El solvente en contacto con la especie vegetal arrastrará los metabolitos secundarios solubles por extracción en rotavapor a una temperatura de 46° a una rotación de 690 rpm ^[42] respectivamente durante 3 horas	Concentración del Extracto etanólico de Zingiber officinale (Jengibre).	Concentración baja: 0.25 mg/ml Concentración media: 4.0 mg/ml Concentración alta: 32 mg/ml	Nominal	Cualitativa
DEPENDIENTE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria P. aeruginosa, E.coli Y S. aureus 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 Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus , expuesta al extracto en estudio	Grado de Turbidez	Ausencia de turbidez en los cultivos de las cepas ensayadas, inhibición del 100% ligera turbidez del medio, inhibición del 75% Inhibición aparente del crecimiento, inhibición del 50% Ligera inhibición, inhibición del 25% No inhibición	Nominal	Cualitativa

Tabla 5: Método de Macrodilución

Variable		Definición Conceptual	Indicador	Definición Operacional	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
INDEPENDIENTE	Extracto etanólico de Zingiber officinale	Producto obtenido mediante el método de maceración.	Concentración del Extracto etanólico de Zingiber officinale (jengibre).	La especie vegetal en contacto con etanol como solvente para arrastrar los metabolitos secundarios solubles en ellas y cuya extracción se realizó en rotavapor a una temperatura de 46° a una rotación de 690 rpm ^[42] respectivamente durante 3 horas	Concentración alta: 12 mg Concentración baja: 6 mg	Nominal	Cualitativa
DEPENDIENTE	Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria P. aeruginosa, E. coli, S. aureus , causado por agentes químicos externos produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo	Grado de sensibilidad que presentan los medios de cultivos inoculados con Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Staphylococcus aureus , expuesta al extracto	Indican los criterios de interpretación de los diámetros de las zonas de inhibición que categorizan con precisión el nivel de susceptibilidad de los organismos a varios agentes antimicrobianos	S Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada con la dosis de extracto recomendada para el tipo de infección y la especie infectante. I Esta categoría incluye cepas que pueden ser inhibidas por concentraciones de extracto más elevado. R Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales.	Nominal	Cualitativa

Tabla 6: Método de Difusión en Disco

2.5 HIPOTESIS

El Extracto Etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale*; presentara Actividad Antibacteriana *In vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

CAPÍTULO III

3.1 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION

3.1.1 Tipo de investigación

Se empleará el Diseño **experimental, longitudinal y prospectivo:**

- ✓ **Experimental:** Es experimental porque se manipulan las variables.
- ✓ **Longitudinal:** Porque permite la recolección sistemática (repetición de ensayos) de las variables involucradas en función del tiempo.
- ✓ **Prospectivo:** Porque se desarrolla a través del tiempo.

3.1.2 Flujoograma de la Investigación

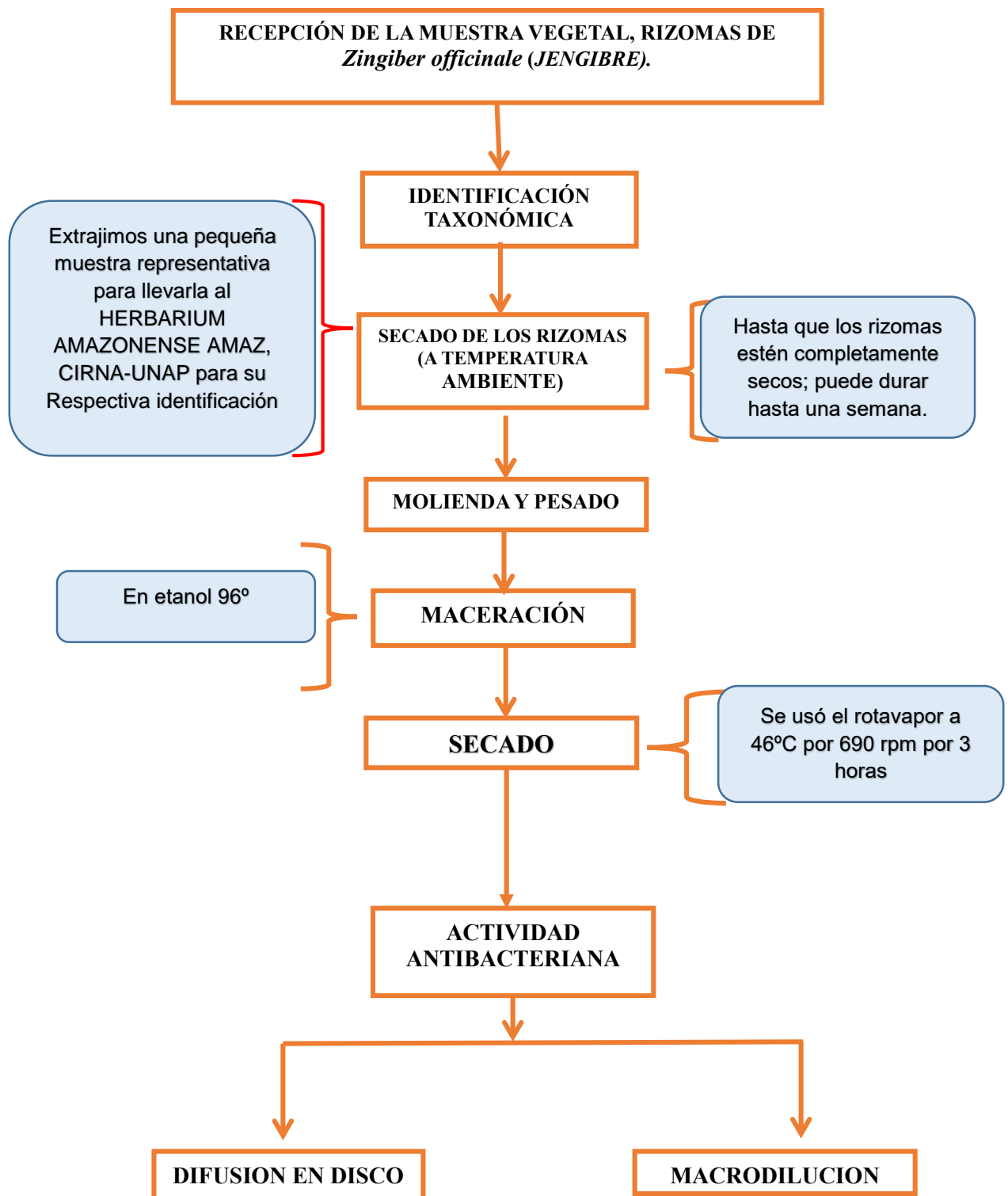


FIGURA 2: Obtención del extracto Etanólico de *Zingiber officinale*

3.2 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

3.2.1 Procedimiento Experimental

3.2.1.1 Recolección de la muestra vegetal

Las especies vegetales seleccionadas fueron recolectadas en el km 40 a altura de puente Tocón de la carretera Iquitos-Nauta y la segunda muestra fue recolectada en la comunidad de LAMAS – Departamento de San Martín, Provincia de Lamas, Distrito de Lamas, PERÚ.

3.2.1.2 Identificación de la muestra vegetal

La identificación taxonómica de la especie recolectada fue realizada teniendo en cuenta el nombre científico, familia, nombre vulgar. En el HERBARIUM AMAZONENSE AMAZ, CIRNA-UNAP, con la asesoría del botánico responsable, el cual determinó la categoría taxonómica empleando descriptores morfológicos, claves de identificación y bibliografía especializada. Obteniéndose el documento de certificación de la muestra por dicho lugar (HERBARIUM AMAZONENSE). (VER ANEXO 18)

3.2.1.3 Procesamiento de la muestra vegetal

La muestra vegetal de *Zingiber officinale*, se procesó siguiendo los procedimientos de lavado, secado a temperatura ambiente por 10 días, se seleccionó y macero cada muestra, en el laboratorio de Fitoquímico (FIA), posteriormente los extractos fueron llevados al laboratorio de Microbiología de Alimentos en donde se realizó los ensayos de la investigación, estos laboratorios se encuentran dentro de la Planta Piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias, de la Universidad Nacional De la Amazonia Peruana ubicado en la Av. Freyre N° 610 – Iquitos.

3.2.1.4 Molienda de la muestra vegetal

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

3.2.1.5 Obtención del extracto etanólico

Para el estudio fitoquímico se pesó 100 g de cada muestra de la especie vegetal seleccionada seca y molida, se macero con el etanol al 96% durante 7 días, posteriormente el macerado fue filtrado y concentrado en un rota vapor por evaporación de solvente a una temperatura de 46 °C con una rotación de 690 rpm ^[42], este procedimiento se realizó hasta agotamiento.

3.3 POBLACION Y MUESTRA

3.3.1 POBLACIÓN

➤ **Población vegetal**

La población en estudio estuvo constituida por la especie vegetal de *Zingiber officinale*

➤ **Población microbiológica**

La población microbiológica estuvo constituida por las cepas.

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

3.3.2 MUESTRA

La muestra estuvo constituida por los rizomas de *Zingiber officinale*

3.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Las muestras vegetales en buen estado, estructuralmente enteras sin presencia de deterioro, exento de plagas y otros contaminantes visibles.

3.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

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

3.6 PROCEDIMIENTOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

3.6.1 Método de macrodilución

3.6.1.1 Recuperación y activación de cultivos conservados

Se activaron los tubos que contenían las bacterias conservadas en refrigeración, por un lapso de una hora y media a temperatura ambiente, una vez descongeladas los microorganismos en estudio se transfirió una pequeña muestra utilizando el asa bacteriológica, en tubos que contenían caldo nutritivo como medio apropiado para ejercer la reactivación de las bacterias.

Después de realizar la siembra de las bacterias en los tubos con caldo nutritivo que contenían a estas se incubaron a la temperatura de 36 °C a 37 °C por 24 horas, para un buen crecimiento y reproducción de las bacterias.

3.6.1.2 Cultivo en agar

De los tubos que contienen Caldo nutritivo con las bacterias incubadas por 24 horas, se extrae la muestra y se siembra por estría con el asa bacteriológica esterilizada en dos placas Petri (que contienen agar Muller Hinton completamente esteril), las cuales se incubaron a 35 - 37 °C durante 24 horas.

3.6.1.3 Preparación del inóculo bacteriano.

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

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

3.6.1.4 Preparación y control de extractos.

a) Se pesó 320 mg del extracto etanólico respectivamente en viales tipo Sendorff estériles y se añadió 0.5 ml de una solución de etanol/Agua destilada (1:1) obteniendo una concentración de 640 mg/mL (Solución madre o Stock).

b) De la solución madre o Stock se extrajo 0.1 ml y se añadió al tubo N° 01 que contenía 0.9 ml de caldo Mueller Hinton.

c) Posteriormente del tubo N° 01 se extrajo 0.5 ml que se añadió al Tubo N° 02 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al tubo N°08.

d) Del tubo N° 08 se extrajo 0.5 ml que fue desechado.

e) Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana preparada anteriormente para los ensayos.

f) El volumen final de cada tubo fue de 1 ml.

g) Para la preparación del control de turbidez se repitieron los pasos a), b), c), d), añadiendo finalmente 0.5 mL de caldo M-H estéril.

h) Las concentraciones para el ensayo fueron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml, siendo el tubo N° 09 control de crecimiento (0 mg/mL).

