



Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

Efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico a partir de células en suspensión de *Zingiber officinale* “kion” a diferentes concentraciones sobre coliformes totales

Tesis

Para optar el Título Profesional de Bióloga con Mención en Biotecnología

Autoras

Estefania Alexandra Bazalar Aparicio

Gladis Emelin Moreno Quiñones

Asesora

Mg. Hermila Belba Díaz Pillasca

Huacho – Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Reconocimiento: Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

LICENCIADA

(Resolución de Consejo Directivo N° 012-2020-SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020)

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

INFORMACIÓN

DATOS DEL AUTOR (ES):		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	FECHA DE SUSTENTACIÓN
Estefania Alexandra Bazalar Aparicio	71323776	11/12/2023
Gladis Emelin, Moreno Quiñones	75239054	11/12/2023
DATOS DEL ASESOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Mg. Hermila Belba, Díaz Pillasca	15601607	0000-0002-2491-3774
DATOS DE LOS MIEMBROS DE JURADOS – PREGRADO/POSGRADO-MAESTRÍA-DOCTORADO:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Dr. José Luis, Romero Bozzetta	15581525	0000-0002-6631-1480
Blgo. Desiderio Elías, Cotos Duran	07243334	0000-0001-7456-5379
Mo. Alex Fidel, Torres Calderón	40182411	0000-0003-3077-1159

Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico a partir de células en suspensión de Zingiber officinale “kion” a diferentes concentraciones sobre coliformes totales

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

INDICE DE SIMILITUD

16%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

9%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to City University of New York System Trabajo del estudiante	1%
2	datos.unjfsc.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
4	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1%
5	revista.corpoica.org.co Fuente de Internet	<1%
6	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	<1%
7	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	<1%
8	repositorio.upads.edu.pe Fuente de Internet	<1%

Título

Efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico a partir de células en suspensión de *Zingiber officinale* “kion” a diferentes concentraciones sobre coliformes totales

Autoras

Estefania Alexandra Bazalar Aparicio
Gladis Emelin Moreno Quiñones

Asesora:

Mg. Hermila Belba, Díaz Pillasca

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ
CARRIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS

MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR:

Dr. José Luis, Romero Bozzetta
PRESIDENTE

Blgo. Desiderio, Cotos Duran
SECRETARIO

Mo. Alex Fidel, Torres Calderón
VOCAL

Mg. Hermila Belba, Díaz Pillasca
ASESORA

DEDICATORIA

Nuestra tesis la dedicamos a Dios, sin su bendición nada de esto hubiera sido posible, él nunca nos abandonó ni en los momentos más complicados de nuestras vidas y darnos la fortaleza que necesitábamos. Damos las gracias por brindarnos salud y habernos permitido llegar a lograr nuestros objetivos.

De igual manera esta tesis está dedicada de una manera especial a nuestros padres y hermanos por ser los principales impulsores de nuestros anhelos y metas, gracias por siempre confiar en nosotras, ya que sin ellos no hubiera sido posible recorrer todo este camino profesional hasta llegar a este punto de nuestras vidas profesionales, ellos nos inculcaron la responsabilidad y el deseo de superación, además agradecemos por todo el cariño y comprensión que tuvieron hacia nosotras.

AGRADECIMIENTO

Le agradecemos especialmente a nuestra asesora Mg. Díaz Pillasca Hermila Belba, por el empuje que nos brindó al realizar el proyecto de nuestra tesis en el Laboratorio Multifuncional 01 (Biotecnología Vegetal) de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Además de brindarnos sus conocimientos académicos en la elaboración de la presente tesis, y también por todas sus recomendaciones que nos brindó por su amplia experiencia en la investigación.

A nuestro compañero y amigo Blgo. Hernández Amasifuen Angel David, por la orientación y el apoyo que nos brindó desde el primer día que empezamos a recorrer este camino de la realización de nuestra tesis.

A la Escuela Profesional Biología con mención en Biotecnología, por su plana de docentes quienes nos impartieron sus conocimientos académicos además de sus consejos, para llegar a ser unas buenas profesionales.

A nuestros compañeros con quienes empezamos a recorrer todo este camino universitario, con ellos empezamos a querer y respetar esta hermosa carrera que es la biología; en especial a nuestro gran amigo Blgo. Rodríguez Grados Pedro Manuel, quien nos demostró que la amistad sigue a pesar del paso del tiempo.

INDICE

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCION	12
Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
1.1 Descripción de la realidad problemática	14
1.2 Formulación de problema	15
1.2.1. Problema general	15
1.2.2. Problemas específicos.....	15
1.3. Objetivos de la investigación	16
1.3.1. Objetivo General.....	16
1.3.2. Objetivos Específicos	16
1.4. Justificación de la investigación.....	16
1.5. Delimitación del estudio	17
Capítulo II: MARCO TEORICO	18
2.1. Antecedentes de la investigación	18
2.1.1. Investigaciones Internacionales	18
2.1.2. Investigaciones nacionales.....	19
2.2. Bases Teóricas	20
2.2.1. Nomenclatura del “kion”	20
2.2.2. Descripción botánica	21
2.2.3. Habidad y distribución.....	21
2.2.4. Composición fitoquímica.....	22
2.2.5. Usos medicinales	22
2.2.6. Importancia de los cultivos de hortaliza	23
2.2.7. Problemas que afectan al cultivo	23

<i>ESCHERICHIA</i>	23
<i>KLEBSIELLA</i>	24
<i>ENTEROBACTER</i>	24
<i>CITROBACTER</i>	24
2.2.8. Cultivo vegetal de tejidos	24
2.2.9. Obtención de metabolitos secundarios a partir del cultivo <i>in vitro</i>	25
2.3. Definiciones de términos básicos.....	26
2.4. Hipótesis de investigación	27
2.4.1. Hipótesis General.....	27
2.4.2. Hipótesis Especificas	27
2.4.3. Variables en operacionalización	28
Capítulo III: METODOLOGIA.....	29
3.1. Diseño metodológico	29
3.1.1. Tipo de investigación.....	29
3.1.2. Nivel de investigación	29
3.1.3. Diseño de la investigación	29
3.1.4. Enfoque de la investigación.....	29
3.2. Población y muestra	29
3.2.1. Población	29
3.2.2. Muestra	29
3.3. Técnicas de recolección de datos	30
3.3.1. Técnicas a emplear	30
3.3.1.1. Material biológico.....	30
3.3.1.2. Proceso de lavado	30
3.3.1.3. Desinfección	30
3.3.1.4. Proceso de inducción de los explantes.....	30
3.3.1.5. Suspensión celular de los callos	31
3.3.1.6. Extracto hidroalcohólico de la suspensión celular.....	31

3.3.1.7. Elaboración de los discos de sensibilidad.....	32
3.3.1.8. Pruebas microbiológicas.....	32
3.4. Técnicas para el procesamiento de la información.....	33
Capítulo IV: RESULTADOS.....	35
4.1. Análisis de resultados.....	35
4.2. Contrastación de hipótesis.....	40
Capítulo V: DISCUSION.....	42
5.1. Discusión de resultados.....	42
Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
6.1. Conclusiones.....	46
6.2. Recomendaciones.....	46
REFERENCIAS.....	48
7.1. Fuentes Bibliográficas.....	48
7.2. Fuentes Electrónicas.....	53
ANEXOS.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Variables en operacionalización; dimensiones, indicadores y escala de dimensión</i>	28
Tabla 2. <i>Tratamientos para la inducción de callos a partir del rizoma del kion</i>	31
Tabla 3. <i>Evaluación de los extractos por género bacteriano</i>	33
Tabla 4. <i>Escala para comparar la inhibición según Duraffourd</i>	34
Tabla 5. <i>Respuesta de formación de callos en explantes de kion en condiciones in vitro</i> .	36
Tabla 6. <i>Comparación del peso inicial con el peso final obtenidos en la suspensión celular.</i>	37
Tabla 7. <i>Media de los diámetros de los halos de inhibición (mm) para Escherichia</i>	37
Tabla 8. <i>Media de los diámetros de los halos de inhibición (mm) para Klebsiella</i>	38
Tabla 9. <i>Comparación de las medias según su sensibilidad para Escherichia</i>	39
Tabla 10. <i>Comparación de las medias según su sensibilidad para Klebsiella</i>	40
Tabla 11. <i>Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de kion en condiciones in vitro</i>	58
Tabla 12. <i>Análisis de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de kion en condiciones in vitro</i>	58
Tabla 13. <i>Análisis de varianza para la cepa de Escherichia</i>	63
Tabla 14. <i>Análisis de varianza para la cepa de Klebsiella</i>	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Explantes de kion <i>in vitro</i> . A. explantes del rizoma del kion sin formación de callos. B. explantes del rizoma del kion con la formación de callos	35
Figura 2. Callos friables obtenidos de los explantes de kion a la concentración 1 mg/L de 2,4-D para la suspensión celular.	36
Figura 3. Lavado del rizoma del “kion” para retirar la primera capa de suciedad	55
Figura 4. Desinfección en la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%, por un minuto e hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos y 3 enjuagues de 5 minutos cada uno con agua estéril, y secado.	55
Figura 5. Proceso de inducción de los explantes, colocados en medio de cultivo Murashige y Skoog a diferentes concentraciones con y sin el regulador de crecimiento 2,4-dicloro fenoxiacético.....	55
Figura 6. Explantes de kion sin respuesta en medio de cultivo MS sin el regulador de crecimiento 2,4-dicloro fenoxiacético.....	56
Figura 7. Formación de callos en explantes de kion en medio de cultivo MS adicionado el regulador de crecimiento 2,4-dicloro fenoxiacético.....	56
Figura 8. Callos inducidos en explantes de kion.....	57
Figura 9. Los callos friables, en medios de cultivo líquido MS suplementado. Colocados en un agitador rotatorio a 120 rpm a 26 +/-1 °C en condiciones de fotoperiodo 16h de luz y 8h de oscuridad.	58
Figura 10. Concentrador para concentrar nuestra muestra y favorecer la evaporación del solvente. La muestra resuspendida con 2mL de DMSO obteniendo así nuestra solución al 100%.....	59
Figura 11. Concentraciones al 75%,50% y 25% con alcohol de 96°, que luego se agregaron a cada uno de los discos 20 µl de las concentraciones al 25 %, 50 y 75%.....	59
Figura 12. Cepa <i>Escherichia</i> (A) y <i>Klebsiella</i> (B).....	60
Figura 13. Dilución de las sepas en solución salina.....	60
Figura 14. Sembrado con un hisopo estéril en las placas con agar Mueller Hinton.	61
Figura 15. Colocación de los discos	61
Figura 16. Medición de los halos de inhibición de la cepa <i>Escherichia</i>	62
Figura 17. Medición de los halos de inhibición de la cepa <i>Klebsiella</i>	63

RESUMEN

El *Zingiber officinale* conocido comúnmente en Perú como "kion", es muy valorado en la medicina peruana a lo largo de la historia por sus propiedades medicinales para diversos malestares. Los beneficios de estas plantas medicinales se le atribuyen a la presencia de principios activos con potencial farmacéutico. Por esta razón son necesario más estudios que respalden sus beneficios como su actividad antibacteriana. En consecuencia, el objetivo de nuestra investigación, es determinar cuál de las concentraciones del extracto hidroalcohólico del *Zingiber officinale* "kion" tendrá un mejor efecto inhibitorio sobre coliformes totales. Se emplearon segmentos del rizoma "kion" para la inducción de explantes y así obtener callos friables; los cuales fueron utilizados para la suspensión celular por el lapso de 30 días sin cambio de medio de cultivo, se realizó un secado de la biomasa obtenida y posteriormente se prepararon los extractos hidroalcohólicos a concentraciones del 100%, 75%, 50% y 25%; sobre las bacterias *Escherichia* y *Klebsiella*, teniendo como control positivo a los antibióticos Ceftriaxona (CRO) y Levofloxacina (LVX), así como también el extracto del rizoma y como control negativo alcohol de 96%. Los resultados indican como mejor tratamiento a la concentración del 100% mostrando una diferencia significativa, mientras que a la concentración del 75% presentó una inhibición moderada para ambas bacterias. Concluyendo que a mayor concentración mejor será el efecto inhibitorio, de igual manera estos resultados son un gran aporte para la medicina alternativa siendo una buena opción para así disminuir el porcentaje de bacterias resistentes a antibióticos.

Palabras claves: *Zingiber officinale*, kion, callos, suspensión celular, extracto hidroalcohólico, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Zingiber officinale, commonly known in Peru as "kion", is highly valued in Peruvian medicine throughout history for its medicinal properties for various ailments. The benefits of these medicinal plants are attributed to the presence of active ingredients with pharmaceutical potential. For this reason, more studies are necessary to support its benefits such as its antibacterial activity. Consequently, the objective of our research is to determine which of the concentrations of the hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* "kion" will have a better inhibitory effect on total coliforms. Segments of the "kion" rhizome were used for the induction of explants and thus obtain friable calluses; which were used for the cell suspension for a period of 30 days without changing the culture medium, the biomass obtained was dried and the hydroalcoholic extracts were subsequently prepared at concentrations of 100%, 75%, 50% and 25%. ; on *Escherichia* and *Klebsiella* bacteria, with the antibiotics Ceftriaxone (CRO) and Levofloxacin (LVX) as a positive control, as well as the rhizome extract and 96% alcohol as a negative control. The results indicate the 100% concentration as the best treatment, showing a significant difference, while the 75% concentration showed moderate inhibition for both bacteria. Concluding that the higher the concentration, the better the inhibitory effect. Likewise, these results are a great contribution to alternative medicine, being a good option to reduce the percentage of bacteria resistant to antibiotics.

Keywords: *Zingiber officinale*, kion, callus, cell suspension, hydroalcoholic extract, antimicrobial activity.

INTRODUCCION

El *Zingiber officinale* conocido en el Perú como "kion" es originario del sudeste asiático y fue importado al Perú a fines del siglo XVIII; desde esos tiempos es cultivado en la Selva Central, especialmente en Junín. Durante los primeros cuatro meses del año 2020, tuvo un gran incremento en las exportaciones del Perú, durante la pandemia (Comercio, 2020). Desde entonces ocasiono que el Perú sea cuarto exportador mundial del kion (ADEX, 2023).

