

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Zingiber officinale* (jengibre) OBTENIDO POR EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS. AREQUIPA 2013

Presentado Por La Bachiller En Farmacia Y
Bioquímica:

VARGAS AGUILAR, VANNESA NELLY

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

Asesor:

Dr. Gonzalo Dávila del Carpio

AREQUIPA

2014

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, porque me ha hecho sentir su sabiduría y su amor infinito en cada paso de mi vida. *“Porque todo el que pide, recibe; el que busca, encuentra; y se abrirá la puerta al que llama”* (Mateo 7:8).

En memoria de mis queridos abuelitos José y Florentino, vivos ejemplos de honestidad, responsabilidad y humildad; vivirán por siempre en mi corazón.

Gracias Mamita y Mamá Chepita, ustedes son las manos que me sostienen, el sol que calienta mi alma y las estrellas que velan mi sueño.

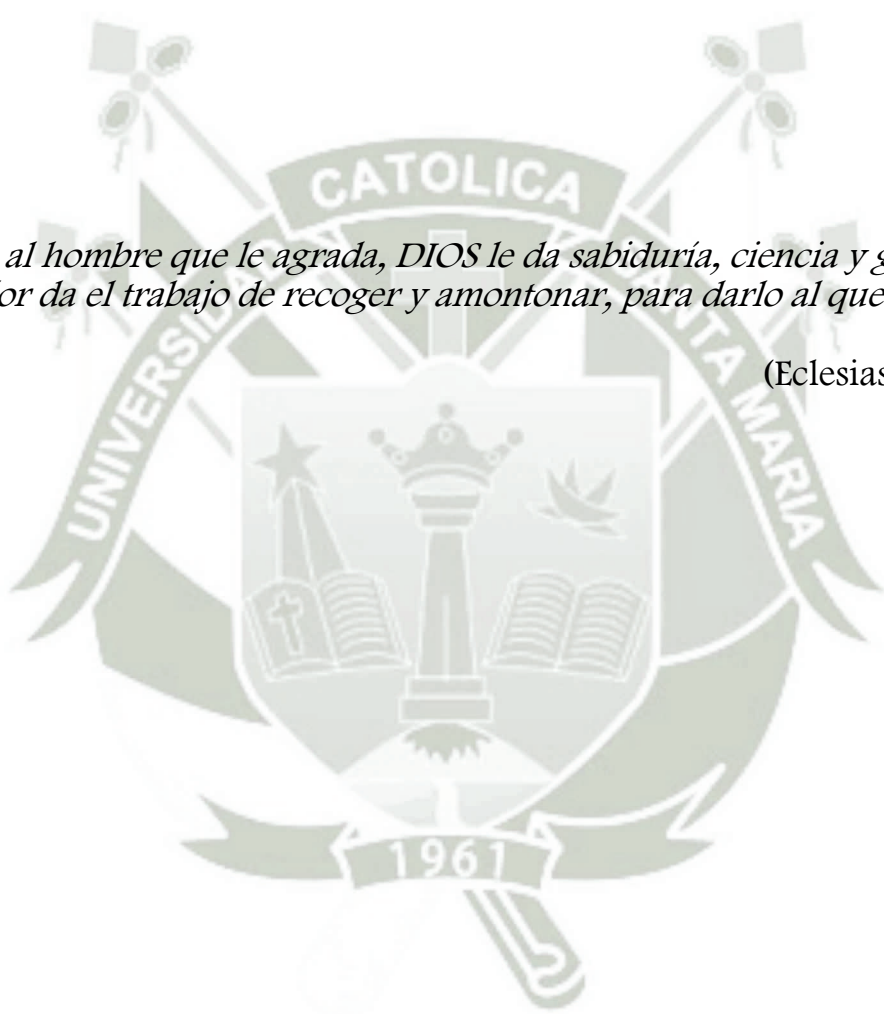
A toda mi familia, mi hermano Marcelo, mi principito Mateo, mis tías, mis tíos, mis primos que siempre me ha alentado para la culminación de este proyecto.

A Deibys, por brindarme su comprensión, su alegría y su amor en mis momentos más difíciles; a mis amigos Fiorella, Evelin, Naider, Lissette, Junior; en este proceso, todo ha sido más sencillo estando ustedes a mi lado.

Al Doctor José Villanueva Salas por su consejo y amistad desde los inicios de mi carrera. A mi asesor de tesis el Doctor Gonzalo Dávila del Carpio por su apoyo constante.

Un agradecimiento especial por la ayuda desinteresada de Jorge Luis Santos, Liliana Delgado, María Fernanda Ponce, Elvis Gonzales y a todos los que colaboraron para la realización de este trabajo de investigación.

Gracias.



“Porque al hombre que le agrada, DIOS le da sabiduría, ciencia y gozo; mas al pecador da el trabajo de recoger y amontonar, para darlo al que agrada a DIOS”.
(Eclesiastés 2:26)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE TABLAS	
RESUMEN.....	
ABSTRACT.....	
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
HIPOTESIS.....	4

CAPITULO I

MARCO TEORICO	5
1.1. <i>ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE</i>	5
1.1.1. GENERALIDADES	5
1.1.2. COMPOSICIÓN	8
1.1.3. QUÍMICA DE LOS COMPONENTES BIOACTIVOS DEL (<i>Zingiber officinale Roscoe</i>) JENGIBRE.....	10
1.1.4. BIOACTIVIDAD DE LOS CONSTITUYENTES DEL JENGIBRE.....	13
1.1.5. FARMACOCINÉTICA DEL 6-GINGEROL.....	16
1.1.6. TOXICOLOGÍA	16
1.1.7. DOSIS	16
1.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	17
1.2.1. EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	17
1.2.2. DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO	27
1.2.3. EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO DE SOXHLET	28
1.3. DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS EN ESTUDIO	30
1.3.1. STAPHYLOCOCCUS AUREUS	30
1.3.2. ESCHERICHIA COLI	33
1.4. MÉTODOS QUE MIDEN EN FORMA DIRECTA LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIMICROBIANOS	35
1.4.1. MÉTODOS DE PRUEBA CONVENCIONALES: DILUCION EN CALDO ..	36

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN.....	38
2.1.1. UNIDADES DE ESTUDIO	38
2.1.2. ÁMBITO GEOGRÁFICO Y TEMPORALIDAD	38
2.2. MATERIALES	38
2.2.1. MATERIALES DE LABORATORIO	38
2.2.2. REACTIVOS	40
2.2.3. INSUMOS.....	40
2.2.4. MATERIAL ANEXO.....	40
2.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	41
2.3.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA PLANTA	41
2.4. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS	42
2.4.1. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO.....	42
2.4.2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO	42
2.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	42
2.5.1. EXTRACCIÓN CON DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO	42
2.5.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET	44
2.6. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES ...	45
2.7. PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF).....	46
2.8. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO	48
2.8.1. RECOLECCIÓN DE LAS CEPAS	48
2.8.2. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS	48
2.8.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PATÓGENAS	48
2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	54
2.9.1. MÉTODO	54
2.9.2. FUNDAMENTO.....	54
2.9.3. PROCEDIMIENTO	54
2.10.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)	56
2.11.DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	57
2.12.ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	58
2.12.1. MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL.....	58
2.12.2. MEDIDA DE DISPERSIÓN	58
2.12.3. TEST T-PAREADO	59

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
3.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	60
3.2. CARACTERÍSTICAS ORGANÓLEPTICAS DEL <i>Zingiber officinale Roscoe</i> “jengibre”	61
3.3. ANÁLISIS PROXIMAL DEL <i>Zingiber officinale Roscoe</i> “jengibre”	61
3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	62
3.4.1. EXTRACTO OBTENIDO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (FSC).....	62
3.4.2. EXTRACTO OBTENIDO POR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET	69
3.5. IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)	71
3.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	71
3.5.2. DETERMINACIÓN DE RF	72
3.6. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO	74
3.6.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PATÓGENAS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	74
3.6.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PATÓGENAS DE <i>Escherichia coli</i> ..	76
3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO.	80
3.7.1. MAPA CONCEPTUAL DEL PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	80
3.7.2. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	81
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	90
3.8.1. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CIM DE <i>Escherichia coli</i>	90
3.8.2. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CBM DE <i>Escherichia coli</i>	91
3.8.3. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CIM DE <i>Staphylococcus aureus</i>	93
3.8.4. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CBM DE <i>Staphylococcus aureus</i>	94
IV. CONCLUSIONES	96
V. SUGERENCIAS	97
VI. BIBLIOGRAFIA	98
VII. ANEXOS	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Rizoma del <i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Jengibre)	5
Fig. 2 Vista general de la planta y de las flores de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	7
Fig. 3 Partes empleadas del jengibre	8
Fig. 4 Estructuras químicas de los principales compuestos del jengibre los gingeroles y shogaoles.	10
Fig. 5 Transformación de Gingeroles en shogaoles.	11
Fig. 6 Principales estructuras de los Diarilheptanoides	12
Fig. 7 Estructura de los principales sesquiterpenos encontrados en el rizoma de jengibre	13
Fig. 8 Diagrama de fases de una sustancia pura	18
Fig. 9 Panorámica general de las características más sobresalientes de los fluidos supercríticos.	19
Fig. 10 Relaciones entre las propiedades básicas de un fluido supercrítico	21
Fig. 11 Partes de un equipo de extracción con fluido supercrítico sin recirculación del disolvente	25
Fig. 12 Equipo De Extracción por Soxhlet	30
Fig. 13 Colonias pigmentadas y β -hemolíticas de <i>Staphylococcus aureus</i> en un medio de agar sangre.	31
Fig. 14 <i>Escherichia coli</i> en agar MacConkey.	33
Fig. 15 Placa de microtitulación para la prueba de microdilución en caldo.	37
Fig. 16 Proceso de acondicionamiento del material vegetal	60
Fig. 17 Oleorresina de Jengibre Obtenida con Dióxido de Carbono Supercrítico	64
Fig. 18 Extracción con Soxhlet del rizoma de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe “jengibre”	69
Fig. 19 Oleorresina de “jengibre” obtenida por el método de Soxhlet.	69
Fig. 20 Resultados de la Cromatografía En Capa Fina de la Muestra A	72
Fig. 21 Resultados de la Cromatografía En Capa Fina de la Muestra B	73
Fig. 22 Cocos Gram positivos a 100x	74
Fig. 23 Prueba de la Catalasa positiva, para <i>Staphylococcus aureus</i>	74
Fig. 24 Prueba de Coagulasa positiva, para <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Fig. 25 Agar Manitol Salado fermentación positiva, para <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Fig. 26 Bacilos Gramnegativos vistos al microscopio.	76
Fig. 27 colonias de <i>Escherichia coli</i> en agar Mac Conkey	76
Fig. 28 <i>Escherichia coli</i> en TSI (A/A+-)	77
Fig. 29 <i>Escherichia coli</i> en LIA (K/K-)	77
Fig. 30 Prueba de Indol Positivo, para <i>Escherichia coli</i>	78
Fig. 31 RM (+) y VP (-) para <i>Escherichia coli</i>	78
Fig. 32 Prueba de Citrato de Simons Negativo, para <i>Escherichia coli</i>	79
Fig. 33 Las pruebas de CIM Y CBM; en esta figura la CIM es de 2 μ g/ml y la CBM es de 8 μ g/ml.	81
Fig. 34 Ejemplo del punto de corte para la CIM de <i>Escherichia coli</i> ATCC (8739)	82
Fig. 35 Ejemplo del punto de corte en placa para la CBM de <i>Escherichia coli</i> ATCC (8739)	83
Fig. 36 Ejemplo del punto de corte para la CIM de <i>Staphylococcus aureus</i> (HRHDE)	84

Fig. 37 Ejemplo del punto de corte en placa para la CBM de Staphylococcus aureus (HRHDE) _____	85
Fig. 38 Ejemplo del punto de corte para la CIM de Escherichia coli (HRHDE) _____	86
Fig. 39 Ejemplo del punto de corte en placa para la CBM de Escherichia coli (HRHDE) _____	87
Fig. 40 Ejemplo del punto de corte para la CIM de Staphylococcus aureus (UCSM) _____	88
Fig. 41 Ejemplo del punto de corte en placa para la CBM de Staphylococcus aureus (UCSM) _____	89



ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Rendimiento de extracción (%RE) de la oleoresina extraída, en función del tiempo a diferentes presiones y a una misma temperatura. _____	65
Gráfico 2 Rendimiento de extracción (%RE) de la oleoresina extraída en función del tiempo a diferentes temperaturas y a una misma presión. _____	66
Gráfico 3 Rendimiento de la oleoresina en (g) frente al tiempo, con los parámetros óptimos determinados. _____	67
Gráfico 4 Porcentaje de rendimiento (%RE) de la oleoresina extraída con diferentes presiones y temperaturas. _____	68
Gráfico 5 Extracciones realizadas con el equipo de Soxhlet _____	71
Gráfico 6 Procedimiento para realizar las microdiluciones. _____	80



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Comparación de las propiedades fisicoquímicas del CO ₂ supercrítico con la de los gases y líquidos ordinarios. _____	21
Tabla 2 Características Generales De Staphylococcus aureus. _____	31
Tabla 3 Características bioquímicas que permiten diferenciar S.aureus de las principales especies patógenas de estafilococos coagulasa negativas. _____	32
Tabla 4 Características Generales De Escherichia coli _____	34
Tabla 5 Características bioquímicas que permiten la identificación de Escherichia coli. _____	35
Tabla 6 Características organolépticas del rizoma de Zingiber officinale Roscoe. _____	61
Tabla 7 Análisis proximales del rizoma de Zingiber officinale Roscoe. _____	61
Tabla 8 Parámetros para la extracción de oleorresina de Zingiber officinale Roscoe. _____	63
Tabla 9 Parámetros óptimos para extracción de oleorresina de Zingiber officinale Roscoe. _____	64
Tabla 10 Resultados confirmatorios para la identificación de Staphylococcus aureus _____	75
Tabla 11 Resultados confirmatorios para la identificación de Escherichia coli _____	79
Tabla 12 CIM de la oleorresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para Escherichia Coli _____	82
Tabla 13 CBM de la oleorresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para Escherichia Coli _____	83
Tabla 14 CIM de la oleorresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para Staphylococcus aureus _____	84
Tabla 15 CBM de la oleorresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para Staphylococcus aureus _____	85
Tabla 16 CIM de la oleorresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para Escherichia Coli _____	86
Tabla 17 CBM de la oleorresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para Escherichia coli _____	87
Tabla 18 CIM de la oleorresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para Staphylococcus aureus _____	88
Tabla 19 CBM de la oleorresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para Staphylococcus aureus _____	89
Tabla 20 Concentración inhibitoria mínima para Escherichia Coli _____	90
Tabla 21 Test t-pareado respecto a la CIM para cepas de Escherichia coli. _____	91

Tabla 22 Concentración bactericida mínima para Escherichia Coli _____	91
Tabla 23 Test t-pareado respecto a la CBM para cepas de Escherichia coli. _____	92
Tabla 24 Concentración inhibitoria mínima para Staphylococcus aureus _____	93
Tabla 25 Test t-pareado respecto a la CIM para cepas de Staphylococcus aureus _____	94
Tabla 26 Concentración bactericida mínima para Staphylococcus aureus _____	94
Tabla 27 Test t-pareado respecto a la CBM para cepas de Staphylococcus aureus _____	95



RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación, fue evaluar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” obtenido por extracción con fluidos supercríticos.

En primera instancia, se recolectaron los rizomas de “jengibre” y se los acondicionó (material vegetal en polvo) para su extracción con dióxido de carbono supercrítico.

Las extracciones usando dióxido de carbono supercrítico, fueron realizadas con distintos niveles de presión y temperatura, para poder definir los parámetros óptimos y alcanzar un porcentaje de rendimiento alto, en la obtención de la oleorresina de “jengibre”. Se utilizaron, tres presiones diferentes (179bar; 207bar; 250bar) y tres temperaturas diferentes (40°C; 50°C; 60°C). El rendimiento más alto fue de 5.2%, alcanzado con una presión de 250 bar y con una temperatura de 50°C.

Los componentes presentes en el extracto obtenido por dióxido de carbono supercrítico, fueron determinados mediante cromatografía en capa fina (CCF), donde se evidenció la presencia de *gingeroles*, *shogaoles* y *terpenos*.

Para las pruebas antimicrobianas se empleó además del extracto de “jengibre” obtenido por extracción con dióxido de carbono; un segundo extracto de “jengibre” obtenido por extracción con el método de Soxhlet. Para evaluar si existe alguna diferencia significativa en el efecto antimicrobiano de ambos extractos, Se empleó el método de Microdilución en caldo y se utilizaron cepas ATCC y cepas aisladas por laboratorios microbiológicos, de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli*).

El extracto obtenido usando dióxido de carbono supercrítico presentó efecto antimicrobiano frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* con una CIM de (110mg/ml) y para *Escherichia coli* una CIM de (110mg/ml); con el extracto obtenido por el método de extracción por Soxhlet también se consiguió efecto antimicrobiano para *Staphylococcus aureus* con una CIM de (120mg/ml) y para *Escherichia coli* una CIM de (113mg/ml).

En la determinación de la concentración inhibitoria mínima para *Staphylococcus aureus*, si hubo una diferencia significativa para ambos extractos (probabilidad = 1.39×10^{-6}); Por tanto en extracto obtenido con dióxido de carbono supercrítico tuvo un efecto antimicrobiano superior.

Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima para *Escherichia coli* no hubo una diferencia significativa para ambos extractos (probabilidad = 0.333); Por tanto ambos extractos producen un mismo efecto antimicrobiano.

Palabras claves: jengibre, extracción supercrítica, dióxido de carbono supercrítico, actividad antimicrobiana.



ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the in vitro antimicrobial effect of the extract of *Zingiber officinale Roscoe* "Ginger" obtained by supercritical fluid extraction.

Firstly, the rhizomes of "Ginger" were collected and conditioned (vegetable powder) for extraction with supercritical carbon dioxide.

The Extractions using supercritical carbon dioxide were performed with different levels of pressure and temperature, in order to define the optimal parameters and attain a high yield rate, in obtaining oleoresin "ginger". Were used three different pressures (179bar, 207bar, 250 bar) and three different temperatures. (40 ° C, 50 ° C, 60 ° C) The highest yield was 5.2%, achieved with a pressure of 250 bar and a temperature of 50 °C.

The components Present in the extract obtained by supercritical carbon dioxide were determined by thin layer chromatography (TLC), where the presence of gingerols, shogaols and terpenes were determined.

For antimicrobial testing was employed the extract obtained by extraction with carbon dioxide; and also a second extract of "ginger" who were obtained by extraction with Soxhlet. To assess whether there is any significant difference in the antimicrobial effect of both extracts, The Method used were microdilution in broth and were used ATCC strains and Microbiological laboratory isolates strains; Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram negative (*Escherichia coli*).

The extract obtained using supercritical carbon dioxide presents antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* strains with a MIC (110mg / ml) and an MIC of *Escherichia coli* (110mg / ml); with the extract obtained by Soxhlet extraction method, antimicrobial effect to *Staphylococcus aureus* was also achieved with an MIC of (120mg / ml) and an MIC of *Escherichia coli* (113mg / ml). In determining the minimum inhibitory concentration for *Staphylococcus aureus*, if there was a significant difference for both extracts (probability = 1.39×10^{-6}); Extract thus obtained with supercritical carbon dioxide had a superior antimicrobial effect. To determine the minimum inhibitory concentration for *Escherichia coli* was no significant difference for both extracts (probability = 0.333); Therefore both extracts produce the same antimicrobial effect.

Keywords: ginger, supercritical extraction, supercritical carbon dioxide, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas con fines curativos se remonta a muchos años atrás y guarda relación con la flora existente en cada territorio. Así como en el Perú; el poblador recurre a la medicina tradicional para aliviar sus afecciones habituales (dolor estomacal, tos, gripe, disentería). En la actualidad son objeto de múltiples investigaciones científicas, demostrándose experimentalmente algunas acciones atribuidas a estas plantas, como las propiedades antimicrobianas y antimicóticas; teniendo una alternativa viable para combatir las infecciones que afectan al organismo humano, provocadas por bacterias como la *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli*.

El *jengibre* es una de las especias más importantes y más utilizadas en todo el mundo. Debido a su atractivo universal, el *jengibre* se ha extendido a la mayoría de los países del mundo en regiones tropicales y subtropicales. Es originario de China y la India. En la antigüedad, el *jengibre* era más valorado por sus propiedades medicinales y jugó un papel importante en la atención primaria de la salud en la antigua India y China.

Esta raíz tiene un nombre muy particular en el Perú, y solo en tierras peruanas lo llaman *kion*, existe muy poca información del porqué de este nombre, la más aceptable se refiere a partir de 1849, con la llegada de los primeros inmigrantes chinos.

La parte del *jengibre* empleada tradicionalmente es el rizoma. Su uso común es en casos de cólicos y flatulencias. Presenta propiedad carminativa, antiulcerosa, antiespasmódica, colagoga, protector hepático, antitusiva, expectorante y laxante. Se le considera como un eficaz antiinflamatorio, antiemético y antioxidante.

El *jengibre* contiene una oleorresina, en la que destacan el aceite esencial y las sustancias picantes. El aceite esencial tiene una composición variable según la procedencia. Los principales componentes son sesquiterpenos, el α -zingibereno, como el componente predominante. Los *gingeroles* y los *shogaoles* son los compuestos que contribuyen a la pungencia del *jengibre*.

Desde la segunda mitad del siglo XX, se han desarrollado varias técnicas nuevas para la extracción de solutos desde matrices sólidas, entre ellas se tiene: la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción con disolvente acelerado y la extracción con fluidos supercríticos; con el objeto de acortar el tiempo de extracción,

disminuir el consumo de disolvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto.

La preocupación mundial por los temas ambientales, ha impulsado activamente la investigación en el campo de la ciencia y tecnología de los fluidos supercríticos, por ser una operación inocua con el medio ambiente en comparación con los métodos de extracción con disolventes convencionales.

En la actualidad, el dióxido de carbono supercrítico se emplea para la extracción de productos naturales y en especial para el polvo de jengibre y otras especias. Se utiliza principalmente porque el dióxido de carbono supercrítico es seguro, no combustible, barato, inodoro, incoloro, insípido, no tóxico, y un solvente fácilmente disponible. Su baja viscosidad le permita penetrar en la matriz para alcanzar el material extraído, y su bajo calor latente de la vaporización y la alta volatilidad significa que se puede quitar fácilmente sin dejar un residuo de disolvente.

Con el presente trabajo se pretende demostrar el efecto antimicrobiano del extracto de *Zingiber officinale Roscoe* “Jengibre” empleando dióxido de carbono supercrítico para su obtención y mediante este nuevo método alcanzar un mayor porcentaje de rendimiento y extractos libres de solvente. Lo que significaría una base científica válida para el uso de esta planta.



OBJETIVOS

- GENERAL
 - Determinar si el extracto de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” obtenido por fluidos supercríticos, tiene actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

- ESPECÍFICOS
 - Determinar las condiciones óptimas para la obtención del extracto de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” empleando dióxido de carbono supercrítico.
 - Obtener el extracto de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” por el método de extracción por Soxhlet.
 - Caracterizar por cromatografía de capa fina (CCF) los extractos obtenidos del *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”.
 - Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

HIPOTESIS

Dado que existen antecedentes terapéuticos reportados por la medicina tradicional sobre la acción antimicrobiana del *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”, es probable que: EL EXTRACTO OBTENIDO CON DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRTICO TENGA EFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE LAS CEPAS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI*.



CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1. *ZINGIBER OFFICINALE ROSCOE*

1.1.1. GENERALIDADES

Además de ser un condimento muy apreciado, el jengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) ha sido utilizado con propósitos curativos desde hace miles de años. En la medicina Ayurvédica de la India y en la medicina China, el jengibre ocupa un lugar muy importante. ⁽⁵⁰⁾

Es un tubérculo articulado, en forma de mano, al cual se le da el nombre de rizoma. Parte esencial de la planta, de un olor fuerte aromático; sabor agrio, picante.

Su uso es común en caso de cólicos y flatulencias. Presenta propiedad carminativa, antiulcerosa, antiespasmódica, protector hepático, antitusiva, expectorante y laxante. Además de los compuestos volátiles que aportan el olor típico de este rizoma, existe un grupo de compuestos no volátiles que aportan su pungencia y propiedades farmacológicas importantes. ⁽⁹⁾

1.1.1.1. ETIMOLOGÍA

El nombre del género *Zingiber* proviene del hindú *zingibil* o *zengibil*, nombre común dado a esta planta. ⁽²⁹⁾



Fig. 1 Rizoma del *Zingiber officinale Roscoe* (Jengibre)

Fuente: Elaboración propia

1.1.1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

El jengibre, es originario de las zonas tropicales del sureste asiático, exactamente del área Indomalaya al sur de Asia. Naturalizada en Jamaica, África, en las Indias occidentales, México y en la Florida. La cultura Hindú y China lo han utilizado por milenios como un alivante digestivo. ⁽¹⁾

Requiere de un clima tropical húmedo, con una temperatura superior a los 30° C, humedad de 80% a 95%, y una altitud de 0 a 1500 m.s.n.m. Así pues, el Perú con su gran riqueza natural cuenta con una serie de microclimas, aptos para el desarrollo de esta especie y se cultiva principalmente en la selva central en los departamentos de Junín y Huánuco. ⁽¹⁴⁾

1.1.1.3. UBICACIÓN TAXONÓMICA

- REINO: Plantae
- SUB REINO: Tracheobionta
- FILO: Magnoliophyta
- CLASE: Liliopsida
- SUBCLASE: Zingiberidae
- ORDEN: Zingiberales
- FAMILIA: Zingiberaceae
- GENERO: Zingiber
- ESPECIE: *Zingiber officinale*
- NOMBRE CIENTIFICO: *Zingiber officinale Roscoe*
- NOMBRE COMÚN: Jengibre o Kion

1.1.1.4. DESCRIPCIÓN Y MORFOLOGÍA

Se trata de una planta herbácea perenne, reptante, perteneciente a la familia de las Zingiberáceas; que consiste de 47 generos incluyendo *Zingiber*, *Cúrcuma*, *Alpinia*, *Amomum*, *Elettaria*, y alrededor de 1.400 generos más. Caracterizada por presentar una altura entre 60 a 120 cm; rizoma tuberoso,

poliobulado y grueso; hojas envainantes lanceoladas de 15 a 30 cm de longitud; flores verdosas con manchas púrpuras dispuestas en espigas cónicas y soportadas por escamas empizarradas. Algunos tallos son estériles y no presentan flores, sirviendo únicamente para asimilación. El fruto es de forma capsular aunque rara vez el jengibre fructifica. (22,38)

Los rizomas son de color cenizo por fuera y blanco amarillento por dentro en un corte transversal de los rizomas muestra que consta de tres partes esenciales, corcho, región cortical y cilindro central. Las capas de corcho son producidas en la epidermis y forman de cuatro a ocho estratos de células de parénquima, alargadas en sentido tangencial, que se renuevan constantemente y le dan el aspecto seco y corchoso característico. (1,38)

La región cortical está constituida por parénquima, de color grisáceo oscuro y contiene abundante número de células con oleorresinas, y haces vasculares. El cilindro central es amarillento y se encuentra separado del anterior por una banda más clara.



Fig. 2 Vista general de la planta y de las flores de *Zingiber officinale Roscoe*

Fuente: Mesomo, M. (2013). *Obtenção de Extrato de Gengibre (Zingiber Officinale Roscoe) Usando Co₂ Supercrítico e Propano Comprimido.*

1.1.1.5. PARTE UTILIZADA

Los rizomas se recolectan antes de que se formen nuevos retoños pues los rizomas viejos pierden sus propiedades terapéuticas. Se lavan, se raspan y se pone a secar al sol. (50)

Estos rizomas presentan un sabor picante y olor aromático característico y son el doble de picantes que los frescos ya que el proceso de desecado permite la descomposición de los Gingeroles. ^(9,14)



Fig. 3 Partes empleadas del jengibre

Fuente: Elaboración propia

1.1.2. COMPOSICIÓN

1.1.2.1. COMPOSICIÓN ALIMENTARIA

- Humedad (15%)
- Cenizas totales (8%)
- (2%) de cenizas insolubles en HCL al 10%.
- Proteínas (12.3%) y proteínas solubles en agua (2.3%)
- Almidón (45.25%)
- Grasas (4.5%) incluyendo ácidos grasos libres
- Esteroles (0.53%)
- Fibra cruda (10.3%)
- Minerales (en g/100g): Ca (0.025), Na (0.122), K (0.035), Fe (0.007), P (0.075), Mg (0.048).

El contenido de elementos en el jengibre fue reportado por Zaidi (1992) y Afzal (2001) además de la Base de Datos de Nutrientes: USDA National Nutrient Database For Standard Reference (Anexo 2).

1.1.2.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA

El rizoma del jengibre presenta componentes químicos que aportan beneficios a la salud de quien lo ingiere, estos se conocen como principios

aromáticos (α -zingibereno, α -curcumeno, β -bisaboleno) presentes en el aceite esencial y los principios pungentes ([6]-gingerol y el [6]-shogaol), presentes en la resina. La unión del aceite esencial y la resina constituyen la oleorresina que se encuentra de un 4 a 7,5% en el rizoma. ^(1,38)

1.1.2.2.1. EL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial (1,5-3% de la droga) tiene una composición variable según la procedencia. ^(1, 22, 38)

Los principales componentes son:

- Sesquiterpenos como: α -zingibereno, α -bisaboleno α -curcumeno, β -curcumeno, β -sesquifelandreno y farnesol.
- monoterpenos, como: canfeno, cineol, citral, borneol, limoneno, α -felandreno; alcanfor, β -felendreno, geranial, neral y linalol.
- Hidrocarburos: (undecano, hexadecano, dodecano, tolueno, p-cimeno, etc), alcoholes alifáticos (2-butanol, 2-heptanol, 2-nonanol).
- aldehídos alifáticos: (butanal, 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, pentanal), cetonas (acetona, 2-hexanona, 2-novanona, heptanona, criptona, carvotanacetona, metil-heptanona).

Un estudio sensorial completado en 1975 puso de manifiesto que el β -sesquifelandreno y el α -curcumeno eran los principales responsables del aroma a jengibre, mientras que el α -terpineol y el citral causan el aroma a limón. ⁽⁵⁾

1.1.2.2.2. FRACCIÓN RESINOSA

Las sustancias picantes presentes en la fracción resinosa (5-8%) entre los que destacan: gingerdiolos, gingeroles: (6)-gingerol, (8)-gingerol, (10)-gingerol, con una concentración del 33%, originando por desecación: zingerona, zingibereno, (6)-shogaol, (8)-shogaol y (10)-shogaol (los cuales se caracterizan por ser más picantes).

Los gingeroles y los shogaoles son fenilalcanonas no volátiles con cadenas de diferentes longitudes, siendo los más importantes el (6)-gingerol y el (6)-shogaol.

El rizoma de jengibre también contiene diarilheptanoides: difenilheptenonas, difenilheptanonoles, difenilheptanodiolos y sus acetatos.

Otros componentes son: ácido 6-gingsulfónico y monoacil digalactosil glicerolos. ^(5,38)

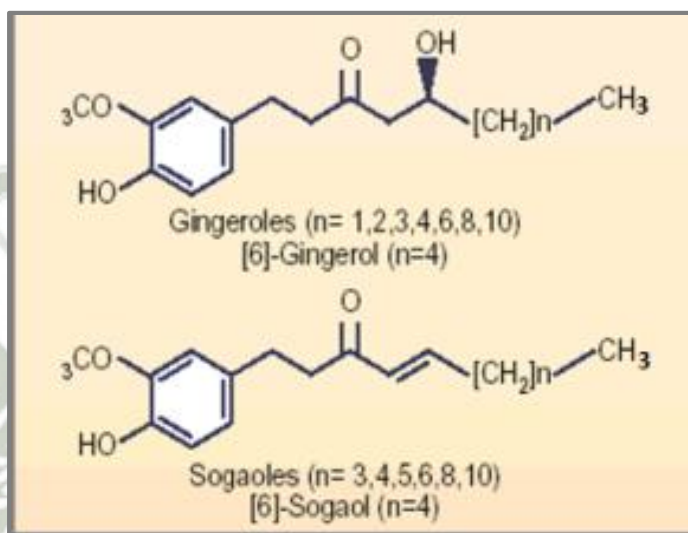


Fig. 4 Estructuras químicas de los principales compuestos del jengibre los Gingeroles y Shogaoles.

Fuente: Cañigueral, S. (2003) *Farmacia Práctica, Plantas Medicinales y Drogas Vegetales*.

1.1.3. QUÍMICA DE LOS COMPONENTES BIOACTIVOS DEL (*Zingiber officinale Roscoe*) JENGIBRE

1.1.3.1. GINGEROLES

Los Gingeroles son compuestos pungentes del rizoma del *Zingiber officinale Roscoe*, se encuentran en la oleorresina en una cantidad del 5 al 8%, se les considera responsables de las propiedades medicinales de dicha planta.

Sin embargo el mayor compuesto pungente de la oleorresina es el (6)-gingerol, químicamente es un decano no cíclico que tiene un grupo 4-hidroxi-3-metoxifenil, en el carbono número uno [C1], un grupo carbonilo en el carbono número tres [C-3] y un grupo hidroxilo en el carbono número cinco [C-5] además, la estereoquímica del carbono número cinco [C-5] fue determinada como una configuración “S”. ⁽³⁰⁾

El nombre de (6)-gingerol deriva del hecho de que la hidrólisis alcalina del gingerol proporcionó un n-hexanal, un aldehído de seis carbonos.

A su vez se reportó que el 8-gingerol fue el más pungente entre los miembros de la serie de los gingeroles, lo cual indica que la longitud de la cadena desempeña un papel importante en la pungencia. ^(30,38)

1.1.3.2. SHOGAOLES

El nombre de shogaol proviene de “shoga” la palabra japonesa para el jengibre. El shogaol es un gingerol monodehidratado, usualmente en el rizoma fresco no se encuentra ninguno o pequeñas cantidades de shogaoles mientras que el rizoma seco es rico en shogaoles. Esto sugiere que los shogaoles se forman a través de la deshidratación durante el procesamiento o el almacenamiento del rizoma fresco.

Se reportó que la relación del (6)-gingerol a (6)-shogaol en el rizoma fresco fue aproximadamente 7:1 y esta proporción no cambió después del secado a 40 °C. Cuando se evaporó por 10 horas seguido de un secado, la proporción fue aproximadamente 1:1 esto implica la dependencia de la conversión del (6)-gingerol en (6)-shogaol con el tiempo. ^(30,38)

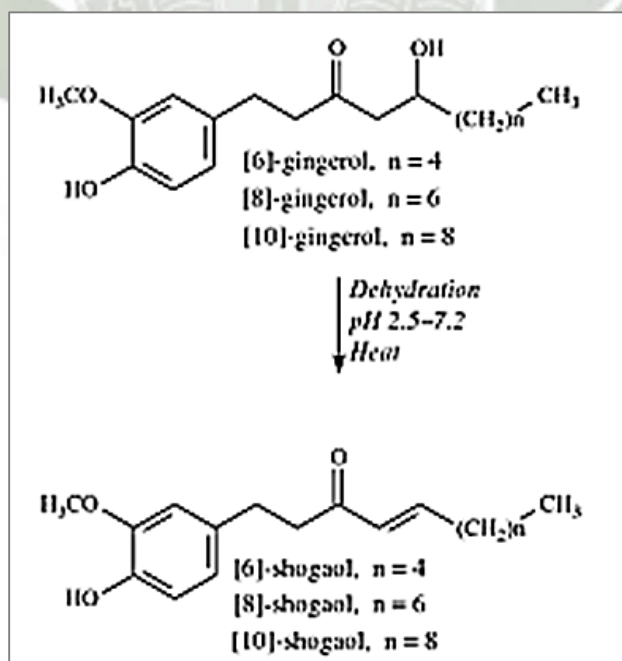


Fig. 5 Transformación de Gingeroles en Shogaoles.

Fuente: Ravindran, N., Nirmal, K. (2004) *Ginger: The Genus Zingiber*

1.1.3.3. DIARILHEPTANOIDES

El rizoma del jengibre contiene muchos diarilheptanoides, heptanos con grupos fenilos en el carbono número uno [C-1] y el carbono número siete [C-7], aunque las cantidades son menos de 0,005% cada uno.

Entre los diarilheptanoides el hexahidrocurcumin (18, en la fig.8) es el mayor componente y tiene un grupo carbonil en el carbono número tres [C-3] y un grupo hidroxilo en el carbono número cinco [C-5].⁽³⁰⁾

La figura 6 muestra las estructuras de Algunos diarilheptonoides aislados del rizoma de jengibre; estos diarilheptanoides pueden clasificarse estructuralmente de acuerdo al patrón de sustitución del heptano en 4 tipos:

- 5-hidroxi-3-ona
- 4-en-3-ona
- 3,5-diol
- 3,5-diacetato

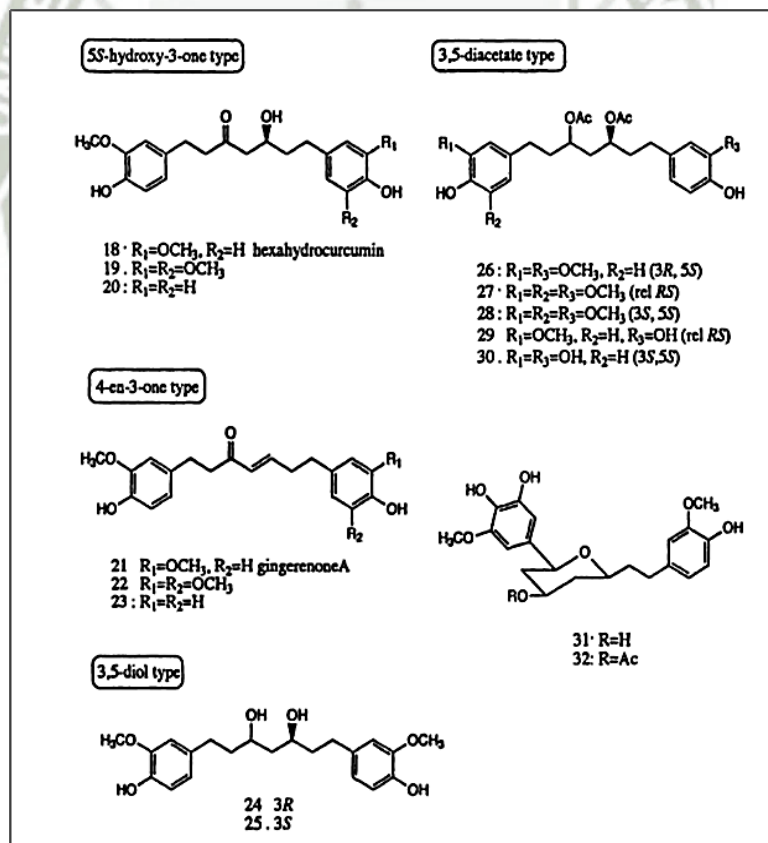


Fig. 6 Principales estructuras de los Diarilheptanoides

Fuente: Oomah, D., Mazza, G. (2000) *Herbs Botanicals and Teas*

Otros análogos minoritarios del gingerol fueron encontrados y tenían grupos 3,4-dimetoxifenil o 4-hidroxifenil y varios diarilheptanoides fueron aislados a su vez con grupos 4-hidroxifenil; 3-4-dihidroxifenil; 3-4-dihidroxi-5-metoxifenil ó 3,5-dimetoxi-4-hidroxifenil.

Los compuestos derivados del gingerol y los diarilheptanoides que poseen el grupo 4-hidroxi-3-metoxifenil son, sin embargo, los mayores componentes del jengibre. ^(30,38)

1.1.3.4. TERPENOS

Cada grupo de terpenos es el resultado de la condensación “cabeza-cola” de un número variable de unidades isoprenicas. Ruzicka (1953)

Pueden clasificarse como Monoterpenos (C10), Sesquiterpenos (C15), Diterpenos (C20), Triterpenos (C30), Tetraterpenos (C40).

El rizoma del jengibre posee muchos terpenos, incluyendo los monoterpenos: geraniol, geranilacetato, geranial, y 1,8 cineole y los sesquiterpenos: α -zingibereno (33), β -sesquifelandreno (34), β -bisaboleno(35) y ar-curcumeno (36). (Figura 7).

La cantidad y la composición de los terpenos en el jengibre varían considerablemente de acuerdo al área de producción de cosecha y preparación. ^(4,30)

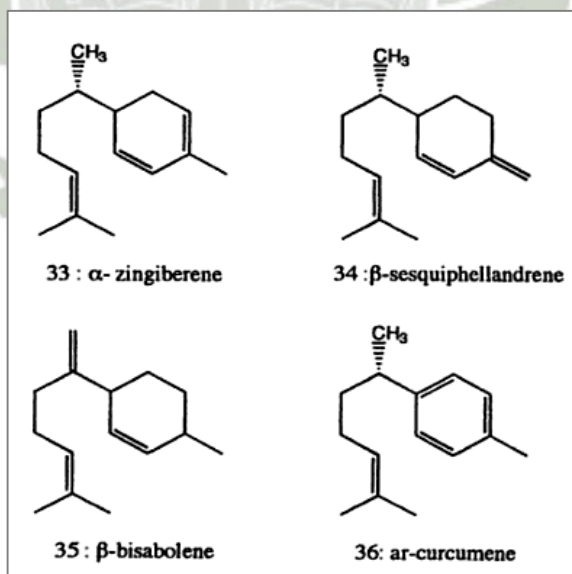


Fig. 7 Estructura de los principales sesquiterpenos encontrados en el rizoma de jengibre

Fuente: Oomah, D., Mazza, G. (2000) *Herbs Botanicals and Teas*

1.1.4. BIOACTIVIDAD DE LOS CONSTITUYENTES DEL JENGIBRE

1.1.4.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Muchas investigaciones se han llevado a cabo para determinar los efectos antioxidantes de varias especias y plantas incluyendo al jengibre.

Se reportó la actividad antioxidante de los principios pungentes, Zingerona y Shogaoles en carne deshidratada de cerdo, que demostraron la eficacia del gingerol como un antioxidante, en un sistema de emulsión β -caroteno-ácido linoléico-agua.

También se examinó el efecto antioxidante de algunos compuestos derivados del gingerol y diarilheptanoides, usando ácido linoléico como sustrato en una solución buffer de etanol-fosfato.

Los homólogos del gingerol con diferentes longitudes de cadenas alquílicas mostraron eficacia como antioxidantes, correlacionándose la mayor actividad, con las cadenas alquílicas más largas. Los homólogos de los shogaoles tuvieron tendencias similares al de los gingeroles.⁽³⁰⁾

1.1.4.2. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA-ANTIPIRÉTICA

El Extracto alcohólico del rizoma de jengibre demostró en animales de laboratorio, actividad antiinflamatoria y antipirética similar al ácido acetil salicílico. Se postuló en este sentido una acción inhibitoria de los gingeroles sobre la lipooxigenasa.

Tanto el gingerol como la gingerdiona y la dihidrogingerdiona han sido reportados como potentes agentes inhibitorios de la biosíntesis de las prostaglandinas in vitro, con una eficacia superior a la indometacina.

Uno de los mecanismos de la inflamación es el incremento de la oxigenación del ácido araquidónico, que es metabolizado por la ciclooxigenasa y la 5-lipoxigenasa, produciendo prostaglandina E2 y leucotrieno B4, dos potentes mediadores de la inflamación. Estudios in vitro han demostrado que extractos de jengibre inhiben las actividades de ambas enzimas en la cascada del ácido araquidónico, por lo tanto, sus efectos antiinflamatorios pueden ser debidos a la disminución de la formación de prostaglandinas y leucotrienos.

El jengibre también es un potente inhibidor de la tromboxano sintetasa e incrementa los niveles de prostaciclina sin aumento concomitante de las prostaglandinas E₂ o F₂á.

Estudios in vivo han demostrado que la administración oral de extractos de jengibre disminuyeron el edema de la pata de rata. El (6)-Shogaol inhibió el edema de pata de rata inducido por carragenina inhibiendo la actividad de la ciclooxigenasa.

Un estudio en China reportó que 113 pacientes con dolor reumático y lumbalgia crónica, a quienes se inyectó un extracto con 5–10% de jengibre en los puntos dolorosos, experimentaron alivio total o parcial del dolor, disminución de la inflamación articular y mejoría o recuperación de la función articular. La administración oral de polvo de jengibre a pacientes con reumatismo u otras alteraciones musculoesqueléticas ha reportado alivio del dolor y la inflamación. ⁽¹⁾

1.1.4.3. ACTIVIDAD ANTIEMÉTICA

Atribuida principalmente a un efecto local sobre el tracto gastrointestinal de los gingeroles y sogaoles. Estudios clínicos han demostrado que la administración oral de polvo de raíz de jengibre (940 mg) fue más efectiva que el dimenhidrinato (100 mg) en la prevención de los síntomas gastrointestinales de la cinetosis (mareo locomocional).

Los resultados de este estudio sugieren que no actúa sobre el sistema nervioso central, pero tiene un efecto directo sobre el tracto gastrointestinal, por medio de sus propiedades aromáticas, carminativas y absorbentes, aumentando la motilidad gástrica y adsorbiendo toxinas y ácidos. ^(1,30)

1.1.4.4. OTROS EFECTOS BIOACTIVOS DE LOS COMPONENTES DEL JENGIBRE

Se han encontrado también que los compuestos del jengibre pueden mejorar la motilidad gastrointestinal y de inhibir la hipotermia y diarrea inducida por la serotonina, poseen una acción antihepatotóxica.

Recientemente el (6)-gingerol fue reportado como un promotor de la actividad antitumoral en dos etapas, de un modelo de carcinogénesis en piel de ratón.

El (6)-gingerol y el (6)-shogaol también demostró supresión del sistema nervioso central y tiene efecto antipirético, analgésico y antitusivos. El (6)-shogaol demostró eficacia significativamente mayor en estas acciones que el (6)-gingerol. ⁽³⁰⁾

1.1.5. FARMACOCINÉTICA DEL 6-GINGEROL

El (6)-gingerol, el principal constituyente pungente del jengibre, ha sido estudiado después de una inyección de bolus intravenoso a una dosis de 3 mg/kg de peso en ratas.

El análisis cuantitativo con alta reproducibilidad se logró en el rango de concentración de 0.2 a 40 µg/ml. Un modelo abierto de dos compartimientos describe la curva plasmática de concentración – tiempo.