3.6.1.5 Preparación del control positivo.

- El control positivo empleado en la prueba fue el antibiótico gentamicina (160 mg/2ml), del cual se utilizó 0.64 ml y se enrasó hasta 5 ml en un tubo estéril para obtener una solución madre o stock de 10240 ug/ml.
- De la solución madre se extrajo 0.1 ml y se añadió al tubo N° 01 que contendrá 0.9 mL de caldo Mueller Hinton.
- Del tubo N° 01 se extrajo 0.5 ml que se añadió al Tubo N° 02 que contenía 0.5 mL de caldo M-H y así se realizó sucesivamente hasta llegar al tubo así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 09
- Del tubo N° 09 se extrajo 0.5 ml que fue desechado
- Después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana.
- El volumen final de cada tubo fue de 1 ml.
- Las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 512 ug/ml a 2 ug/ml, siendo el tubo N° 10 control de crecimiento (0 µg/mL) .

3.6.1.6 Incubación.

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución. [43]

3.6.1.7 Interpretación de resultados.

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

3.6.2 MÉTODO DE DIFUSION EN DISCO

3.6.2.1 Preparación del inóculo

De las placas con agar Mueller Hinton sembradas con cada bacteria de estudio, se extrajo nuevamente con el asa bacteriológica un aproximado de tres a cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en agar Mueller Hinton, para transferirlos a los tubos (1 por bacteria) que contienen 3 ml de Cloruro de sodio 0.9 % (NaCl), utilizando el vórtex para un mejor homogenizado, hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mc. Farland por comparación visual con dicho patrón. Ver anexo 13 cabe recalcar nuevamente que se usó una luz apropiada y se miró los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. Este proceso se repitió tanto para los ensayos de Macrodilución y difusión en Disco respectivamente.

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

3.6.2.2 Dilución de extractos.

Se pesaron 360 mg de cada extracto en microtubos de tipo Sppendorf estériles, luego fueron diluidos en 0.6 ml de una mezcla Etanol/Agua (1:1) respectivamente para cada extracto, para alcanzar una

concentración de 600mg/ml (Concentración 1). Para facilitar su homogenización fueron llevados al vórtex.

Para obtener la Concentración 2, se procedió a extraer 0.2 ml de la Concentración 1 para posteriormente ser agregado en 0.2 ml de una mezcla de Etanol/Agua (1:1) alcanzando una concentración de 300 mg/ml (Concentración 2) que fueron colocados nuevamente en el vórtex para su homogenización.

Finalmente se procedió a impregnar a cada disco de papel whattman N°5 (estéril) con 20uL de cada concentración (1 y 2 respectivamente), para ser llevados a la estufa durante 18 horas con la finalidad de eliminar la presencia del Etanol/agua que fueron utilizadas para la disolución de los extractos. Obteniendo así discos impregnados de 12 mg (Concentración 1) y 6 mg (Concentración 2).

Cabe precisar que se realizó el mismo procedimiento tanto para el extracto etanólico (Lamas) y el extracto etanólico (Iquitos) independientemente.

3.6.2.3 Inoculación de las placas

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se procedió a extraer con una micropipeta graduada 100 uL del inóculo bacteriano (3 tubos por bacteria), para luego verter en placas con Agar Mueller Hinton, previamente preparadas para el ensayo (3 placas por bacteria) diseminando con la espátula de Drigalsky en todas las direcciones de la superficie de cada placa, asegurando una distribución uniforme del inóculo.
- Antes de colocar los discos dejamos secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

3.6.2.4 Aplicación de los discos

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

3.6.2.5 Incubación

Se incubaron las placas en posición invertida a 35°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, durante 24 horas. Después del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa, para proseguir con la medición de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

3.6.2.6 Interpretación de los resultados

- Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando la regla vernier.
- Se mantuvo iluminada la parte posterior a la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre fondo negro.
- Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.

- El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento bacteriano, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

3.6.2.7 INTERPRETACIÓN DE DATOS PARA EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

3.6.2.7.1 Valores críticos para la medida de sensibilidad en disco.

Los valores de las concentraciones y de los diámetros críticos que delimitan las categorías sensible, intermedio y resistente (S, I, R), son el resultado de la integración de un conjunto de elementos: la distribución de las CMI para diversas poblaciones de cepas sensibles y resistentes, las concentraciones séricas y tisulares de los antibióticos, la confrontación de los resultados in vitro y de los resultados clínicos, así como la variabilidad estadística de los métodos utilizados.^[44]

3.6.2.7.2 Procedimiento de categorización.

Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios. (Tabla 7)

Tabla 7: Categorización

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

Fuente: manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión del INS.

Por otra parte, la lectura interpretativa del antibiograma, fundada en el conocimiento de los antibiogramas de sensibilidad y resistencia permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo de fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma. [45]

3.7 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

3.7.1 Reactivos

- Agua destilada
- Ácido sulfúrico cc.
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Wagner.
- Reactivo de Mayer.
- Disoluciones de hidróxido de sodio al 5% y 10%.
- Disolución de ácido pícrico al 1%.
- Sudan III.
- Disolución de cloruro férrico al 5%.
- Disolución de Ninhidrina al 5%.
- Disolución de hidróxido de potasio al 5,7%.
- Disolución de ácido clorhídrico al 1% y 10%.
- Metanol.
- Cloroformo.
- Acetato de etilo.
- Cloruro de sodio
- Ácido clorhídrico 0.5 M REMEL
- Ácido Sulfúrico 0.2M BBL
- Agua destilada MEDIFARMA
- Carbonato de sodio BIOMERIUX
- Etanol 70° ALCOFARMA
- Cloruro de bario QUELAB
- Agar Müller Hinton MERCK
- Agar Nutritivo QUILAB

- Caldo Müller Hinton DIFCO

3.7.2 Materiales

3.7.2.1 Material de vidrio y otros

- Filtros Millipore de 0,22µm
- Frascos de cultivo de 25 cm² de cuello inclinado
- Gradillas
- Micropipetas de 100-1000µL
- Micropipetas de 20-100µL
- Micropipetas de 2-20µL
- Micropipetas de 0.5-10µL
- Micropipetas multicanal de 50-200µL
- Tips con filtro 1000 µL
- Tips con filtro 200 µL
- Tips con filtro 10 µL
- Microplacas de cultivo de 96 alvéolos de fondo plano estériles
- Tubos de microcentrífuga 1,5mL estériles
- Papel secante
- Pipetas serológicas 10ml estériles
- Pipetas serológicas 5mlestériles
- Pipetas serológicas 2mlestériles
- Pipetas serológicas 1mlestériles
- Láminas Portaobjetos
- Probetas de 100mL a 1000mL
- Tubos de centrifuga de 15mL
- Tubos de centrifuga de 50mL
- Tubos de fondo redondo 5mL
- Vaso precipitado
- Guantes de látex
- Mandil
- Mascarilla
- Gafas

- Contador manual
- Asa de Kolle para siembra bacteriológica.
- Cuchillo mediano.
- Escobillas lava tubos.
- Espátulas medianas.
- Gradilla metálica.
- Pinza estéril.
- Regla Vernier
- Algodón.
- Detergente.
- Guantes quirúrgicos.
- Hisopos.
- Mascarillas.
- Papel aluminio.
- Papel de despacho.
- Papel secante.
- Papel tissue.
- Parafilm 2' x 250'
- Plumón marcador.
- Soportes para tubos
- Viales (Eppendorf)
- Cinta adhesiva
- Gasa
- Gorro
- Mascarillas
- Solución desinfectante
- Mandiles
- Discos impregnados con antibiótico y con muestra problema.
- Mortero
- Lentes de protección
- Tubos de hemólisis

3.7.3 EQUIPOS

- Rotavapor
- Bomba de vacío
- Balanza analítica
- Centrífuga
- Incubadora para cultivo
- Vortex
- Mechero de Bunsen
- Cabina de bioseguridad

3.8 PLAN DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE DATOS

Para el análisis de la base de datos y cuadros estadísticos se utilizó los programas Microsoft Excel 2013 para Windows.

Se presentaron los resultados en tablas de frecuencias, cuadros y gráficos de promedios y desviación estándar.

3.9 NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

“Los profesionales del laboratorio están expuestos a una variedad de riesgos a su salud relacionados con su trabajo. Como ejemplo, se encuentran aquéllos derivados del manejo de material infeccioso, radiación, compuestos tóxicos y químicos e inflamables. En el caso particular del material biológico-infeccioso, el peligro surge de la posibilidad de exponerse a agentes patógenos e infectarse por dicha exposición. En laboratorios de diagnóstico clínico, de investigación, industriales, de patología clínica, de producción de biológicos, de enseñanza, u otros donde se lleguen a manejar patógenos aislados o muestras que los contengan, los profesionales del laboratorio debemos prestar especial cuidado en las medidas que tomamos para prevenir un accidente .La Organización Mundial de la Salud, mediante el Reglamento Sanitario Internacional (2005), estipula otras recomendaciones relacionadas a la bioseguridad en el laboratorio, las cuales tienen como objetivo “prevenir la propagación internacional de enfermedades,

proteger contra esa propagación, controlarla y darle una respuesta de salud pública proporcionada y restringida a los riesgos para la salud pública”. [46]

3.10 CUESTIONES ETICAS EN LA EXPERIMENTACION

“En la práctica científica hay principios éticos rectores. Dado que la ciencia busca evidencias y se apoya en la rigurosidad, el investigador debe hacer gala de "altos estándares éticos", como la responsabilidad y la honestidad. Muchos ideales y virtudes los recibe el científico de la sociedad en la cual está inmerso y a la cual se debe. La moralidad y el sentido del deber lo conectan a su entorno. Los científicos no son una clase aparte (no existe la carrera universitaria de científico) sino que pertenecen a distintas profesiones que obedecen a unos principios deontológicos (ética profesional) con los cuales el científico aporta a la construcción de una ética del investigador. Frente a los estándares éticos deseables en una comunidad científica se presenta el lado negativo de la balanza, caracterizado por deshonestidad, plagio, fraude, etc. Gran parte de la investigación científica se realiza teniendo como sujeto de experimentación a seres vivos. La investigación biomédica con seres humanos está regida por los principios de la Declaración de Helsinki. De otro lado, el empleo de animales de experimentación se rige por los principios éticos que consideran el respeto hacia ellos, su salud y bienestar, y sobre todo la búsqueda de alternativas a su uso”. [47]

CAPÍTULO IV

4.1 RESULTADOS:

4.1.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.