Es una de las especies más empleadas en la medicina natural, en virtud de sus principios activos como el shogaol y el gingerol, los cuales le otorgan propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antioxidantes, etc. Adicionalmente; es muy codiciado en la industria farmacéutica, alimenticia, cosmética y la perfumería. (Zambrano, 2015).

La medicina natural está presente desde tiempos inmemorables, lo utilizaron nuestros antepasados y se sigue empleando hasta la actualidad. La práctica más conocida es el uso de plantas medicinales, para su aplicación ha sido necesario un estudio profundo de cada una de ellas. Por esta razón; en las últimas décadas, han sido utilizadas en contra ciertas enfermedades resistentes a los tratamientos farmacéuticos y han dado resultados sorprendentes (Rodríguez *et al.*, 2002).

La orientación del uso de plantas medicinales en el Perú es cerca al 80%, la mayoría de la población tiene el conocimiento de emplear las plantas como tratamiento de enfermedades, además de comprobarse que el 76% de los asegurados de EsSalud están dispuestos de seguir ese tratamiento (UNMSM, 2010).

Sin embargo, estos principios activos con potencial farmacéutico son producidos en bajas concentraciones; debido a un estrés biótico y abiótico que sufren las plantas, también llamados metabolitos secundarios. Además de su lento proceso decrecimiento (Morales *et al.*, 2016)

Por eso, es necesario el uso de herramientas biotecnológicas para facilitar la obtención de los metabolitos secundarios. Por medio del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, usando la técnica de suspensión celular, facilitara la multiplicación celular y producción de metabolitos secundarios (Vanisree *et al.*, 2004).

De tal manera, la presente investigación plantea determinar efecto antimicrobiano del *Zingiber officinale* “kion” a partir del extracto hidroalcohólico de la suspensión celular a diferentes concentraciones sobre coliformes totales, presentando un antecedente para la evaluación a partir de una suspensión celular.

Capítulo I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

La pandemia trajo consigo muchos problemas, los cuales significaron un daño considerable en la economía peruana. Sin embargo, pese a este obstáculo la agricultura sigue siendo una fuente de trabajo para un gran sector de la población, a pesar de no ser muy bien remunerada, y esto puede ser por su poco desarrollo a nivel tecnológico. En particular los cultivos de hortalizas presentan problemas con métodos de trabajo poco o nada estandarizados (Cauty y Memenza, 2021).

La ingesta de hortalizas en nuestra vida diaria, es necesaria para mantener una buena salud, ya que está compuesta de vitaminas, minerales y fibra; además favorecen la eliminación de toxinas de nuestro cuerpo, también nos ayuda con nuestra hidratación por su alto contenido de agua. Así mismo; contienen antioxidantes que el cuerpo humano utiliza para eliminar radicales libres, los principales causantes de enfermedades asociadas con la degeneración del sistema cardiovascular, nervioso e incluso el cáncer. (González, 2006).

No obstante; según el Centro de enfermedades contagiosas, un gran porcentaje de las enfermedades gastrointestinales son transmitidas por el consumo de frutas y verduras crudas. En este contexto nos referimos a las hortalizas, esto se debe por el tipo de agua empleada para el riego, además de ser cultivos de tallos cortos, están más expuesta a la contaminación microbiana, generando un riesgo para la salud humana. (Rivera *et al.*, 2009).

Las aguas residuales, son una alternativa para atender la demanda destinado a la Agricultura. Esto evidencia que no hay un manejo, ni control de las aguas residuales.

El escaso tratamiento para las aguas residuales domésticas, y las miles de hectáreas de cultivo que son regadas con aguas contaminadas, que se echan en los ríos sin el uso de algún tratamiento apropiado, esto lleva a que se genere un alto riesgo de que diseminen enfermedades entéricas (Moscoso *et al.*, 2005).

Uno de los perjuicios al usar aguas residuales, es que contiene bacterias coliformes; provenientes de las heces de animales y humanos, y parásitos; que proceden del uso de agua residuales, y del empleo de bostas (estiércol) como fertilizante. (Córdoba *et al.*, 2002). El agua residual actúa como vehículo de infecciones y es transmitido a través del consumo de alimentos contaminados. Entre los indicadores de calidad microbiológicos en alimentos incluyen los coliformes, habitualmente representados por cuatro géneros de la familia

Enterobacteriaceae: Escherichia, Klebsiella, Enterobacter y Citrobacter (Jay, 2002).

En el presente sabemos que, los metabolitos secundarios de las plantas medicinales son una fuente de sustancias activas contra muchas bacterias; por esta razón, actualmente ha aumentado el interés por indagar distintas especies de plantas con efectos antimicrobianos (Salazar, 2016). En este ámbito, EsSalud promueve el Programa de Medicina Complementaria, empleando la medicina natural, dado que las bacterias muchas veces causan resistencia a los antibióticos, se recurre actualmente al estudio e interés por la medicina alternativa (EsSalud, 2014).

Entre las plantas con propiedades medicinales destaca la especie *Zingiber officinale* (kion), el cual es un tubérculo aprovechado por distintas culturas por su amplio rango de acción antimicrobiano, sobre bacterias Gram Negativas y Gram Positivas (Kumar y Sharma, 2014). Las propiedades antimicrobianas del “kion” es similares al antibiótico amoxicilina por sus compuestos como; el gingerol, shogaol, zingerona, (Abd-Alrahman *et al.*, 2013). La extracción de los metabolitos secundarios activos en las plantas es muy limitada, por su crecimiento lento y por presentar una concentración baja en el material vegetal de moléculas activas (Bart, 2011).

Por ello, se necesita buscar alternativas para la obtención de metabólicos secundarios, con propiedades antimicrobianas, productivas y sustentables; como cultivos de tejidos vegetales *in vitro* utilizando herramientas biotecnológicas, por lo que la suspensión celular de callos será nuestra mejor herramienta para obtener una producción de biomasa y metabolitos secundarios con un efecto antimicrobiano (Dagla, 2012).

1.2 Formulación de problema

1.2.1. Problema general

¿Tendrá efecto antimicrobiano el extracto de suspensión celular hidroalcohólico de *Zingiber officinale* “kion” a diferentes concentraciones sobre coliformes totales?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál de las diferentes concentraciones de la hormona 2,4-D será mejor para poder obtener un buen porcentaje de callos friables?
- ¿Qué cantidad de biomasa se obtendrá del cultivo de suspensión celular?

- ¿Cuál de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Zingiber officinale* “kion” tendrá un mejor efecto inhibitorio sobre coliformes totales?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo General

Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de células en suspensión de *Zingiber officinale* “kion” a diferentes concentraciones sobre coliformes totales.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Diferenciar cual de las concentraciones de la hormona 2,4-D será mejor para poder obtener un buen porcentaje de callos friables
- Determinar el crecimiento de la biomasa celular obtenida a partir de cultivos de células en suspensión
- Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto a diferentes diluciones de biomasa de la suspensión celular sobre los coliformes totales.

1.4. Justificación de la investigación

Actualmente el proyecto “Salud y Medicina Tradicional”, formada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto a otras internacionales organizaciones, vienen planteando alternativas, mediante la medicina alternativa, con la utilización de hierbas medicinales para curar las enfermedades de las personas. Esta información es importante para el descubrimiento de diferentes medicamentos, que hoy se emplean a base de plantas.

Es por ello que es necesario seguir buscando métodos alternativos, como el empleo de extractos de hierbas medicinales; para tratar enfermedades infecciosas que emplean metabolitos secundarios reconocidos en estudios como una fuente de principios activos de medicamentos con aplicaciones farmacéuticas. Actualmente existe un incremento del interés de la población por medidas naturales alternativas que no causan resistencia frente a microorganismos; además de un menor costo con respecto a la medicina convencional, que a su vez tiene un efecto igual o mejor y con menos efectos secundarios para el organismo.

En la medicina natural la especie más empleada es el “kion” (*Z. officinale*) por sus cualidades medicinales; sin embargo, hay escasos estudios realizados sobre su actividad antimicrobiana, es por ello que es importante realizar una investigación vinculada con la evaluación de la actividad inhibición microbiana de estos extractos, generando antecedentes para en un futuro surja la posibilidad que sea validado científicamente y se pueda comercializar como una nueva opción de fármaco para tratar infecciones bacterianas.

1.5. Delimitación del estudio

La presente tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio Multifuncional 01 (Biotecnología Vegetal) de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, con código SL01LA09. Así mismo, la investigación se efectuó en este ambiente por presentar equipos que nos permitió aplicar todos los conocimientos requeridos para la obtención de cada uno de nuestros objetivos planteados.

Capítulo II: MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Investigaciones Internacionales

Después de realizar la búsqueda de estudios sobre extractos en plantas y su efecto antimicrobiano, se reporta los siguientes estudios en kion.

Fernández *et al.* (2020), evaluaron el efecto antimicrobiano de extractos foliares y de callo no embriogénico de *Azadirachta indica* en microorganismos de interés alimentario. En su metodología emplearon hojas maduras y frutos inmaduros de donde obtuvieron extractos a concentraciones del 5 al 50% utilizando solventes acetónicos, metánolicos, hexanólicos y etanólicos, mediante la técnica de microdilución sobre las bacterias *S. typhimurium* y *L. monocytogene*. En sus resultados mostraron en ambas bacterias un efecto inhibitorio con los extractos etanólico de callo. Concluyendo que en *S. typhimurium* tiene inhibición el extracto al 20% mientras que para *L. monocytogene* necesitaría concentraciones mayores al 50%.

Narges *et al.* (2015), establecieron un protocolo para la formación de callo y cultivo en suspensión celular de *Escrofularia estriada boiss.* En la metodología utilizaron semillas estériles para obtener explantes y sembrarlos en medio MS y suplementado con diferentes niveles de ácido naftalenacético (NAA) y de benciladenina (BA). Para el cultivo de suspensión celular se utilizó 3g de callos friables en medio líquido MS suplementado con NAA y BA. Como resultado el medio MS modificado con 0.5 mg/l de NAA y 2.0 mg/l BA fue donde se observó un mayor crecimiento de callos, y el caldo suplementado con 0.5 mg/l NAA y 2.0 mg/l de BA obtuvo un máximo de acteósido.

Díaz *et al.* (2014), utilizaron los rizomas, hojas y raíces de planta de jengibre antorcha, para su reproducción de las plántulas cultivadas in vitro y evaluar la inducción embriogénica somática. En su metodología utilizaron el medio MS adicionado con 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a cuatro concentraciones, y de picloram. Los cultivos fueron incubados a 25 ± 2 °C en oscuridad durante 120 días. Los resultados indicaron que el 2,4-D produjo callos con 86 % de estabilidad, y produjo un 64 % con picloram, el callo formado en combinación del 2,4-D y picloram tuvo un aspecto friable, siendo la primera señal de éxito en la diferenciación de los tejidos.

Abd-Alrahman *et al.* (2013), valoraron la actividad de inhibición microbiana y la composición de los extractos metanólico y etanólico al 50% de *Zingiber officinale* "kion". En su metodología emplearon el rizoma para realizar los extractos a concentraciones de 250,

500 y 1000 mg/mL; estos fueron analizado mediante (GC/MS). Se trabajó con 7 cepas: *S. aureus* ATCC 2491, *E. coli* ATCC 25912, *B. subtilis* IMG 22, *P. vulgaris* FMC1, *K. pneumonia* FMC 5, *P. aeruginosa* DSM 50071 y *L. monocytogenes* SCOOT A; se evaluaron por el método de difusión. En su resultado mostró eficacia la mayor concentración en ambos extractos para *E. coli*, *K. pneumonia* y *B. subtilis*; además se encontró los ácidos triterpénicos.

Cruz *et al.* (2010), determinaron las propiedades antimicrobianas de extractos etanólicos de las hojas secas de *S. molle*, *L. cámara*, *S. marianum* y *B. pilosa*. En su metodología evaluaron los extractos a concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.8 y 1 mg/ mL sobre las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* por método de difusión en pozo y disco. En los resultados obtuvieron acción antibacteriana frente a *S. aureus*, con un promedio alto de inhibición con el extracto de *B. pilosa* y medio con *L. camara* y *S. molle*; así mismo evidencian que la prueba de difusión en pozo exhibe mejor desempeño con relación a la difusión en discos ya que difunde mayor la cantidad de los extractos.

Zhenxian *et al.* (2005), evaluaron un protocolo para regeneración de plántulas de cultivos en suspensión de células embriogénicas somáticas. En su metodología utilizaron 4 genotipos de *Zingiber officinale* "kion" a los cuales indujeron a callos a partir de meristemas, en medio MS con diferentes concentraciones de 2,4-D, ácido 1-naftalenacético (NAA) con o sin 6-bencilaminopurina (BA) o kinetin (Kn). En sus resultados mostraron callos friables a la concentración de 1 mg 2,4-D y 0.2 mg Kn y para que los embriones fueron con 5.0 mg BA y 0.2 mg 2,4-D. Hubo diferencias entre los genotipos en la tasa y periodo requerido. En 2 meses se pudieron obtener plántulas regeneradas y callo embriogénico.

2.1.2. Investigaciones nacionales

Uriol y Espinoza (2021), determinaron la actividad de inhibición microbiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* L. "aguaymanto" y *Eucalyptus globulus* Labill "eucalipto". En su metodología utilizaron los frutos del aguaymanto y las hojas del eucalipto para los extractos a concentraciones al 40%, 70% y 100% contra *S. aureus* por difusión en disco. En sus resultados no hubo efecto antimicrobiano con el extracto de *P. peruviana* L. a ninguna de sus concentraciones; sin embargo, se encontró actividad antimicrobiana con el extracto al 100% de *E. globulus* Labill, refiriendo su efecto muy similar a la vancomicina (16.30 mm) frente al *Staphylococcus aureus*.

Vásquez *et al.* (2021), determinaron la eficacia de inhibición bacteriana *in vitro* de los extractos metanólicos de *Curcuma longa* "guisador", *Zingiber officinale* "kion" y la

mezcla de *C. longa* con *Z. officinale*, sobre las cepas resistentes de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27833, empleando el método de difusión en disco a concentraciones de 40%, 60%, 80% y 100% de los extractos. Como resultado el extracto de kion y la combinación con el guisador presentaron inhibición a las concentraciones 10 mg/mL, frente a *S. aureus*. Y el extracto de *C. longa*, no presentó inhibición bacteriana con ninguna de las tres especies bacterianas.