El (6)-gingerol tuvo una eliminación rápida del plasma con una vida media de 7.23 minutos y un clearance total de 16.8 ml /minutos/kilogramo. El (6)-gingerol tiene una unión a proteínas del 92.3% ⁽⁴⁾

1.1.6. TOXICOLOGÍA

Decocciones del jengibre seco y asado fueron investigadas en cuatro modelos experimentales de ulcera gástrica. El test de toxicidad aguda demostró que la DL50 de la decocción del jengibre asado administrado oralmente fue de 170.6 ± 1.1 g/Kg y la DL50 de la decocción del jengibre seco era más de 250 g/Kg. ⁽⁴⁾

1.1.7. DOSIS

Diferentes dosis son recomendadas para los diferentes usos del jengibre. Usualmente se sugiere entre 0.5 a 1g (tabletas o capsulas) de polvo seco de rizoma de jengibre. ⁽¹²⁾

Para cualquier condición, es generalmente recomendado que la dosis no exceda 4 gramos por día. ⁽¹²⁾

1.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La extracción es una de las operaciones farmacéuticas por medio de la cual se obtienen los principios activos de una manera más concentrada; Para separar estos compuestos (solutos) de la fase sólida, esta se pone en contacto con una fase líquida, ambas fases entran en contacto íntimo y el (los) soluto(s) se difunde(n) desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura natural original, formando así un extracto crudo o total el cual va a tener la mayor cantidad de principios activos, pigmentos vegetales y metabolitos primarios. ⁽⁵⁴⁾

Dentro de los procedimientos de extracción tenemos:

- Maceración
- Percolación
- Digestión
- Soxhlet
- Fluidos Supercríticos

Los aceites esenciales de las plantas poseen un alto valor agregado; sin embargo, constituyen una mezcla compleja de sustancias, muchas de ellas fácilmente termosensibles. El Fraccionamiento convencional de aceites esenciales en destiladores al vacío pueden conducir a la descomposición de estos componentes termolábiles y el calentamiento prolongado en contacto con el agua puede conducir a la hidrólisis de ésteres, la polimerización de aldehídos o descomposición de otros compuestos.

La calidad del extracto de la planta está muy influenciada por la metodología de extracción utilizada. ⁽²⁸⁾

1.2.1. EXTRACCIÓN POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

1.2.1.1. DEFINICIÓN

Fluido supercrítico se define como el estado de un compuesto, mezcla o elemento por encima de su presión crítica (P_c) y temperatura crítica (T_c); pero por debajo de la presión requerida para que se solidifique. ⁽²¹⁾

1.2.1.2. ESTADO SUPERCRÍTICO DE LOS FLUIDOS

Una sustancia entra a la fase de fluido supercrítico cuando supera los valores de las variables de su punto crítico, P_c . La figura 8 representa las

regiones de una sustancia pura en función de la temperatura y la presión. Estas zonas están separadas por las líneas de coexistencia de dos fases sólido-gas, sólido-líquido y líquido-gas, correspondientes a los equilibrios de sublimación, fusión y vaporización, respectivamente. Las líneas se cortan en el punto triple (PT) en el cual coexisten las tres fases en equilibrio. ⁽⁷⁾

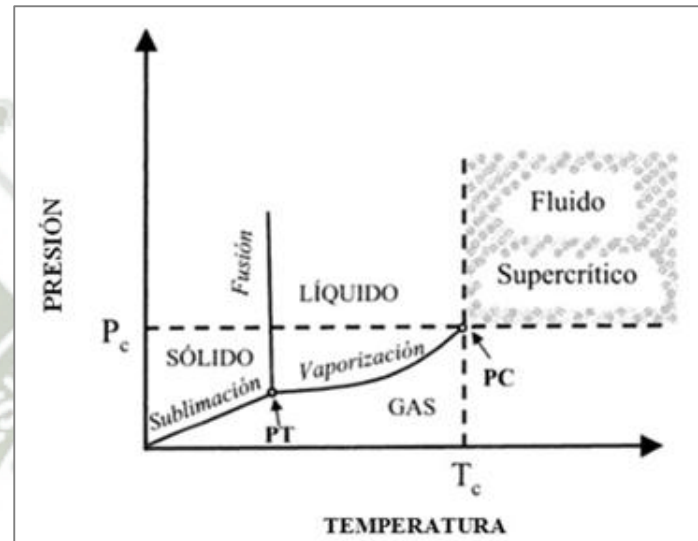


Fig. 8 Diagrama de fases de una sustancia pura

Fuente: De Lucas, A. (2004) *Termotecnia Básica para Ingenieros Químicos*.

Asimismo, un punto crítico (PC) marca el final de una curva, que representa el lugar de los puntos de coexistencia de la fase líquida y la fase gaseosa, que tienen diferencias cuantitativas en las densidades y propiedades asociadas. Así, cuando las densidades son iguales, las dos fases convergen en una fase sin cambio en la simetría local. ⁽²⁵⁾

1.2.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Las características generales de los fluidos supercríticos se enumeran en el esquema de la figura 9. En primer lugar la densidad de un fluido supercrítico depende ampliamente de la presión y la temperatura a la que se encuentre el fluido, pero en cualquier caso su valor está próximo a los valores típicos de los líquidos. Esta es la causa de sus buenas propiedades disolventes, ya que las interacciones entre las moléculas del fluido y las del soluto son fuertes.

Los valores de viscosidad en la región supercrítica están entre los que presentan los estados líquido y gaseoso, lo que les proporciona unas características hidrodinámicas más favorables si se comparan con los líquidos. Por otra parte, la bajísima tensión superficial permite una alta penetrabilidad de los mismos a través de sólidos porosos y lechos empacados.

En fluidos supercríticos los solutos tienen valores de coeficientes de difusión intermedios entre los que presentan en líquidos y gases. Debido a que los coeficientes de difusión en fluidos supercríticos son mayores que en líquidos, la transferencia de masa en un fluido supercrítico es más favorable. ⁽²⁵⁾



Fig. 9 Panorámica general de las características más sobresalientes de los fluidos supercríticos.

Fuente: Luque de Castro, M. (1993) *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*

1.2.1.4. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL DISOLVENTE

La presión y la temperatura son variables que ejercen control para varias propiedades básicas de un fluido en estado supercrítico: densidad, difusividad, viscosidad y constante dieléctrica. ⁽⁴⁷⁾

1.2.1.4.1. DENSIDAD

La densidad de un fluido supercrítico aumenta cuando la presión se eleva a temperatura constante. Cuando la presión es constante, la densidad del material disminuye al aumentar la temperatura. El efecto

disolvente de un fluido supercrítico es dependiente de su valor de densidad. Además, los fluidos supercríticos son mejores disolventes que los gases, gracias a su mayor densidad. Por lo tanto, la densidad es un parámetro esencial para las operaciones de separación que operan en condiciones supercríticas: extracción, cristalización, cromatografía, entre otras. ^(3,25)

1.2.1.4.2. DIFUSIVIDAD

La difusividad es paralela con la temperatura y contraria con la presión. La difusividad aumenta con la temperatura. El aumento de la presión afecta a las moléculas de un fluido supercrítico en un mayor acercamiento entre ellas y disminuye la difusividad en el material. La mayor difusividad da a un fluido supercrítico la oportunidad de ser un disolvente más rápido para aplicaciones analíticas. Por lo tanto, los fluidos supercríticos juegan un papel importante para las operaciones de cromatografía y extracción. ^(3,25)

1.2.1.4.3. VISCOSIDAD

La viscosidad de un fluido supercrítico depende de la temperatura, pero la presión es también una variable muy importante. Al aumentar la presión aumenta la viscosidad del fluido supercrítico, lo que comporta una disminución de la difusividad de los solutos en él mismo y una disminución de los fenómenos de transporte, aunque también aumenta en la mayoría de los casos la solubilidad como consecuencia de un aumento de la densidad. ^(3,25)

1.2.1.4.4. CONSTANTE DIELECTRICA

Constituye una medida de la polaridad de un fluido y es muy importante para predecir la solubilidad de un material en un determinado fluido supercrítico. La constante dieléctrica aumenta con la presión de forma similar como lo hace la densidad. ⁽²⁵⁾

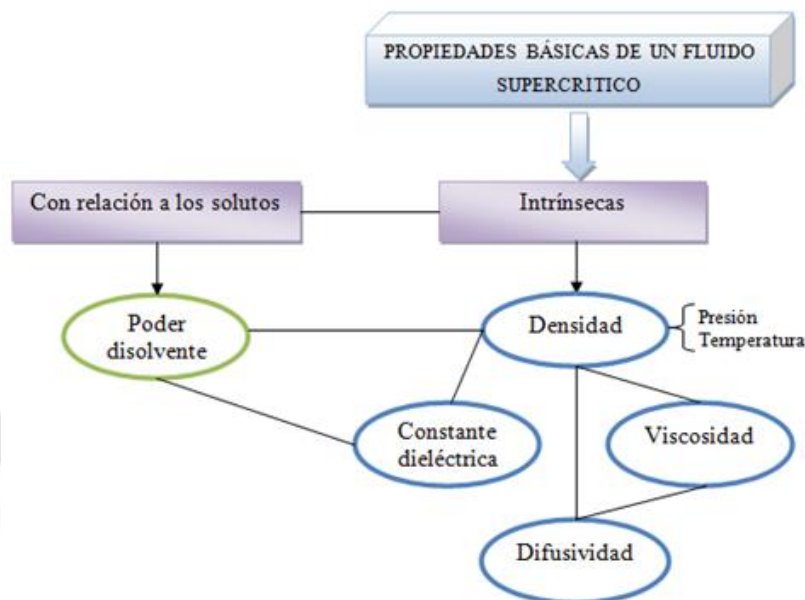


Fig. 10 Relaciones entre las propiedades básicas de un fluido supercrítico

Fuente: Modificado de Luque de Castro, M. (1993) *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*

La tabla 1 presenta valores aproximados de las propiedades de densidad, viscosidad y difusividad en los distintos estados. (Gaseoso, Supercrítico, Líquido)

Tabla 1 Comparación de las propiedades fisicoquímicas del CO₂ supercrítico con la de los gases y líquidos ordinarios.

		Densidad (g/cm ³)	Viscosidad (g/cm·s)	Coefficiente de difusión (cm ² /s)
Gases		(0.1 - 2) 10 ⁻³	(1 - 3) 10 ⁻⁴	0.1 - 0.4
CO ₂ supercrítico	T _c , P _c	0.47	3x10 ⁻⁴	7x10 ⁻⁴
	T _c , 6P _c	1.0	1x10 ⁻³	2x10 ⁻⁴
Líquidos		0.6 - 1.6	(0.2 - 3) 10 ⁻²	(0.2 - 2) 10 ⁻⁵

Fuente: Shen, Z. (1998). *The Use of Dense Carbon Dioxide Extraction and Fractionation to Recover and Refine Natural Food Ingredients From Food Processing Wastes.*

Los fluidos supercríticos poseen propiedades de transferencia de materia similares a las de los gases y características de solvatación semejantes a las de los líquidos. Sus densidades similares a las de los líquidos, los hacen capaces de disolver solutos de una matriz sólida. Son compresibles y pequeños cambios de presión pueden originar importantes cambios de densidad y poder disolvente. ^(3, 25,49)

1.2.1.5. PROPIEDADES TERMODINAMICAS DE LA EXTRACCIÓN

1.2.1.5.1. POLARIDAD

La compatibilidad entre el disolvente y el soluto se basa en la evaluación de la polaridad de la estructura molecular para predecir su solubilidad y miscibilidad. Como regla general, se supone que los solutos no polares se disuelven por disolventes no polares, mientras que los solutos polares se disuelven por disolventes polares. Si el componente deseado de la matriz es libremente disponible y, la polaridad del disolvente y del soluto es compatible; el disolvente disolverá el soluto para formar una solución homogénea. ⁽⁴²⁾

1.2.1.5.2. SOLUBILIDAD

La solubilidad es de gran importancia en el proceso de extracción, porque determina la cantidad máxima de soluto que puede ser solubilizado a condiciones operativas supercríticas (presión y temperatura). Entonces, cuanto mayor es la solubilidad del soluto, será mayor la cantidad de producto extraído. La solubilidad de un compuesto es dependiente de la densidad del disolvente supercrítico, así como de la afinidad física y química del soluto con el disolvente. Muchos solutos orgánicos pueden aumentar su solubilidad mediante la adición de co-disolventes. ^(20, 33)

1.2.1.5.3. SELECTIVIDAD

La selectividad del disolvente para ciertos componentes de una mezcla, se puede controlar mediante el ajuste de la presión y la temperatura del proceso dentro de la región supercrítica. El bajo poder de solvatación significa una alta selectividad; mientras que el alto poder de

solvatación significa una baja selectividad. Este parámetro es importante sobre todo para la extracción de aceites esenciales. ⁽⁴⁷⁾

1.2.1.6. EXTRACCION SUPERCRITICA

La extracción con fluidos supercríticos es una operación unitaria de transferencia de masa, que explota las propiedades del disolvente en la región por encima de su punto crítico (presión crítica y temperatura crítica) para separar los componentes de una muestra dada. ^(19, 49)

1.2.1.6.1. TIPOS DE EXTRACCION

Existen dos tipos de extracción supercrítica según la matriz que se utiliza: discontinuo y continuo, se describen a continuación. ⁽¹¹⁾

▪ EXTRACCION DISCONTINUA

Se aplica a procesos de extracción sólido-fluido; por ejemplo: en el descafeinado del café y en la extracción de aromas y sabores de especias de hierbas aromáticas y lúpulos. La desventaja de este tipo de extracción es que se requiere compresión y descompresión continua por la carga con batch.

▪ EXTRACCION CONTINUA

Se aplica en procesos de extracción líquido- fluido; por ejemplo: en el desalcoholizado de bebidas alcohólicas, en el fraccionamiento de la grasa láctea y en la extracción del colesterol de lácteos.

1.2.1.6.2. MODOS DE EXTRACCION

Un sistema de extracción con fluidos supercríticos puede actuar de tres modos diferentes: estático, dinámico o combinado. ⁽⁴⁵⁾

▪ ESTATICO

La celda de extracción es presurizada con el fluido supercrítico manteniendo cerrada la válvula de restricción. Una vez finalizada esta operación, dicha válvula es abierta, pasando el fluido con el extracto al sistema de colección.

- **DINAMICO**

Se deja fluir de forma continua el fluido supercrítico a través de la celda de extracción, manteniendo abierta la válvula de restricción del extractor durante todo el período de extracción.

- **COMBINADO**

La extracción estática se realiza por un corto período de tiempo, seguida de la extracción dinámica.

1.2.1.6.3. EQUIPO DE EXTRACCION

La mayor parte de extracciones con fluidos supercríticos a escala industrial y de laboratorio son procesos por batch. La industria Supercritical Fluid Technologies (2007) en el manual de información para el usuario SFT-100 Supercritical fluid extractor; menciona los siguientes componentes básicos resaltados en la figura 11.

- **Tanque o cilindro.-** Almacena el dióxido de carbono líquido. Posee una bomba de jeringa o de pistón que eleva la presión para liberar el fluido cuando sea necesario.
- **Bomba.-** Presenta las siguientes partes importantes:
 - Condensador, enfría y condensa el dióxido de carbono líquido al ingresar a la bomba.
 - Compresor, presuriza el dióxido de carbono líquido por encima de la presión crítica.
- **Extractor o cámara de mezcla.-** Presenta las siguientes partes importantes:
 - Intercambiador de calor, lleva la temperatura al nivel deseado (por encima de la temperatura crítica) antes de la introducción del fluido dentro de la celda de extracción.
 - Celda de extracción o extractor, donde un batch de materia prima se tratará con el disolvente supercrítico.
 - Válvula restrictor o descompresor, reduce la presión para que el soluto pueda precipitarse por un tubo metálico desde la celda de

extracción, sin despresurizar todo el sistema, y el dióxido de carbono pueda convertirse en gas.

- Recipiente de separación o colector.- Sirve para separar el extracto obtenido en soluto extraído y dióxido de carbono gaseoso.



Fig. 5 Partes de un equipo de extracción con fluido supercrítico sin recirculación del disolvente

Fuente: Elaboración Propia

1.2.1.6.4. SELECCIÓN DEL DISOLVENTE

En la selección de un posible disolvente supercrítico para una aplicación concreta, se debe tener en cuenta las siguientes propiedades ideales: elevada y selectiva capacidad disolvente, no ser tóxico ni inflamable ni contaminante, constantes críticas moderadas, químicamente inerte y de bajo costo. ⁽¹⁰⁾

En el anexo 3, se observan los valores críticos de la temperatura, presión y densidad de disolventes industriales utilizados para la extracción supercrítica.

La estabilidad térmica del compuesto extraído a una temperatura necesaria para operar, es uno de los factores que determina la elección del futuro disolvente, siendo preferibles bajas temperaturas críticas.

La adición de un modificador o coodisolvente puede dar lugar a una mayor eficiencia de la extracción supercrítica; por lo general, se utiliza una bomba externa que adiciona el coodisolvente de manera continua durante la extracción. Cuando se añade un coodisolvente en pequeñas cantidades (1-5%) no se modifican significativamente las propiedades críticas o la densidad del disolvente supercrítico. La adición del coodisolvente aumenta la selectividad, mientras se mantiene la solubilidad sensible a pequeños cambios de temperatura y presión. ⁽⁴⁹⁾

1.2.1.7. VENTAJAS ⁽⁴⁸⁾

- La extracción con fluidos supercríticos es rápida. La velocidad de transporte de masa entre la matriz de una muestra y un fluido de extracción, se determina mediante la velocidad de difusión de la especie en el fluido y por la viscosidad de éste; cuanto mayor sea la velocidad de difusión y menor la viscosidad, tanto mayor es la velocidad de transferencia de masa. Por lo tanto, la extracción con fluidos supercríticos se completa generalmente entre 10-60 minutos, mientras que las extracciones con líquido orgánico necesitarían varias horas e incluso días.
- El poder disolvente de un fluido supercrítico puede modificarse cambiando la presión y, con menor alcance, la temperatura. Por el contrario, el poder disolvente de un líquido orgánico es en esencia constante e independiente de las condiciones. Esta propiedad permite que las condiciones para la extracción con fluidos supercríticos puedan ser mejoradas para una clase de analitos dada.
- Muchos de los fluidos supercríticos son gases a temperatura ambiente. Por consiguiente, la recuperación de los analitos es sencilla en comparación con la de los líquidos orgánicos que deben vaporizarse por calentamiento, lo que lleva a una posible descomposición en el caso de analitos térmicamente inestables, o bien, a pérdidas en el caso de analitos volátiles. En cambio, un

fluidos supercrítico puede separarse del analito simplemente al disminuir la presión.

- Algunos fluidos supercríticos son baratos, inertes y no tóxicos. Por tanto, se les puede eliminar con facilidad una vez que se ha finalizado la extracción, dejando que se evaporen a la presión atmosférica.

1.2.2. DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRITICO

1.2.2.1. DEFINICION

El dióxido de carbono es un gas incoloro a temperatura ambiente, con débil olor pungente, sabor ácido y muy abundante en forma pura. Es más pesado que el aire y poco soluble en agua. Tiene bajo coste en comparación con los disolventes orgánicos y es reciclable. No es inflamable ni corrosivo; tiene baja toxicidad con un mínimo valor límite de 5 000 ppm, aunque requiere precauciones de seguridad específicas y; es químicamente inerte a la oxidación y a los radicales libres. ^(13,37)

1.2.2.2. PROPIEDADES COMO DISOLVENTE SUPERCRITICO

El gas que por sus características es más adecuado para la extracción supercrítica de productos vegetales, es el dióxido de carbono. Por su temperatura crítica 31.1 °C, es apto para la extracción a bajas temperaturas. Su presión crítica 73.8 bar, permite que alcance las propiedades supercríticas a costes energéticos moderados y con instalaciones asequibles. En condiciones del punto crítico su densidad es relativamente alta 0.468 g/cm³, por tanto, lo es su poder disolvente. Además, presenta ventajosas propiedades de transporte como las un gas, así como menor viscosidad y mayor difusividad que los disolventes líquidos. ^(3, 13)

El dióxido de carbono en estado supercrítico, tiene un alto poder disolvente de sustancias no polares o ligeramente polares y de bajo peso molecular; muchas de estas sustancias son precisamente responsables de los aromas y sabores de las plantas. Cuando recupera la presión atmosférica, no tiene propiedades disolventes, sino que se separa del material extraído sin dejar residuo y se consigue un extracto con un elevado grado de pureza. ⁽³⁷⁾

1.2.2.3. VENTAJAS ⁽⁵⁵⁾

- Posee alto coeficiente de difusión y más baja viscosidad que los líquidos.
- Ausencia de tensión superficial, la cual aumenta la operación de extracción por la rápida penetración del dióxido de carbono supercrítico al interior de los poros de la matriz heterogénea
- Selectividad durante la extracción, que puede ser manipulada por la variación de las diferentes condiciones de operación (principalmente temperatura y presión) afectando la solubilidad de varios componentes.
- No deja residuos químicos a temperatura ambiente. El soluto resulta inalterable y no tiene el riesgo de ser tóxico;
- Tratamientos no agresivos de materiales termosensibles que permiten la extracción de sustancias volátiles.
- Facilidad de recuperación del disolvente por procesos de reciclaje.
- Coste bajo de separación, debido a que sólo es necesario reducir levemente la presión.

1.2.3. MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET

1.2.3.1. FUNDAMENTO

Es un método de extracción equivalente a una digestión y a una percolación, es un sistema cerrado que permite el reflujo del solvente en ciclos. Los equipos de Soxhlet constan de tres partes: un reservorio de solvente en la parte inferior, el cual es un balón, donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición. La segunda parte es un soporte para el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro. Finalmente se tiene un refrigerante o condensador el cual recibe los vapores del solvente que vienen desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente sobre el material vegetal.

Para la extracción con Soxhlet se debe tener en cuenta: la selección del solvente, características de la matriz, condiciones de operación; que veremos a continuación. ^(28, 55)

1.2.3.2. SELECCIÓN DEL SOLVENTE

Debe seleccionarse un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables: alto límite de saturación y

selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo. ⁽⁵⁵⁾

1.2.3.3. CARACTERÍSTICAS DE LA MATRIZ

La extracción con Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz y de las dimensiones de las partículas puesto que la difusión interna puede ser el paso limitante durante la extracción. ⁽⁵⁵⁾

1.2.3.4. CONDICIONES DE OPERACIÓN

Durante la extracción con Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos

Debe seleccionarse un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables: alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer, capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente, estabilidad química en las condiciones del proceso, baja viscosidad, baja presión de vapor, baja toxicidad e inflamabilidad, baja densidad, baja tensión superficial, facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y bajo costo. ⁽⁵⁵⁾

1.2.3.5. DESVENTAJAS

La extracción con disolventes tiene como principales inconvenientes el hecho de que los solventes clásicos son generalmente poco selectivos y su eliminación aumentan los costos energéticos y los riesgos de pérdida de compuestos volátiles.