4.1.1.1 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE *Zingiber officinale*

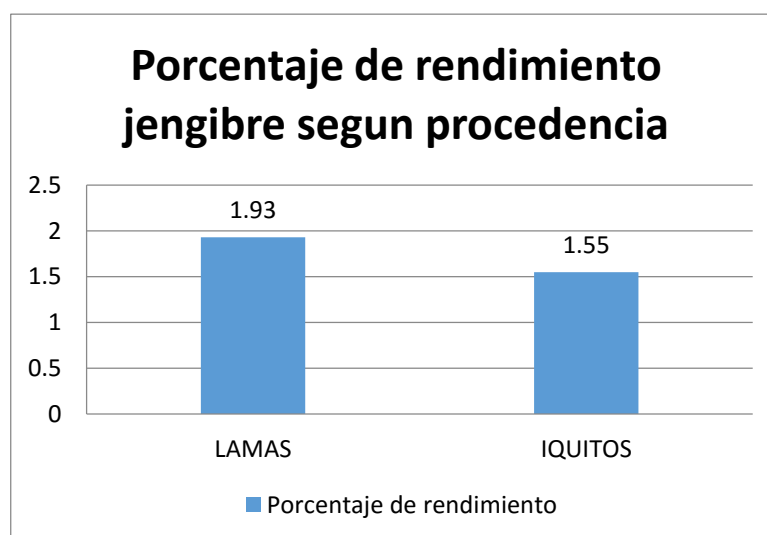
Tabla 8: Rendimiento del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale* procedentes de Lamas

Parte de planta	Cantidad de Muestra vegetal (g.)	Cantidad Muestra seca para maceración (g.)	Cantidad de Extracto etanólico (g.)	Porcentaje de Rendimiento (%)
Rizoma	900	600	11.6	1.93 %

Tabla 9: Rendimiento del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale* procedentes de Iquitos

Parte de planta	Cantidad de Muestra vegetal (g.)	Cantidad Muestra seca para maceración (g.)	Cantidad de Extracto etanólico (g.)	Porcentaje de Rendimiento (%)
Rizoma	1200	955	14.8	1.55

Figura 3: Porcentaje de Rendimiento del extracto etanólico de *Zingiber officinale*.



La Tabla N°08, N°9 y la Figura N°03, representan el rendimiento en porcentaje, de la planta utilizada *Zingiber officinale*, obtenidas por el equipo Rotavapor. En la Tabla N°08, se determinó el rendimiento de 1.93 % de 900 g. de muestra seca, mientras que en la tabla N° 9 se determinó un rendimiento de 1.5 % de 1200 g. de muestra seca.

4.1.2 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS: TAMIZAJE FITOQUÍMICO.

Tabla 10: Tamizaje Fitoquímico de los rizomas *Zingiber officinale*

METABOLITOS	ENSAYOS	EXTRACTO ETANÓLICO	
		<i>Zingiber officinale</i>	
		Lamas	Iquitos
ALCALOIDES	Drangendorff	+	++
TRITERPENOS Y ESTEROIDES	Liebermann – Burchard	+	++
QUINONAS	Borntrager	++	+++
LACTONAS Y CUMARINAS	Baljet	+++	++
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	+	+
SAPONINAS	Espuma	-	-
FENOLES Y TANINOS	Cloruro Férrico	++	+
AMINOÁCIDOS Y AMINAS	Ninhidrina	+++	+++
FLAVONOIDES	Shinoda	+	+
GLICÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	Kedde	+	+

(+++) **Abundante; (++) Moderado; (+) Leve; (0) Ausente; (--) No se realizo**

4.1.3 ANTIBACTERIANA DE ZINGIBER OFFICINALE.

4.1.3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN DE DISCO (KIRBY - BAUER)

Tabla 11: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Zingiber officinale* procedente de la localidad de Iquitos, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, según diámetro de la zona de inhibición.

BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ETANÓLICO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
	RIZOMAS			% INHIBICIÓN	RESULTADO
	(mg/mL)	(mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	9.3 ± 0.6	RESISTENTE	43.8	POCO ACTIVO
	6	8.7 ± 1.2	RESISTENTE	37.2	INACTIVO
	Gentamicina 10mcg	27.0 ± 7.8	SENSIBLE	---	---
<i>Escherichia coli</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	Gentamicina 10mcg	18.3 ± 3.1	SENSIBLE	---	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	Gentamicina 10mcg	20.0 ± 1.0	SENSIBLE	---	---

* Esquema DZI frente a Control positivo

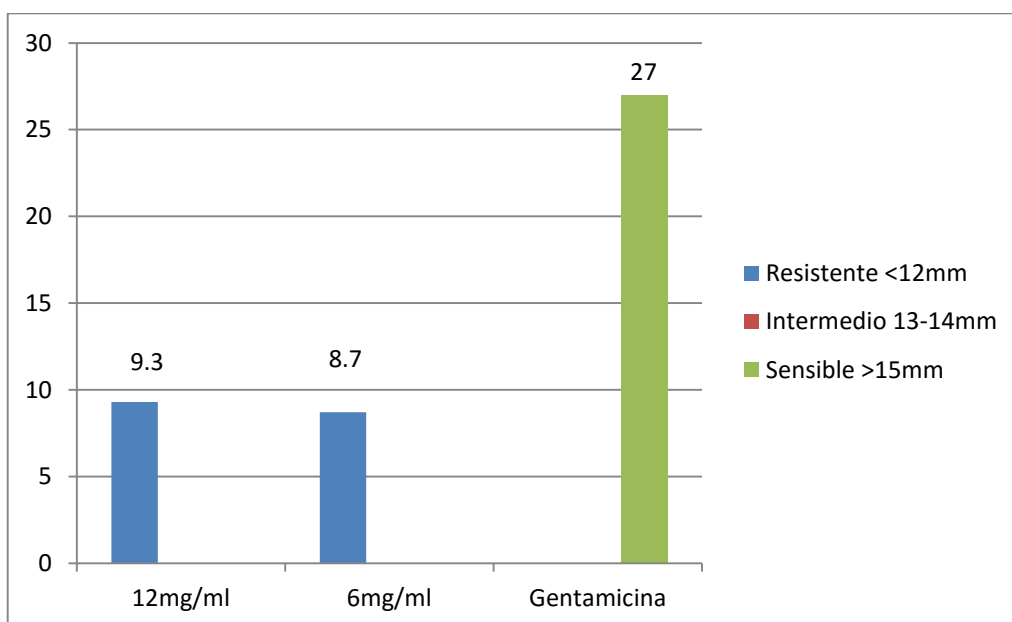
Resistente: <12 mm
Intermedio: 13 - 14 mm
Sensible: > 15 mm
Fuente: MPPSAMDD⁽⁴⁹⁾

& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición

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

La Tabla N° 11 muestra el promedio y desviación estándar de los diámetros de la zona de inhibición que se obtuvieron en las lecturas del ensayo de disco difusión, a diferentes niveles de concentraciones del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* recolectados en la ciudad de Iquitos, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

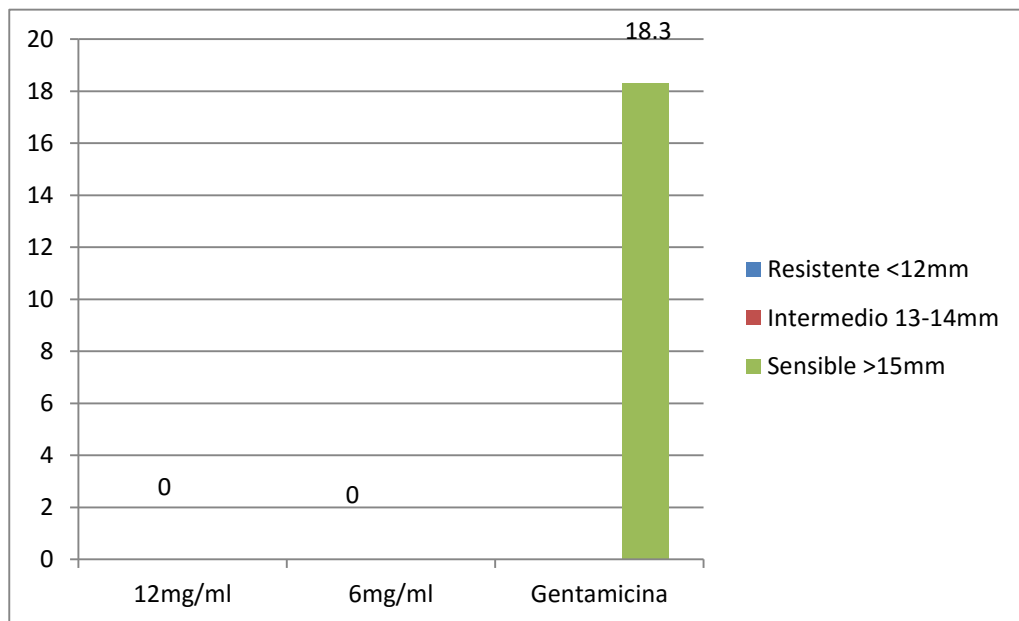
Figura 4: Categorización del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad de Iquitos, frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.



La Figura N°4, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale* y del control positivo (Gentamicina 10mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 27.0 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale*, obtuvieron valores de DZI de 8.7 y 9.3mm, a las concentraciones de 6 y 12mg/ml, respectivamente, por lo cual se categorizan como RESISTENTE.

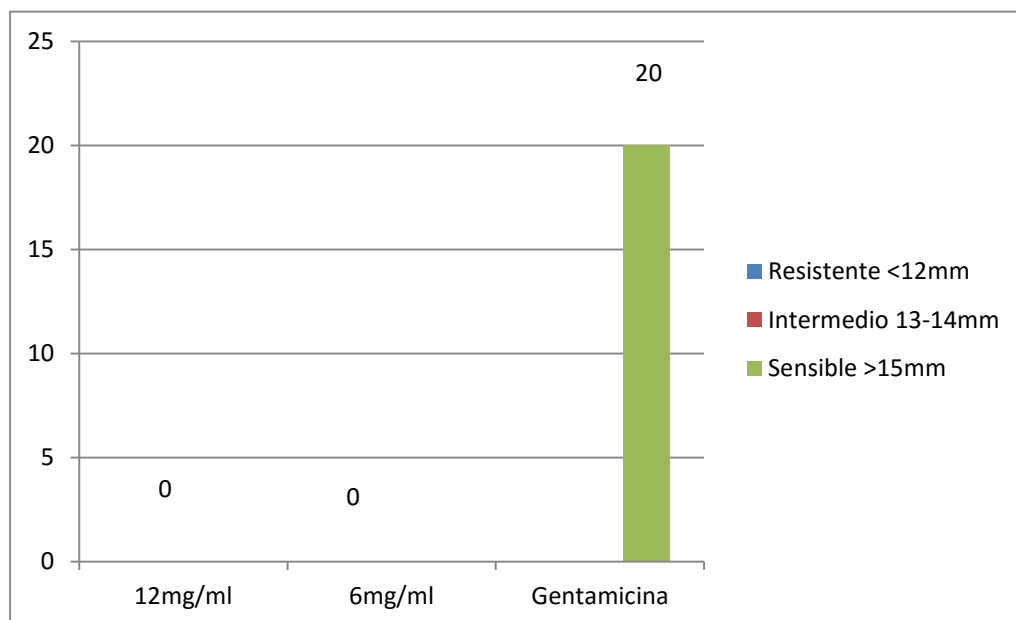
Figura 5: Categorización del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad de Iquitos, frente a *Escherichia coli* según Diámetro de la zona de inhibición.