López *et al.* (2021), evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de *Zingiber officinale* “kion” en *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* en cerdos, para ello se tomaron muestra en los animales que presentaron salmonelosis y colibacilosis. Para los tratamientos se utilizó agua destilada estéril y el extracto del kion y. Los tratamientos se prepararon a concentraciones de 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% y 60%. Como resultado se evidencio que el “kion” no presento efecto antibacteriano sobre las bacterias mencionadas.

Andamayo *et al.* (2020), determinaron de que está compuesto el extracto hidroalcohólico de *Zingiber officinale* (kion) realizado en la selva central del Perú. Para ello deshidrataron la raíz y fue macerado por 10 días; para la determinación de metabolitos secundarios se realizaron diferentes ensayos con reacción química de cambio de color o formación de precipitaciones. Obteniendo como resultado la presencia de diferentes metabolitos secundarios, pero en especial una alta concentración de alcaloides seguido de aminoácidos y además de presentar antocianinas, flavonoides, saponinas, tanino, azúcares reductores y fenoles. No encontrándose lactosa, cardenolidos, esteroides ni quinonas.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Nomenclatura del “kion”

El “kion” también conocido como jengibre de la lengua indoeuropea y significa “forma de cuerno”. Su nombre científico es *Zingiber officinale*; no obstante, hay distintas especies, variando el nombre por su lugar de procedencia. Por consiguiente, se le atribuye distintos nombres nativos; “kion” (Perú), “jengibre dulce” (Puerto Rico), “gingembre” (Francia), “ajengibre” (Cuba), “gingembre”, “gengibre”, “gengivre”, “mangaratiá” (Portugal), “gengibre” (Antillas Francesas) “ginger” (Inglaterra), “ingwer” (Alemania) y “kiong” (China) (Roig, 2007). (Roig, 2007).

Taxonomía del "kion" (Castillo, 2018).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Zingiberales

Familia: Zingiberaceae

Género: *Zingiber*

Especie: *Zingiber officinale* (Roscoe).

El "kion" es una especie infértil que no pudo producir semillas. Por lo tanto, no puede propagarse sexualmente; por esta razón se utilizan sus rizomas para su propagación vegetativa (Guanoluisa, 2017).

2.2.2. Descripción botánica

Es una planta herbácea perenne, su rizoma es tuberoso, grueso, nudoso, carnosos, ramificado, es de un color blanco amarillento por dentro y cenizo por fuera. Es rastrero con tallos erectos de aproximadamente 1 m de alto. Sus falsos tallos aéreos son rojizos que pueden medir entre 60 y 90 cm de altura y de ahí nacen las hojas que están formadas en dos líneas paralelas, de color verde claro lanceoladas. Presenta una inflorescencia ovoide, que se forma donde terminan los falsos tallos, está compuesta de brácteas imbricadas de 2 a 3 cm de largo por 1 a 1.5 cm de ancho. Las flores en inflorescencia están agrupadas en una espiga, son de color amarillas y labios purpúreos de los cuales se destacan un labelo trilobulado con manchas de color amarillo-violeta-pardo (Guanoluisa, 2017).

2.2.3. Hábitad y distribución

El *Zingiber officinale* "kion" es procedente de la región Indomalaya, son zonas tropicales del sureste asiático; se ha habituado en Jamaica, África, México, Florida y en las Indias occidentales. Crece en un clima tropical húmedo entre los 80% y 95% de humedad, temperatura mayor a los 30° C, y la altitud de 0 a 1500 m.s.n.m. Gracias que en el Perú contamos con un clima variado, principalmente en la selva central, favorece el desarrollo de esta especie, en los departamentos de Junín y Huánuco (Vargas, 2014).

2.2.4. Composición fitoquímica

El "kion" dentro de su composición fitoquímica posee terpenos los cuales son hidrocarburos, sesquiterpenoides y compuestos fenólicos como son el gingeron, zingerone y el paradol en un mayor porcentaje. Cabe mencionar que contiene 3% de compuestos volátiles y el 5% no volátiles (Alzate, 1980).

Algunos componentes de su estructura química como el 6-shogaol, el gingerol, 1-deshidro-6- gingerdiona y 6 Dehidroshogaol y tienen un efecto antioxidante al neutralizar los radicales libres y el estrés oxidativo celular generando un equilibrio del sistema de defensa de nuestro organismo. Además, que el kion posee propiedades antiinflamatorias por ser un inhibidor de algunas citoquinas (Rahmani *et al.*, 2014).

Existen más de 30 compuestos fitoquímicos en el extracto etanólico del "kion". Los compuestos como el gingerenona, gingerol, shogaol, le dan la propiedad antimicrobiana al kion, además que existen otros compuestos como los flobotaninos, saponinas, alcaloides, terpenoides, taninos, flavanoides, esteroides y glicósidos. Y en mayor porcentaje se encuentran el β - Seiquphellandrene (12.71%), α -Curcumen (11.27%), α - Gingerene (20.57%), entre otros. Además de contener β -Eudesmol (2.05%) y Zingiberone (42.18%). (Bhargava *et al.*, 2012).

2.2.5. Usos medicinales

El rizoma "kion" se ha utilizado desde la antigüedad, como especia y en la medicina. Dioscórides, famoso griego farmacólogo del siglo I d.C., menciona al kion dentro de su ilustre obra De Materia Medica. En Europa Central, la medicina natural es muy utilizada para la fatiga de los nervios, inflamación intestinal, disuria, reumatismo, dolor de garganta, tos y en contracciones musculares dolorosas. También es empleado en problemas del aparato reproductor femenino, circulatorio y gástrico. Además, el kion también es conocido por tener efecto estimulante. Es un gran aliado del sistema inmunitario, susceptibilidad a bajas temperaturas y cansancio matutino (Siedentopp, 2008).

El gran valor nutricional del "kion" se debe a la presencia de aceites esenciales (2.5-3%), los componentes esenciales de estos aceites son los sesquiterpenoides como la curcumina y el farneseno. Así mismo presenta sustancias pungentes no volátiles. Dándole un 25% de la cualidad de pungencia los gingeroles. Este componente le da al kion una sensación de frescura. Los gingeroles químicamente son similares al ácido acetilsalicílico, dando un efecto analgésico. Además frena la acción del neurotransmisor serotonina, a nivel

del sistema digestivo alivia las náuseas, los gases y cólico. El gingerol a la par con el shogaol son sustancias pungentes poco volátiles frente a altas temperaturas. Provocan la salivación y segregación de ácido estomacal. Al estimular los termorreceptores estomacales generan en él una sensación de quemazón y ardor intenso. (Siedentopp, 2008).

2.2.6. Importancia de los cultivos de hortaliza

Dentro de la dieta alimenticia, las verduras representan una gran fuente de nutrientes para reparar tejidos, producción energética y regular funciones fisiológicas. Las hortalizas no solo son de gran importancia desde el punto alimenticio, sino también a nivel económico y social. En cuanto a lo económico y social, cumplen un papel fundamental en el Perú, por su gran impacto en el sector agrario, pues la agricultura aparte de producir la fuente alimenticia, también genera empleo en las áreas rurales y urbanas. A nivel sociales por la necesidad de alimentos a nivel de los mercados y a nivel industrial. Cabe resaltar que las hortalizas contienen hidratos de carbono, minerales, vitaminas, brindan fibra y en menor número proteínas; todos estos aportes son necesarios en nuestro cuerpo, ayudando a: producción energética (hidratos de carbono), regular funciones fisiológicas (vitaminas), mejora la función intestinal (fibra), reparación de tejidos (proteínas). Son necesarios en el desarrollo humano, aportando muchos beneficios y ayudando a prevenir enfermedades (Fernández, 2017).

2.2.7. Problemas que afectan al cultivo

Los cultivos de hortalizas están expuestos a diversos agentes contaminantes durante el transcurso de su producción, muchas veces afectando la salud; entre los que destacan son de origen microbiano. Por ello existen microorganismos que son usados como indicadores de contaminación fecal; los cuales ayudan a evaluar la calidad de los alimentos, entre ellos están los coliformes (Ambientalys, 2006).

ESCHERICHIA

Es una bacteria de la familia Enterobacteriaceae. Es gram negativa, anaerobia facultativa, no formadora de esporas (Madigan & Martinko, 2005). Algunas cepas de este género son patógenas, considerando que la gran parte de las bacterias de esta especie *Escherichia* son inofensivos comensales. (Baron, 1996).

KLEBSIELLA

Es una bacteria gram negativa, anaerobia facultativa, presentan cápsula, son no motiles y lactosa positiva. Se encuentra en la flora bucal, flora intestinal y en la piel. Esta bacteria es frecuente un patógeno oportunista (Podschun y Ullmann, 1998).

ENTEROBACTER

Las bacterias de este género son bacilos gramnegativos, se las puede ubicar en la naturaleza. Así como también en la flora intestinal animal, humana. Muchas son patógenas oportunistas, otras descomponen la materia orgánica muerta y algunas viven como parte de nuestra microbiota humana (Francisco, 2018).

CITROBACTER

Estos bacilos gramnegativos son aerobios que se encuentran en los mismos ambientes que el género *Enterobacter* antes mencionado. Son de igual manera patógenos oportunistas y afectan con mayor frecuencia a pacientes con su sistema inmune debilitado (Lipsky *et al.*, 1980).

Los coliformes también son causantes de gastroenteritis, la cual se contagia por la ingesta de alimentos contaminados tales como hortalizas de consumo directo y agua contaminada (Ambientalys, 2006).

2.2.8. Cultivo vegetal de tejidos

El cultivo vegetal de tejidos también conocido como “cultivo de plantas *in vitro*” permite obtener plantas libres de contaminantes al ser cultivadas en condiciones asépticas y controladas. Esta técnica consiste colocar en medio nutritivo estéril, de consistencia semisólida o gelificada, un segmento de una planta; la cual tomará el nombre de explanto (esta puede ser una hoja, tallo o una parte de ellos, ápice, embrión, semilla, etc.), a partir de ellos se formará una nueva planta para multiplicación, teniendo un cultivo. La composición del medio de cultivo varía de acuerdo al tipo de explanto y se quiera conseguir, como callos, desarrollo de raíces y yemas o producir semillas artificiales a partir de embriones somáticos (Segretín, 2006).

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se debe a las células vegetales totipotentes (Acosta, 2015), las cuales permiten producir un nuevo organismo a partir de un explanto; a partir de esta capacidad es posible que células meristemáticas (no diferenciadas) logran ser

células diferenciadas y realizar funciones específicas mediante la división celular que ocurre dentro del organismo (Peralta, 2014).

Desarrollar un cultivo vegetal de tejidos *in vitro*, permite reducir el tiempo de desarrollo y al crecer en placas o frascos logra reducir el espacio que ocuparía *in vivo*, permitiendo luego trasplantar a tierra (Segretín, 2006).

Esta técnica biotecnológica permite mejorar las plantas; teniendo cultivos libres de enfermedades, tener una producción de metabolitos secundarios y tener un control de su crecimiento. Estos sustentos permite aplicarlos en la horticultura, agricultura y la industria química (Dagla, 2012).

2.2.9. Obtención de metabolitos secundarios a partir del cultivo *in vitro*

Las plantas tienen rutas metabólicas comunes en las que producen sustancias conocidas como metabolitos, estos a su vez se dividen en dos tipos: los metabolitos primarios; son quienes participan en el desarrollo, supervivencia y reproducción de las plantas, procesos fundamentales como la fotosíntesis, síntesis proteica, etc. En cambio los metabolitos secundarios no son indispensables para sus funciones, desempeñan un papel valioso en su supervivencia, son producidos como medio de defensa de las plantas (Filová, 2014).

Estos metabolitos secundarios producidos en gran cantidad por las plantas, algunos de estos compuestos activos son de gran interés medicinal (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Por este motivo, es preciso realizar estudios para la obtención de metabolitos secundarios sin necesidad de cultivar una planta completa y así amenorar el tiempo en obtención, mejorando su producción y esto es posible con el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (Dagla, 2012).

La suspensión de células vegetales, es una herramienta que nos ayuda a comprender las distintas facetas del cultivo, las fases de biotransformación (metabolismo) que pasa al transcurso de su desarrollo en el cultivo; proporcionando una plataforma valiosa para la producción de metabolitos secundarios de alto valor y otras sustancias de interés comercial (Moscatiello *et al.*, 2013).

En esta técnica los callos (friables) son inoculados en un caldo de cultivo con una agitación constante; esto se hace con el fin de separar las células entre sí, creando una

suspensión integrada por pequeños agregados celulares o células individuales (Trang y Bui, 2004).

La suspensión celular indican un mayor índice de crecimiento en comparación a los callos; esto se debe a que al estar en un caldo, estos son bañados con los nutrientes, favoreciendo su absorción (Tineo, 2001). Mostrando que las suspensiones celulares son el mejor aliado para estudios sobre la formación de metabolitos secundarios, favoreciendo su obtención (Szabados *et al.*, 1991).

2.3. Definiciones de términos básicos

CALLOS: Son células indiferenciadas de origen vegetal, que están en continua división celular (Larson *et al.*, 2006).

DESDIFERENCIADO: Pérdida parcial de los caracteres morfológicos y funcionales de una célula o tejido (Española, 2016).

METABOLITO: Es una sustancia obtenida en el transcurso del metabolismo; cabe mencionar que las plantas tienen la capacidad de producir metabolitos primarios y secundarios (NCI, 2022).

MACERADO HIDROALCOHÓLICO: Consiste en remojar en alcohol con el fin de extraer un activo (Velada, 2022).

ANTIMICROBIANO: Sustancia que inhibe el crecimiento bacteriano (NCI, 2022).

IN VITRO: Es un procedimiento fuera del cuerpo, este se realiza en un laboratorio en condiciones controladas (ECHA, 2022).

HALO DE INHIBICIÓN: Es el área sin crecimiento que rodea al disco con antibiótico, el cual muestra inhibición bacteriana (CBTis, 2022).