A pesar de ser ampliamente utilizado en la extracción de compuestos orgánicos, el tiempo de extracción suele ser muy prolongado que van desde 1 a 72 horas, pueden considerarse como una limitación. Además, los disolventes son generalmente tóxicos y dejan residuos en el extracto obtenido, lo que dificulta su aplicación en productos farmacéuticos y alimentos. En este proceso,

el disolvente extrae el material orgánico retenido en la muestra, a la temperatura de ebullición del disolvente, que en algunos casos puede causar cambios químicos en los componentes extraídos. El proceso de extracción no es selectivo y, básicamente, la temperatura de extracción y la naturaleza del disolvente determinan el poder de disolución. ^(28, 55)



Fig. 12 Equipo De Extracción por Soxhlet

Fuente: Elaboración Propia

1.3. DESCRIPCIÓN DE MICROORGANISMOS EN ESTUDIO

1.3.1. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

1.3.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Son bacterias muy resistentes al calor y a la desecación que pueden crecer en medios con elevada salinidad (7.5% de CLNa). Tras 24 horas de incubación *Staphylococcus aureus* crecen formando colonias lisas, elevadas brillantes y de bordes enteros. Típicamente, las colonias presentan una consistencia cremosa, con una coloración amarilla dorada; casi todas las cepas tienen un halo de β -hemólisis o hemólisis completa alrededor de la colonia, cuando crecen en medios de cultivos con sangre. (Fig. 12) Las características generales se describen mejor en la siguiente tabla. ⁽³¹⁾

Tabla 2 Características Generales De *Staphylococcus aureus*.

Orden: Bacillales
Familia: Staphylococceae
Género: Staphylococcus
<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias esféricas (cocos) • Grampositivas • Agrupación típica en racimos • Catalasa positiva • Anaerobios facultativos • Inmóviles • No esporulados • Crecimiento rápido (18 a 24 hr.) • Resistentes a condiciones ambientales adversas

Fuente: Pahissa, A. (2009) *Infecciones Producidas Por Staphylococcus aureus*.

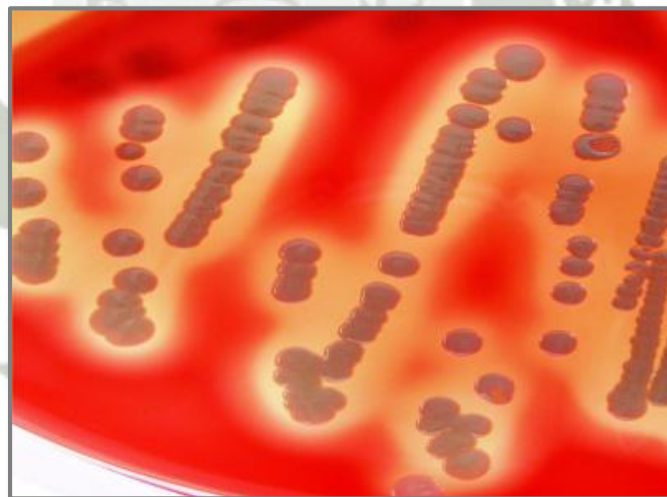


Fig. 13 Colonias pigmentadas y β -hemolíticas de *Staphylococcus aureus* en un medio de agar sangre.

Fuente: Pahissa, A. (2009) *Infecciones Producidas Por Staphylococcus aureus*.

1.3.1.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO

Staphylococcus aureus crece bien en medios de cultivo no selectivos, como agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro-corazón.

En el cultivo de muestras clínicas donde pueden encontrarse bacterias gramnegativas junto con *Staphylococcus aureus*, debe incluirse un medio selectivo. ^(31, 16, 53)

El medio selectivo más empleado para aislar *Staphylococcus aureus* es el medio agar manitol salado (medio de Chapman), que por su elevado contenido en sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias gramnegativas. Además, este medio permite realizar una identificación presuntiva basándose en la coloración amarilla característica que adquieren las colonias ⁽³¹⁾

1.3.1.3. IDENTIFICACIÓN

La identificación puede realizarse mediante unas pocas pruebas bioquímicas convencionales. Inicialmente la detección de catalasa permite diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los géneros *Streptococcus* y *enterococcus* (catalasa negativos). ^(31, 53)

Tabla 3 Características bioquímicas que permiten diferenciar *S.aureus* de las principales especies patógenas de estafilococos coagulasa negativas.

PROPIEDAD	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. saprophyticus</i>
Colonias pigmentadas	+	-	-
Producción de coagulasa	+	-	-
Proteína A	+	-	-
Producción de ADNsa	+	-/v*	-
Fermentación de manitol	+	-/v*	-
Sensibilidad a Novobiocina	-	-	+

*v= variable. Raras cepas de *S.epidermidis* presentan una débil actividad ADNsa y pueden fermentar manitol

Fuente: Pahissa, A. (2009) *Infecciones Producidas Por Staphylococcus aureus*.

1.3.1.4. TRATAMIENTO

Las cepas de *Staphylococcus aureus* no productoras de β -lactamasas son sensibles a la penicilina G y a otros compuestos β -lactámicos. Las cepas resistentes a las penicilinas G, productoras de β -lactamasas son sensibles a penicilinas β -lactamasa-resistentes, cefalosporinas y vancomicina.

Un problema muy importante, a nivel clínico y epidemiológico, lo constituyen las cepas resistentes a la meticilina (MRSA), cuya resistencia a compuestos β -lactámicos no depende de la producción de β -lactamasas. La mayor parte de estas cepas son resistentes a un gran número de antibióticos pero algunas son sensibles a la vancomicina. ^(23,36)

1.3.2. *ESCHERICHIA COLI*

1.3.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Es un bacilo gramnegativo, móvil. No delicado, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, Tolera la bilis, es capaz de crecer a 44 °C. ⁽⁴⁰⁾

Es uno de los habitantes más comunes del trato intestinal humano; Su presencia en el agua o en los alimentos es una indicación de contaminación fecal. *Escherichia coli* no suele ser un microorganismo patógeno, pero puede causar infecciones urinarias y ciertas cepas segregan enterotoxinas que producen la diarrea del viajero y en ocasiones enfermedades muy graves transmitidas por los alimentos. ⁽⁴³⁾



Fig. 14 *Escherichia coli* en agar MacConkey.

Fuente: Forbes, B. (2009) *Diagnostico Microbiológico*.

Tabla 4 Características Generales De *Escherichia coli*

Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: Escherichia
Bacilo corto Gramnegativo 2 a 3 micras Una cadena de ADN Móviles Cápsula o microcápsula Fimbria Flagelos peritricos No forman esporas Resistentes a condiciones ambientales adversas

Fuente: Modificado de Forbes, B. (2009) *Diagnostico Microbiológico*.

1.3.2.2. CULTIVO Y AISLAMIENTO

La mayoría de los microorganismos de la familia enterobacteriaceae crecen bien en los medios de cultivo de laboratorio de rutina, como agar sangre de carnero al 5%, agar chocolate y agar MacConkey. Además de estos medios de cultivo suelen usarse agares selectivos como agar Hektoen entérico (HE), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD). ^(32, 40)

1.3.2.3. IDENTIFICACIÓN

Una vez aislado *Escherichia coli*, la identificación puede realizarse mediante unas pocas pruebas bioquímicas convencionales, que se observan en la tabla 6 en la página siguiente. ^(32, 40)

Tabla 5 Características bioquímicas que permiten la identificación de *Escherichia coli*.

PRUEBA	REACCION
Movilidad	+ (casi siempre)
Indol	+
Rojo de metilo	+
Voges Proskauer	-
Betagalactosidasa	+
Citrato de Simmons	-
SH2	-
Lisina	+
Urea	-
Fermentación de la glucosa	+
Fermentación de la lactosa	+

Fuente: Modificado de Romero,R. (2007) *Microbiología y Parasitología Humana*

1.3.2.4. TRATAMIENTO

El tratamiento de las gastroenteritis por *Escherichia coli* se basa en la hidratación, en cuanto a la profilaxis la doxiciclina es útil. En las infecciones urinarias bajas sin sepsis como cistitis o bacteriemia asintomática basta la administración de cotrimoxazol.

Las sulfonamidas y los antisépticos urinarios como la nitrofurantoina (100 mg cada 6 horas), el ácido nalidixico (0.5 a 1g cada 6h), o el norfloxacino que es una quinolona con cierta penetración tisular son suficientes; la duración del tratamiento convencional es de 5 días. ^(23, 36)

1.4. MÉTODOS QUE MIDEN EN FORMA DIRECTA LA ACTIVIDAD DE LOS ANTIMICROBIANOS

Los métodos que miden en forma directa la actividad de los antimicrobianos requieren que los agentes antimicrobianos en estudio y la bacteria infectante se coloquen en el mismo medio in vitro para determinar el impacto de la presencia del agente antimicrobiano sobre el crecimiento o la viabilidad bacterianos.

Se mide y se interpreta el nivel de impacto sobre el crecimiento bacteriano de modo que pueda informarse al médico la resistencia o la disminución de la sensibilidad del microorganismo a cada agente. Las mediciones directas de la actividad antimicrobiana se realizan con: ⁽¹⁶⁾

- Métodos de prueba de sensibilidad convencionales, como dilución en caldo, dilución en agar y difusión con discos.
- Sistemas comerciales de pruebas de sensibilidad
- Pruebas especiales para cribado (screening) e indicadoras

1.4.1. MÉTODOS DE PRUEBA CONVENCIONALES: DILUCIÓN EN CALDO

La prueba por dilución en caldo consiste en exponer el microorganismo de interés a agentes antimicrobianos en un medio líquido (caldo de cultivo). Cada agente antimicrobiano se prueba en un rango de concentraciones que suele expresarse en μg de fármaco activo/ml de caldo ($\mu\text{g}/\text{ml}$).

El rango de concentraciones probado para cada fármaco depende de varios criterios, entre los que figura la concentración que es alcanzable con seguridad en el suero del paciente. Por consiguiente, el rango de concentraciones probado por lo general variará de un fármaco a otro en función de las propiedades farmacológicas de cada uno. La concentración de prueba para un fármaco puede variar según el microorganismo y las resistencias asociadas que se intenta detectar con la prueba. Por ejemplo, para detectar resistencia clínicamente importante a la cefotaxima en *S.pneumoniae* el esquema de diluciones sólo necesita alcanzar los $2\mu\text{g}/\text{ml}$ pero para detectar la resistencia a la cefotaxima de *Escherichia coli* el esquema debe alcanzar los $16\mu\text{g}/\text{ml}$ o más. ⁽¹⁶⁾

El rango típico de concentraciones probado para cada antibiótico es una serie de diluciones al $\frac{1}{2}$ (p.ej., 16,8,4,2,1,0.5,0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), la menor concentración de antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento bacteriano observable, detectada visualmente o a través de un método automatizado o semiautomatizado, se registra como concentración inhibitoria mínima (CIM). ⁽¹⁶⁾

Las pruebas por dilución en caldo se dividen en dos categorías: microdilución y macrodilución. Los principios de las pruebas son iguales; la única diferencia es el volumen de caldo en el que se realiza la prueba. Para la prueba de

microdilución el volumen total del caldo es de 0.05 a 0.1 ml. Y para la prueba de macrodilución los volúmenes habituales de caldo son de 1 ml, o más. Como la mayoría de las baterías para las pruebas de sensibilidad requieren de la evaluación de diversos antibióticos a varias concentraciones diferentes, el menor volumen usado con la microdilución permite realizar la prueba de manera práctica en una sola placa de microtitulación. ⁽¹⁶⁾

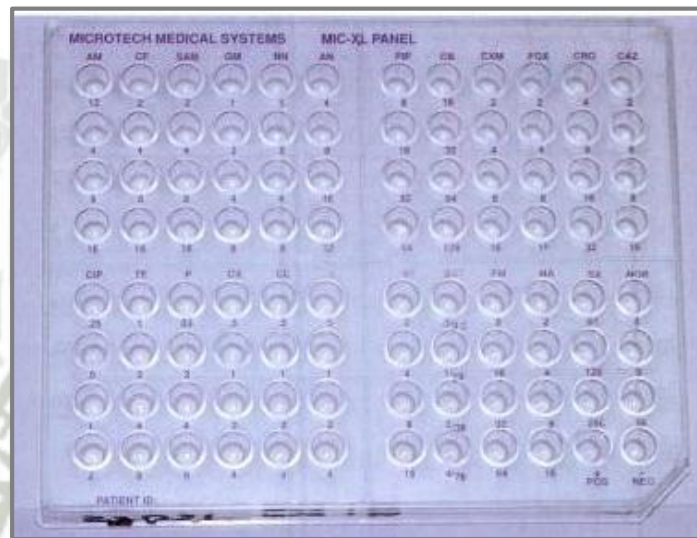


Fig. 14 Placa de microtitulación para la prueba de microdilución en caldo.

Fuente: Forbes, B. (2009) *Diagnostico Microbiológico*.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. CAMPO DE INVESTIGACIÓN

2.1.1. UNIDADES DE ESTUDIO

Para realizar el presente trabajo de investigación se utilizó como muestra, oleorresinas de rizomas de *Zingiber officinale roscoe* “Jengibre”; obtenidas por dos métodos de extracción: Fluidos supercríticos y Soxhlet.

Además se utilizaron cepas ATCC y cepas aisladas de laboratorios¹, de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; dos por cada una de las especies.

Los certificados de las bacterias ATCC para este trabajo, se presentan en el anexo 4.

2.1.2. ÁMBITO GEOGRÁFICO Y TEMPORALIDAD

La parte experimental del presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del pabellón H (primer piso) y el laboratorio de análisis clínicos de las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, de la ciudad de Arequipa – Perú, durante los meses de Setiembre 2013 – julio 2014

2.2. MATERIALES

2.2.1. MATERIALES DE LABORATORIO

2.2.1.1. EQUIPOS Y APARATOS

- Analizador de humedad electrónico, modelo MA45, Sartorius Group (Alemania).
- Autoclave (P Selecta).
- Balanza analítica electrónica, modelo PA214, Ohaus (EE.UU.).
- Balanza analítica (Modelo A-160 Denver Instrument Company).
- Baño María (Cimatec).
- Cocina eléctrica
- Estufa (P Selecta).

¹ Hospital Regional Honorio Delgado Espinoza y Universidad Católica de Santa María

- Extractor de fluidos supercríticos, modelo SFT-100, fabricante Supercritical Fluid Technologies, Inc., (EE.UU.).
- Lámpara de luz UV (Mineralight Lamp Multiband UV 254-366 nm)
- Refrigerador (Philips).

2.2.1.2. MATERIAL DE VIDRIO

- Baguetas.
- Cubetas cromatográficas
- Embudo de vidrio
- Extractor Soxhlet
- Frascos de color ámbar 10ml, 30ml, 100ml
- Laminas Cubre y portaobjetos
- Matraz Erlenmeyer de 100ml y 250ml.
- Pipetas de 0,1ml, 1ml, 2ml, 5ml, 10ml.
- Pipetas Pasteur
- Probetas de 20ml, 50ml y 100ml.
- Placas petri 15x60mm y 15x100 mm.
- Tubos de ensayo de 13x100mm.
- Tubos de ensayo con tapa rosca de 25mm por 150mm
- Vasos de precipitado 50ml ,100ml y 250ml.

2.2.1.3. MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mac Conkey
- Agar Manitol Salado
- Agar Mueller Hilton
- Caldo Peptonado
- Caldo MRVP
- Citrato de Simons
- LIA
- SIM
- TSI
- Urea

2.2.2. REACTIVOS

- Acetato de etilo químicamente puro Merck
- Ácido sulfúrico concentrado 95-98% Merck
- Agua destilada
- Cloruro férrico
- Etanol Absoluto 99,7° G.R. (PuriqumReagent)
- Éter etílico
- Ferrocianuro de potasio
- Hexano químicamente puro Merck
- Tolueno químicamente puro Merck
- Vainillina

2.2.3. INSUMOS

- Dióxido de carbono

El gas licuado de 97% de pureza fue fabricado por la industria Praxair Perú S.R.L., y adquirido en su sucursal de Arequipa.

2.2.4. MATERIAL ANEXO

- Algodón
- Asa de Kolle
- Botella ámbar, tapa esmerilada con capacidad mayor a 200mL.
- Capilares
- Frascos atomizadores
- Mechero bunsen
- Micropipetas de rango variable de 10-100 μ L y 100-1000 μ L, fabricante Brand (Alemania).
- Microplacas
- Papel filtroN°4
- Papel Kraft
- Pinzas
- Rollo de papel aluminio
- Soporte de microplacas

2.3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.3.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA PLANTA

2.3.1.1. RECOLECCIÓN

El material vegetal fueron rizomas del *Zingiber officinale Roscoe* “Jengibre” procedente del centro-norte del país; fue recolectada en el mes de Agosto del 2013 en el centro de abastos “Mi Mercado”, en el distrito de José Luis Bustamante y Rivero, en la ciudad de Arequipa.

2.3.1.2. SELECCIÓN Y LAVADO

La selección es minuciosa, para poder separar los rizomas que se encuentren en mal estado o dañados; después se procede a limpiarlos con una escobilla de uñas para eliminar posibles residuos de tierra y/o raíces; el lavado se realiza mediante un flujo continuo de agua potable, uno por uno, luego se deja escurrir y se deja orear bajo sombra para eliminar el exceso de humedad.

2.3.1.3. DESECACIÓN Y ESTABILIZACIÓN

Una vez hecha la selección y el lavado de los rizomas; se procede a fraccionarlos en rodajas para lograr un mejor secado. La desecación se hizo en estufa, las rodajas de rizoma de “jengibre” se acomodaron sobre un papel Kraft, simulando una capa, en la estufa a 40° C por un lapso de tiempo de 20 horas.

La estabilización se realizó con una alíquota de la muestra de rizomas en desecación y teniendo en cuenta el % de humedad que se obtuvo, se aplicó un tratamiento térmico de 80°C por 2h.

2.3.1.4. PULVERIZACIÓN

Los rizomas secos se pulverizaron con ayuda de un mortero y una licuadora para la obtención de partículas uniformes.

2.3.1.5. ALMACENAMIENTO

Los rizomas pulverizados y estabilizados, se almacenaron dentro de un frasco ámbar de vidrio y se conservaron a una temperatura de 5° C.

2.4. DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

2.4.1. ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

Para este análisis se toma en cuenta los siguientes caracteres:

- Olor
- Color
- Sabor
- Textura

2.4.2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO

Finalizada la operación de estabilización, se procedió a realizar el análisis proximal de una muestra de polvo de jengibre mediante el empleo de métodos descritos por la AOAC (2005) en el laboratorio de control de calidad de la UCSM.

En este análisis se determinó los siguientes caracteres:

- determinación de la humedad residual
- determinación de grasas
- determinación de cenizas
- determinación de proteínas

2.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

2.5.1. EXTRACCIÓN CON DIOXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

2.5.1.1. FUNDAMENTO

Cuando un gas licuado está contenido en un recipiente y es presurizado y calentado sobre su temperatura crítica, sus propiedades físicas cambian bajo estas condiciones el fluido supercrítico posee dos propiedades fundamentales:

- El poder de solvatación de un líquido
- La difusividad de un gas

Debido a estas características únicas, los fluidos supercríticos son utilizados como un medio de extracción para una amplia variedad de aplicaciones químicas y biológicas.

2.5.1.2. PROCEDIMIENTO

Se cargó la celda de extracción con 40g de material vegetal seco y pulverizado, para cada batch y se cubrió ambos extremos de la celda con dos pequeños trozos de algodón, uno para cada extremo. La bomba de pistón dual se programó a 179, 207, 250bar según las condiciones de extracción para cada batch, y a 0.13mL/s como flujo constante del fluido disolvente. En el equipo de extracción se programó la cabina del horno a 40, 50 y 60 °C según las condiciones de extracción para cada batch.

La operación de extracción se realizó en modo combinado. Primero, se llevó a cabo la extracción estática durante 20 min, seguida de la extracción dinámica durante 10min.

El dióxido de carbono líquido, contenido en el tanque, es extraído por el tubo de inmersión hacia la bomba de pistón dual donde se enfría y se presuriza a una presión determinada (mayor a la presión crítica), según el diseño experimental. El dióxido de carbono presurizado, pasa a través de un calentador para ajustarlo a una temperatura determinada (mayor a la temperatura crítica), según el diseño experimental. Se deja fluir el dióxido de carbono supercrítico en contra corriente hacia la celda de extracción de 100mL de volumen, montada verticalmente en el equipo dentro de una cabina que mantiene la temperatura de extracción.

El extracto compuesto por el dióxido de carbono supercrítico y el aceite extraíble, salen de la celda de extracción y pasan por una válvula restrictor que descomprime el fluido disolvente. Luego, el extracto fluye hacia un recipiente de separación que colecta el aceite extraído y desecha el dióxido de carbono gaseoso.

El procedimiento detallado para el manejo de los equipos involucrados, se describe en el anexo 6.

2.5.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE EXTRACCIÓN

La obtención de la curva de extracción del aceite de jengibre, consistió en la determinación de la masa de aceite acumulado en función del tiempo de extracción.

Los valores para graficar la curva, se obtuvieron al pesar cada 10 min el recipiente colector con la oleorresina acumulada ,restándole esta cantidad al peso del mismo recipiente colector previamente pesado en una balanza analítica. La colecta de la oleorresina extraíble fue realizada hasta las 3h, solamente en el modo dinámico de extracción. En el anexo 9 se muestra el modelo del reporte de datos utilizado en esta investigación, para la extracción con fluidos supercríticos.

2.5.1.4. ALMACENAMIENTO DE LA OLEORRESINA DE JENGIBRE

Se recolectó el extracto obtenido, en un frasco pequeño de 30 ml, color ámbar de vidrio.

EL frasco de vidrio ámbar conteniendo la oleorresina de jengibre se almacenó a una temperatura de 4-6°C.durante el todo el tiempo en el que se realizó la investigación.

2.5.2. MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET

2.5.2.1. FUNDAMENTO

La extracción solido-liquido, se usa a menudo para extraer un producto natural a partir de su fuente natural, tal como una planta. Se escoge un solvente que selectivamente disuelva el compuesto deseado pero que deje los sólidos insolubles indeseados en la fuente natural se utiliza el extractor Soxhlet para tal fin.

2.5.2.2. PROCEDIMIENTO

Se procedió a pesar 15 g de materia prima, la cual se empaqueto en hoja de papel filtro a un tamaño adecuado para que se pueda introducir en el equipo extractor, El solvente utilizado fue hexano 60 mL, que se coloca en el balón de destilación de fondo redondo y se calienta hasta reflujo. Los vapores suben hacia el condensador donde se condensan. El líquido condensado cae dentro del paquete hecho de papel filtro que contiene la materia vegetal (jengibre).

El solvente (hexano) caliente empieza a llenar el paquete de papel filtro y extrae el aceite a partir del material vegetal (jengibre). Una vez el paquete de papel filtro se llena con el solvente, el otro brazo actúa como un sifón, y el solvente (hexano), el cual contiene el aceite, se regresa dentro del balón de destilación.

El ciclo vaporización-condensación-extracción-evacuación por el sifón, se repite varias veces, hasta el agotamiento de la muestra y por último se debe evaporar a baño maría el solvente (hexano) para concentrar el aceite que se encuentra en el balón de destilación

2.5.2.3. ALMACENAMIENTO DE LA OLEORRESINA DE JENGIBRE

La oleorresina de jengibre obtenida se almacena en un frasco pequeño de 30 ml. color ámbar.

La botella conteniendo el aceite de jengibre se almacenó a una temperatura de 4-6 °C durante el todo el tiempo en el que se realizó la investigación.