La Figura N°5, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale* y del control positivo (Gentamicina 10mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 18.3 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale*, obtuvieron valores de DZI de 0.0 y 0.0mm, a las concentraciones de 6 y 12mg/ml, respectivamente, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

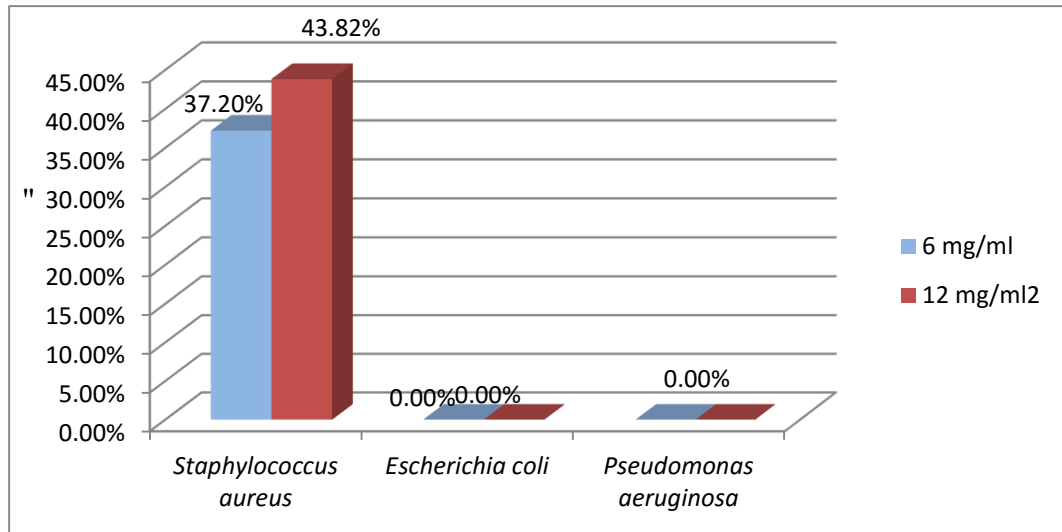
Figura 6: Categorización del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad de Iquitos, frente a *Pseudomonas aeruginosa* según Diámetro de la zona de inhibición



La Figura N°6, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale* y del control positivo (Gentamicina 10mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 20.0 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale*, obtuvieron valores de DZI de 0.0 y 0.0mm, a las concentraciones de 6 y 12mg/ml, respectivamente, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

Figura 7: Actividad antibacteriana de extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” según Porcentaje de inhibición.



La Figura N°7., muestra los porcentajes de inhibición del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale* en las diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran los extractos etanolicos a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose tanto para *Staphylococcus aureus*, un porcentaje de inhibición de 43.82% a la concentración de 12mg/ml, 37.20% en la concentración de 6mg/ml, con el cual se obtiene como resultado POCO ACTIVO E INACTIVO respectivamente

Para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, no se evidenciaron porcentajes de inhibición alguna, por lo tanto, son considerados INACTIVO.

Tabla 12: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, según diámetro de la zona de inhibición.

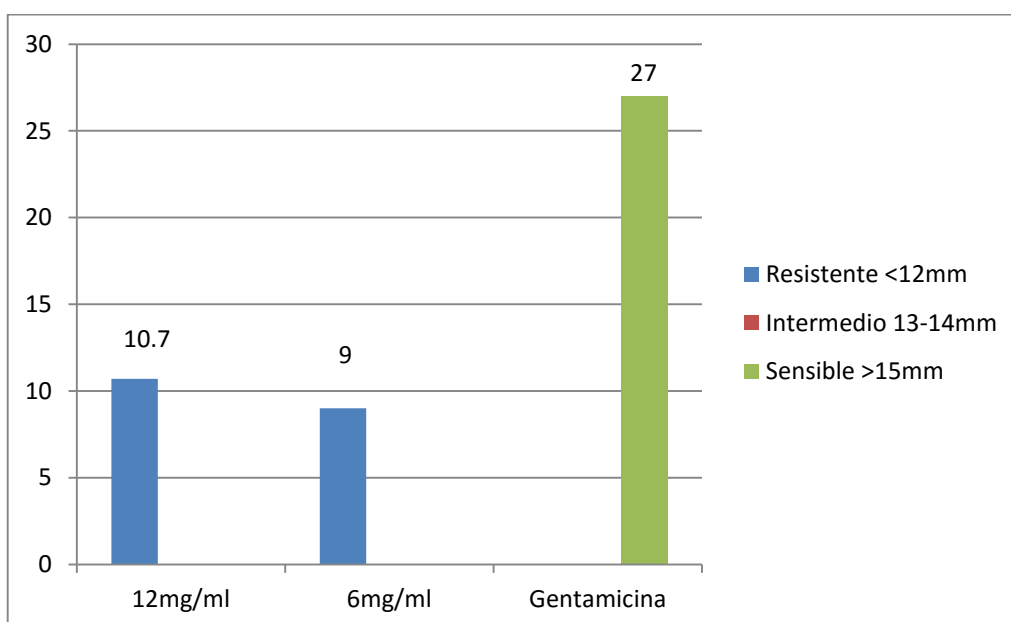
BACTERIAS DEL ESTUDIO	EXTRACTO ETANÓLICO	DIAMETRO DE LA ZONA DE INHIBICIÓN (DZI) *		ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (&)	
	RIZOMAS	(mm) X ± SD	RESULTADO (Kirby – Bauer)	% INHIBICIÓN	RESULTADO
	(mg/mL)				
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	10.7 ± 1.2	RESISTENTE	45.8	POCO ACTIVO
	6	9.0 ± 1.0	RESISTENTE	38.6	INACTIVO
	Gentamicina 10mcg	27.0 ± 7.8	SENSIBLE	---	---
<i>Escherichia coli</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	Gentamicina 10mcg	18.3 ± 3.1	SENSIBLE	---	---
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	6	0.0 ± 0.0	RESISTENTE	0.0	INACTIVO
	Gentamicina 10mcg	20.0 ± 1.0	SENSIBLE	---	---

* Esquema DZI frente a Control positivo
 Resistente: <12 mm
 Intermedio: 13 - 14 mm
 Sensible: > 15 mm
 Fuente: MPPSAMDD ⁽⁴⁹⁾

& Actividad antimicrobiana / Porcentaje de inhibición
 Inactivo: < 40%
 Poco activo: 40 – 50%
 Moderadamente activo: 51 – 75%
 Buena actividad :> 76 %

La Tabla N°12.: se muestra el promedio y desviación estándar de los diámetros de la zona de inhibición que se obtuvieron en las lecturas del ensayo de disco difusión, a diferentes niveles de concentraciones del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* recolectados en la localidad de lamas frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

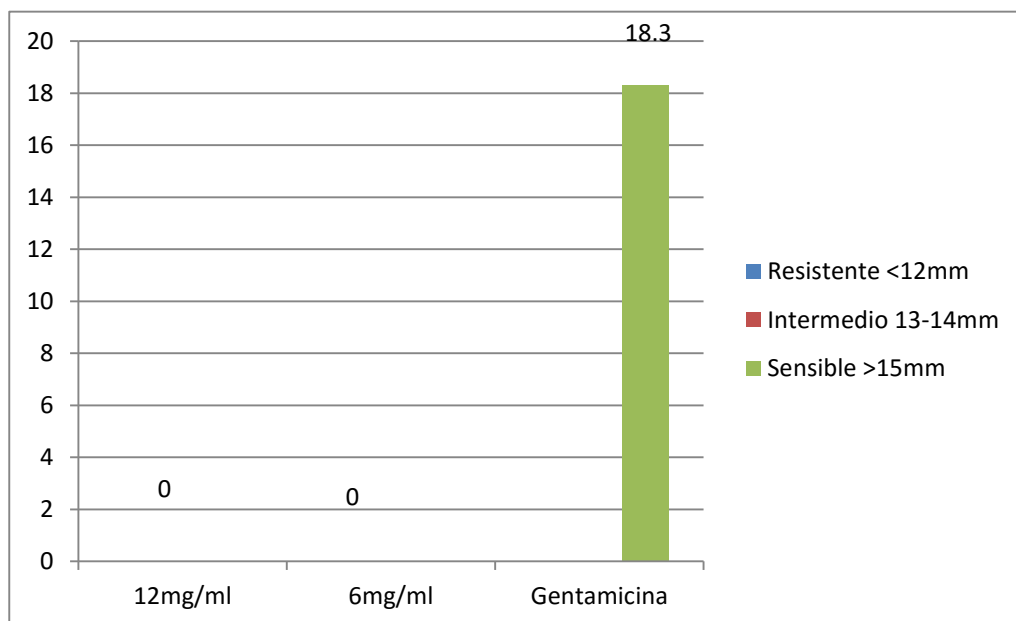
Figura 8: Categorización del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* "Jengibre" procedente de la localidad de Lamas, frente a *Staphylococcus aureus* según Diámetro de la zona de inhibición.



La Figura N°8, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale* y del control positivo (Gentamicina 10mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 27.0 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale*, obtuvieron valores de DZI de 10.7 y 9.0 mm, a las concentraciones de 6 y 12mg/ml, respectivamente, por lo cual se categorizan como RESISTENTE.

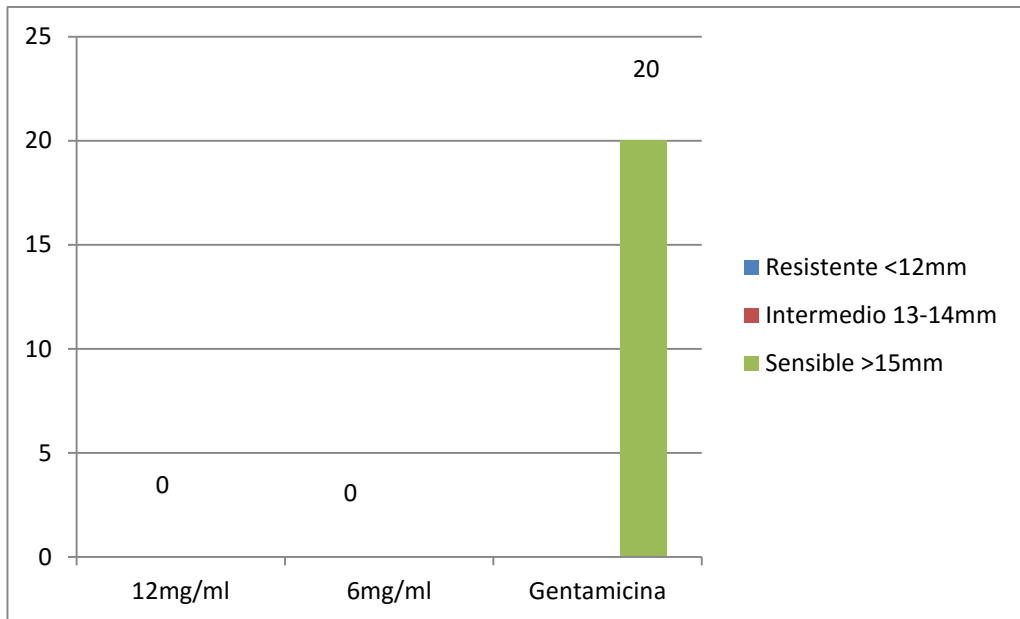
Figura 9: Categorización del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, frente a *Escherichia coli* según Diámetro de la zona de inhibición.