2,4-D: El 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es un producto químico que elimina malezas. Es comúnmente utilizado como auxina ya que semeja su acción (Ruiz *et al.*, 2019).

BIOMASA: Es un conjunto de incluir microorganismos, plantas o animales que se encuentran en un entorno determinado en un preciso momento (UPM, 2022).

FRIABLE: Que se desmenuza o se aplasta con facilidad (RAE, 2022).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD: También llamada antibiograma, permiten precisar la sensibilidad de los microorganismos a diferentes antibióticos. Permitiendo determinar que antibiótico es efectivo para dicho microorganismo. Las pruebas de sensibilidad pueden hacerse para hongos, bacterias o virus (Vázquez, 2020).

METODO DE DIFUSION EN DISCO: Es un método cualitativo, llamado también prueba de Kirby-Bauer; esta prueba consiste en el empleo de discos de antibióticos, los cuales se colocan sobre las placas sembradas con el microorganismo en estudio. Es ideal para microorganismos de rápido crecimiento (Vázquez, 2020).

DISCO DE SENSIBILIDAD: Son círculos impregnados antibióticos; los cuales se utilizarán para las pruebas de difusión antes mencionadas (Espinoza y Serna, 2018).

DILUCION: Consiste en disminuir la concentración de un soluto en su disolvente (CUN, 2022).

UFC: Unidades formadoras de colonias (CUN, 2022).

2.4. Hipótesis de investigación

2.4.1. Hipótesis General

El extracto hidroalcohólico de la suspensión celular de *Zingiber officinale* tendrá efecto antimicrobiano frente a coliformes totales

2.4.2. Hipótesis Específicas

- El tratamiento con hormona 2,4-D al 1 mg/L dará mayor porcentaje de callos friables
- La biomasa final de la suspensión duplicara la inicial en el periodo de 30 días
- A menor dilución de biomasa en el extracto hidroalcohólico de la suspensión celular presentara un mayor porcentaje de inhibición

2.4.3. Variables en operacionalización

Tabla 1. Variables en operacionalización; dimensiones, indicadores y escala de dimensión

VARIABLES		DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE DIMENSIÓN
Variable independiente	Extracto hidroalcohólico de células en suspensión de <i>Zingiber officinale</i> "kion"	<ul style="list-style-type: none"> • Inducción de callos friables • Producción de suspensión celular • Obtención de extractos hidroalcohólico 	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje de inducción • Promedio del peso • Extracto al 100%, 75%, 50% y 25% 	<ul style="list-style-type: none"> • % • g • %
Variable dependiente	Efecto antimicrobiano	<ul style="list-style-type: none"> • Cultivos bacterianos de coliformes totales 	<ul style="list-style-type: none"> • Diámetro de halos de inhibición 	<ul style="list-style-type: none"> • mm

Capítulo III: METODOLOGIA

3.1. Diseño metodológico

3.1.1. Tipo de investigación

Investigación aplicada ya que se busco aplicar los conocimientos de nuestra investigación científica con respecto a los beneficios de *Zingiber officinale* "kion" así como también comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* sobre los coliformes totales.

3.1.2. Nivel de investigación

La investigación fue de nivel explicativo, ya que estuvo orientada a ver el efecto antimicrobiano a partir del extracto hidroalcohólico de la suspensión celular de *Zingiber officinale* "kion". De esta manera explicar una alternativa de medicina natural frente problemas gastrointestinales relacionados con coliformes totales.

3.1.3. Diseño de la investigación

La presente investigación presentó un diseño experimental, porque a base de nuestro experimental se valoró el efecto antimicrobiano en la búsqueda de definir un tratamiento ideal con dicha propiedad. Efectuando una comparación para establecer los tratamientos que presentaron mejores resultados, y dependiendo de las variables con las cuales se evaluaron.

3.1.4. Enfoque de la investigación

La investigación desarrollada tuvo un enfoque cuantitativo, debido a que nuestras evaluaciones se basaron en datos numéricos y se utilizó instrumentos estadísticos teniendo en cuenta que se recogió, procesó y analizó la variable independiente en la variable dependiente.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

La población estuvo definida por un total de 20 rizoma de *Zingiber Officinale* "kion" comercial.

3.2.2. Muestra

La muestra estuvo definida por un total de 250 segmentos del rizoma de *Zingiber officinale*. "kion".

3.3. Técnicas de recolección de datos

3.3.1. Técnicas a emplear

3.3.1.1. Material biológico

El *Zingiber officinale* "kion" fue obtenido de la empresa AGRO DEVELOP PERU SAC provenientes de Satipo, en su sucursal de Miraflores. Quienes venden "semillas" certificadas brindando la seguridad de la especie a trabajar. Posteriormente los rizomas fueron llevados al Laboratorio Multifuncional 01 código SL01LA09, (Biotecnología Vegetal) de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huacho.

3.3.1.2. Proceso de lavado

Los rizomas del "kion" fueron lavados con una esponja pequeña y unas gotas de lavavajilla líquido hasta quitar toda suciedad superficial, después de este proceso se colocaron en un vaso de precipitación de 250ml con agua potable al cual se le agrego Benomyl (1mL/L) y se dejó remojando una noche. Transcurrido el tiempo se lavaron con agua estéril, para quitar el exceso del antifúngico.

3.3.1.3. Desinfección

El proceso de la desinfección se realizó en la cámara de flujo laminar; primero los rizomas del kion estuvieron sumergidos en alcohol al 70% por un minuto, luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos estando en movimiento constante, para el lavado se utilizó agua estéril el cual se realizara 3 veces por un tiempo de 5 minutos cada uno, con el mechero prendido para una mayor esterilidad; posteriormente se extrajeron los rizomas con una pinza estéril para ser colocadas en placas estériles y puedan secarse, una vez que se observó seco el rizoma se procedió con el pelado.

3.3.1.4. Proceso de inducción de los explantes

Las partes optimas del rizoma del kion, fueron cortadas en pequeños trozos del tamaño de 1cm de diámetro y fueron colocadas en diferentes medios de cultivos por sus diferentes concentraciones, para analizar qué medio de cultivo presenta mayor porcentaje de formación de callos friables. Los medios de cultivo estuvieron compuestos por los mismos micronutrientes y macronutrientes descritas por Murashige y Skoog (1962), pero en media concentración, y adicionada sacarosa (30 g/L), agar (6 g/L) y la hormona Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, también se graduó el pH a 5.7 (Tabla 1). Después se trasladaron a la autoclave los medios para ser esterilizados a 121° C y 1.2 Bar de presión durante 20 minutos.

Tabla 2. *Tratamientos para la inducción de callos a partir del rizoma del kion*

TRATAMIENTO	2,4-D¹ (mg/L)
T1	0
T2	0.25
T3	0.50
T4	0.75
T5	1

¹Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

Se colocaron 10 explantes por placa y cada tratamiento se hizo con 5 repeticiones. Por último, fueron incubados a una temperatura de 24°C en condiciones de fotoperiodo 8h de oscuridad y 16h de luz por un periodo de 30 días aproximadamente para la obtención de la formación de los callos.

3.3.1.5. Suspensión celular de los callos

Los callos friables que se logró obtener de la mejor concentración del medio fueron transferidos a medios de cultivo líquido con una composición similar al medio de inducción de callos. Para ello se pesó 1.5g de callos friables por matraz de 125mL con 25mL de medio líquido MS suplementado y dicho proceso se realizó por triplicado. Posteriormente se colocaron en un agitador rotatorio a 120 rpm a 26 +/-1 °C en condiciones de fotoperiodo 8h de oscuridad y 16h de luz por el periodo de 30 días. Al término de dicho tiempo, los callos fueron separados del medio por filtración para lo cual se utilizó papel Whatman de 0.42 mm y se pesó como peso fresco al término del cultivo.

3.3.1.6. Extracto hidroalcohólico de la suspensión celular

La biomasa obtenida fue secada a 40°C en estufa por 2 días, para luego ser molida con un mortero en la cámara de flujo laminar. Luego se maceró 0.5g del pulverizado en 50mL de alcohol a 96° en agitación continua a 65 rpm durante 48 horas en un frasco ámbar. Después fue centrifugado a 10 000 rpm durante 10 min, para así separar la biomasa (sedimento) de la fase líquida (sobrenadante), posteriormente el solvente fue evaporado en un concentrador a una temperatura de 30°C durante 30 minutos, para evitar degradaciones térmicas de la muestra. La muestra obtenida fue resuspendida con 2 mL

de dimetilsulfóxido (DMSO), teniendo una solución final al 100%, a partir de la cual se diluyo a concentraciones al 75%, 50% y 25% con alcohol de 96° para realizar la evaluación antimicrobiana.

3.3.1.7. Elaboración de los discos de sensibilidad

Los discos se elaboraron empleando papel Whatman N°4, y utilizando un perforador. Formados los discos se esterilizaron en la autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después de esterilizarlos, dentro de la cámara de flujo laminar se le agrego a cada disco 20 µl del extracto hidroalcohólico con las concentraciones al 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, y para realizar un secado más rápido se utilizó el mechero para mayor esterilidad.

3.3.1.8. Pruebas microbiológicas

Se siguió el protocolo establecido por el Ministerio de Salud del Perú (Sacsquispe y Velásquez, 2002); para la prueba de antibiograma por método de disco-difusión para lo cual se tuvo un grupo control positivo a los antibióticos Levofloxacin (LVX), Ceftriaxona (CRO) y el extracto hidroalcohólico del rizoma; nuestro control negativo fue alcohol de 96°. Se trabajó con una bacteria representante del género: *Escherichia* y *Klebsiella*. Para la preparación del inóculo, las cepas fueron diluidas independientemente en solución salina; para posteriormente ser sembradas con un hisopo estéril en las placas con agar Mueller Hinton. Luego se colocaron los discos con los extractos a diferentes concentraciones, así como también los controles positivos y el control negativo, con la ayuda de la aguja de una jeringa estéril; se hizo este proceso por quintuplicado (Tabla 2). Finalmente fueron incubadas a 37°C, por 24 horas en posición invertida.

Se realizó una única medición de los halos a las 24 horas, midiendo el diámetro del halo de inhibición e incluyendo los mm del disco.

Tabla 3. Evaluación de los extractos por género bacteriano

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)								
N° DE REPLICAS	DILUCIONES DEL EXTRACTO DE LA BIOMASA				CONTROL POSITIVO			CONTROL NEGATIVO
	100%	75%	50%	25%	LVX ¹	CRO ²	Extracto hidroalcohólico del rizoma	Alcohol de 96°
1								
2								
3								
4								
5								

¹ Levofloxacin, ² Ceftriaxona

3.4. Técnicas para el procesamiento de la información

El diseño empleado para los tratamientos de inducción de callos como para la inhibición de crecimiento bacteriano fue completamente al azar (DCA). Se presentaron 5 repeticiones por tratamiento de inducción y la unidad experimental estuvo constituida por 10 explantes de rizoma por placa Petri. En el caso de la inhibición microbiana fueron 8 tratamientos evaluados con 5 repeticiones cada uno.

La frecuencia de inducción de callos (%) se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$F.C (\%) = \frac{E.C}{T.E} \times 100$$

Donde:

F.C: Frecuencia de inducción de callos (%)

E.C: Número de explantes que producen callo

T.E: Número total de explantes inoculados

La inhibición microbiana se determinó al comparar las medias de los diámetros de los halos de los tratamientos con la escala de sensibilidad de Duraffourd *et al.* (1987).

Tabla 4. *Escala para comparar la inhibición según Duraffourd*

ESCALA	MEDIDAS (mm)
Resistencia (-)	Diámetro menor a 8 mm
Baja sensibilidad (+)	Diámetro entre 8 y 14 mm
Sensibilidad intermedia (++)	Diámetro dentro 14 y 20 mm
Alta sensibilidad (+++)	Diámetro mayor a 20 mm

Los datos fueron procesados empleando los paquetes estadísticos agricolae y car del software libre R versión 3.6.2 y RStudio Desktop versión 1.2.5033, se realizaron Análisis de Varianza (ANOVA) y comparación entre las medias con prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Capítulo IV: RESULTADOS

4.1. Análisis de resultados

4.1.1. Obtención de callos friables de *Zingiber officinale*

Se indujo la formación de callos a partir del rizoma del kion al agregar el regulador 2,4-D a los medios de cultivo, el tratamiento sin agregar el regulador de crecimiento no mostro la formación de callos (Figura 1 A). Se observó en los explantes del rizoma la formación de una masa voluminosa color blanco y algunas translucidas, lo que caracteriza la presencia de callos (Figura 1 B).



Figura 1. Explantes de kion *in vitro*. **A.** explantes del rizoma del kion sin formación de callos. **B.** explantes del rizoma del kion con la formación de callos.

Se presentó diferencia significativa en cada uno de los tratamientos, lo que se observó en el T1 fue la ausencia de la formación de callos en el cual no contenía la auxina (2,4-D 1 mg/L). En el caso de los otros 4 tratamientos se observó la formación de callos ya que estos tratamientos si contenían auxina (2,4-D mg/L) y el porcentaje de la formación de callos varían de acuerdo al porcentaje de hormona. Siendo el T5 con 1 mg/L de concentración del 2,4-D quien obtuvo el 92% de la formación de callos.

Tabla 5. Respuesta de formación de callos en explantes de kion en condiciones *in vitro*

Tratamiento	2,4-D (mg/L)	Formación de callos (%)*
T1	0.00	0 d
T2	0.25	8 d
T3	0.50	38 c
T4	0.75	64 b
T5	1.00	92 a

*Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ($p < 0.05$)

4.1.2. Determinación del crecimiento de biomasa celular de la suspensión celular

Diversos estudios han demostrado que los callos friables son los más convenientes para establecer suspensiones celulares; es por ello que se utilizaron los callos obtenidos de los explantes del T5. El proceso para la suspensión celular se realizó por triplicado y en cada matraz se colocó 1.5g de los callos friables con el 20 % de volumen con medio de cultivo (25 mL) en condiciones *in vitro*. (Figura 2.).



Figura 2. Callos friables obtenidos de los explantes de kion a la concentración 1 mg/L de 2,4-D para la suspensión celular.