2.6. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LAS EXTRACCIONES

2.6.1. MÉTODO

Gravimétrico

2.6.2. FUNDAMENTO

El porcentaje de rendimiento de extracción (%RE) o el porcentaje de sólidos solubles, se fundamenta en determinar la diferencia de peso del extracto obtenido, entre el peso de la materia prima inicial por el 100%. Conforme a la siguiente ecuación:

$$\%RE = \frac{PESO\ DEL\ SOLUTO}{PESO\ DEL\ MATERIAL\ VEGETAL} \times 100$$

2.6.3. PROCEDIMIENTO

Inmediatamente concluida cada extracción por fluidos supercríticos FSC y por el método de Soxhlet, con sus respectivas condiciones de operación, se

determinó su rendimiento, porcentaje de extracción de oleorresina de jengibre, por medio de cálculos porcentuales basados en la diferencia de peso.

2.7. PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

2.7.1. FUNDAMENTO

De los muchos métodos cromatográficos actualmente disponibles, la Cromatografía en Capa Fina (CCF) ha sido ampliamente adoptada para análisis rápido y seguro de drogas y preparaciones complejas.

La mezcla de productos a separar se sitúa en la línea base, y se hace ascender por capilaridad dentro de una cámara cerrada con atmósfera saturada de vapores de la fase móvil.

Los componentes de la mezcla ascienden más o menos según su polaridad, los menos polares ascienden en primer lugar y los disolventes más polares avanzan más lentamente.

El recorrido diferencial de una sustancia en una placa de CCF, se fundamenta en su estructura química, la cual determina una mayor o menor afinidad por la fase estacionaria de la placa (cromatofolio) o por la fase móvil o solvente utilizado para el desarrollo cromatográfico.

Las coloraciones generales de las sustancias frente a reveladores químicos y la distancia recorrida por cada componente de la droga en estudio, permite ver la naturaleza de los componentes.

2.7.2. MUESTRA

Oleorresinas de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” obtenidas por el método de fluidos supercríticos FSC y de Soxhlet.

2.7.3. FASE MOVIL

Se utilizó solo una, se obtiene mezclando tolueno con acetato de etilo en la siguiente proporción (93 /7).

2.7.4. FASE ESTACIONARIA

Se utilizó silica gel 60 F₂₅₄ en placas con aluminio de Merck.

2.7.5. REACTIVOS REVELADORES

Los reveladores usados son: vainillina sulfúrica y el reactivo de Bartons. El primero está constituido por ácido sulfúrico concentrado al 10% en etanol y vainillina al 1% en etanol. El segundo está constituido por 2 g de cloruro férrico disuelto en 100 ml y 1 g de ferricianuro de potasio.

2.7.6. PROCEDIMIENTO

Se seleccionó la fase estacionaria, la fase móvil y las técnicas operativas (atmósfera de la cámara, desarrollo del cromatograma y selección de agentes reveladores).

La fase estacionaria empleada consistió en cromatofolios de sílica gel con base de aluminio. Cortadas en un tamaño de 10 x 2 cm, se trazó una línea a 1 cm del borde; al que se le aplicó la muestra a analizar, esta fue aplicada sobre la línea en banda con capilares. Luego se colocaron en una cámara que se preparó 30 minutos antes para obtener una buena saturación del medio, se utilizó 5 ml de la fase móvil, se desarrolló el cromatograma hasta que la fase móvil llegó a 1 cm del extremo superior de la placa, para luego retirarla y dejarlas secar durante 20 minutos, finalmente la placa después de seca, es rociada con 10 ml aproximadamente de los reveladores antes mencionados.

2.7.7. DETERMINACION DEL FACTOR RF

Es un número que permite identificar sustancias considerando las distancias recorridas en un cromatograma y con un método cromatográfico dado. Cada sustancia tiene un RF único y específico, por medio del que se le puede identificar.

Cálculos

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el solvente}}$$

2.8. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

2.8.1. RECOLECCIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas utilizadas en esta investigación, se obtuvieron de los laboratorios de análisis clínicos del Hospital Regional Honorio Delgado Escobedo HRHDE y del laboratorio de análisis clínicos de la universidad Católica de Santa María UCSM, a su vez las cepas ATCC se obtuvieron del laboratorio de microbiología de la planta industrial Naturgen.

2.8.2. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Para la conservación de las cepas se utilizó el Agar BHI. y diferentes medios de cultivo; Agar Mac Conkey para la replicación de *Escherichia Coli* para cepas ATCC y cepas patógenas; así mismo para la replicación de *Staphylococcus aureus* se utilizó el Agar selectivo Manitol salado para cepas ATCC y cepas patógenas.

Estos medios de cultivo tienen el fin de mantener la viabilidad de las bacterias, conservando sus características fisiológicas, morfológicas, tintoriales, etc.

En el caso de las cepas aisladas de laboratorios clínicos, además de la replicación en los medios de cultivo ya mencionados, se realizó pruebas de identificación bacteriana que se describen mejor a continuación.

2.8.3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS PATÓGENAS

2.8.3.1. IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

Una vez Obtenidas las bacterias patógenas se procedió a verificar las cepas a través de diferentes pruebas microbiológicas de identificación específicas para *Staphylococcus aureus*, como las que veremos a continuación.

A. TINCIÓN GRAM

La tinción diferencial requiere el uso de al menos 3 reactivos químicos que se aplican en secuencia a un frotis fijado por calor. El primer reactivo es llamado colorante primario. Su función es impartir color a todas las células. Con el objetivo de establecer un contraste de color, el segundo reactivo usado es un agente decolorante, el cual puede decolorar la célula completa o solo parte de ella. El reactivo final, el colorante de contraste, le da a las células decoloradas un color que contrasta con el del colorante primario. El

colorante de contraste no puede ser absorbido por células que no han perdido el colorante primario. De esta manera, tipos de células o sus estructuras se pueden distinguir unas de otras en función del colorante que es absorbido.

B. PRUEBA DE LA CATALASA

Pone de manifiesto la presencia de la enzima catalasa en una bacteria. Esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en agua y oxígeno, con la consiguiente aparición de burbujas. Esta enzima es similar a la estructura de la hemoglobina.

Procedimiento:

- Con una Asa de kolle en punta colocar en el centro de la lámina porta objeto la colonia a investigar.
- Posteriormente agregar 1 a 2 gotas de peróxido de hidrogeno.
- Suspender el organismo y observar si hay la aparición de burbujas debido al desprendimiento de oxígeno.

C. PRUEBA DE COAGULASA EN PORTAOBJETO

La coagulasa es una proteína producida por varios microorganismos que permite la conversión del fibrinógeno en fibrina. En el laboratorio, se usa para distinguir entre diferentes tipos de Staphylococcus, produce 2 formas de coagulasa (por ejemplo, coagulasa ligada y coagulasa libre). La coagulasa ligada también conocida como "factor de Clumping " se puede detectar mediante la realización de una prueba de portaobjetos y la coagulasa libre con una prueba de coagulasa de tubo.

Procedimiento:

- Con el asa de kolle en punta colocar en el centro de la placa una colonia a investigar.
- Agregar 1 o 2 gotas de plasma.
- Suspender el organismo e inclinar el portaobjeto hacia uno y otro lado y observar si hay la aparición de grumos.

La aparición de grumos en el portaobjeto nos indica que la reacción es positiva

D. AGAR MANITOL SALADO

Es un medio que contiene una alta concentración (7.5%-10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para *estafilococos* debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias. Además contiene un indicador de pH; rojo de fenol.

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado mediante estría en placa.
- Se deja en la estufa 37C° por 24 horas.

En el Manitol positivo fermentador, se produce cambios de coloración del medio amarillo por la producción de ácido y en el Manitol negativo no fermentador, el medio permanece de color rojo.

2.8.3.2. IDENTIFICACIÓN DE *Escherichia coli*

Una vez Obtenidas las cepas aisladas de laboratorios clínicos se procedió a verificar las cepas de *Escherichia coli* a través de diferentes pruebas microbiológicas de identificación, como las que veremos a continuación.

A. TINCIÓN GRAM

La tinción Gram ya anteriormente mencionada, es una tinción de tipo diferencial Se utiliza para la diferenciación bacteriana; Este método divide las bacterias en dos grandes grupos, las Gram-negativas y las Gram-positivas. Esto es esencial para la clasificación y diferenciación de microorganismos. La reacción a la tinción de Gram está basada en la diferencia en la composición química de la pared celular bacteriana. Así se considera Bacteria Gram positiva, a las bacterias que se visualizan de color morado, y Bacteria Gram negativa, a las que se visualizan de color rosa o rojo o grosella.

B. AGAR MACCONKEY

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gramnegativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras

clínicas, aguas y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* se desarrollan en el mismo. Las colonias son de color fucsia debido a la utilización de la lactosa presente en el agar.

Procedimiento

- Se siembra las muestras de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey en placa y se siembra en zig-zag.
- Se deja en la estufa a 37C° por 24 horas.
- Las colonias se perciben de color rosado que indican que las bacteria *Escherichia coli* es fermentadora de lactosa

C. TRIPLE AZUCAR HIERRO (TSI)

Medio universalmente empleado para la diferenciación de Enterobacterias, en base a la fermentación de los hidratos de carbono glucosa, lactosa y sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* en agar TSI (pico-fondo) mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se deja en la estufa a 37C° por 24 horas.

La degradación de los tres hidratos de carbono va a producir un pH ácido ocasionando el viraje del indicador rojo fenol a amarillo.

D. LISINA HIERRO (LIA)

Por decarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta. La decarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesaria que la glucosa sea previamente fermentada.

Los microorganismos que no producen lisina decarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24 hs de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo.

La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro.

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida en agar LIA (pico-fondo) mediante el método de siembra picadura y estria.
- Se deja en la estufa a 37C° por 24 horas

En el caso de *Escherichia coli* al producir la descarboxilación de la Lisina produciéndose cadaverina el indicador púrpura de bromocresol va a retornar a su color púrpura lo que indica como Lisina Positiva.

E. PRODUCCIÓN DE INDOL

El Indol es un compuesto que se genera mediante la desaminación reductiva del triptófano y esta reacción es llevada a cabo por algunas bacterias que poseen las enzimas denominadas en su conjunto triptofanasas.

Procedimiento:

- Se carga al asa de kolle con la muestra de *Escherichia coli* obtenida y se le agrega al caldo peptonado agitándola.
- Se deja en la estufa 37C° por 24 horas.
- Luego de la incubación se agrega una gota del reactivo de Kovacs.

La aparición de un anillo de color rojo indica INDOL positivo.

F. ROJO DE METILO –VOGES PROKAUER (RM-VP)

Esta prueba se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía mixta o con producción de un producto final neutro (acetoína) por la vía butanodiólica.

Procedimiento

- Inocular el caldo RM-VP e inocular por 48 horas a 37C°.
- Luego de finalizado el tiempo de incubación transferir 1 ml de caldo para Voges- Proskauer.

- En el caldo restante revelar rojo de metilo, agregando 4 o 8 gotas del indicador rojo de metilo.
- Para revelar Voges- Proskauer 10 gotas de α -naftol al 5% y una gota de KOH al 5%.
- Agitar cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar durante 10 a 15 min.

La prueba Voges- Proskauer es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia de 15 minutos, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetona.

La prueba de rojo de metilo es positiva si se observa un color rojo estable, esto indica que la producción de ácido es suficientemente fuerte para producir el viraje del indicador, lo que significa que el microorganismo fermenta la glucosa para la vía de ácido-mixta.

G. CITRATO DE SIMONS

Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

El medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

Procedimiento:

- Se siembra la muestra de *Escherichia coli* obtenida en agar Citrato de Simmons mediante el método de siembra picadura y estría.
- Se deja en la estufa 37C° por 24 horas.

La prueba es positiva cuando el medio cambia de un color verde a un color azul, por alcalinización del medio lo cual produjo un viraje del indicador azul de bromotimol.

2.9. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

2.9.1. MÉTODO

Microdilución en caldo

2.9.2. FUNDAMENTO

Se basa en la sensibilidad del microorganismo en estudio frente a la mínima concentración de la sustancia en investigación a la cual va a inhibir el crecimiento de las cepas en estudio.

2.9.3. PROCEDIMIENTO

A. ESTERILIZACIÓN DE LOS MATERIALES Y DEL AMBIENTE DE TRABAJO

Primero se debe de hacer un requerimiento de todos los materiales a utilizar en nuestra investigación, en este caso se trata de material de vidrio, material de plástico, medios de cultivo etc. Para su correcta esterilización se empleará la autoclave, equipo que emplea el vapor a presión a 121°C por 30 minutos, como método de esterilización rápido, eficaz, económico, seguro, etc. mediante este equipo se procederán a esterilizar los medios de cultivo y el material de plástico. Para el material de vidrio se utilizó la estufa a 160°C por una hora.

En segundo lugar se prepara la mesa de trabajo, donde se realizará las diluciones para determinar la actividad antimicrobiana de las oleorresinas del *Zingiber officinale* Roscoe obtenidas por fluidos supercríticos FSC y por el método de Soxhlet. Para desinfectar este ambiente se utilizó hipoclorito de sodio al 5%, 500 ppm.

B. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Se prepara el inóculo para cada microorganismo en estudio, tomándose de 3 a 5 colonias de las placas, se inoculan en 10 ml de caldo peptonado, hasta que se asemeje a la turbidez del tubo N° 05 de la Escala de Mac Farland. Este enturbiamiento corresponde aproximadamente a 5×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) por mililitro. Luego se procede a

realizar una dilución 1/100 del inóculo para obtener una solución 10^6 UFC/ml que es la que se utilizará finalmente en las microdiluciones.

C. PREPARACION DE LAS SOLUCIONES MADRE

Enseguida se preparan dos soluciones con la oleorresina de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”; la primera, obtenida por fluidos supercríticos FSC, a una concentración de 300mg/ml; y la segunda, obtenida por el método de Soxhlet, a una concentración de 300 mg/ml. Llamaremos a cada una de estas soluciones, “Solución Madre”, de fluidos supercríticos y de Soxhlet respectivamente.

Para la elaboración de las soluciones madres se utilizó tween 20 o polisorbato 20, que se empleó en la preparación de estas, debido a su estabilidad, baja toxicidad pero sobre todo a su acción emulsificante, puesto que era necesario disolver las oleorresinas en agua destilada; siendo estos líquidos inmiscibles.

D. REALIZACIÓN DE LAS MICRODILUCIONES

Una vez realizados los procedimientos anteriores se prepara la placa de microdilución, los pocillos son seleccionados de acuerdo a la cantidad de diluciones que se realizarán.

El primer paso es añadir caldo peptonado a los pocillos, en el volumen que corresponde a cada uno de ellos.

Enseguida se agrega la solución madre de oleorresina de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” obtenida por fluidos supercríticos o por Soxhlet según corresponda.

De igual manera se agrega el inóculo correspondiente en el volumen indicado, finalmente se cubre la placa de microdilución y se lleva a la estufa para incubarla por 24 horas a 37° C para observar el crecimiento bacteriano.

Transcurrido este tiempo se observa la turbidez y ausencia de turbidez para la determinación del punto de quiebre.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los microorganismos en estudio.

2.10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

Es definida como la menor concentración de antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento bacteriano observable, detectada visualmente o a través de un método automatizado o semi automatizado.

2.10.1. MÉTODO

Microdilución en caldo

2.10.2. PROCEDIMIENTO

Tras la incubación, la placa de microdilución se examina en busca de crecimiento bacteriano. Cada placa debe incluir en un pocillo un control de crecimiento que no contenga la solución madre (que contiene el agente antimicrobiano, oleorresina del *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”) y un control de esterilidad a su vez, que no contenga una suspensión bacteriana.

Una vez que se confirma el desarrollo en el control de crecimiento y la ausencia de este en el pocillo de esterilidad puede establecerse el perfil de crecimiento para cada dilución de nuestra solución madre y determinarse la CIM.

La detección de la presencia de crecimiento en los pocillos de la placa de microdilución a menudo se facilita mediante el uso de la luz. La presencia de crecimiento bacteriano, se puede manifestar como una turbidez leve o densa.

Al examinar la serie de diluciones se localiza el pocillo de microdilución que contiene la concentración más baja de la solución madre que inhibe por completo el crecimiento bacteriano visible y este se registra como la CIM.

Éste procedimiento se repitió para cada uno de los microorganismos en estudio. En el capítulo III se conocerán los resultados de la CIM, y en el anexo 8 se pueden observar el modelo de tabla que se utilizó para reportar los resultados de las microdiluciones.

2.11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Se define como la mínima concentración de un agente antimicrobiano que en un periodo de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99% de una población bacteriana previamente estandarizada.

2.11.1. MÉTODO

Siembra en Agar

2.11.2. PROCEDIMIENTO

Esta técnica se realiza después de haber encontrado la CIM, donde se observa la turbidez y ausencia de turbidez para la determinación del punto de quiebre.

Se realiza una siembra a partir de los pocillos transparentes (en los cuales se ha inhibido el crecimiento) en placas Petri que previamente han sido plaqueadas con Agar Nutritivo esterilizado; a 37° C por 24 horas.

Después de este tiempo se debe observar el crecimiento bacteriano si los organismos no crecen en los pocillos de caldo pero crecen en las placas Petri, la solución madre que contiene el agente antimicrobiano inhibirá el crecimiento del organismo pero no lo matará. Esta concentración de la droga será bacteriostática.

Si los organismos no crecen en las placas Petri querrá decir que han muerto. Esta concentración de la droga será bactericida.

El pocillo con la concentración bactericida más baja se corresponderá con la concentración mínima bactericida CMB de la solución madre.

Éste procedimiento se repitió para cada uno de los microorganismos en estudio.

En el capítulo III se conocerán los resultados de la CBM, donde se pueden observar el modelo de tabla que se utilizó para reportar los resultados correspondientes.

2.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el ordenamiento interpretación y análisis estadístico de los datos en estudio se utilizó el software Microsoft-Excel 2010, para lo cual se utilizaron los siguientes instrumentos estadísticos:

2.12.1. MEDIDA DE TENDENCIA CENTRAL

- **Media Aritmética (\bar{x})**

Para calcular la media aritmética de la muestra, sume los valores de todos los elementos de la muestra ($\sum x$) y divida el resultado entre el número total de elementos de la muestra.

$$(\bar{x}) = \frac{\sum x}{n}$$

$\sum x$ = Sumatoria de los elementos de la muestra

n = Número total de elementos de la muestra

2.12.2. MEDIDA DE DISPERSIÓN

- **Desviación estándar (DS)**

La desviación estándar (o desviación típica) es una medida de dispersión para variables de razón (ratio o cociente) y de intervalo, de gran utilidad en la estadística descriptiva. Es una medida (cuadrática) de lo que se apartan los datos de su media, y por tanto, se mide en las mismas unidades que la variable.

Para conocer con detalle un conjunto de datos, no basta con conocer las medidas de tendencia central, sino que necesitamos conocer también la desviación que representan los datos en su distribución, con objeto de tener una visión de los mismos más acorde con la realidad a la hora de describirlos e interpretarlos para la toma de decisiones.

$$S = \sqrt{S^2}$$

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

2.12.3. TEST T-PAREADO

En estadística, una prueba *t* de Student, prueba *t*-Student, o Test-T es cualquier prueba en la que el estadístico utilizado tiene una distribución *t* de Student si la hipótesis nula es cierta. Se aplica cuando la población estudiada sigue una distribución normal pero el tamaño muestral es demasiado pequeño como para que el estadístico en el que está basada la inferencia esté normalmente distribuido, utilizándose una estimación de la desviación típica en lugar del valor real. Es utilizado en análisis discriminante.

Las *pruebas-t* de dos muestras para probar la diferencia en las medias pueden ser desapareadas o en parejas. Las pruebas *t* apareadas son una forma de bloqueo estadístico, y poseen un mayor poder estadístico que las pruebas no apareadas cuando las unidades apareadas son similares con respecto a los "factores de ruido" que son independientes de la pertenencia a los dos grupos que se comparan. En un contexto diferente, las *pruebas-t* apareadas pueden utilizarse para reducir los efectos de los factores de confusión en un estudio observacional.

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal (rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe “jengibre”) se realizó en el centro de abastos “mi mercado”, para que después de algunas operaciones como: selección, lavado, desecación y pulverización se obtenga el material vegetal en polvo.

Se midió la humedad inicial del jengibre desecado, en el analizador de humedad electrónico y lanzó un resultado de 10% de humedad inicial. Por tanto, es recomendable que después de la desecación de la droga, la humedad sea inferior al 10 % para conservar la droga por un tiempo prolongado. Según lo aplicado por Mesomo (2012) en “*Ginger (Zingiber officinale R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation*”. Y Enriquez Flores A. (2008) en “*estudio farmacognóstico y fitoquímico del rizoma de Zingiber officinale roscoe “jengibre” de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú*”.

Los rizomas pulverizados y estabilizados, se almacenaron dentro de un frasco ámbar de vidrio y se conservaron a una temperatura de 5° C



Fig. 16 Proceso de acondicionamiento del material vegetal

Fuente: Elaboración propia

3.2. CARACTERÍSTICAS ORGANÓLEPTICAS DEL *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”

En cuanto a las características organolépticas del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe*. “jengibre”, todas estas corresponden a la bibliografía revisada, en el tabla 6 se ilustran mejor estos resultados.

Tabla 6 Características organolépticas del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe*.

Olor	Sui generis
Color	Pardo claro (externo) y amarillenta (interno)
Sabor	Pungente (picante)
Condición	Fresca
Textura	Piel lisa y con algo de brillo

Fuente: *Elaboración propia*

3.3. ANÁLISIS PROXIMAL DEL *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”

Después de las operaciones de recolección y estabilización del rizoma de jengibre, se llevó una muestra de la materia vegetal ya acondicionada (pulverizada) al laboratorio de ensayo y control de calidad de la UCSM para determinar su análisis proximal. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 7, a continuación.

Tabla 7 Análisis proximales del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe*.

PARAMETROS	PORCENTAJE (%)
Humedad residual	6.5
Cenizas totales	6.1
Grasas totales	5.47
Proteínas	1.79

Fuente: *Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad*

La importancia de este análisis radica en conocer, sobretodo, el porcentaje de humedad y de grasa que posee el jengibre.

Se aplicó un tratamiento térmico para reducir la humedad inicial (10 %) como se puede apreciar en la tabla 9, donde el % de humedad en el jengibre ya estabilizado fue de 6.5%, lo que indica que, la materia vegetal puede conservarse por un tiempo prolongado, evitando de esta manera el riesgo de contaminación por hongos y bacterias.

Asimismo, el valor del porcentaje de grasa en el polvo de jengibre estabilizado, servirá como referencia, en la obtención de la oleorresina de jengibre por fluidos supercríticos (FSC) y extracción por Soxhlet.

3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

3.4.1. EXTRACTO OBTENIDO POR FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (FSC)

3.4.1.1. PRUEBAS PRELIMINARES

Para definir los parámetros a utilizar en la extracción de la oleorresina de jengibre con dióxido de carbono supercrítico y determinar el (%) de rendimiento de extracción (%RE), fueron realizadas extracciones preliminares. Siendo necesaria la revisión bibliográfica como Reyes Najjar A. y colaboradores (2011) en *“Obtención de extractos de jengibre (Zingiber officinale) empleando CO₂ supercrítico”* y Mesomo C. (2013) en *“Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (Zingiber officinale R.): Chemical composition and antibacterial activity”*.