La Figura N°9, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* y del control positivo (Gentamicina 10mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Escherichia coli*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 18.3 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale*, obtuvieron valores de DZI de 0.0 y 0.0mm, a las concentraciones de 6 y 12mg/ml, respectivamente, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

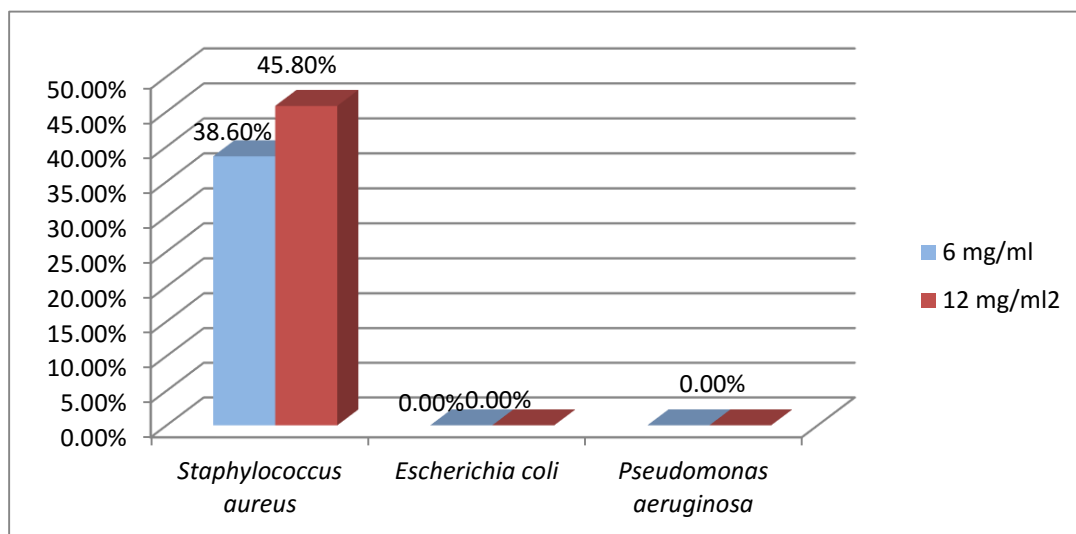
Figura 10: Categorización del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, frente a *Pseudomonas aeruginosa* según Diámetro de la zona de inhibición.



La Figura N°10, muestra la categorización de las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale* y del control positivo (Gentamicina 10mcg), respecto al Diámetro de la Zona de Inhibición (DZI) frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

El grupo control positivo obtuvo un diámetro de inhibición de 20.0 mm, lo cual lo categoriza como SENSIBLE según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión. Los grupos con las diferentes concentraciones del extracto etanolico de rizomas de *Zingiber officinale*, obtuvieron valores de DZI de 0.0 y 0.0mm, a las concentraciones de 6 y 12mg/ml, respectivamente, por lo cual se categoriza como RESISTENTE.

Figura 11: Actividad antibacteriana de Extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedente de la localidad de Lamas, según Porcentaje de inhibición.



La Figura N°11, muestra los porcentajes de inhibición del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” procedentes de la localidad de Lamas, en las diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

La actividad antibacteriana se mide principalmente por el porcentaje de inhibición que demuestran los extractos etanólicos a las diversas concentraciones evaluadas. Encontrándose tanto para *Staphylococcus aureus*, un porcentaje de inhibición de 45.80% a la concentración de 12mg/ml, 38.60% en la concentración de 6mg/ml, con el cual se obtiene como resultado POCO ACTIVO E INACTIVO respectivamente

Para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, no se evidenciaron porcentajes de inhibición alguna, por lo tanto, son considerados INACTIVO.

4.1.3.2 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM)

4.1.3.2.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Tabla 13: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Zingiber officinale* procedente de Lamas según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

<i>TABLA N° 13: Zingiber officinale – Lamas</i>			
BACTERIA EN ESTUDIO	N° DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	C3	8 mg/ml	POCO ACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

Tabla 14: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Zingiber officinale* procedente de Iquitos según Concentración Mínima Inhibitoria (CIM), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

<i>TABLA N° 14: Zingiber officinale – Iquitos</i>			
BACTERIA EN ESTUDIO	N° DILUCIÓN	CMI	RESULTADO (*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	C2	16mg/ml	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderado activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

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

En la Tabla N° 13, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de ***Zingiber officinale*** según la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 8 mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de *Zingiber officinale* demostró ser POCO ACTIVO frente a *Staphylococcus aureus*. Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo

de macrodilución frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* demostró ser inactivo.

En la Tabla N° 14, se muestra los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de ***Zingiber officinale*** según la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).

Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución fue en la Concentración 16 mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de *Zingiber officinale* demostró ser INACTIVO frente a *Staphylococcus aureus*. Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* demostró ser negativo.

4.2 DISCUSION

La actividad antibacteriana del extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” está basado en los métodos de disco difusión en agar y dilución en caldo (macrodilución), según el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.

Las muestras vegetales fueron recolectadas en diferentes regiones, con la finalidad de verificar la diferencia o similitud en el contenido de metabolitos secundarios y en el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Una muestra de rizomas de *Zingiber officinale*, fue recolectado en los alrededores de la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, departamento de Loreto y la otra muestra fue recolectado en alrededores de la ciudad de Lamas, provincia de Lamas, departamento de San Martín.

Los extractos vegetales fueron macerados en etanol de 96° durante 7 días por separado según procedencia de las muestras de rizomas de *Zingiber officinale*, éstos fueron filtrados y concentrados en equipo de rota vapor.

La concentración del extracto se realizó por eliminación de disolventes a presión reducida en un rotavapor, a una temperatura de 46°C y a una presión de 690 mnHg por espacio de 3 horas aproximadamente, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente por 7 días. [42]

El presente estudio, tuvo como finalidad evaluar la actividad antibacteriana y para ello se utilizó como fármaco comparativo (control) a Gentamicina 10mcg.

Los resultados obtenidos en el estudio referente al Rendimiento del extracto de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre” según lugar de procedencia fue de 1.55% para las muestras recolectadas en la localidad de Iquitos, y 1.93% para las muestras procedentes de la Localidad de Lamas – San Martín, lo cual nos indica que por cada 100 gramos de rizomas desecados se podrá obtener aproximadamente 1.55 g. (Iquitos) y 1.93 g. (Lamas) de extracto etanólico en polvo respectivamente; lo cual demuestra que probablemente el mayor porcentaje en rendimiento de las muestras recolectadas en Lamas puede deberse a las condiciones edafológicas y ambientales propias de esa región, que favorece la concentración de nutrientes y metabolitos secundarios.

El tamizaje fitoquímico de rizomas de *Zingiber officinale* “Jengibre”, se realizaron mediante protocolo estandarizado en la Facultad de Ingeniería en Industrias alimentarias, basado en el método de Shinoda.

El conocimiento de los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana debe orientar a la elaboración de esquemas de tratamiento más eficaces y la información proporcionada por la vigilancia debe servir de insumo para la elaboración de un programa de uso racional de antibióticos, además de la búsqueda de moléculas y/o principios activos provenientes de especies vegetales amazónicas, dentro de los cuales se evaluaron los rizomas de *Zingiber officinale*.

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron los métodos de Difusión en Disco (Kirby -Bauer) y Difusión en caldo (macrodilución)

frente a bacterias gram positivas y gram negativas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En los resultados encontrados se demuestra que el extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* procedentes de la localidad de Iquitos, logró inhibir el crecimiento en las placas con *Staphylococcus aureus*, evidenciándose un Diámetro en la zona de inhibición de 9.3 mm para la concentración de 12mg/ml y de 8.7 mm en la concentración de 6mg/ml., los cuales al ser comparados con el fármaco control (gentamicina 10mg) e interpretado con el manual referencial el Instituto Nacional de Salud, fue categorizado como RESISTENTE.

Frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, no se evidenció inhibición en el crecimiento, por lo tanto, éstos también fueron categorizados como RESISTENTES.

El extracto etanólico de rizomas de *Zingiber officinale* procedentes de la localidad de Lamas, mostró similar resultado, ya que solo logró inhibir el crecimiento en las placas con *Staphylococcus aureus*, con 10.7 mm para la concentración 12mg/ml y 9.0 mm para la concentración de 6mg/ml. No presento capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Estos resultados concuerdan con lo reportados por *Nada K, Zainab A, Zainab G.* quienes evaluaron la actividad antibacteriana de extractos acuosos de Rizomas frescos, polvo seco, en extracto de manzana y aceite crudo de *Zingiber officinale*, encontrando en el extracto acuoso del rizoma seco la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.^[18]

Malu, S. P., Obochi, G. O., Tawo, E. N., & Nyong, B. E. En un estudio con diferentes extractos (agua, n-hexano, acetato de etilo y etanol) de *Z. officinale* demostró actividad antibacteriana frente a *Bacillus colliform*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus viridians*.^[17]

Baskaran S, Baradwaj R. G. Evaluaron el extracto etanólico de *Zingiber officinale* frente a *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*; a concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 ug/ml; obteniendo diámetros crecientes según concentración desde 6mm en la zona de inhibición del crecimiento bacteriano, especialmente frente a *Staphylococcus aureus* [19].

Konning G.H., Agyare C, Enninson B. En un estudio realizado con plantas medicinales de Ghana donde está incluido el *Zingiber officinale* (jengibre), encontró inhibición en *S. aureus*, sin embargo, este estudio difiere con nuestro resultado frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, donde obtuvieron diámetros en la zona de inhibición de 10.9mm y 7.6mm respectivamente, lo cual puede ser categorizado como Intermedio. [20]

Khalid A, et al. Encontraron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *P. aureginosa*, a concentraciones de 10, 20 y 30 ul/ml del extracto metanólico y acuoso. [21]

Respecto al método de macrodilución el extracto etanólico de las rizomas de *Zingiber officinale* procedente de la localidad de Lamas, presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 8mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*, siendo clasificado como POCO ACTIVO. Frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, no se encontraron la concentración mínima inhibitoria, por lo tanto son considerados INACTIVOS.

En las muestras recolectadas en la comunidad de Iquitos, se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 16mg/ml frente a *Staphylococcus aureus*, siendo clasificado como INACTIVO.