Culminado el periodo de la suspensión celular que duro 30 días, las células fueron separadas del medio por filtración para lo cual se utilizó papel Whatman de 0.42 mm y se pesó como peso fresco al término del cultivo (Tabla 4). Obteniendo en promedio más del triple de su peso inicial.

Tabla 6. Comparación del peso inicial con el peso final obtenidos en la suspensión celular.

Matraz	Peso inicial	Peso final	Promedio final
M1	1.5g	5.268g	4.866g
M2	1.5g	4.842g	
M3	1.5g	4.488g	

4.1.3. Comparación del efecto antimicrobiano del extracto a diferentes diluciones

Se presenta los resultados obtenidos mediante la medición de los halos de inhibición de crecimiento de *Escherichia*. y *Klebsiella* a las 24 horas, para lo cual se midió el diámetro de la zona incluyendo los mm del disco. Para cada extracto se evaluaron cuatro concentraciones 100%, 75%, 50% y 25% por quintuplicado. Además de los controles positivos y negativos.

Se muestra diferencia significativa entre los tratamientos, teniendo estadísticamente como mejor tratamiento al antibiótico Ceftriaxona (CRO) con una inhibición de 32.4 mm, seguidamente de la concentración del 100% del extracto con una inhibición de 19.2 mm y es estadísticamente mejor que el antibiótico Levofloxacin (LVX) y del rizoma del kion. Además se reporta que a la concentración del 75% no difiere estadísticamente del antibiótico Levofloxacin (LVX) (Tabla 5).

Tabla 7. Media de los diámetros de los halos de inhibición (mm) para *Escherichia*

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)								
TRATAMIENTOS	Diluciones del extracto de la biomasa				Control positivo			Control negativo
	100%	75%	50%	25%	LVX ¹	CRO ²	Extracto hidroalcohólico del rizoma	Alcohol de 96°
MEDIA*	25.2 b	19.2 d	14.8 e	12.4 e	19.6 d	32.4 a	20.0 c	6 ^a f

* Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ($p < 0.05$); ¹ Levofloxacin,

² Ceftriaxona, ^a Diámetro del disco de sensibilidad es de 6mm; sin presencia de halo.

Para la bacteria *Klebsiella*, se reporta de igual manera como mejor tratamiento al antibiótico Ceftriaxona (CRO) con 26.0 mm de inhibición y como segundo mejor tratamiento al extracto a una concentración del 100% con 21.2 mm de inhibición. Mientras que la concentración del 75% y el extracto del rizoma no difieren estadísticamente, sin embargo, tuvo mayor inhibición que con el antibiótico Levofloxacin (LVX).

Tabla 8. Media de los diámetros de los halos de inhibición (mm) para *Klebsiella*

DIAMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)								
TRATAMIENTOS	Diluciones del extracto de la biomasa				Control positivo			Control negativo
	100%	75%	50%	25%	LVX ¹	CRO ²	Extracto hidroalcohólico del rizoma	Alcohol de 96°
MEDIA*	21.2 b	17.2 c	12.4 e	7.6 f	15.6 d	26.0 a	17.2 c	6 ^a g

*Medias con letras distintas difieren significativamente según prueba de Tukey ($p < 0.05$); ¹ Levofloxacin,

² Ceftriaxona, ^a Diámetro del disco de sensibilidad es de 6mm; sin presencia de halo.

Para la actividad antimicrobiana se compararon las medidas de los extractos con la tabla de sensibilidad según la escala de sensibilidad de Duraffourd *et al.*, 1986 (tabla 4). En la tabla 9 podemos observar una alta sensibilidad con el antibiótico Ceftriaxona (CRO) y con nuestro tratamiento al 100% para la bacteria *Escherichia* y una sensibilidad intermedia con la concentración al 75%, 50%, al igual que el antibiótico Levofloxacina (LVX) y el extracto del rizoma. Por otra parte, nuestra concentración al 25% tuvo una baja sensibilidad.

Tabla 9. Comparación de las medias según su sensibilidad para *Escherichia*

TRATAMIENTOS	MEDIA (mm)	SENSIBILIDAD
100%	25.2	+++
75%	19.2	++
50%	14.8	++
25%	12.4	+
LVX¹	19.6	++
CRO²	32.4	+++
Extracto del rizoma	20.0	++
Alcohol de 96°	6 ^a	-

¹ Levofloxacina, ² Ceftriaxona, ^a Diámetro del disco de sensibilidad es de 6mm; sin presencia de halo. Escala: Alta sensibilidad (+++), sensibilidad intermedia (++), baja sensibilidad (+) y resistencia (-).

En cuanto la sensibilidad frente a la bacteria *Klebsiella*, observamos alta sensibilidad con el antibiótico Ceftriaxona (CRO) y la concentración al 100%. Así mismo la concentración al 75% presenta una sensibilidad intermedia junto con el antibiótico Levofloxacina (LVX) y el extracto del rizoma; mientras que al 50% presento una baja sensibilidad. Sin embargo, la bacteria mostro resistencia con la concentración al 25%.

Tabla 10. Comparación de las medias según su sensibilidad para *Klebsiella*

TRATAMIENTOS	MEDIA (mm)	SENSIBILIDAD
100%	21.2	+++
75%	17.2	++
50%	12.4	+
25%	7.6	-
LVX¹	15.6	++
CRO²	26.0	+++
Extracto del rizoma	17.2	++
Alcohol de 96°	6	-

¹ Levofloxacina, ² Ceftriaxona, ^a Diámetro del disco de sensibilidad es de 6mm; sin presencia de halo. Escala: Alta sensibilidad (+++), sensibilidad intermedia (++), baja sensibilidad (+) y resistencia (-).

4.2. Contrastación de hipótesis

4.2.1. Influencia de la hormona 2,4-D

Para la variable con hormona 2,4-D al 1 mg/L, efectivamente fue el tratamiento que dio un mayor porcentaje de callos friables en explantes de kion; dando un 92% de formación de callos. Determinando estadísticamente que la influencia de dicha variable, fue altamente significativa para el prendimiento la obtención de callos.

4.2.2. Producción de suspensión celular

Para la variable de la biomasa final, se obtuvo más del triple del peso inicial, siendo esto más de lo esperado; pasando de 1.5g a 4.866g como como promedio de la biomasa final.

Determinando que el crecimiento de la biomasa celular obtenida no solo duplico la cantidad, sino que triplico el peso en el periodo de incubación establecido.

4.2.3. Influencia de la dilución

Para la variable dilución de biomasa se consideraron 4 concentraciones: 100%, 75%, 50% y 25%, siendo estadísticamente significativo su influencia en efecto de inhibición. También se puede observar que solo hay diferencia significativa con la concentración al 100% y una alta sensibilidad para ambas bacterias, obteniéndose 25.2 mm para *Escherichia* y 21.2 mm para *Klebsiella* de inhibición, confirmando que a menor dilución será mejor el porcentaje de inhibición.

Capítulo V: DISCUSION

5.1. Discusión de resultados

Estadísticamente el mejor tratamiento en la obtención de la mejor formación de callos friables fue el tratamiento en el que se utilizó 1mg/L de la fitohormona 2,4-D. Esto coincide con el resultado obtenido por Zhenxian *et al.* (2005), quien menciona que el 2,4-D desempeñaba un papel importante en la inducción de la formación de callos embriogénicos de jengibre, teniendo la mejor concentración en su trabajo al 1mg/L de hormona. Sin embargo; una concentración demasiado alta de dicha hormona podría ser toxica y causar un efecto contrario, al inhibir la proliferación celular y reducir la calidad de los callos, tal como lo menciona Rashid y Minhas (2004).

Los efectos de las auxinas en el desarrollo del callo, pueden estar relacionados con la capacidad la cual tienen compuestos que estimulan a que se genere la división celular y afecta indirectamente en la regulación de dicho ciclo, particularmente estimulando las ciclinas a nivel transcripcional, por ejemplo, las de tipo D, las cuales liberan la activación de las quinasas que se necesitan para la etapa G1 del ciclo celular. Durante la etapa G1, las células van creciendo y juntando nutrientes, además, se cree que las citocininas y las auxinas provocan la agrupación de las ciclinas y por tanto conducen a un ciclo nuevo (Arellano, 2008). Por ello la hormona 2,4-D es una muy eficiente en la estimulación para la formación de callos friables, así mismo no se descompone fácilmente con el calor durante el proceso de esterilización ni por las enzimas liberadas por los explantes, teniendo así propiedades más estables que otras auxinas (George *et al.*, 2008).

Respecto a la biomasa celular de la suspensión; se obtuvo un promedio de 4.866g siendo este más del triple del peso inicial (1.5g), considerando que este tuvo las mismas condiciones de fotoperiodo 16h de luz y 8h de oscuridad, lo cual es una condición en la que mejora la producción de biomasa del callo según Sheng (2020). A pesar de ello; nuestra biomasa fue menor comparada con el trabajo de Khanpour (2015), quien empleo el doble de inóculo y volumen con medio de cultivo en un tiempo de 30 días y obtuvo más de 10 g de peso fresco de células; además menciona, la necesidad de subcultivar a nuevos medios frescos entre los días 15 y 17 de incubación, ya que después de esta fase de crecimiento las células producen sustancias toxicas (Bhojwani, 1983).

Cabe mencionar que una vez que se activa el mecanismo de inhibición del crecimiento, este no se revierte fácilmente incluso transfiriendo las células a un medio nuevo según refiere Kim *et al.* (2008). Teniendo en cuenta ello, priorizamos aumentar la producción de metabolitos secundarios, lo cual resulta como un medio de autodefensa a partir del estrés que sufren las células por la reducción de la ingesta de nutrientes en el medio (Damayanti, 2020) y es por ello que se optó por no hacer subcultivos del medio, considerando que esto afectaría a la biomasa resultante.

Agregando a lo anterior, es preciso mencionar el trabajo de Chaudhry *et al.* (2015), en el cual sometió a estrés sus cultivos en suspensión de *N. sativa*; con la finalidad de evaluar su efecto antimicrobiano, dando mejores resultados que sus antibióticos estándares, provocada por 10 mg/L de $MnCl_2$ y con 15 mg/L de peptina. Provocando así mayor producción de timol y timoquinona, responsables de sus propiedades antibacterianas.

En cuanto a los resultados del efecto antimicrobiano del extracto de células en suspensión podemos indicar que el mejor tratamiento es con el antibiótico Ceftriaxona (CRO) para ambas bacterias; sin embargo, nuestro extracto a una concentración al 100% presentó un efecto inhibitorio significativo para ambas bacterias, obteniendo en promedio 25.2 mm para *Escherichia* y 21.2 mm para *Klebsiella* en el diámetro del halo de inhibición. Mientras que a una concentración al 75% presentó una inhibición moderada; siendo para *Escherichia* en promedio de 19.2 mm, similar a la media de Levofloxacina (LVX) con 19.6 mm, pero inferior a la del extracto del rizoma con 20.0 mm en promedio. Con respecto a la bacteria *Klebsiella* a dicha concentración demostró un efecto inhibitorio igual a la del extracto del rizoma con 17.2 mm, mostrando mayor inhibición que con el antibiótico Levofloxacina (LVX) con 15.6 mm.

Arias *et al.* (2019), trabajando con extractos etanolitos de células en suspensión al 100% de *Thevetia peruviana* observaron una mayor inhibición contra *Salmonella thipimurium* mostrando una inhibición de 14 mm de diámetro y para *E.coli* 9.7 mm; que en comparación de nuestros resultados obtenidos, el extracto de *Zingiber officinale* demuestran un mejor efecto inhibitorio.

Otros autores han reportado actividad antimicrobiana de extractos obtenidos del rizoma; como es el caso de Abd-Alrahman *et al.* (2013), donde menciona concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 62.50 para *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeruginosa* y *Listeria monocytogenes* y de 31.25 μ g/ml para *Bacillus subtilis*, *Escherichia*

coli y *Klebsiella pneumoniae*; además que a la mayor concentración de 1000 mg/mL tuvo mayor eficacia frente a *E. coli* con 9.5 mm y para *K. pneumonia* y *B. subtilis* 9.0 mm de diámetro de inhibición, reportando valores de inhibición inferiores a los que nosotros pudimos encontrar.

Así mismo; Calle (2018), menciona en sus resultados de su extracto etanólico de *Zingiber officinale* contra *Staphylococcus aureus*, a sus concentraciones del 100%, 75%, 50% y 25% diámetros de inhibición de 17.75 mm, 13.63 mm, 11mm y 0mm respectivamente. Siendo valores inferiores a su control, el cual fue ciprofloxacino con 31.13mm. Siendo una diferencia significativa entre su control y su concentración al 100%. Caso que no paso con nuestra evaluación ya que nuestra concentración al 100% fue altamente sensible junto con nuestro antibiótico control CRO.

Diversos estudios *in vitro* demuestran que diversos componentes de *Zingiber officinale* como sus compuestos fenólicos, el shogaol y gingerol tienen efecto antioxidante y a la vez le dan potencial de inhibición bacteriana muy semejantes al antibiótico amoxicilina. Además de sus propiedades antiinflamatorias al inhibir diferentes citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina-1 (IL -1). Generando muchos beneficios a nuestro sistema inmunológico. (Abd-Alrahman *et al.*, 2013). Asimismo Mao *et al.*, (2019) menciona que el kion seco tiene mayor actividad antioxidante, porque el número de compuestos fenólicos es mayor que el del jengibre fresco.

Con referencia a la sensibilidad bacteriana, obtuvimos una alta sensibilidad con la concentración al 100% junto al antibiótico CRO y una sensibilidad intermedia al 75% para ambas bacterias; mientras que al 50% para *Escherichia* tuvo una sensibilidad intermedia, para *Klebsiella* hubo una baja sensibilidad. Sin embargo, al 25% tuvo una baja sensibilidad solo para *Escherichia*, ya que presento resistencia para la otra bacteria.

Por otra parte, Chaudhry *et al.* (2015), en su trabajo antes mencionado donde sometió a estrés su cultivo celular de *N. sativa*, menciona una alta sensibilidad frente a *E. coli* y a *B. cereus* con 30 mm de halo de inhibición sometido a estrés con MnCl₂. La cual en comparación con nuestros resultados es un diámetro mayor al nuestro que fue de 25.2 mm, he ahí la importancia de la relación del estrés del cultivo con el efecto de inhibición bacteriano.