Se comenzaron las extracciones con variaciones entre presión y temperatura, con el objetivo de definir los parámetros óptimos para extraer el mayor % de rendimiento de oleorresina de jengibre. Los parámetros utilizados se exponen en la tabla 8 en la página siguiente.

Tabla 8 Parámetros para la extracción de oleorresina de *Zingiber officinale Roscoe*.

N°	P	T°	Flujo ml/seg	T' Estático	T' Dinámico	Aceite Extraído (g)	% RE
1	179 bar	40 °C	8	20 min.	10 min.	0.918	2.0
2	207 bar	40 °C	8	20 min.	10 min.	1.306	3.2
3	250 bar	40 °C	8	20 min.	10 min.	1.247	3.5
4	250 bar	50 °C	8	20 min.	10 min.	2.087	5.2
5	250 bar	60 °C	8	20 min.	10 min.	1.711	4.2

Donde P=presión; T°=temperatura; T'=tiempo

Fuente: Elaboración propia

El tiempo estático fue de 20 minutos, el tiempo dinámico de 10 minutos, el flujo fue de 8 ml/seg. Estos parámetros fueron constantes en todas las extracciones que se realizó con dióxido de carbono supercrítico; se tomaron estos datos como consecuencia de las experiencias anteriores a esta investigación como fue: Zanabria Y. David (2012) en “Extracción de aceite de las semillas de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) por fluidos supercríticos FSC y determinación de los ácidos grasos linoleicos, linoleico y oleico por cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC”. Además de Ponce M. María Fernanda y Alberto H. Olga. (2013) en “Aplicación tecnológica del dióxido de carbono supercrítico para la extracción de aceite de polvillo de arroz (*Oryza sativa* L.)”.

Otro parámetro constante fue la cantidad de muestra de 40g en la celda de extracción, porque el fabricante recomienda en el manual del extractor llenar hasta el 80% de la capacidad de la celda de extracción, para un mejor funcionamiento del equipo (Supercritical Fluid Technologies, 2007).

El tiempo total de extracción fue de 3 horas, debido a que se determinó en las curvas de extracción que pasado ese tiempo, la cantidad de aceite acumulado no fue significativo para el rendimiento (% RE).

3.4.1.2. PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA LA EXTRACCIÓN CON DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO.

La diferencia entre los parámetros de presión y temperatura investigados nos permitió obtener un porcentaje del 5.2% de contenido graso, siendo este el más alto de todos y que comparado con el análisis proximal 5.47%, se tomó como el valor óptimo de la extracción.

Siendo 5.2% el valor óptimo de la extracción, se consideró que los parámetros utilizados para su obtención, son los parámetros óptimos para la extracción de oleorresina de *Zingiber officinale Roscoe*, “jengibre”. En la tabla 9 se muestran dichos parámetros.

Tabla 9 Parámetros óptimos para extracción de oleorresina de *Zingiber officinale Roscoe*.

Muestra (g)	P Bar	T °C	T' estático	T' dinámico	Flujo (ml/seg)	Aceite Extraído (g)	% RE
40.083	250	50	20 min	10 min	8	2.087	5.2

Donde P=presión; T°=temperatura; T'=tiempo

Fuente: Elaboración propia

3.4.1.3. CARACTERÍSTICAS ORGANÓLEPTICAS DE LA OLEORRESINA OBTENIDA

Color: de un tono amarillo-naranja, limpio,

Olor: ligeramente a limón y característico de la especie.

Sabor: picante característico de la especie

Aspecto: translucido sin ninguna partícula.



Fig. 17 Oleorresina de Jengibre Obtenida con Dióxido de Carbono Supercrítico

Fuente: Elaboración propia

3.4.1.4. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN

A. DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ÓPTIMA A UNA MISMA TEMPERATURA

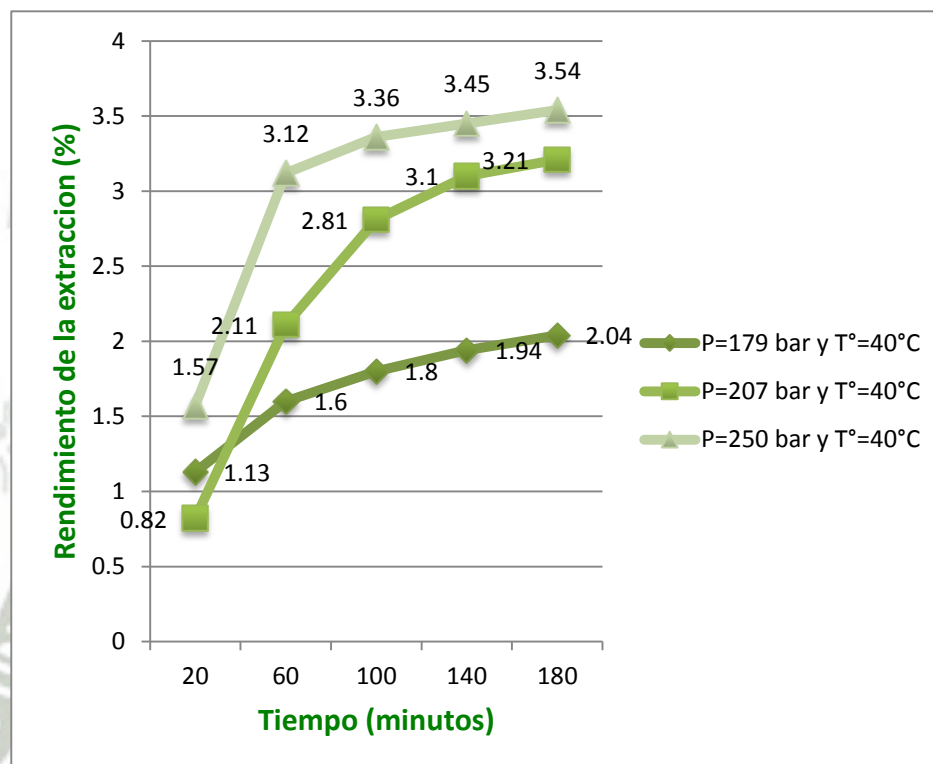


Gráfico 1 Rendimiento de extracción (%RE) de la oleoresina extraída, en función del tiempo a diferentes presiones y a una misma temperatura.

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de extracción fue de 3 horas frente al rendimiento en (%) a una misma temperatura de 40°C, flujo de 8 ml/seg y 20 minutos de saturación, la presión de 179 bar presenta un rendimiento del 2.04%, la presión de 207 bar presenta un rendimiento del 3.21% y la presión de 250 bar presenta un rendimiento del 3.54% siendo con esta presión, que se alcanzó el mayor porcentaje de rendimiento y por tanto se determinó que es la presión óptima de extracción.

B. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA A UNA MISMA PRESIÓN

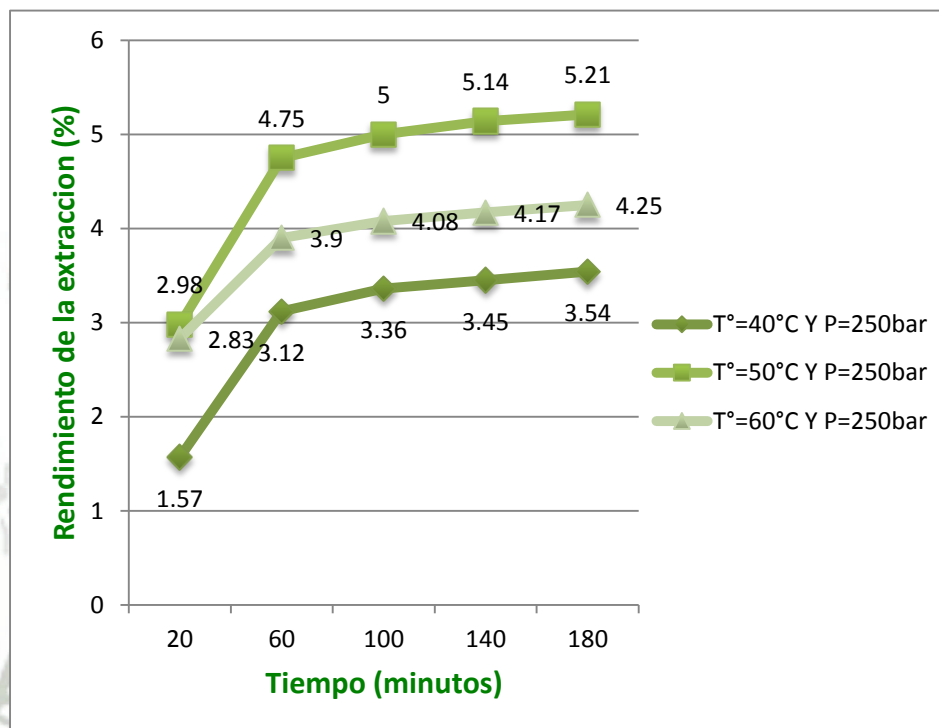


Gráfico 2 Rendimiento de extracción (%RE) de la oleoresina extraída en función del tiempo a diferentes temperaturas y a una misma presión.

Fuente: Elaboración propia

El tiempo de extracción fue de 3 horas frente al rendimiento en (%). A una misma presión 250 bar, flujo de 8ml/seg y diferentes temperaturas; con 40°C se obtuvo un rendimiento del 3.54% en tanto que con 50°C se obtuvo un rendimiento del 5.21% y finalmente con 60°C se obtuvo 4.25% de rendimiento. De acuerdo a estos datos se puede reconocer que la temperatura óptima fue de 50°C.

C. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE OLEORRESINA EXTRAÍDA CON LOS PARÁMETROS ÓPTIMOS

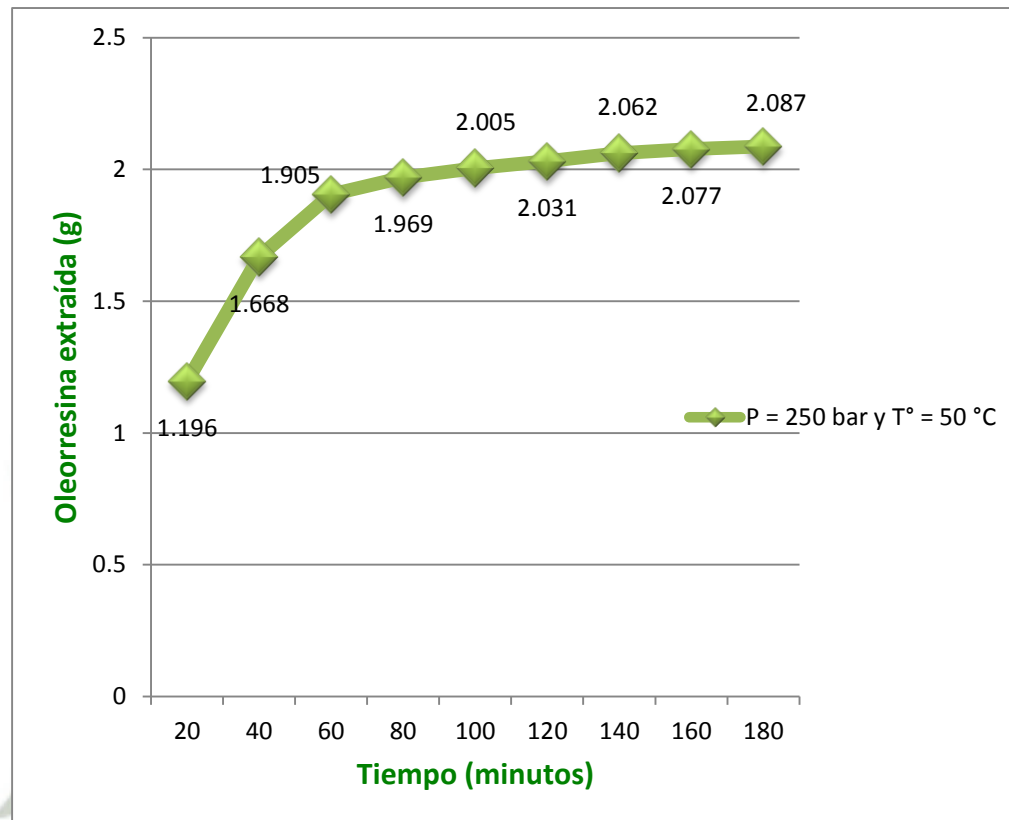


Gráfico 3 Rendimiento de la oleorresina en (g) frente al tiempo, con los parámetros óptimos determinados.
Fuente: Elaboración propia

Con los parámetros óptimos de extracción de oleorresina por Fluidos supercríticos FSC según la tabla 8. La curva de extracción nos demuestra que es al inicio de la segunda hora donde empieza a haber una extracción sustancial, (1.905g) que sigue progresivamente y que se estanca al llegar la tercera hora y finalizada está, el incremento de la extracción no es considerable por ser inferior a 0.010g en el anexo 7 se puede observar las curvas que se obtienen con los demás parámetros utilizados.

D. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO CON TODOS LOS PARÁMETROS EMPLEADOS

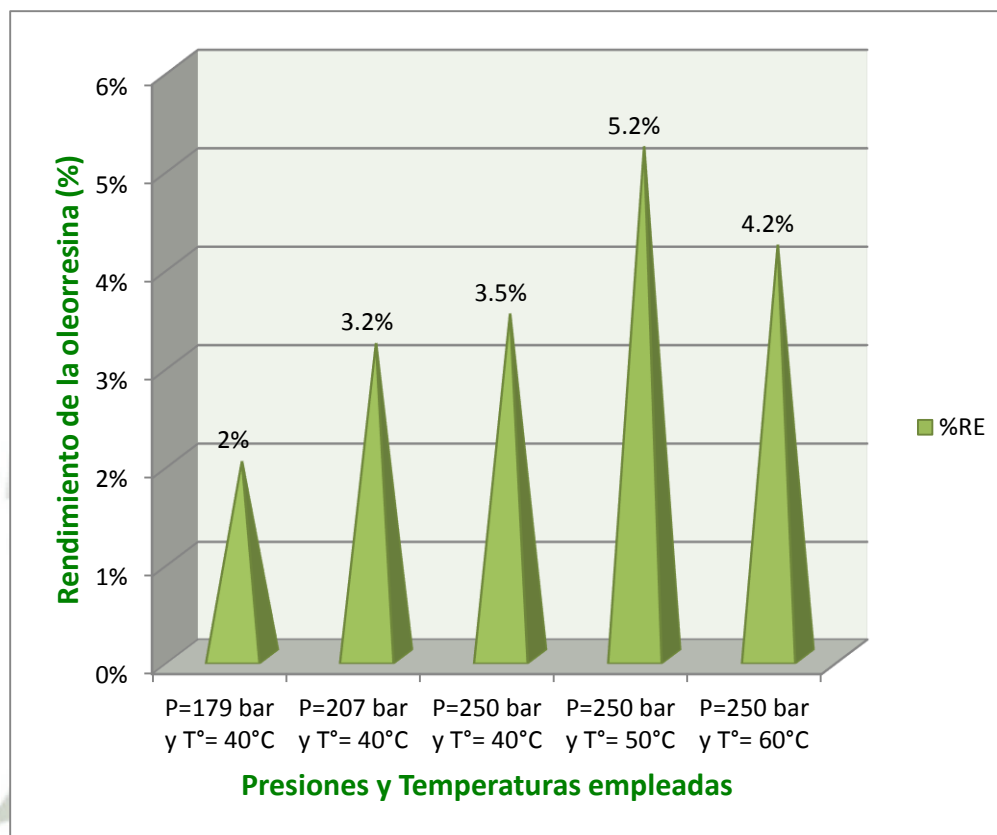


Gráfico 4 Porcentaje de rendimiento (%RE) de la oleorresina extraída con diferentes presiones y temperaturas.

Fuente: Elaboración propia

Con este gráfico se puede confirmar las diferentes presiones y temperaturas utilizadas, para poder determinar cuál de estos parámetros son los óptimos, en la extracción de oleorresina de *Zingiberofficinale* R. “jengibre”; siendo que con una presión de 250 bar y una temperatura de 50°C se obtuvo un mayor % de rendimientos se determinó que estos son los parámetros óptimos de extracción.

El segundo % más alto es de 4.2% que se obtiene a una presión de 250 bar y a una temperatura de 60°C, lo que indica la importancia de la temperatura en la extracción.

3.4.2. EXTRACTO OBTENIDO POR EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR SOXHLET

3.4.2.1. RESULTADOS

Después de tener la materia vegetal estabilizada, Se procede a armar el equipo de Soxhlet para la extracción utilizando como solvente hexano 60ml y 10g de rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” en polvo, colocados en el equipo en un dedal hecho de papel filtro y se extrae por alrededor de 4 horas.



Fig. 18 Extracción con Soxhlet del rizoma de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”
Fuente: Elaboración propia

3.4.2.2. CARACTERÍSTICAS ORGANÓLEPTICAS DE LA ÓLEORRESINA OBTENIDA

Color:	caramelo oscuro,
Olor:	característico pero poco perceptible
Sabor:	ligeramente picante característico de la especie
Aspecto:	opaco

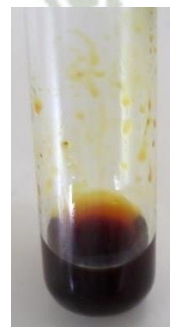


Fig. 6 Oleorresina de “jengibre” obtenida por el método de Soxhlet.
Fuente: Elaboración propia

3.4.2.3. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Se realizan tres extracciones con el equipo de Soxhlet para comprobar que no haya una diferencia significativa en el % de rendimiento.

a) Primera extracción

Peso del balón vacío: 59.2348g

Peso de la muestra: 10.0320g

Peso del balón desecado: 59.4507

$$\%RE = \frac{59.4507 - 59.2348}{10.0320} \times 100$$

$$\%RE = 2.15$$

b) Segunda extracción

Peso del balón vacío: 59.2348g

Peso de la muestra: 10.0059g

Peso del balón desecado: 59.4459g

$$\%RE = \frac{59.4459 - 59.2348}{10.0059} \times 100$$

$$\%RE = 2.11$$

c) Tercera extracción

Peso del balón vacío: 59.2348g

Peso de la muestra: 10.0018g

Peso del balón desecado: 59.4520

$$\%RE = \frac{59.4520 - 59.2348}{10.0018} \times 100$$

$$\%RE = 2.17$$

Se saca un promedio de los tres datos obtenidos para determinar con certeza el porcentaje de rendimiento (%RE) que se obtiene mediante este método.

Resultados: 2.15%, 2.11%, 2.17%

Promedio: 2.14%

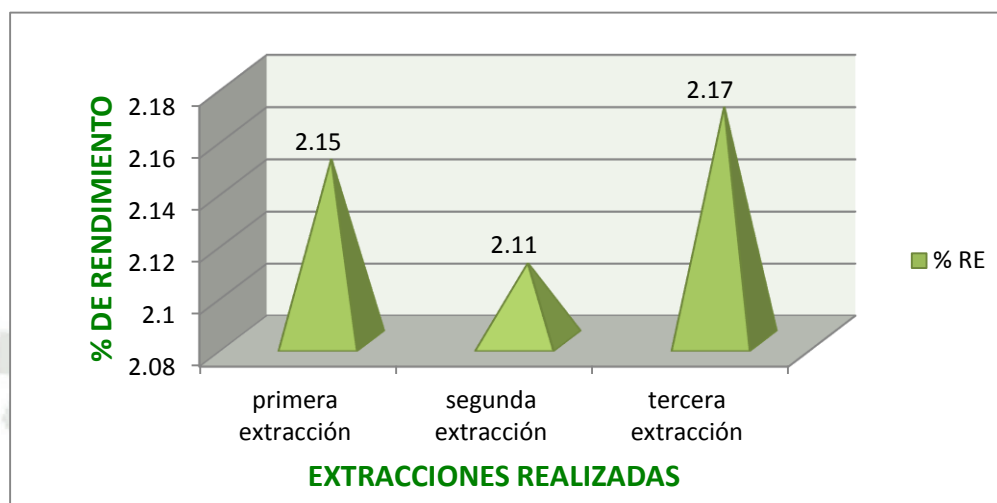


Gráfico 5 Extracciones realizadas con el equipo de Soxhlet

Fuente: Elaboración propia

3.5. IDENTIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

3.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Muestras a investigar:

- A. oleoresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico disuelta en alcohol etílico de 96°
- B. oleoresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción, Soxhlet, disuelta en hexano.

Elementos para la cromatografía:

- Fase estacionaria: silica gel 60
- Fase móvil :tolueno-acetato de etilo (93:7)

Detección:

- UV-254nm los gingeroles muestran una fluorescencia distintiva débil.

Reveladores:

- **Reactivo de Barton**
Los gingeroles y/o los shogaoles en el visible se muestran de tonalidades entre azul y violetas a un R_f aproximado de 0.2.
Los diarilheptanoides se muestran con un tono azul oscuro prominente con un R_f aproximado de 0.45.
- **Reactivo vainilla sulfúrica**
Con este reactivo se pueden detectar mayormente terpenos con un R_f aproximado de 0.6 y por encima de este, se muestran de color azul y azul-violetas.
- **Lieberman-burchard**
Con este reactivo se pueden detectar triterpenos y esteroides los primeros dan una coloración rosa.