Éstos resultados difieren con los reportados por Kaushik P, Goyal P. Quienes evaluaron extractos metanólicos, etil acetato, etanólico y acuoso de rizomas de *Z. officinale*, y determinaron la Concentración mínima inhibitoria, donde concluyen que el extracto metanólico obtuvo mayor significancia al inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, en

comparación al extrato etanólico que obtuvo CIM 2048ug/ml. Respecto a *E. coli*, el extracto metanólico no presentó actividad antibacteriana. [22]

En el estudio las bacterias gram positivas mostraron mayor sensibilidad comparadas con las Gram Negativas, esto puede atribuirse a la presencia de terpenoides, flavonoides, alcaloides y taninos, entre otros. El uso de solventes orgánicos en la preparación de extractos muestra mayor capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, la razón detrás de esto puede darse en términos de mayor solubilidad de peptidoglicano de pared celular bacteriana y capas de lipopolisacárido en disolventes orgánicos.

El etanol como disolvente tiene la propiedad de arrastrar gran cantidad de metabolitos como saponinas, taninos, flavonoides ésteres y terpenos, estos metabolitos secundarios probablemente tienen la propiedad antibacteriana cuyo mecanismo es inhibir la síntesis o dañar la pared celular o inhibir la síntesis de ADN o ARN ya que la estructura que tienen éstos compuesto es similar a la de las bases púricas y pirimídicas y se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno, alterando así la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos. (Acción bactericida y acción bacteriostático). [48]

La poca presencia de metabolitos con actividad antibacteriana del extracto etanólico de jengibre (*Zingiber officinale*), puede deberse a la diferencia de condiciones agroecológicas del cultivo, cambios morfológicos, histológicos, fisiológicos y a los distintos parámetros operativos del proceso de extracción tales como tiempo, temperatura de extracción y cantidad de agua empleado. [23]

En el presente estudio tanto de la muestra de jengibre de Iquitos y Lamas se logró identificar la presencia de los constituyentes químicos que **coinciden** con los antecedentes Enríquez A, Prieto E, De Los Ríos E, Ruiz S. [24] en Flavonoides (+), glicósidos cardiotónicos (+), aminoácidos y aminas (+++), azúcares reductores (+), triterpenos y esteroides (++) , alcaloides (+), lactonas y cumarinas (+++), quinonas (++) , fenoles y taninos (++). [24]

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

- De la Obtención del extracto etanolico de los rizomas de *Zingiber officinale* (Jengibre) obtuvimos un rendimiento, 1.93 % para el extracto etanolico procedente de la ciudad de Lamas y un rendimiento de 1.55 % extracto etanolico procedente de la ciudad de Iquitos.
- De las pruebas realizadas en el screening fitoquímico de los rizomas de *Zingiber officinale* (jengibre) procedente de la ciudad de Lamas destacan: lactonas y cumarinas (+++), aminoácidos y aminos (+++), triterpenos y esteroides (++), quinonas (++), fenoles y taninos (++), alcaloides (+), azúcares reductores (+), flavonoides, (+), glicósidos cardiotónicos(+) y de las pruebas realizadas en el screening fitoquímico de los rizomas de *Zingiber officinale* (jengibre) procedente de la ciudad de Iquitos destacan :triterpenos y esteroides (+++), quinonas (+++), aminoácidos y aminos (+++), alcaloides(++), lactonas y cumarinas(++), azúcares reductores (+), fenoles y taninos(+), flavonoides(+), glicósidos cardiotónicos(+)
- En los ensayos utilizados para el “Método de Difusión en Disco” (Kirby - Bauer) del extracto etanolico de los rizomas de *Zingiber officinale* (Jengibre)procedente de Iquitos y Lamas, no presentaron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 12mg y 6mg, por no evidenciarse el halo de inhibición; frente a *Staphylococcus aureus*, la muestra procedente de Lamas presentó un halo de inhibición de 9.3 ± 0.6 mm y 8.7 ± 1.2 mm a la concentración de 12mg/ml y 6mg/ml respectivamente, mientras que para el extracto etanolico de Iquitos, a concentración 12mg/ml tuvo un halo de inhibición 10.7 ± 1.2 y a concentración 6mg/ml presento un halo 9.0 ± 1.0 .
- En los ensayos utilizados para la Determinación: “Concentración Mínima Inhibitoria” (CMI) del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale* (Jengibre), por el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución, se aprecia la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Zingiber officinale* procedente de Lamas frente a *Staphylococcus aureus*, por el método de Macrodilución, donde se determinó la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) en el Tubo C3 cuya concentración del extracto fue de 8mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de *Zingiber officinale* demostró ser pocp ACTIVO frente a *Staphylococcus aureus*. Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* demostró ser inactivo.

- En los ensayos utilizados para la Determinación: “Concentración Mínima Inhibitoria” (CMI) del extracto etanólico de los rizomas de *Zingiber officinale* (Jengibre), por el método de macrodilución frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Según rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución, se aprecia la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Zingiber officinale* procedente de Iquitos frente a *Staphylococcus aureus*, por el método de Macrodilución, donde se determinó la Concentración Inhibitoria mínima (CIM) en el Tubo C2 cuya concentración del extracto fue de 16mg/ml, por lo tanto, el efecto del extracto etanólico de *Zingiber officinale* demostró ser INACTIVO frente a *Staphylococcus aureus*. Asimismo, en el rango de lectura de la concentración inhibitoria mínima, encontrada en el ensayo de macrodilución frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* demostró ser negativo.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar diferentes ensayos con concentraciones más elevadas como a 30, 50, 100, etc. con el objetivo de tener mejores resultados.
- Utilizar diferentes tipos de solventes como metanol, vinagre de manzana, hexano, etc.
- utilizar diferentes tipos de controles positivos como ceftriaxona, ceftriaxona sódica, cefuroxina, ciprofloxacina, gentamicina, levofloxacina, metronidazol, etc. Con el objetivo de profundizar los estudios.
- Realizar otros tipos de ensayos para corroborar la sensibilidad antibacteriana de *Zingiber officinale* “Jengibre”, como por ejemplo un fraccionamiento para así poder realizar un aislamiento y profundizar que componentes cumple con acción antibacteriana, para así validar resultados.

CAPÍTULO VI

6.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shanahan F (2006). «The gut flora as a forgotten organ». *EMBO Rep* 7 (7): 688-93. PMID 16819463.
2. Zoetendal E, Vaughan E, de Vos W (2006). «A microbial world within us». *Mol Microbiol* 59 (6): 1639-50. PMID 16553872.
3. Gorbach S (1990). «Lactic acid bacteria and human health». *Ann Med* 22 (1): 37-41. PMID 2109988.
4. Salminen S, Gueimonde M, Isolauri E (2005). «Probiotics that modify disease risk». *J Nutr* 135 (5): 1294-8. PMID 15867327.
5. Prescott, L. M.; Harley, J. P. y Klein, D. A. (2004): *Microbiología* (5a ed.). Madrid: McGraw Hill Interamericana.
6. French, G. L. (2005): *Clinical Impact and Relevance of Antibiotic Resistance*. *Adv Drug Deliv Rev.*, 57, 1514-1527.
7. Barreto, G., Sónora, N., Vázquez, L., Rodríguez, H., Velásquez, B. Y G. Guevara: Acumulación de cepas de *E. coli* con una mayor virulencia debido a cambios en el ecosistema. *Rev. Prod. Anim.* 7 (3): 137-140, 1993a.
8. Jansen, W. T.; Van der Bruggen, J. T.; Verhoef, J. y Fluit, A. C. (2006): *Bacterial Resistance: A Sensitive Issue Complexity of the Challenge and Containment Strategy in Europe*. *Drug Resist Updat.*, 9, 123-33.
9. Falagas, M. E. y Bliziotis, I. A. (2007): *Pandrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: The Dawn of The Post-Antibiotic era?* *Int. J. Antimicrob. Agents*, 29, 630-636.
10. Barreto, G. y Rodríguez, H. (2007): *La cápsula, algo más que una estructura no esencial (Revisión)*. *Rev. Prod. Anim.*, 20 (1), 69-80.
11. C. Desmarchelier, F. Witting: *Etnomedicina y bioactividad - sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon, ecology, ethnomedicine and bioactivity* 1ra ed. Lima; 2000.
12. S. Zacchino : *Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos*. En: Yunes and Calixto eds. *Plantas como fontes de novos medicamentos*. SC, Brasil: Grifos (Ed); 2001
13. Mayon-White RT et al. *An international survey of the prevalence of hospital-acquired infection*. *J Hosp Infect*, 1988, 11 (Supplement A):43-48

14. Laffita O, Castillo A. Avances en la caracterización farmacotológica de la planta medicinal *Curcuma longa* Linn (Advances in the pharmacological and toxicological characterization of the herbal medicine *Curcuma longa* Linn) **2011**; Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Autopista Nacional, Km 1¹/₂, Santiago de Cuba, Cuba. Dirección electrónica: oneyda@toxi.scu.sld.cu
15. Health Canada. Preventing the transmission of bloodborne pathogens in health care and public services. *Can Commun Dis Rep*, 1997, 23 Suppl 3: i-vii, 1-43; i-vii,
16. Casanova, R.; J. Castillo; Y. Him; M. E. Sanabria y D. Rodríguez. 2004. Metabolitos secundarios en dos variedades de Jengibre. I Seminario Presente y futuro de la investigación y aprovechamiento de las plantas medicinales en Venezuela. IDEA. Fundación Instituto de Estudios Avanzados. Caracas, 8 al 10 de Diciembre.
17. Malu, S. P., Obochi, G. O., Tawo, E. N., & Nyong, B. E. (2009). Antibacterial activity and medicinal properties of ginger (*zingiber officinale*). *Global Journal Of Pure And Applied Sciences*, 15(3), 365-368.
18. Nada K, Zainab A, Zainab G. Antibacterial activity of the aquatic extract of fresh, dry powder ginger, Apple vinegar extract of fresh ginger and crud oil of ginger (*zingiberofficinale*) against different types of bacteria in hilla city, Iraq. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014; 6(5):414-417.
19. Baskaran S, Baradwaj R. G. Antibacterial, anti-oxidant and in vitro anticancer analysis of *Zingiber officinale* (L.) Rosc. *JOAASR* 2016; 1(6):1-17
20. Konning G.H., Agyare C, Enninson B. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana. *Fitoterapia* 2004; 75:65-67
21. Khalid A, Waseem A, Saadullah M, Rehman U, Khiljee S, Sethi A, et al. Antibacterial activity analysis of extracts of various plants against gram-positive and -negative bacteria. *Afr. J. Pharm. Pharmacol* 2011; 5(7): 887-893
22. Kaushik P, Goyal P. Evaluation of Various Crude Extracts of *Zingiber officinale* Rhizome for Potential Antibacterial Activity: A Study in Vitro. *Advances in Microbiology*, 2011; 1:7-12.