Además, Ozdemir *et al.* (2016), sugiere que el efecto antibacteriano de los cultivos *in vitro* mejora con específicas combinaciones de reguladores de crecimiento, lo cual influye

directamente con la inhibición bacteriana. Esto es una acotación que se podría considerar para mejorar más el efecto de antibacteriano.

Los resultados obtenidos son alentadores, siendo el extracto de células en suspensión de *Zingiber officinale* una herramienta valiosa para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana; estos potenciales beneficios otorgan a medicina alternativa ser una buena opción para la salud humana y así disminuir el uso de antibióticos con la intención de evitar el alto porcentaje de bacterias resistentes por el uso excesivo de los antibióticos.

Capítulo VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Se determinó el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de células en suspensión de *Zingiber officinale* “kion” *in vitro* a diferentes concentraciones sobre coliformes totales, en el cual se encontró mayor inhibición a la concentración del 100% para ambas bacterias *Escherichia* y *Klebsiella*, concluyendo que a mayor concentración mejor será el efecto inhibidor.

Se logró la obtener callos friables a partir de explantes de kion, estadísticamente el mejor tratamiento es el T5; donde se obtuvo el mayor porcentaje correspondiente al 92% empleando 1mg/L de 2,4-D, concluyendo que a mayor porcentaje de auxina mayor porcentaje de la formación de callos.

El medio liquido empleado de Murashige y Skoog (1962) a concentración media, con la agregación de sacarosa (30 g/L) y la hormona Ácido 2,4-dicloro fenoxiacético; con un pH a 5.7. Determinó el peso final de la biomasa celular a partir de la suspensión celular, obteniéndose más del triple del promedio de su peso inicial.

Se comparó el efecto antimicrobiano del extracto de la suspensión celular a concentraciones diferentes, indicando como mejor tratamiento después del antibiotico CRO, al 100% de concentración con una sensibilidad alta para ambas bacterias *Escherichia* y *Klebsiella*. Presentando un aporte prometedor para la medicina alternativa, con la intención de disminuir el alto porcentaje de bacterias resistentes por el uso excesivo de antibióticos.

6.2. Recomendaciones

- Sobre el material a trabajar en este caso el rizoma del “kion”, se recomienda realizar un buen protocolo de desinfección, ya que el rizoma se encuentra expuesto a muchos contaminantes biológicos como hongos y bacterias, dificultando el crecimiento de la formación de los callos *in vitro* de una manera aséptica.
- Se recomienda establecer un rango de tiempo o una curva de crecimiento para determinar el crecimiento óptimo de las células en suspensión o la biomasa celular, para determinar el mejor período para usar la suspensión celular.

- En el caso del extracto hidroalcohólico del “kion” *in vitro* se podría emplear su uso en otras enterobacterias para probar su efecto antimicrobiano y si tiene una mayor eficacia
- Se sugiere valorar el efecto del extracto hidroalcohólico del “kion” sobre *Klebsiella* y *Escherichia* en ensayos *in vivo*, para determinar la eficiencia antibacteriana.
- Teniendo esta investigación desarrollada sobre la obtención de callos del “kion” o el extracto hidroalcohólico del “kion” también se podría emplear para empezar a trabajar con otros tipos de cultivos y poderlas emplear de diferentes maneras.

REFERENCIAS

7.1. Fuentes Bibliográficas

- Abd-Alrahman, S; Salem-Bekhit, M; Yakout, S y Elhalwagy, M. (2013). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Various Crude Extracts of Ginger (*Zingiber officinale Roscoe.*). *Pure and applied microbiology*, 309-316.
- Acosta, J. (2015). Embriogénesis somática en Café (*Coffea canephora* y *Coffea arabica*) para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal. *Universidad de Guayaquil*.
- Alzate, E. (1980). *Plantas medicinales*. Colombia: 15ª ed Medellín. Ed. Arzobispado de Medellín.
- Andamayo, D; Navarro, V y Castillo, D. (2020). Determinación de la composición fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Zingiber officinale* (kion) en la selva central del Perú. *Visionarios en ciencia y tecnología.*, 5:17-21.
- Arellano, Y; García, E y Vázquez, J. (2008). Estimulación de la síntesis de ADN y de proteínas del ciclo celular por auxinas durante la germinación de maíz. *Agrociencia.*, 637-644.
- Arias, J; Ortega, I & Peñuela, M (2019). Antimicrobial activity of callus and cell suspension cultures extracts of *Thevetia peruviana*. *Universidad Nacional de Colombia*, 45-56.
- Baron, S. (1996). *Medical Microbiology*. Texas: Medical Branch at Galveston.
- Bart, H. (2011). Extraction of Natural Products from Plants- An Introduction. *Industrial Scale Natural Products Extractions*, 1-25.
- Bhargava, S; Dhabhai, K; Batra, A y Sharma, A (2012). *Zingiber Officinale* : Chemical and phytochemical screening and evaluation of. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 360-364.
- Bhojwani, S (1983). Plant Tissue Culture: Theory and Practice. *Development in Crop Science*, 1-10.

- Calle, M. (2018). *Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Zingiber officinale sobre cepas de Staphylococcus aureus atcc 25923 comparado con ciprofloxacino*. [Tesis de titulación]. Perú: Universidad Cesar Vallejo.
- Castillo, B. (2018). *Efecto in vitro antimicrobiano de aceite esencial y extracto etanólico de jengibre (Zingiber officinale) frente a streptococcus mutans*. [tesis de titulacion]. Ambato: Universidad Regional Autónoma de los Andes.
- Cauty, N y Memenza, A. (2021). *Propuesta de aplicación del modelo EFQM y caracterización de procesos con el objetivo de estandarizar la producción de fresas de los pequeños agricultores del distrito de Huara para alcanzar niveles de calidad de exportación*. [Tesis de titulación], Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.
- Chaudhry, H y Fatima, N (2015). Evaluation of Antioxidant and Antibacterial Potentials of *Nigella sativa L.* Suspension Cultures under Elicitation. *BioMed Research International*, 13.
- Córdoba, A; Ciármela, M; Pezzani, B; Gamboa, M; De Luca, M; Minvielle, M y Basualdo, J. (2002). Presencia de parásitos intestinales en paseos públicos urbanos en La Plata Argentina. *Parasitología Latinoamericana*, 25-29.
- Cruz, A; Rodríguez, N y Rodríguez, C. (2010). Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 117-124.
- Dagla, H. (2012). Plant tissue culture: Historical developments and applied aspects. *Resonance*, 759-767.
- Damayanti, e. a. (2020). Variación de la concentración de ácido (2,4--D) en el crecimiento de callos de *cal kaffir* como materia prima para suspensión celular. *Actas de la conferencia AIP2260*, 030012-1–030012-7.
- Diaz, G. (2014). Inducción embriogénica en callo de jengibre antorcha (*Etilingera elatior*). *Agrociencia*, 173-184.
- Duraffourd, C y Lapraz, J (1987). *Cuadernos de fitoterapia clinica*. Barcelona: Primera ed. Duraffourd, C; editor.

- Espinoza, C., & Serna, Z. (2018). *Efecto antibacteriano in vitro del látex de Croton lechleri Müll. Arg. (sangre de grado) frente a Staphylococcus aureus*. [Tesis de titulación]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
- Fernández, A. (2017). Las Hortalizas y su importancia. *Centro de Estudios Independientes a Distancia A.C.*, 1-5.
- Fernández, R; Salomón, J y Reyes, D. (2020). Efecto antibacteriano de hojas y callo de *Azadirachta indica* A. Juss en microorganismos de interés alimentario. *Salus*, 27-34.
- Filová, A. (2014). Production of Secondary Metabolites. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 236-246.
- Francisco, P. (2018). Complejo Enterobacter cloacae. *Infectol*, III(35), 297-298.
- George, E y Hall, M (2008). *Propagación de plantas por cultivo de tejidos*. Países bajos: Springer.
- González, C. (2006). *Rastreabilidad de hortalizas para determinar su inocuidad biológica*. [Tesis de Posgrado], El Salvador: Universidad de El Salvador.
- Guanoluisa, S. (2017). *Efecto antimicrobiano del extracto, aceite esencial de jengibre (zingiber officinale) y el hipoclorito de sodio al 5, 25% sobre cepas de Enterococcus faecalis. Estudio comparativo in vitro*. [Tesis de titulación]. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Jay, J. (2002). *Microbiología moderna de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
- Khanpour, N y Sharif, M (2015). Establecimiento de callo y cultivo de suspensión celular de *Scrophularia striata* Boiss.: Un enfoque *in vitro* para. *Cytotechnology*, 475-485.
- Kim, B & Gibson, D (2008). Effect of Subculture and Elicitation on Instability of Taxol Production in *Taxus* sp. Suspension Cultures. *Biotechnology progress*, 1666-1673.
- Kumar, S & Sharma, A. (2014). Medicinal properties of *Zingiber officinale* Roscoe. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 124-129.
- Larson, C; Gómez, C y Sánchez, M (2006). Inducción de caulogénesis indirecta en *Eucalyptus*. *Bosque* 27 (3), 250-257.

- Lipsky, B; Hook, E; Smith, A y Plorde, J. (1980). Citrobacter infections in humans: experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center. *Infect, II*, 746-760.
- López, G; Reátegui, R y Reátegui, M. (2021). Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto de *Zingiber officinale* en. *Revista de Investigación Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 57-62.
- Madigan, M & Martinko, J. (2005). *Brock Biology of Microorganisms* (Onceava ed.). Prentice Hall.
- Mao, Q., Xu, X., Cao, S., Gan, R., Corke, H., Beta, T., & Li, H. (2019). Compuestos bioactivos y bioactividades del jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 8 (6): 185.
- Moscatiello, R; Baldán, B y Navazio, L. (2013). Cultivos en suspensión de células vegetales. En F. Maathuis, *Nutrientes minerales vegetales* (págs. 77-93). Totowa: Springer Science+Business Media.
- Moscoso, J; Egocheaga, L y Ramirez, M. (2005). *Validación de lineamientos para formular políticas de gestión del agua residual doméstica en América Latina*. Lima: Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente.
- Narges, K; Mozafar, S y Mehrdad, B. (2015). Establecimiento de callo y cultivo de suspensión celular de *Scrophularia striata* Boiss.: un enfoque *in vitro* para la producción de acteoside. En S. Mozafar, *Citotecnología 67* (págs. 475–485).
- Ozdemir, F y Kilic, O (2016). Propagación *in vitro* de callos y actividades antibacterianas de callos, una planta comestible endémica y medicinal *Scutellaria orientalis* L. subsp. *bicolor*. *Progreso en Nutrición* , 81-86 .
- Peralta, L. (2014). *Cultivo in vitro de tejidos vegetales de plantas del género Zephyranthes y evaluación de su producción de alcaloides*. [Tesis de titulación]. Santiago de Cali: Universidad ICESI.
- Podschun, R & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors* (Vol. 11). USA: Clinical Microbiology Reviews.

- Rahmani, A; Shabrmi, F & Aly, S. (2014). Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 125-136.
- Rashid, M y Minhas, N. (2004). Efecto del ácido 2, 4-diclorofenoxiacético en la inducción de callos en semillas maduras de trigo (*Triticum aestivum L.*). *Revista Internacional de Agricultura y Biología*, 156-159.
- Rivera, A; Rodríguez, C y López, J. (2009). Contaminación fecal en hortalizas que se expenden en mercado de la ciudad de Cajamarca-Perú . *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 45-48.
- Roig, J. (2007). *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de cuba- La Habana*. Cuba: ED. CIENTIFICA-TECNICA.
- Ruiz, C; Soloneski, S y Larramendy, M. (2019). Genotoxicidad inducida por el herbicida fitohormonal ácido 2,4-diclorofenoxiacético contenido en la formulación comercial dma® en *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Investigación Joven, 6 (Especial)*, 135.
- Sacsquispe, R. (2002). Manual de procedimientos anual para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. *Organismo Público Descentralizado de Sector Salud*, http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual_sensibilidad_2.pdf. Obtenido de Organismo Público Descentralizado de Sector Salud.
- Salazar, M. (2016). *Eficacia antibacteriana del extracto acuoso del Allium sativum "ajo" comparado con Amikacina en Escherichia coli*. [Tesis de titulación]. Trujillo: Universidad César Vallejo.
- Segretín, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *ArgenBio*, 1-6.
- Sepúlveda, G; Porta, H y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios . *Revista Mexicana de Fitopatología*, 355-362.
- Sheng, K; Lynn, B y Sathasivamb, K. (2020). El establecimiento de cultivos en suspensión de callos y células de *Hylocereus costaricensis* para la producción de pigmentos de betalaína con potencial antioxidante. *Industrial Crops & Products*, Volumen 155.

- Siedentopp, U. (2008). El jengibre, una planta medicinal eficaz como medicamento, especia o infusión. *Revista Internacional de Acupuntura*, 188-192.
- Szabados, L; Mroginski, L y Roca, W. (1991). *Suspensiones celulares : descripción, manipulación y aplicaciones*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Tineo, G. (2001). *Notas del curso de biotecnología VI "Cultivo de tejidos vegetales"*. Obregón.
- Trang, T y Bui, T. (2004). Crecimiento de las suspensiones Celulares del cv. "Cau man". *La revista internacional sobre Bananos y Plátanos* , 2,3.
- UNMSM. (2010). *Conocimiento, Aceptación u Uso de los usuarios de Establecimientos de Salud en Lima Metropolitana*. [Tesina]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San
- Uriol, D y Espinoza, M. (2021). Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de frutos de "aguaymanto" (*Physalis peruviana L.*) y de hojas de "eucalipto" (*Eucalyptus globulus Labill.*) frente a *Staphylococcus aureus*. *Arnaldoa*, 115-124.
- Vargas, V. (2014). *Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de Zingiber officinale (jengibre) obtenido por extracción con fluidos supercríticos*. [Tesis de titulación]. Arequipa: Universidad Regional Autónoma de los Andes.
- Vásquez, E; Paredes, J; Delgado, H; Iglesias, S y Vargas, R. (2021). Estudio comparativo *in vitro* de la actividad antibacteriana de *Curcuma longa* y *Zingiber officinale* frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Medicina naturista*, ISSN 1576-3080, Vol. 15, N° 1, 69-79.
- Zhenxian, Y. (2005). Establecimiento y regeneración vegetal de plantas somáticas en cultivos de suspensión de células embriogénicas de *Zingiber officinale*. *Ciencia Horticulturae*, 90-96.