3.5.2. DETERMINACIÓN DE R_f

- **Muestra A:** oleorresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico disuelta en alcohol etílico de 96°

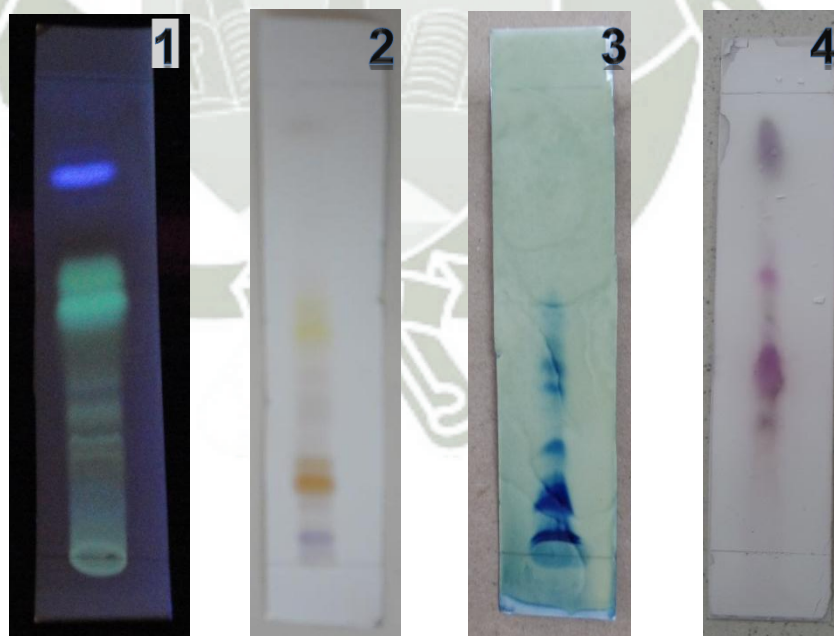


Fig. 7 Resultados de la Cromatografía En Capa Fina de la Muestra A

Fuente: Elaboración propia

Con respecto a la figura 25 se puede observar que:

1. Detección de gingeroles en el UV-254, se puede notar la fluorescencia con un R_f entre 0.25 a 0.5
 2. Detección de triterpenos con el revelador liebermann-burchard de color rosa-violeta.
 3. Detección de gingeroles con el revelador de Barton, se observa en el visible los gingeroles con un R_f de 0.2 aproximadamente y los shogaoles con un R_f de 0.45.
 4. Detección de sesquiterpenos con el revelador vainillina sulfúrica, se observan manchas de color violeta R_f de 0.6
- **Muestra B:** oleoresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción, soxhlet, disuelta en hexano

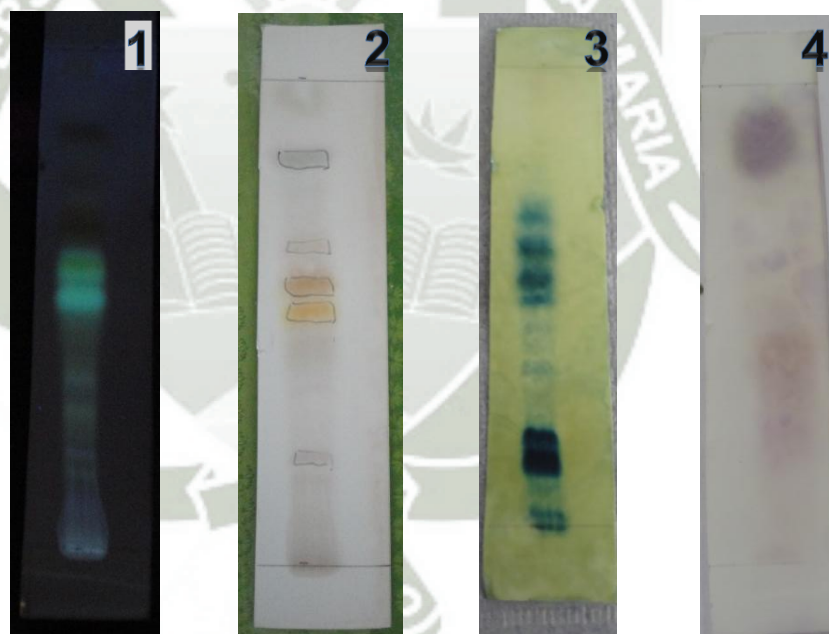


Fig. 8 Resultados de la Cromatografía En Capa Fina de la Muestra B

Fuente: Elaboración propia

Con respecto a la figura 26 se puede observar que:

1. Detección de gingeroles en el UV-254, se puede notar una débil fluorescencia con un R_f entre 0.25 a 0.5

2. Detección de triterpenos con el con el revelador liebermann-burchard de color rosa-violeta.
3. Detección de gingeroles con el revelador de Barton, se observa en el visible los gingeroles con un RF de 0.2 aproximadamente y los shogaoles con un RF de 0.45.
4. Detección de sesquiterpenos con el revelador vainillina sulfúrica, se observan manchas de color violeta R_f de 0.6.

3.6. PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

3.6.1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus*.

- TINCION GRAM

Se observa al microscopio cocos Gram positivos, se encuentran aislados en racimos, pares o cadenas

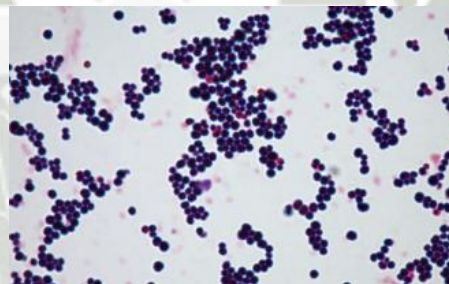


Fig. 22 Cocos Gram positivos a 100x
Fuente: Elaboración propia

- PRUEBA DE LA CATALASA

Para detectar la catalasa, se aplicó peróxido de hidrógeno, se nota la aparición de pequeñas burbujas de oxígeno.

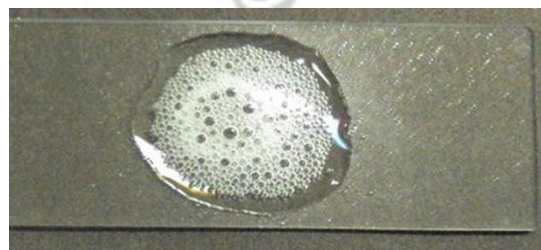


Fig. 23 Prueba de la Catalasa positiva, para *Staphylococcus aureus*
Fuente: Elaboración propia

- PRUEBA DE LA COAGULASA

Para detectar la coagulasa se pone una gota de plasma emulsionada con las colonias del organismo en estudio y se observó aglutinación macroscópica que es una reacción positiva a la prueba

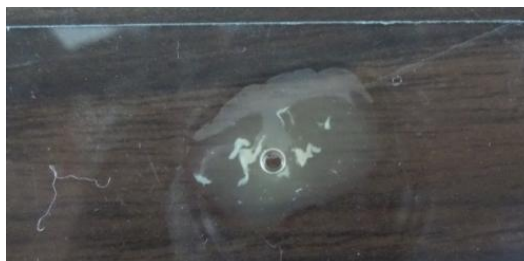


Fig. 9 Prueba de Coagulasa positiva, para *Staphylococcus aureus*

Fuente: Elaboración propia

- FERMENTACION DEL MANITOL SALADO

Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; con lo que se modifica el pH del medio y vira el indicador de pH del color rojo al amarillo.



Fig. 25 Agar Manitol Salado fermentación positiva, para *Staphylococcus aureus*

Fuente: Elaboración propia

3.6.1.1. RESULTADOS CONFIRMATORIOS

Tabla 10 Resultados confirmatorios para la identificación de *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	
Tinción Gram	Cocos Gram positivos
Prueba de catalasa	Positivo
Prueba de coagulasa	Positivo
Manitol salado	Fermentación positiva

Fuente: Elaboración propia

3.6.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Escherichia coli*

- TINCIÓN GRAM

Se observa al microscopio bacilos cortos Gramnegativos que pueden estar en cadenas o solos.

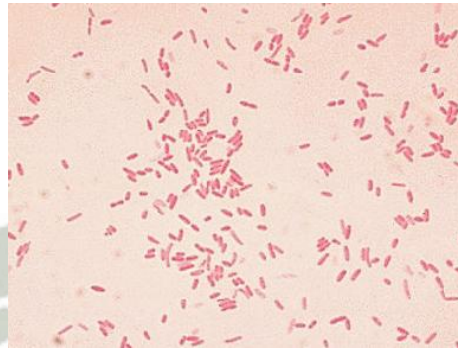


Fig. 26 Bacilos Gramnegativos vistos al microscopio.

Fuente: Elaboración propia

- AGAR MAC CONKEY

En el medio de cultivo, Al utilizar la lactosa las bacterias como *Escherichia coli*, producen acidez, lo cual baja el pH, lo que tiene como consecuencia la aparición de colonias de color rosadas o rojas.

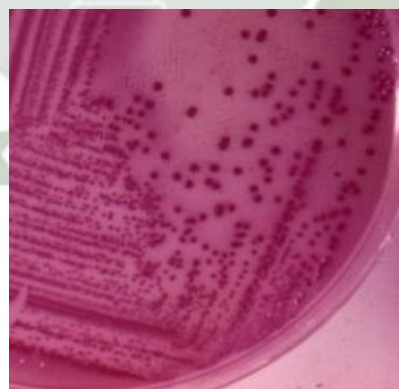


Fig. 10 colonias de *Escherichia coli* en agar Mac Conkey

Fuente: Elaboración propia

- TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI)

Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo fenol, el cual vira el color amarillo en medio ácido.

El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrogeno que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.

Para *Escherichia coli* el resultado es: (A/A+-)

- Lactosa (+)
- Sacarosa (+)
- Glucosa (+)
- Co₂ (+)
- H₂S (-)



Fig. 11 *Escherichia coli* en TSI (A/A+-)

Fuente: Elaboración propia

▪ LISINA HIERRO (LIA)

En el caso de *Escherichia coli* encontramos que en el presente medio nos debe dio K/K-; Al producir la descarboxilación de la Lisina produciéndose cadaverina, el indicador purpura de bromocresol va a retornar a su color purpura lo que nos indica como Lisina Positiva.

- Lisina (+)
- Descarboxilación (+)
- Desaminación (-)
- H₂S (-)



Fig. 12 *Escherichia coli* en LIA (K/K-)

Fuente: Elaboración propia

- **PRODUCCIÓN DE INDOL**

El indol es un compuesto que se genera mediante la desaminación reductiva del triptófano. El triptófano es hidrolizado por las enzimas triptofanasas para producir tres productos finales posibles uno de las cuales es la producción indol. El Indol es detectado por el reactivo de Kovac, este reacciona con el indol para producir un compuesto de color rojo. Para *Escherichia coli* el resultado es positivo.



Fig. 13 Prueba de Indol Positivo, para *Escherichia coli*

Fuente: Elaboración propia

- **PRUEBA DE ROJO DE METILO - VOGES PROSKAUER (RM-VP)**

La prueba de rojo de metilo es positiva si se observa un color rojo estable, lo que significa que el microorganismo fermenta la glucosa para la vía de ácido-mixta. Que en nuestro caso es positivo. La prueba Voges - Proskauer es positiva si se desarrolla un color rojo-fucsia, que indica la presencia de diacetilo, producto de oxidación de la acetona. Que para nuestro caso fue negativo presentando una coloración amarilla



Fig. 31 RM (+) y VP (-) para *Escherichia coli*

Fuente: Elaboración propia

- CITRATO DE SIMONS

La prueba es positivo (+) cuando el medio cambia de un color verde a un color azul, por alcalinización del medio lo cual produjo un viraje del indicador azul de bromotimol. Para *Escherichia coli* es negativo.



Fig. 32 Prueba de Citrato de Simons Negativo, para *Escherichia coli*

Fuente: Elaboración propia

3.6.2.1. RESULTADOS CONFIRMATORIOS

Tabla 11 Resultados confirmatorios para la identificación de *Escherichia coli*

Escherichia Coli	
Coloración Gram	Bacilos Gram Negativos
Agar Mac Monkey	Fermentación de Lactosa
Triple Azúcar Hierro (TSI)	A/A+-
Lisina Hierro (LIA)	K/K-
Caldo Peptonado (INDOL)	Positivo
Prueba de Rojo de Metilo- Voges Proskauer	Positivo Negativo
Citrato de Simons	Negativo

Fuente: Elaboración propia

3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO

3.7.1. MAPA CONCEPTUAL DEL PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA



Gráfico 6 Procedimiento para realizar las microdiluciones.

Fuente: Elaboración propia

3.7.2. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Las pruebas de CIM y CBM se realizaron después de los procedimientos descritos en el gráfico anterior para las microdiluciones.

La CIM (concentración inhibitoria mínima) es la menor concentración de una droga que inhibe el crecimiento bacteriano. La CBM (concentración bactericida mínima) es la menor concentración que mata las células bacterianas. Al sembrar en placa, a partir de los tubos en los cuales no se produce crecimiento, se determina si una droga es bacteriostática (simplemente detiene el crecimiento) o bactericida (mata los microorganismos).

En nuestro caso en particular no utilizamos tubos de ensayo para las diluciones, utilizamos micropozos por esta razón esta técnica se llama Microdilución. Las cantidades empleadas en la realización de las microdiluciones se pueden observar en el anexo 8.

En los cuadros posteriores se observaran los resultados obtenidos de la CIM y la CBM para los microorganismos en estudio, teniendo como agente antimicrobiano las soluciones madres preparadas con las oleorresinas de *Zingiber officinale Roscoe*. “jengibre”, obtenida por fluidos supercríticos y por el método de extracción por Soxhlet.

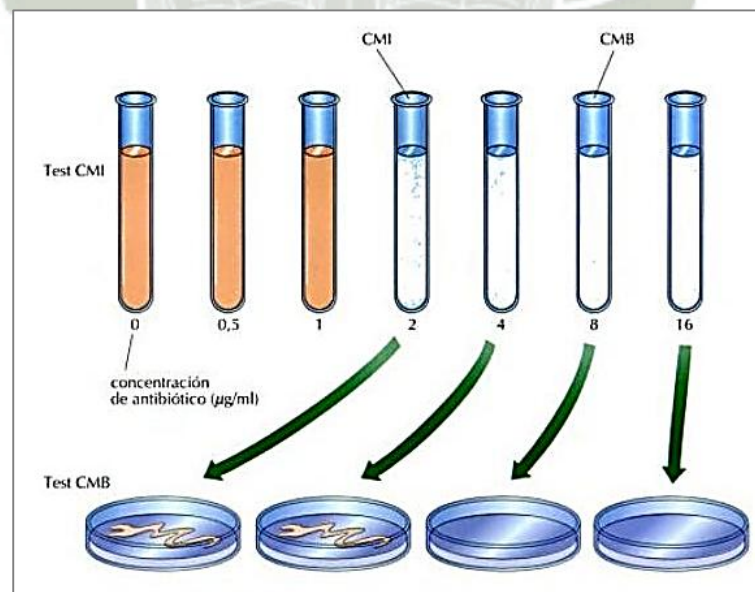


Fig. 33 Las pruebas de CIM Y CBM; en esta figura la CIM es de 2µg/ml y la CBM es de 8µg/ml.

Fuente: Forbes, B. (2009) Diagnóstico Microbiológico

Tabla 12. CIM de la oleorresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para *Escherichia coli*.

Micropozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Escherichia coli</i> ATCC (8739)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (HRHDE)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (UCSM)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+: Micropozo con crecimiento Bacteriano

-: Micropozo sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 12 se observan los resultados de la CIM de diferentes cepas de *Escherichia coli*, utilizando como agente antimicrobiano la oleorresina de “jengibre” obtenida con dióxido de carbono supercrítico. Se puede notar que el punto de corte es el mismo para todas las bacterias en ensayo, teniendo como resultado de la CIM la concentración de 110 mg/ml respectivamente.

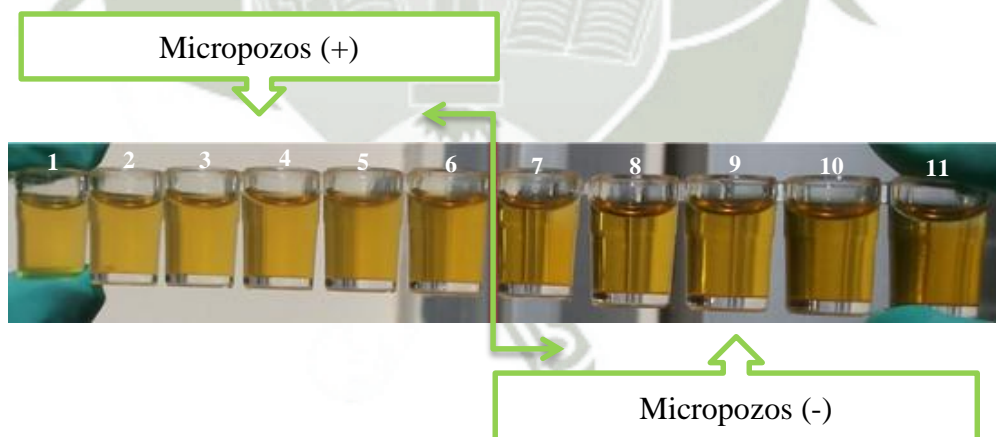


Fig. 34 Ejemplo del punto de corte para la CIM de *Escherichia coli* ATCC (8739)

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 13. CBM de la oleorresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para *Escherichia coli*.

Sección en la placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Escherichia coli</i> ATCC (8739)	D	D	D	D	D	D	+	+	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (HRHDE)	D	D	D	D	D	D	+	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> (UCSM)	D	D	D	D	D	D	+	+	-	-	-

D: Descartado (hubo crecimiento en la CIM y para la CBM no se toma)

+: Placa con crecimiento Bacteriano

-: Placa sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla **13** se observan los resultados de la CBM de diferentes cepas de *Escherichia coli*, donde el punto de corte es diferente para las bacterias en ensayo; teniendo como resultado de la CBM la concentración de 130 mg/ml y 140 mg/ml respectivamente; para la oleorresina de “jengibre”, obtenida con dióxido de carbono supercrítico.



Fig. 35 Ejemplo del punto de corte en placa para la CBM de *Escherichia coli* ATCC (8739)

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 14. CIM de la oleoresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para *Staphylococcus aureus*.

Micropozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (6538)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (HRHDE)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UCSM)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: Micropozo con crecimiento Bacteriano

-: Micropozo sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 14 se observan los resultados de la CIM de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, utilizando como agente antimicrobiano la oleoresina de “jengibre”, obtenida con dióxido de carbono supercrítico. Se puede notar que el punto de corte es el mismo para todas las bacterias en ensayo, teniendo como resultado de la CIM la concentración de 100 mg/ml respectivamente.

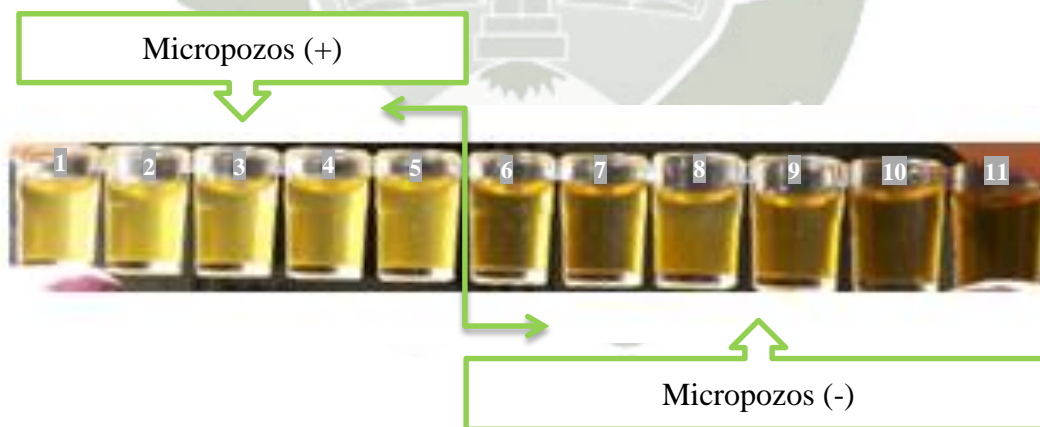


Fig. 36 Ejemplo del punto de corte para la CIM de *Staphylococcus aureus* (HRHDE)

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 15. CBM de la oleoresina de jengibre obtenida con dióxido de carbono supercrítico para *Staphylococcus aureus*.

Sección en la placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (6538)	D	D	D	D	D	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (HRHDE)	D	D	D	D	D	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UCSM)	D	D	D	D	D	+	+	-	-	-	-

D: Descartado (hubo crecimiento en la CIM y para la CBM no se toma)

+: Placa con crecimiento Bacteriano

-: Placa sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 15 se observan los resultados de la CBM de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, donde el punto de corte es el mismo para las bacterias en ensayo; teniendo como resultado de la CBM la concentración de 100 mg/ml respectivamente; para la oleoresina de “jengibre”, obtenida con dióxido de carbono supercrítico.



Fig. 37 Ejemplo de punto de corte en placa para la CBM de *Staphylococcus aureus* (HRHDE)

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 16. CIM de la oleorresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para *Escherichia coli*.

Micropozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Escherichia coli</i> ATCC (8739)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (HRHDE)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> (UCSM)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+: Micropozo con crecimiento Bacteriano

-: Micropozo sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 16 se observan los resultados de la CIM de diferentes cepas de *Escherichia coli*, utilizando como agente antimicrobiano la oleorresina de “jengibre”, obtenida con el equipo de extracción Soxhlet. Se puede notar que el punto de corte es diferente para las bacterias en ensayo, teniendo como resultado de la CIM la concentración de 120mg/ml y 100mg/ml respectivamente.

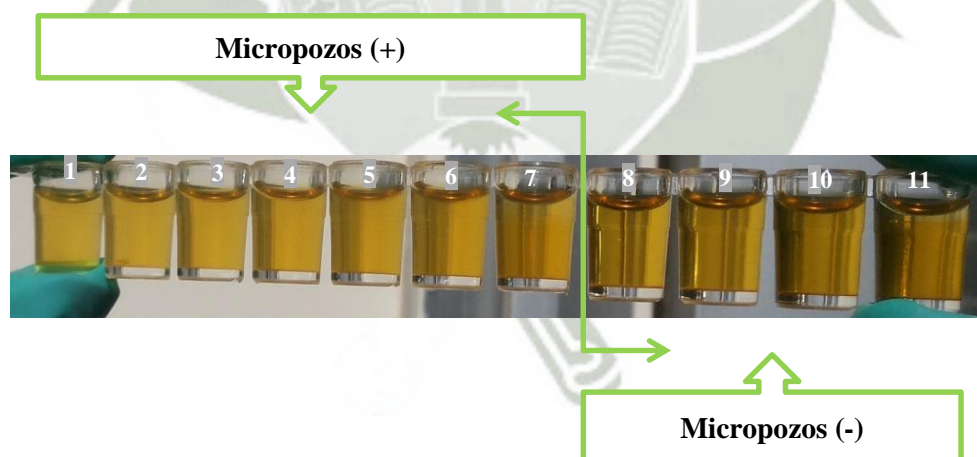


Fig. 38 Ejemplo del punto de corte para la CIM de *Escherichia coli* (HRHDE)

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 17. CBM de la oleorresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para *Escherichia coli*.

Sección en la placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Escherichia coli</i> ATCC (8739)	D	D	D	D	D	D	D	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> (HRHDE)	D	D	D	D	D	D	D	+	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> (UCSM)	D	D	D	D	D	+	+	+	-	-	-

D: Descartado (hubo crecimiento en la CIM y para la CBM no se toma)

+: Placa con crecimiento Bacteriano

-: Placa sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 17 se observan los resultados de la CBM de diferentes cepas de *Escherichia coli*, donde el punto de corte es diferente para las bacterias en ensayo; teniendo como resultado de la CBM la concentración de 150 mg/ml, 140 mg/ml y 130mg/ml respectivamente; Para la oleorresina de “jengibre”, obtenida con el equipo de extracción Soxhlet.

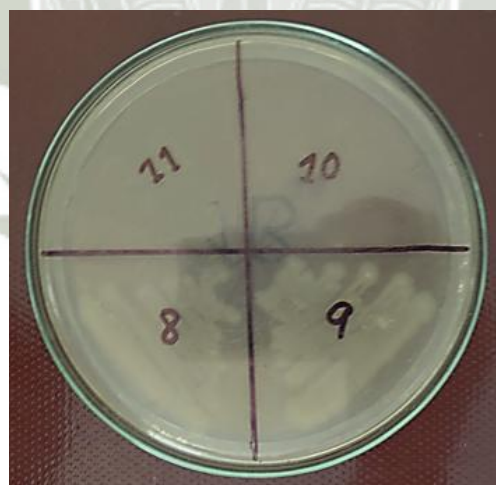


Fig. 39 Ejemplo del punto de corte en placa para la CBM de *Escherichia coli* (HRHDE)

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 18. CIM de la oleorresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para *Staphylococcus aureus*.

Micropozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (6538)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (HRHDE)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UCSM)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+: Micropozo con crecimiento Bacteriano

-: Micropozo sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla **18** se observan los resultados de la CIM de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, utilizando como agente antimicrobiano la oleorresina de “jengibre”, obtenida con el equipo de extracción Soxhlet. Se puede notar que el punto de corte es el mismo para todas las bacterias en ensayo, teniendo como resultado de la CIM la concentración de 120 mg/ml respectivamente.