23. Acosta de la Luz Lérica. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2003 Abr [citado 2016 Mayo 24] ; 8(1):Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-7962003000100008&lng=es
24. 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(The pharmacognostic and phytochemical study of rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe, of Chanchamayo, Junin. Peru) Rev. Med. Vallejana 2008; 5 N°1
25. J. Amorín. (1988) Guía taxonómica con plantas de interés farmacéutico - Bs. As. Rev. de Inf. Fcia. y Bioq. N° 702 – 80 pp. Disponible en URL: <http://www.herbotecnia.com.ar/exojengibre.html>
26. M. Del Rio, L. López. El Jengibre: Historia de un Monocultivo Caribeño del Siglo XVI. Universidad Complutense de Madrid. Ed. Complutense. Madrid 1992. Fecha de revisión: 07/02/07. Disponible en URL: <http://www.ucm.es/bucm/revistas/ghi/11328312/articulos/rcha9292110063a.pdf>
27. A. Batista; J. Pino, J.; L. Rodríguez; G. Padrón y G. Palomar. 2003. Caracterización de los compuestos pungentes en la tintura de jengibre al 50 %. Rev. Cubana Plant. Med. 8(3):2-7
28. Programa de investigación aplicada (APROCSAL), Colección “Plantas Medicinales”, Asociación de Promotores comunales salvadoreños, San salvador, El Salvador
29. A. Sabilon; M. Bustamante “Plantas Con Propiedades Plaguicidas”, 1a parte, Publicación DPV – Zamorano, Escuela de Agricultura Panamericana Zamorano, Honduras.
30. Kushwaha R, Guarro J (Eds.) Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao, Revista.
31. Gamazo, Lopez-Goñi y Diaz, R. 2005 “Manual práctico de Microbiología”. Barcelona: Editorial MASSON S.A.
32. R. Taroco, V. Seija, R. Vignoli, Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica; pag.669-670.

33. Clinical laboratory standards institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute. 2008.
34. Sánchez-Schmidt J., et al. Manifestaciones cutáneas en las candidiasis perinatales. *Piel*. 2005; 20(9):450-6.
35. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001; 357: 1225-1240.
36. Kloss WE, Schleir KH, Goirtz F. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. *The Prokaryotes*, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag; 1992
37. Guadalupe Rodríguez-Angeles. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>. *Salud Publica Mex* 2002;44:464-475.
38. EFSA- European Union Summary Reports on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 and 2010 - specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2726.pdf>
39. Iglewski BH (1996). *Pseudomonas*. In: *Baron's Medical Microbiology* (Barron S et al, eds.)(4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch. (via NCBI Bookshelf) ISBN 0-9631172-1-1.
40. Merino, L. A. (2007), "Pseudomonas aeruginosa: una bacteria con personalidades múltiples". *Rev. argent. microbiol.*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 39, n. 3, sept. Disponible en http://www.scielo.org.ar/scielo.phpscript=sci_arttext&pid=S0325-75412007000300004&lng=es&nrm=iso>. accedido en 21 abr. 2015.
41. Manimome, S. (2004), Recuperado el 27 junio del 2012 de <http://ww.codeinep.org>
42. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A. 1100 Págs., ISBN: 84-200-0956-3

43. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 2005. Tercera Edición. Ginebra.
44. Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M. (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 85:415-421.
45. Dartois V, Sanchez-Quezada J, Cabezas E, Chi E, Dubbelde C, Dunn C, Granja J, et al. (2005). Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. *Antimicrob Agents Chemother.* 49:3302-3310.
46. Humberto H. Lara-Villegas y cols. Bioseguridad en el laboratorio: medidas importantes para el trabajo seguro. *Abril-Junio 2008;33(2):59-70*
47. Ospina L. (2001). CÁTEDRA MANUEL ANCIZAR Ética y bioética -I Semestre
48. Espinoza, I. 2003. Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana de *Tillandsia revurvata*. *Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp.: 2-30*
49. Taroco, V. Seija, R. Vignoli, Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Procedimientos de Microbiología Clínica. 2001; 663 - 670.*

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO N° 1: *Zingiber officinale* (jengibre) Iquitos



ANEXO N° 2: *Zingiber officinale* (jengibre) Lamas



OBTENCION DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS

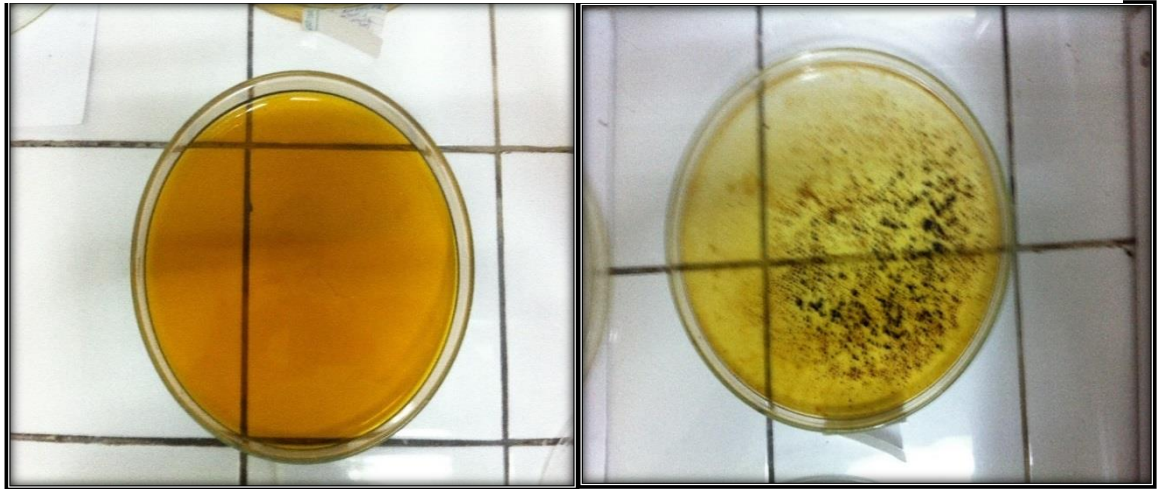
ANEXO N° 3: Filtración de los extractos



ANEXO N° 4: Concentración de los extractos Mediante el rotavapor.

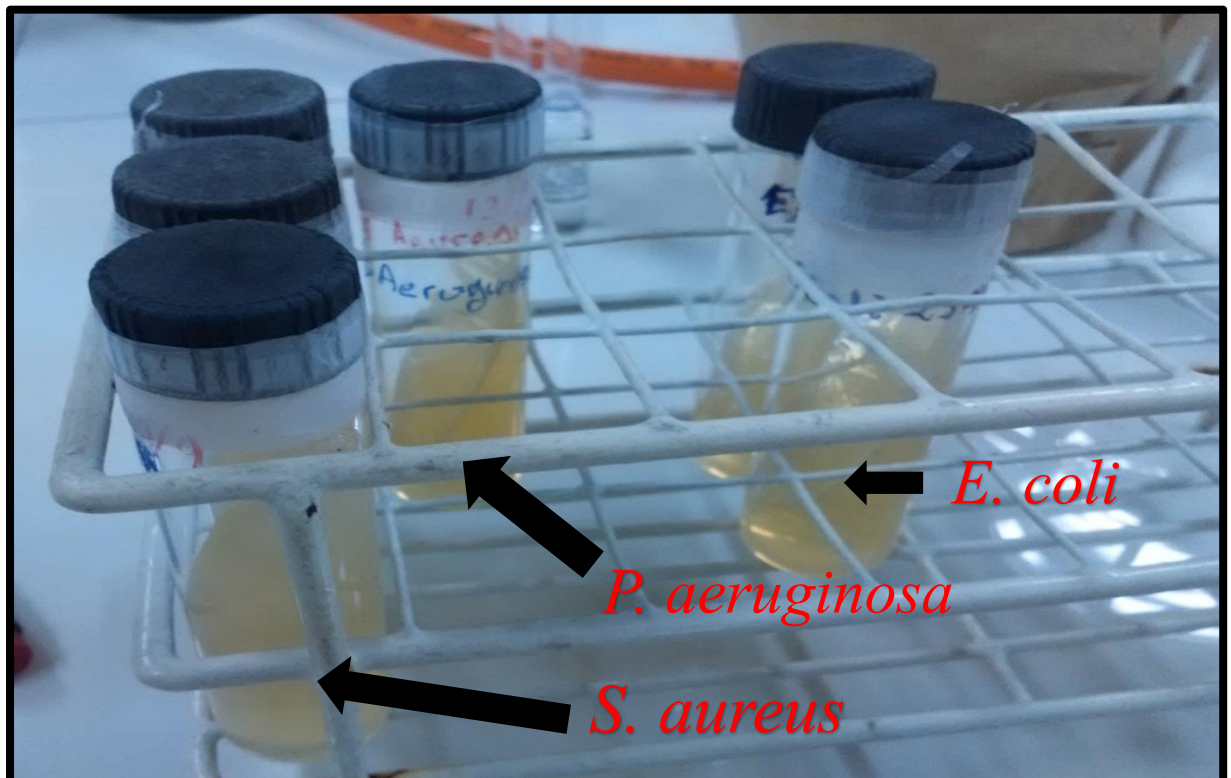


ANEXO N° 5: Extracto Etanolico (Lamas) Y Extracto Etanolico (Iquitos)



POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA

ANEXO N° 6: Cepas bacterianas con las que se realizó el estudio



PROCEDIMIENTOS DE LOS ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

ANEXO N° 7: Microtubos, tips para micropipetas, matraz con agar mueller hinton, tubos de CINa antes de ser llevados al autoclave.



ANEXO N° 8: AUTOCLAVE



ANEXO N° 9: Placas para los ensayos después de esterilizarlos en la estufa.



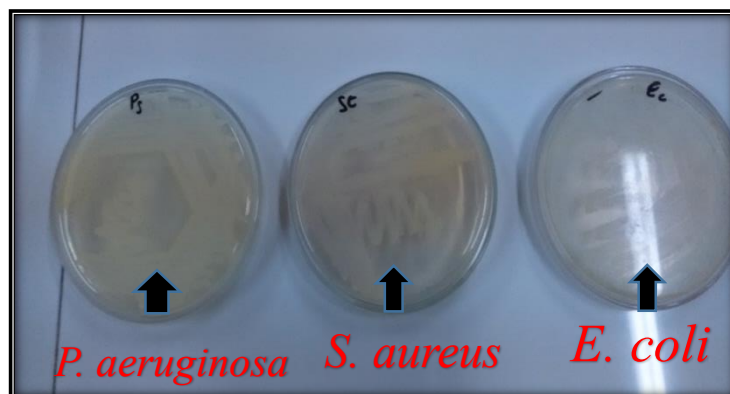
ANEXO N° 10: Preparación de las placas con Agar Mueller Hinton.