7.2. Fuentes Electrónicas

- Ambientalys. (Parámetros microbiológicos controlados en aguas de consumo: bacterias coliformes de 2006). *Consultaría y Análisis*. Recuperado el 13 de Agosto de 2022, de <https://www.ambientalys.com/bacterias-coliformes>

- CBTis. (22 de Septiembre de 2022). *Microbiología*. Obtenido de <https://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/blank-ch2nw>
- CUN. (22 de Septiembre de 2022). *Clinica Universidad de Navarra*. Obtenido de Diccionario Médico: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/tejido-friable#:~:text=Tejido%20que%20se%20desmenuza%20o,ej.%2C%20el%20tejido%20cerebral.>
- ECHA. (21 de Septiembre de 2022). *European Chemicals Agency*. Obtenido de <https://echa.europa.eu/es/support/registration/how-to-avoid-unnecessary-testing-on-animals/in-vitro-methods>
- Española. (21 de Septiembre de 2016). *The free dictionary*. Obtenido de Gran Diccionario de la Lengua: <https://es.thefreedictionary.com/dsdiferenciaci%C3%B3n>
- EsSalud. (4 de Diciembre de 2014). *EsSalud*. Obtenido de <http://www.essalud.gob.pe/essalud-recomienda-el-consumo-de-achiote-para-ayudar-a-desinflamar-la-prostata-y-vias-urinarias/>
- NCI. (20 de Septiembre de 2022). *Instituto Nacional del Cáncer*. Obtenido de NIH: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/metabolito>
- RAE. (22 de Septiembre de 2022). *Real Academia Española*. Obtenido de <https://dle.rae.es/friable>
- UPM. (22 de Septiembre de 2022). *DBpedia español*. Obtenido de Universidad Politecnica de Madrid: <http://es.dbpedia.org/>
- Vázquez, M. (22 de Junio de 2020). *Manual MSD*. Obtenido de <https://www.msmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Velada, G. (20 de Septiembre de 2022). *Blog de Gran Velada*. Obtenido de <https://www.granelada.com/blog/diferencias-tipos-extractos-vegetales#:~:text=Hidroalcoh%C3%B3licos%20o%20tinturas%3A%20macerados%20en,macerados%20en%20glicerina%20y%20agua.>

ANEXOS



Figura 3. Lavado del rizoma del “kion” para retirar la primera capa de suciedad



Figura 4. Desinfección en la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%, por un minuto e hipoclorito de sodio al 2% por 15 minutos y 3 enjuagues de 5 minutos cada uno con agua estéril, y secado.



Figura 5. Proceso de inducción de los explantes, colocados en medio de cultivo Murashige y Skoog a diferentes concentraciones con y sin el regulador de crecimiento 2,4-dicloro fenoxiacético.

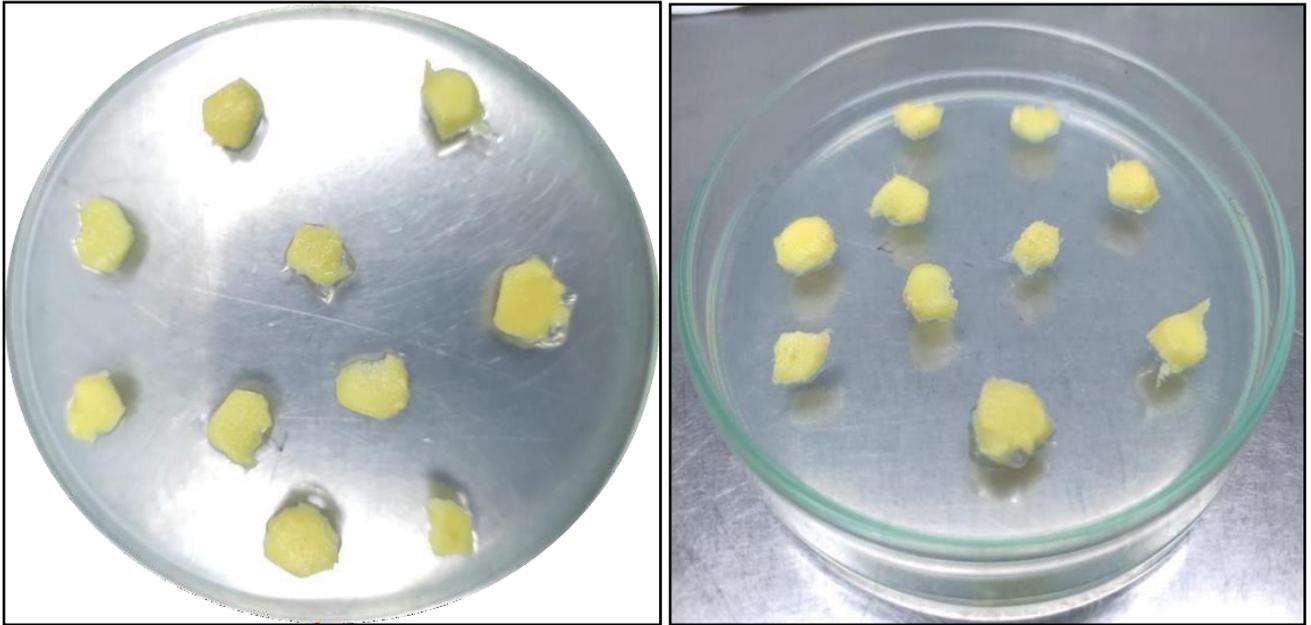


Figura 6. Explantes de kion sin respuesta en medio de cultivo MS sin el regulador de crecimiento 2,4-dicloro fenoxiacético.

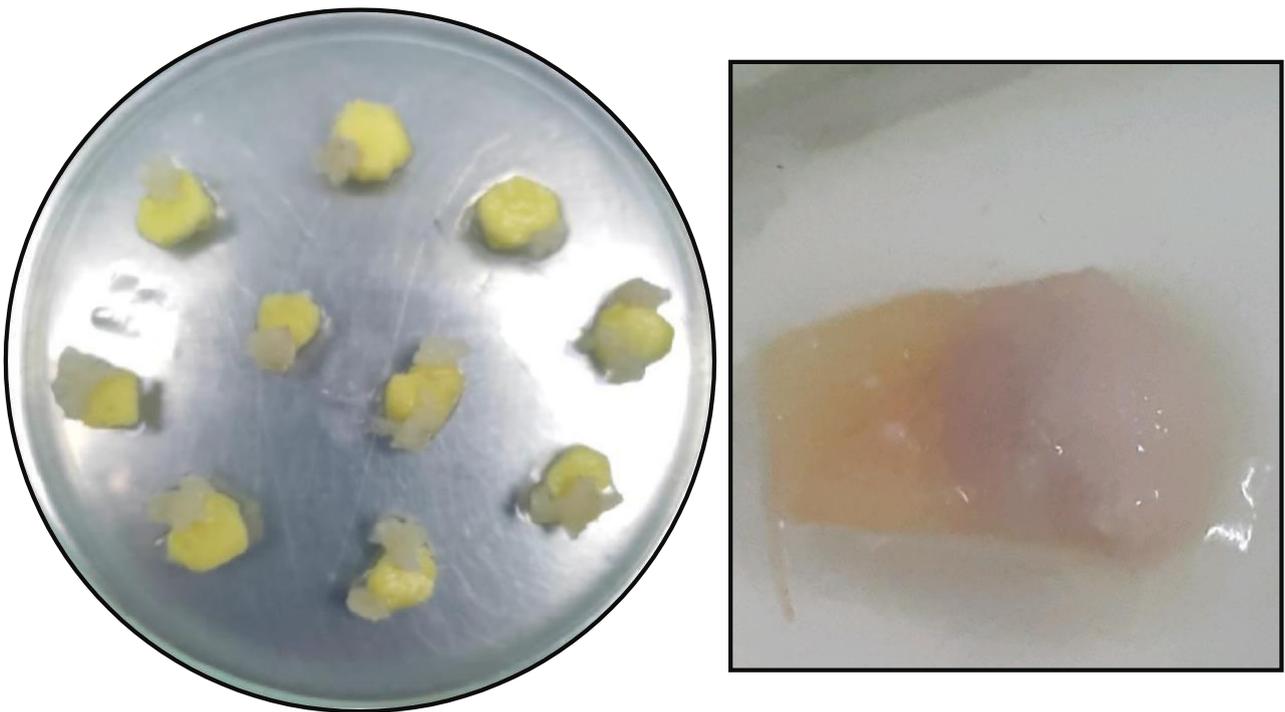


Figura 7. Formación de callos en explantes de kion en medio de cultivo MS adicionado el regulador de crecimiento 2.4-dicloro fenoxiacético.

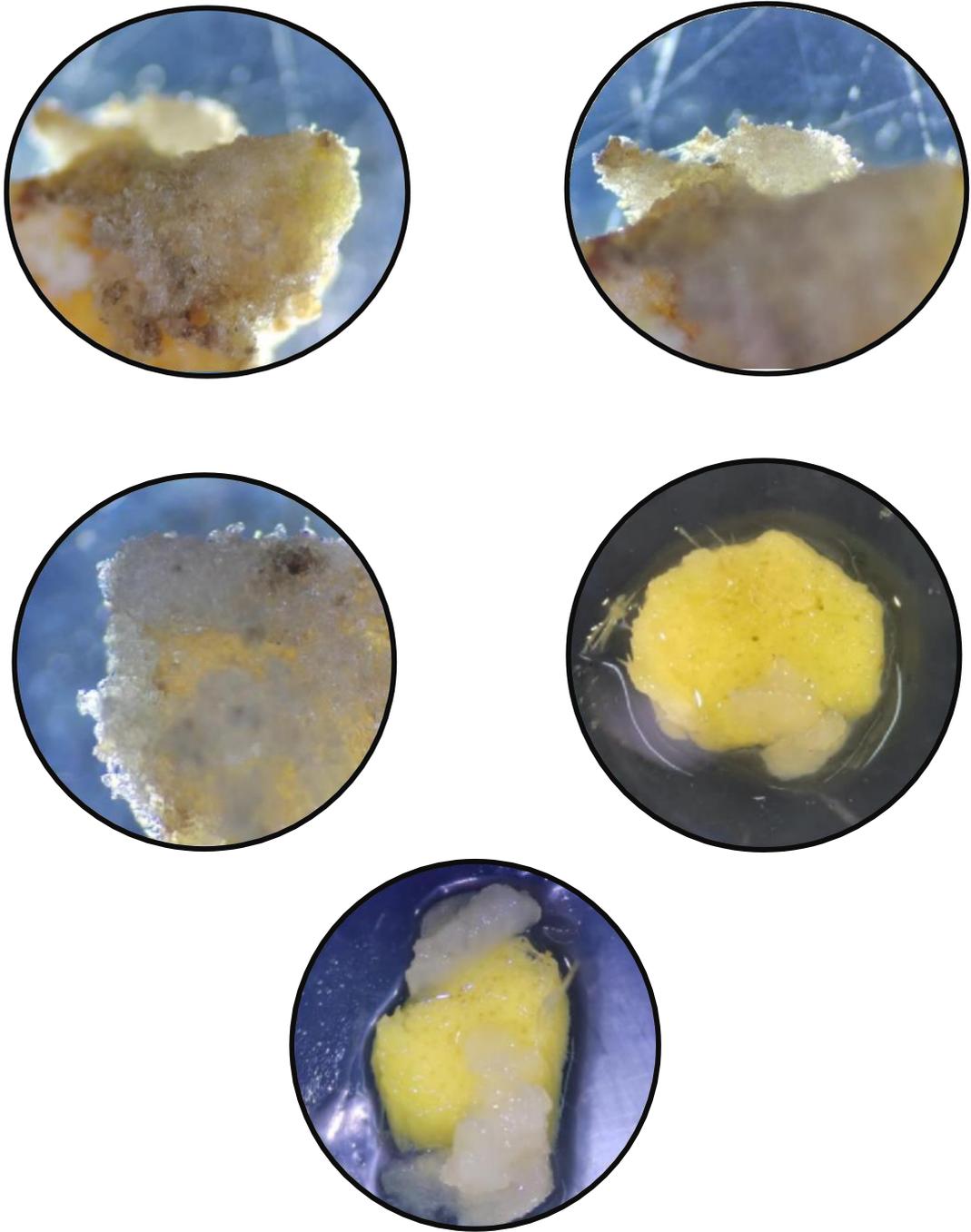


Figura 8. Callos inducidos en explantes de kion

Tabla 11. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de kion en condiciones in vitro.