ANEXO N° 11: Siembra de las bacterias en las placas con agar Muller Hinton



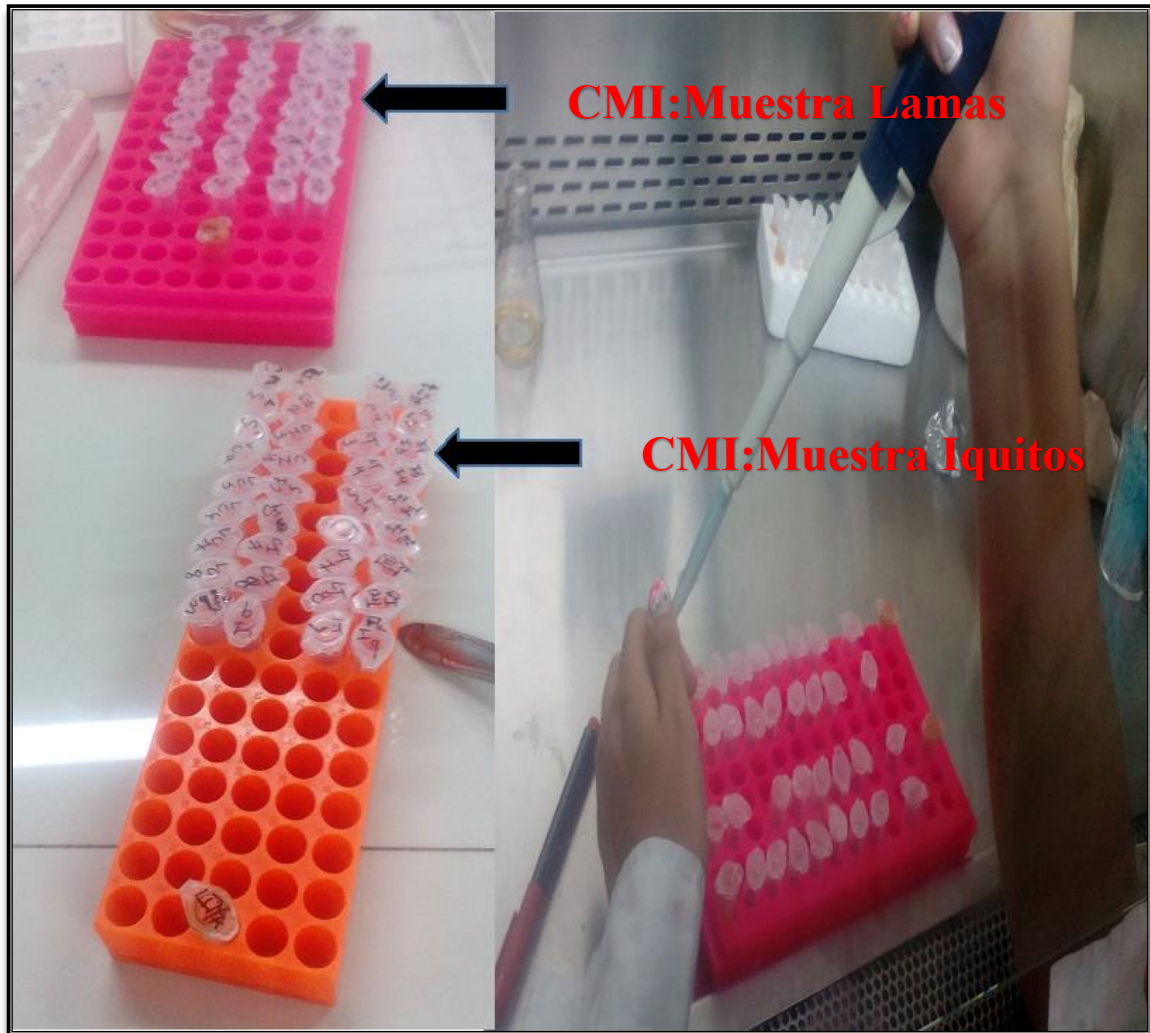
ANEXO N° 12: Crecimiento de las bacterias



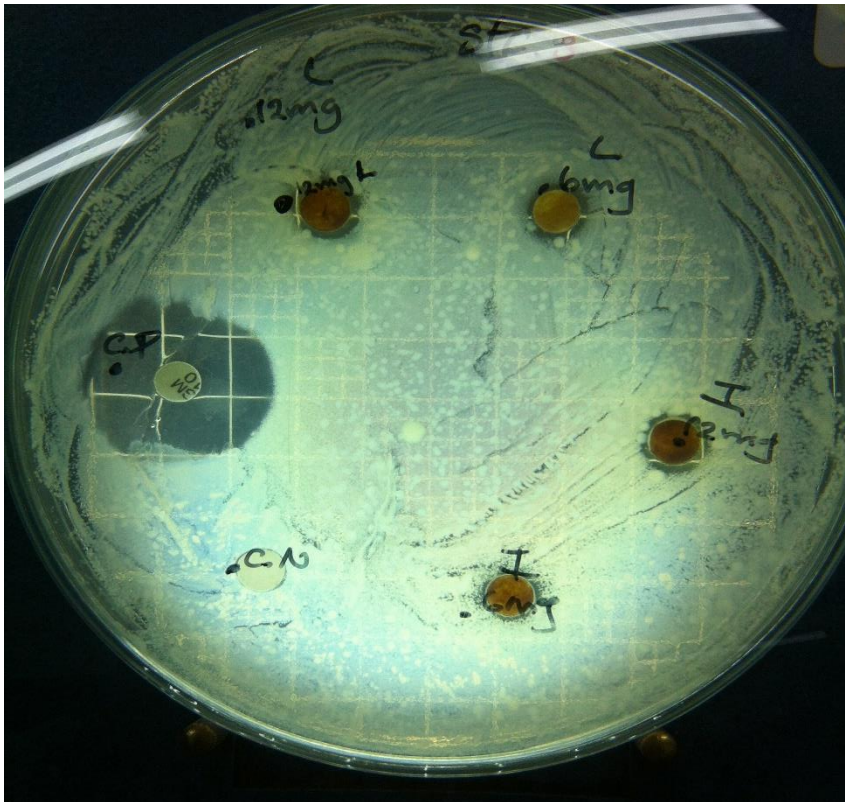
ANEXO N° 13: Patrón de Mac farland



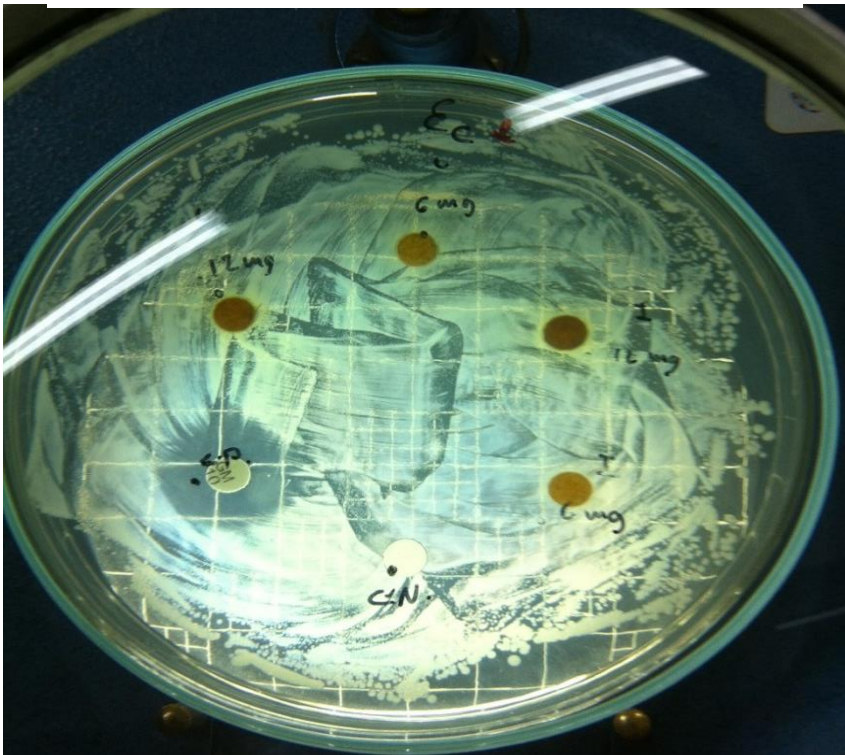
ANEXO N° 14: Procedimientos realizados del ensayo de Macrodilución



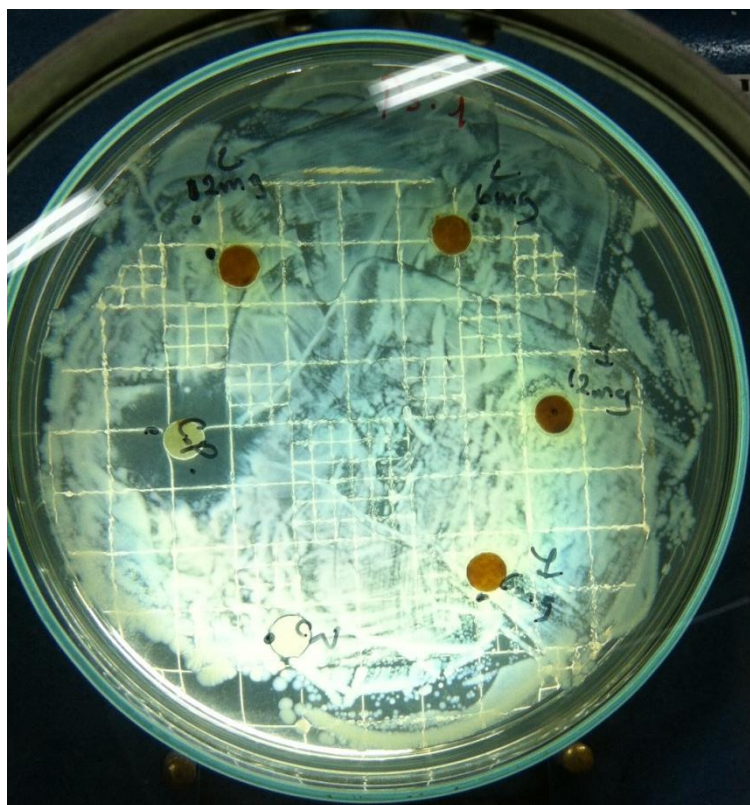
ANEXO N° 15: Resultados de Difusión en Disco.



ANEXO N° 16: Resultados de Difusión en Disco.



ANEXO N° 17: Resultados de Difusión en Disco.



ANEXO N° 18: Co

Constancia del Herbarium Amazonense



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación
de Recursos Naturales

CONSTANCIA N° 015-2017-AMAZ-UNAP

El Coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de La Universidad Nacional De La Amazonia Peruana

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentada por la bachiller: ASTRID STEPHANY URIBE GONZALES de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; es parte de la tesis titulada: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS RIZOMAS DE *Zingiber officinale Roscoe* (JENGIBRE) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*"; las cuales fueron verificadas y determinadas en este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indica:

N° de Herbarium	Nombre común	Nombre Científico	Familia
0033881	Jengibre	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	ZINGIBERACEAE

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

Iquitos 17 de mayo del 2017

Atentamente,


Blgo. RICHARD HUARANCA ACOSTUPA M.S.
Coordinador del Herbarium AMAZ
CIRNA-UNAP