Prueba	Test	Alfa	P valor	Estado
Normalidad	Shapiro	0.05	0.6152	Si cumple
Homogeneidad de varianza	Levene	0.05	0.2583	Si cumple

Tabla 12. Análisis de varianza para porcentaje de formación de callos en explantes de kion en condiciones in vitro

Fuentes de variación	G. L	S. C	C. M	F cal.	P valor	Significancia
Tratamiento	4	29536	7384	108.6	0.0001	***
Error	20	1360	68			
Total	24	30896				

*** = Altamente significativo

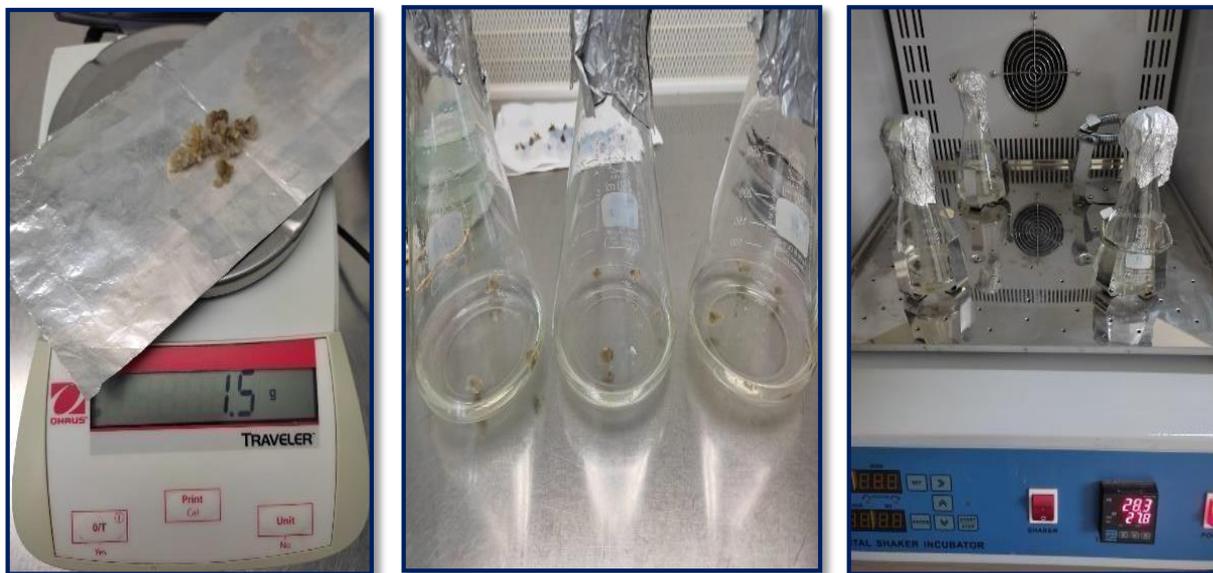


Figura 9. Los callos friables, en medios de cultivo líquido MS suplementado. Colocados en un agitador rotatorio a 120 rpm a 26 +/-1 °C en condiciones de fotoperiodo 16h de luz y 8h de oscuridad.



Figura 10. Concentrador para concentrar nuestra muestra y favorecer la evaporación del solvente. La muestra resuspendida con 2mL de DMSO obteniendo así nuestra solución al 100%.



Figura 11. Concentraciones al 75%,50% y 25% con alcohol de 96°, que luego se agregaron a cada uno de los discos 20 μ l de las concentraciones al 25 %, 50 y 75%.

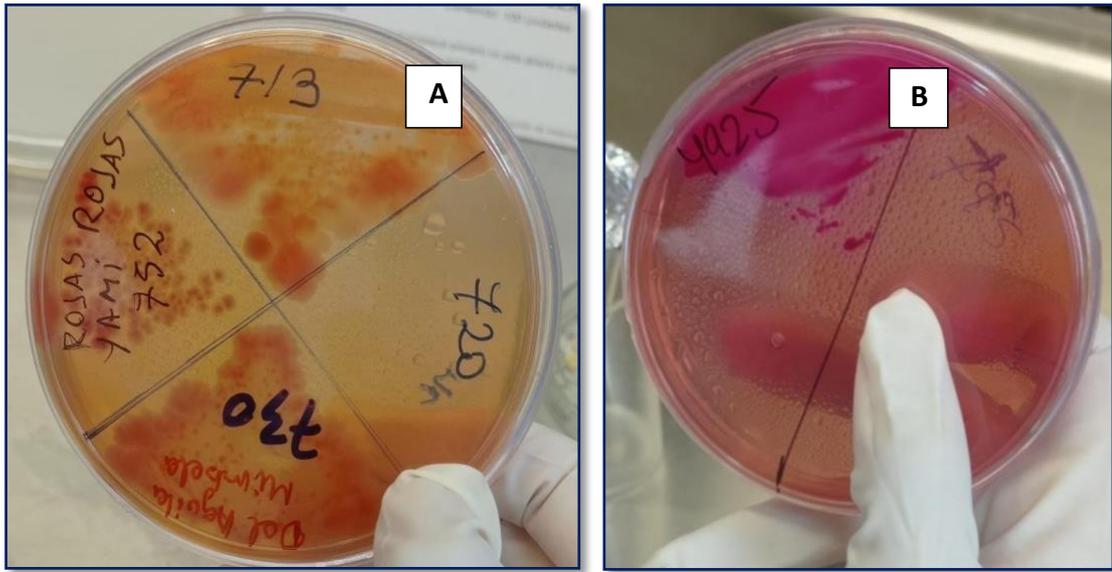


Figura 12. Cepa *Escherichia* (A) y *Klebsiella* (B)



Figura 13. Dilución de las sepas en solución salina

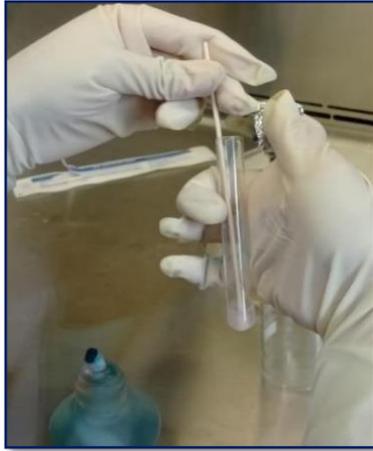


Figura 14. Sembrado con un hisopo estéril en las placas con agar Mueller Hinton.

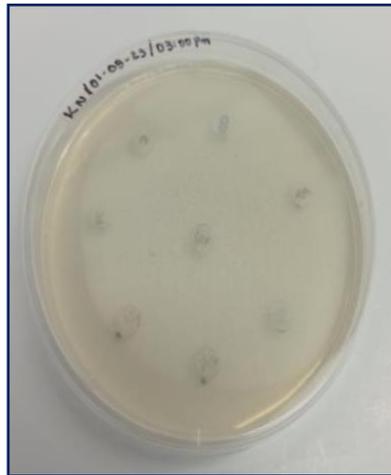


Figura 15. Colocación de los discos

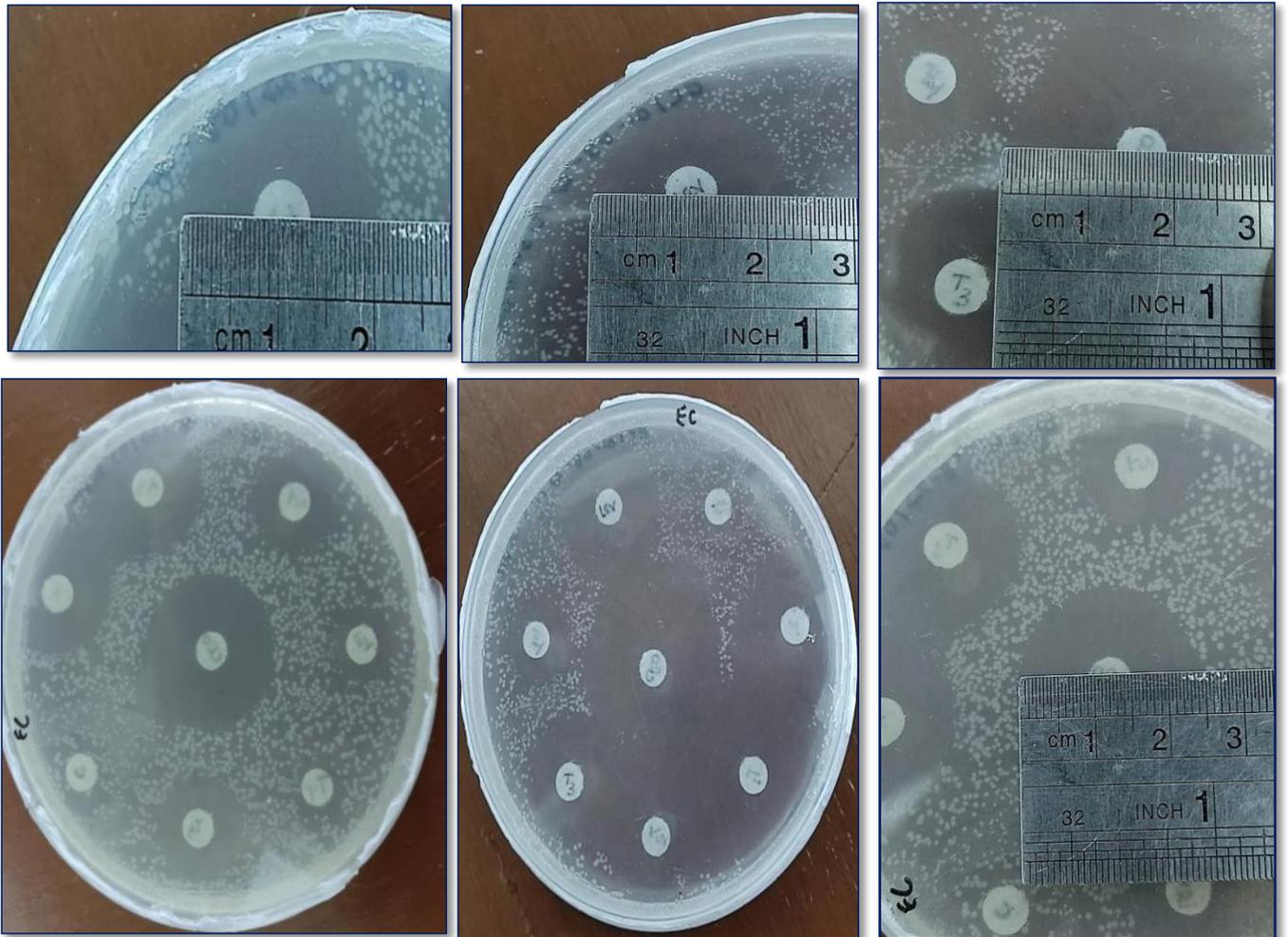


Figura 16. Medición de los halos de inhibición de la cepa *Escherichia*

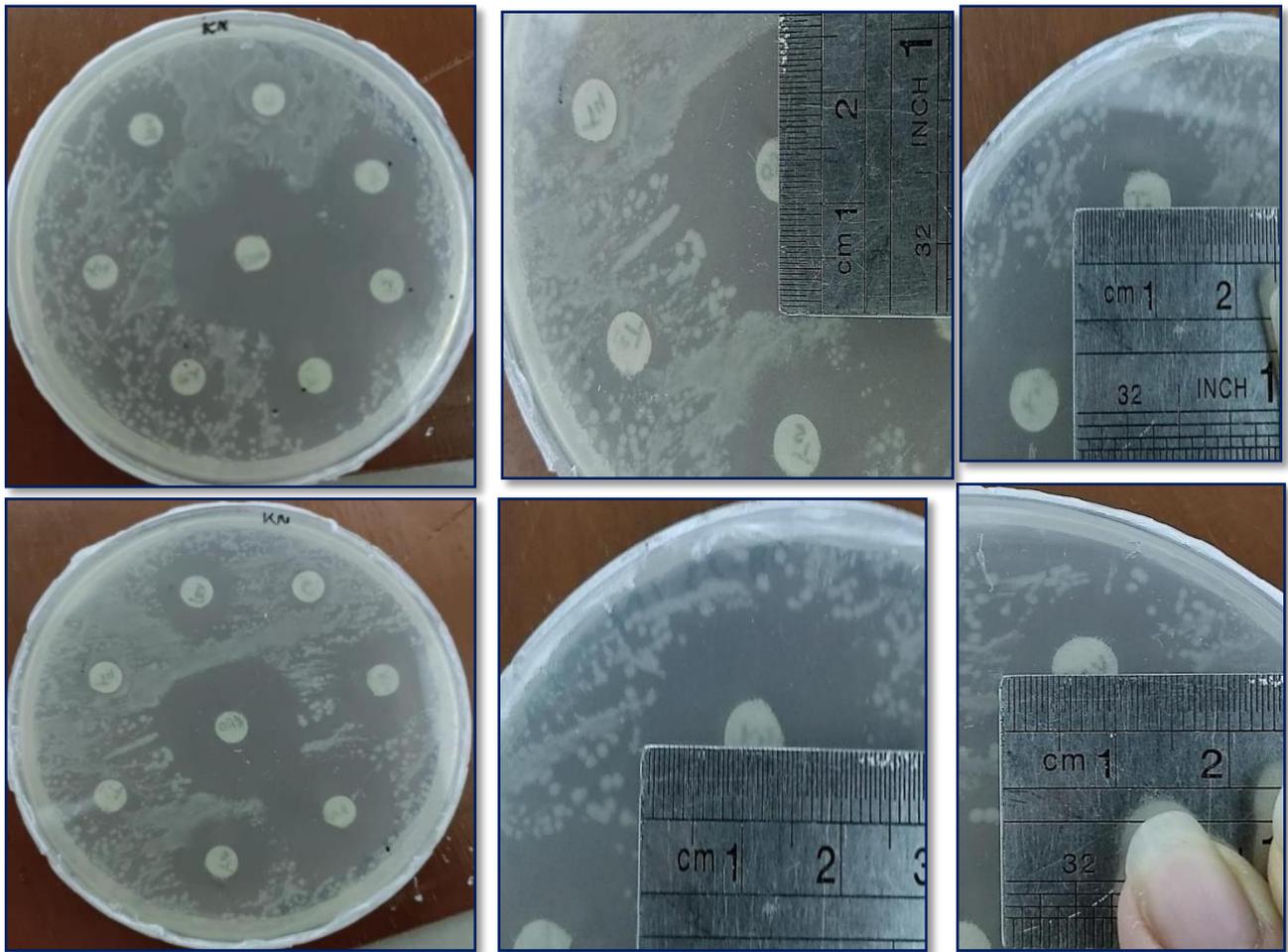


Figura 17. Medición de los halos de inhibición de la cepa *Klebsiella*

Tabla 13. Análisis de varianza para la cepa de *Escherichia*

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G. L</i>	<i>S. C</i>	<i>C. M</i>	<i>F cal.</i>	<i>P valor</i>	<i>Significancia</i>
<i>Tratamiento</i>	7	3164	452	75.33	0.0001	<0.0001***
<i>Error</i>	32	192	6			
<i>Total</i>	39	3356				

*** = Altamente significativo

Tabla 14. *Análisis de varianza para la cepa de Klebsiella*

<i>Fuentes de variación</i>	<i>G. L</i>	<i>S. C</i>	<i>C. M</i>	<i>F cal.</i>	<i>P valor</i>	<i>Significancia</i>
<i>Tratamiento</i>	7	2275	325	68.42	0.0001	<0.0001***
<i>Error</i>	32	152	4.7			
<i>Total</i>	39	2427				

*** = Altamente significativo