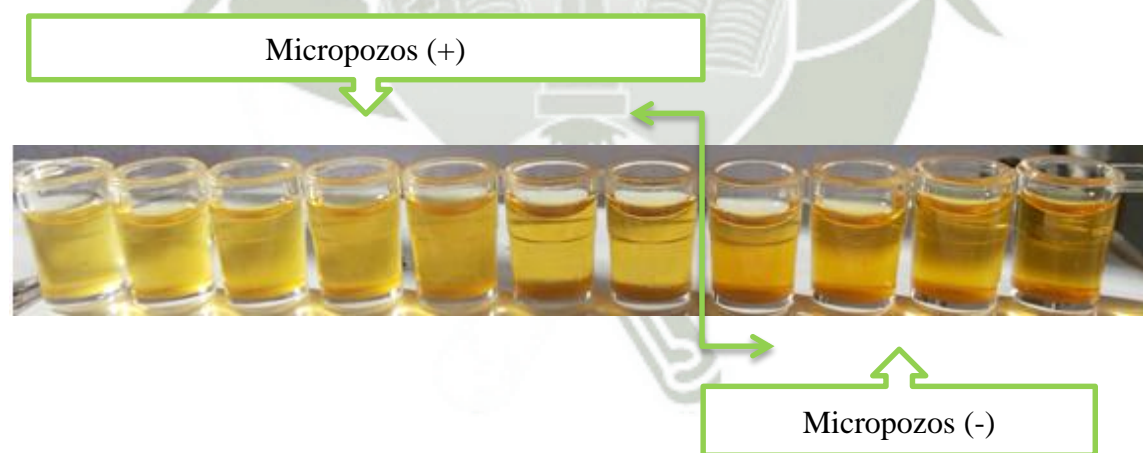


Fig. 40 Ejemplo del punto de corte para la CIM de *Staphylococcus aureus* (UCSM)

Fuente: Elaboración Propia

Tabla 19. CBM de la oleoresina de jengibre obtenida con el equipo de extracción Soxhlet para *Staphylococcus aureus*.

Sección en la placa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Concentración (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Cepas											
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (6538)	D	D	D	D	D	D	D	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (HRHDE)	D	D	D	D	D	D	D	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UCSM)	D	D	D	D	D	D	D	+	+	-	-

D: Descartado (hubo crecimiento en la CIM y para la CBM no se toma)

+: Placa con crecimiento Bacteriano

-: Placa sin crecimiento Bacteriano

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 19 se observan los resultados de la CBM de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, donde el punto de corte es el mismo para las bacterias en ensayo; teniendo como resultado de la CBM la concentración de 140 mg/ml respectivamente; para la oleoresina de “jengibre”, obtenida con el equipo de extracción Soxhlet.



Fig.41 Ejemplo del punto de corte en placa para la CBM de *Staphylococcus aureus* (UCSM)

Fuente: Elaboración Propia

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.8.1. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CIM DE *ESCHERICHIA COLI*.

En la tabla N° 20 se muestran los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de diferentes cepas de *Escherichia coli*. Para determinar si existe diferencia en la inhibición del desarrollo del microorganismo en estudio, respecto a los métodos de extracción empleados; Se procede a hacer el siguiente análisis estadístico.

Tabla 20 Concentración inhibitoria mínima para *Escherichia Coli*

BACTERIA	CIM (mg/ml)	
	FSC	SOXHLET
E. coli ATCC (8739)	110	120
E. coli Hospital (HRHDE)	110	120
E. coli Laboratorio (UCSM)	110	100

Fuente: Elaboración propia

PLANTEO DE HIPÓTESIS

H_0 : FSC = Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta el mismo efecto respecto a la (CIM) que el método de extracción por Soxhlet.

H_1 : FSC > Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta mejor efecto respecto a la (CIM) que el método de extracción por Soxhlet.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 21 se observan los datos correspondientes al análisis estadístico (t-*pareado*), obteniéndose una probabilidad de 0,333 siendo mayor a 0,05; se concluye que, no hay diferencia significativa respecto a la concentración inhibitoria mínima (CIM) entre las oleorresinas de “jengibre” obtenidas por Fluidos Supercríticos y por el método de extracción por Soxhlet. Por lo tanto las oleorresinas extraídas por ambos métodos producen un mismo efecto bacteriostático frente a las cepas de *Escherichia coli*.

Tabla 21 Test t-pareado respecto a la CIM para cepas de *Escherichia coli*.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Soxhlet	FSC
Media	113.3	110
Varianza	133.3	0
Observaciones	3	3
Coeficiente de correlación de Pearson	0	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	0.5	
P(T<=t) una cola	0.333	
Valor crítico de t (una cola)	2.920	
P(T<=t) dos colas	0.667	
Valor crítico de t (dos colas)	4.303	

Fuente: Elaboración propia

3.8.2. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CBM DE *ESCHERICHIA COLI*.

En la tabla N° 22 se muestran los resultados de la concentración bactericida mínima (CBM) de diferentes cepas de *Escherichia coli*. Para determinar si existe diferencia en la capacidad de inducir la muerte in vitro del microorganismo en estudio, respecto a los métodos de extracción empleados; Se procede a hacer el siguiente análisis estadístico.

Tabla 22 Concentración bactericida mínima para *Escherichia Coli*

CBM (mg/ml)		
BACTERIA	FSC	SOXHLET
E. coli ATCC (8739)	130	150
E. coli Hospital (HRHDE)	140	140
E. coli Laboratorio (UCSM)	130	130

Fuente: Elaboración propia

PLANTEO DE HIPÓTESIS

H_0 : FSC = Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta el mismo efecto respecto a la (CBM), que el método de extracción por Soxhlet.

H_1 : FSC > Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta mejor efecto respecto a la (CBM), que el método de extracción por Soxhlet.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 23 se observan los datos correspondientes al análisis estadístico (t-pareado), obteniéndose una probabilidad de 0,211 siendo mayor a 0,05; se concluye que, no hay diferencia significativa respecto a la concentración bactericida mínima (CBM) entre las oleorresinas de “jengibre” obtenidas por Fluidos Supercríticos y por el método de extracción por Soxhlet. Por lo tanto las oleorresinas extraídas por ambos métodos producen un mismo efecto bactericida frente a las cepas de *Escherichia coli*.

Tabla 23 Test t-pareado respecto a la CBM para cepas de *Escherichia coli*.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Soxhlet	FSC
Media	140	133.3
Varianza	100	33.3
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	1	
P(T<=t) una cola	0.211	
Valor crítico de t (una cola)	2.920	
P(T<=t) dos colas	0.423	
Valor crítico de t (dos colas)	4.303	

Fuente: Elaboración propia

3.8.3. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CIM DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

En la tabla N° 24 se muestran los resultados de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* Para determinar si existe diferencia en la inhibición del desarrollo del microorganismo en estudio, respecto a los métodos de extracción empleados; Se procede a hacer el siguiente análisis estadístico.

Tabla 24 Concentración inhibitoria mínima para *Staphylococcus aureus*

CIM (mg/ml)		
BACTERIA	FSC	SOXHLET
S. aureus ATCC (6538)	100	120
S. aureus Hospital (HRHDE)	100	120
S. aureus Laboratorio (UCSM)	100	120

Fuente: Elaboración propia

PLANTEO DE HIPÓTESIS

H₀: FSC = Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta el mismo efecto respecto a la (CIM), que el método de extracción por Soxhlet.

H_i: FSC > Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta mejor efecto respecto a la (CIM), que el método de extracción por Soxhlet.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 25 se observan los datos correspondientes al análisis estadístico (t-
pareado), obteniéndose una probabilidad de 1.39×10^{-6} siendo menor a 0,05; se
concluye que, si hay diferencia significativa respecto a la concentración inhibitoria
mínima (CIM) entre las oleorresinas de “jengibre” obtenidas por Fluidos
Supercríticos (FSC) y por el método de Soxhlet. Por lo tanto la oleorresina extraída
por el método de Fluidos Supercríticos produce un efecto bacteriostático superior al
producido por la oleorresina extraída por el método de extracción por Soxhlet,
frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*

Tabla 25 Test t-pareado respecto a la CIM para cepas de *Staphylococcus aureus*

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Soxhlet	FSC
Media	119.97	100
Varianza	0.003	0
Observaciones	3	3
Coeficiente de correlación de Pearson	0	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	599	
P(T<=t) una cola	1.394E-06	
Valor crítico de t (una cola)	2.920E+00	
P(T<=t) dos colas	2.787E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	4.303E+00	

Fuente: Elaboración propia

3.8.4. PLANTEO DE LA HIPOTESIS CORRESPONDIENTE A LA CBM DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

En la tabla N° 26 se muestran los resultados de la concentración bactericida mínima (CBM) de diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* Para determinar si existe diferencia en la capacidad de inducir la muerte in vitro del microorganismo en estudio, respecto a los métodos de extracción empleados; Se procede a hacer el siguiente análisis estadístico.

Tabla 26 Concentración bactericida mínima para *Staphylococcus aureus*

CBM (mg/ml)		
BACTERIA	FSC	SOXHLET
S. aureus ATCC (6538)	100	120
S. aureus Hospital (HRHDE)	100	120
S. aureus Laboratorio (UCSM)	100	120

Fuente: Elaboración propia

PLANTEO DE HIPÓTESIS

H_0 : FSC = Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta el mismo efecto respecto a la (CBM), que el método de extracción por Soxhlet.

H_i : FSC > Soxhlet.- La oleorresina obtenida por el método de fluidos supercríticos presenta mejor efecto respecto a la (CBM), que el método de extracción por Soxhlet.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 27 se observan los datos correspondientes al análisis estadístico (t-pareado), obteniéndose una probabilidad de 1.39×10^{-6} siendo menor a 0,05; se concluye que, si hay diferencia significativa respecto a la concentración bactericida mínima (CBM) entre las oleorresinas de “jengibre” obtenidas por Fluidos Supercríticos (FSC) y por el método de Soxhlet. Por lo tanto la oleorresina extraída por el método de Fluidos Supercríticos produce un efecto bactericida superior al producido por la oleorresina extraída por el método de extracción por Soxhlet, frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*

Tabla 27 Test t-pareado respecto a la CBM para cepas de *Staphylococcus aureus*

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	Soxhlet	FSC
Media	139.97	120
Varianza	0.003	0
Observaciones	3	3
Coeficiente de correlación de Pearson	0	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	599	
P(T<=t) una cola	1.394E-06	
Valor crítico de t (una cola)	2.920E+00	
P(T<=t) dos colas	2.787E-06	
Valor crítico de t (dos colas)	4.303E+00	

Fuente: Elaboración propia

IV. CONCLUSIONES

- 1) Los parámetros óptimos para la extracción con Fluidos supercríticos fueron:
Presión = 250 bar
Temperatura = 50 °C
Flujo = 8 ml/seg.
Tiempo Estático = 20 minutos
Tiempo Dinámico = 10 minutos
Tiempo de extracción total = 3 horas
- 2) Mediante el método de extracción por Fluidos Supercríticos se obtuvo un rendimiento de 5.2%, mientras que para el método de Soxhlet fue de 2.14%.
- 3) En la caracterización por Cromatografía en capa fina, se pudo observar que los principales componentes de las oleorresinas de jengibre son los gingeroles, shogaoles y sesquiterpenos.
- 4) La oleorresina de jengibre, obtenida con Dióxido de carbono supercrítico presenta efecto antimicrobiano; pues a concentraciones específicas se obtuvo una acción bacteriostática y bactericida frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- 5) las oleorresinas de “jengibre” obtenidas por ambos métodos (Fluidos Supercríticos y Soxhlet), producen un mismo efecto bacteriostático y bactericida frente a las cepas de *Escherichia coli*; mientras que para las cepas de *Staphylococcus aureus* la oleorresina obtenida por Fluidos Supercríticos produjo un efecto bacteriostático y bactericida superior.

V. SUGERENCIAS

- 1) Realizar más investigaciones con el equipo de Fluidos Supercríticos para corroborar sus múltiples ventajas sobre otros métodos de extracción.
- 2) Realizar estudios microbiológicos más amplios; con otras bacterias, hongos y levaduras para conocer la susceptibilidad de estos microorganismos frente al *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”
- 3) Realizar una cuantificación de gingeroles en extractos de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre” obtenidos por diferentes métodos.
- 4) Realizar una cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, para dilucidar mejor todos los componentes presentes en los extractos de *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”.
- 5) Continuar con la investigación de otros efectos farmacológicos importantes que pudiera presentar el *Zingiber officinale Roscoe* “jengibre”.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Aguay, M.P. (2012). *Evaluación De La Actividad Antiinflamatoria De La Mezcla De Extractos Fluidos de jengibre (Zingiber officinale), tomillo (Thymus vulgaris l.), romero (Rosmarinus officinale) mediante el test de edema inducido en ratas (Rattus novergicus)*. (Tesis para optar el Título Profesional). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba- Ecuador
2. Amaguayo, S.A. (2013). *Elaboración de tabletas adelgazantes a partir de tres plantas existentes en la provincia de Chimborazo a escala piloto*. (Tesis para optar el Título Profesional) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba- Ecuador
3. Blanco, C.A., Gómez, M., Ronda, F., Caballero, P.A. (2006). *Técnicas avanzadas de procesado y conservación de alimentos*. (1ª Ed.). recuperado de <http://www.agapea.com/libros/tecnicas-avanzadas-de-procesado-y-conservacion-de-alimentos-9788484483632-i.htm>
4. Bruneton, J. (2001) *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales* (2ª Ed.). España: Acribia, S.A.
5. Cañigüeral, S. (Febrero 2003). Jengibre, *Zingiber officinalis* Roscoe (Zingiberaceas). *Farmacia Práctica. Plantas Medicinales Y Drogas Vegetales*, 22 (2), 167-168.
6. Ciani, G., Chancalay, G., Girotti, A., Glusman, A. & Pacheco, M. L. (2002). Extracción de aceites con fluidos supercríticos. *Invenio*, 5(9), 125-130. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87750911>
7. Cromer, A. (1981). *Física para las ciencias de la vida* (2ª Ed.). España: Reverté S.A.
8. Dávila del Carpio, G. (2012) Curso: *Extracción Con Fluidos Supercríticos*. Dictado en la Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú.
9. De Fréitez Y. H., Páez de Cásares J. (2004). Anatomía foliar comparada de plantas de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivadas en tres ambientes de crecimiento. *Bioagro*, 16 (1), 27-30.
10. De Lucas, A., Villaseñor, J., Lobato, J. (2004). *Termotecnia básica para ingenieros químicos: Bases de termodinámica aplicada*. España: Universidad de Castilla.

11. Domínguez, L., Parzanese, M. (2013). Tecnologías para la industria alimentaria: Fluidos supercríticos. *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina*, 15 (1), 7-9.
12. Donald, O., Walt, L. (2006) *Alternative medicine Christian Handbook* (2ª Ed.). Michigan, USA: Zondervan.
13. Duarte, A. R. C., Duarte, C. M. M. (2009). *Current Trends of Supercritical Fluid Technology in Pharmaceutical, Nutraceutical and Food Processing Industries*. Lisboa, Portugal: Bentham Science Publishers.
14. Enriquez A.M., Prieto, E.P., De Los Rios, E. (2008) Estudio Farmacognóstico y Fitoquímico del rizoma de *Zingiber officinale* roscoe "jengibre" de la ciudad de Chanchamayo - Región Junín. Perú. *Rev. Med. Vallejana*, 5 (1), 50-64.
15. Fonnegra R.G., Jimenez S.L. (2007) *Plantas medicinales aprobadas en Colombia* (2ª Ed.). Colombia: Universidad de Antioquia.
16. Forbes, B A., Sahm, D F. (2009) *Bailey & Scott's Diagnostico Microbiológico* (12ª Ed.). Madrid, España: Panamericana.
17. García, J. A., Picazo, J.J. (1998) *Microbiología Medica* (1ª Ed.). Madrid, España: Brace.
18. Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2010) "Supercritical fluid extraction: Recent Advances and Applications". *Journal of Chromatography A*, 1217 (16), 2495-2511. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309018056>
19. Ibarz, A., Barbosa-Cánovas, G.V. (2005). *Colección tecnología de alimentos: Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos* (1ª Ed.). España: Mundi-Prensa.
20. Jahn, G.B. (2004). *Extração supercrítica do óleo de farelo de arroz e obtenção de frações enriquecidas em γ -orizanol*. (Tesis de posgrado) Universidad Federal de Santa Catarina. Brasil.
21. Jessop, P.G.; Leitner, W. (1999). *Chemical synthesis using supercritical fluids*. Alemania: Wiley-VCH.
22. Kuklinski C. (2000) *Farmacognosia, Estudio de Las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural*. Barcelona, España: Omega, S.A.
23. Koneman, E.W. (2006) *Diagnostico Microbiológico Texto y Atlas en color* (6ª Ed.). Madrid, España: Médica panamericana.

24. Leyva M. A., Ferrada P. J., Martínez J. R., Stashenko E. E. (2007) Rendimiento y composición química del aceite esencial de zingiber officinale en función del diámetro de Partícula. *Scientia Et Technica*, 8(33), 187-1188.
25. Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M., Tena, M.T. (1993). *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. (1ª Ed.). Barcelona, España: Reverté S.A.
26. Mesomo, M.C., Scheer, A.P., Perez, E., Ndiaye, P. M., Corazza, M. L. (2012) Ginger (*Zingiber officinale* R.) Extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 71, Pag. 102-109. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844612002550>
27. Mesomo, M.C., Corazza, M.L., Ndiaye, P. M., Dalla Santa, O. R., Cardozo, L. Scheer, A.P. (2013) Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, Vol. 80, Pages 44-49. Recuperado de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844613001290>
28. Mesomo, M.C. (2013) *Obtenção De Extrato De Gengibre (Zingiber Officinale Roscoe) Usando Co2 Supercrítico E Propano Comprimido: Cinética De Extração E Atividade Biológica*". (Tesis De Postgrado). Universidad De Paraná. Curitiba, Brasil.
29. Obando, Y.A., Quintero, Y.A. (2009) *Elaboración de un Producto Soluble A Base De Jengibre (Zingiber Officinale Roscoe) Saborizada Con Limoncillo (Cimbopogon Citratus)* (Tesis para optar el título profesional). Universidad Tecnológica De Pereira. Colombia.
30. Oomah, B.D., Mazza, G. (2000) *Herbs, Botanicals and Teas, Functional Foods and Nutraceuticals Series*. (1ª Ed.). USA: CRC Press
31. Pahissa, A., (2009) *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus* (1ª Ed.). Barcelona, España: Marge medica books.
32. Pascual, M. R., Calderón, V. (1999) *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica Para Alimentos Y Bebidas* (2ª Ed.). Madrid, España: Díaz de santos.
33. Pederssetti, M.M. (2008). *Análise dos efeitos da temperatura e pressão na extração supercrítica do óleo essencial de canola com dióxido de carbono*

- supercrítico e n-propano pressurizado*. (Tesis de Postgrado). Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste. Brasil.
34. Ponce, M.F., Alberto, O.B. (2013) *Aplicación tecnológica del dióxido de carbono supercrítico para la extracción de aceite de polvillo de arroz (Oryza sativa L.)*.(Tesis para optar el título Profesional). Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú.
 35. Poonam G. D., Brijesh, S. Pundarikakshudu T., Noshir, H. A. & Tannaz J. B. (2010) Antidiarrhoeal activity of *Zingiber officinale* (Rosc.). *Current Science*, 98 (2), 25-30.
 36. Prescott, M. (2002) *Microbiología* (5ª ed.). USA: McGraw Hill
 37. Raventós, M. (2005). *Industria alimentaria: Tecnologías emergentes* (1ª ed.). España: Universidad Politécnica de Catalunya.
 38. Ravindran, P.N., Nirmal, B.K. (2004) *Ginger: The Genus Zingiber*. (1ª ed.). USA: CRC Press.
 39. Reyes-Najar, A. (2011) Obtención De Extractos De Jengibre (*Zingiber Officinale*) Empleando Co2 Supercrítico.*Rev. acad. colomb. cienc. exact. fis. Nat.*, 35(136), 381-385.
 40. Romero, L. (2007) *Microbiología Y Parasitología Humana: Bases Etiológicas De Las Enfermedades Infecciosas Y Parasitarias* (3ª Ed.). México: Panamericana-UNAM.
 41. Ross I. A. (2010) *Medicinal Plants of the World, Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses*. (2ª Ed.). USA: Humana Press.
 42. Rostagno, M.A., Prado, J.M., Kraus, G.A. (2013). Natural product extraction: Principles and applications. *RSC Green Chemistry Series. Royal Society of Chemistry*. 1(21), 60, 63-65, 203.
 43. Sánchez, J.A., Marfil, R., Jodral, L. M. (2009) *Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino*. (1ª Ed.) Madrid, España: Díaz de Santos.
 44. Sarkar, A. (2009) *Herbal toxicology* (1ª Ed.) India: Discovery Publishing.
 45. Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I. (2006). *Natural products isolation, Methods in biotechnology*. (2ª Ed.). EE.UU.: Humana Press Inc.
 46. Shen, Z. (1998). *The use of dense carbon dioxide extraction and fractionation to recover and refine natural food ingredients from food processing wastes*. (1ª Ed.). Australia: Victoria University of Technology.

47. Silva, D.C. (2004). *Determinação experimental de parâmetros de processo na extração supercrítica de óleo essencial de carqueja (Baccharis trimera Less)*. (Tesis de postgrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Brasil.
48. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. (6ª Ed.). México: Cengage Learning Editores, S.A. de C.V.
49. Sousa, E. M. (2001). *Construção e utilização de um dispositivo de extração com fluido pressurizado, aplicado a produtos naturais*. (Tesis de Postgrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Brasil.
50. Stephen, F. (1998) *El Libro del Jengibre*. (1ª Ed.). Barcelona, España: Martínez Roca.
51. Supercritical Fluid Extractor SFT (2007) User documentation. manual de uso.
52. Taroco, R., Seija, V., Vignoli, R. (2002) *Métodos De Estudio De La Sensibilidad Antibiótica*. Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
53. Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007) *Introducción a la microbiología* (9ª Ed.). EE.UU.: Editorial Médica Panamericana.
54. Vásquez, O., Alenguer, A., Marreros, J. (2001) Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *Alimentaria*, 1(1), 38-42.
55. Velasco, R.J., Villada, H.S., Carrera, J.E. (2007). Aplicación de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Información Tecnológica*, 18 (1), 53 57.
56. Wagner, H., Bladt, S. (2001) *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2ª ED). EE.UU.: Springer
57. Zanabria, D. (2012) *Extracción de aceite de las semillas de Plukenetia volubilis L. (sacha inchi) por fluidos supercríticos FSC y determinación de los ácidos grasos linoleicos, linoleico y oleico por cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC*. (Tesis para optar el título Profesional). Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú.



VII. ANEXOS

Anexo 1.

Certificado de Reconocimiento de la especie Botánica



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA Nº 20 -2014-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra fresca correspondiente al rizoma de la planta, procedente de Mi Mercado presentada por la Bachiller **Vargas Aguilar Vannesa Nelly** egresada de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas, de la Universidad Católica de Santa María, para realizar su Tesis sobre “Efecto antimicrobiano del extracto del rizoma de Jengibre obtenido por fluidos supercríticos”. La muestra fue traída para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) corresponden a la siguiente especie:

Especie: *Zingiber officinale* Roscoe

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen conveniente.

Arequipa 11 de Setiembre del 2014

Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)



Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

Anexo 2.

Base de Datos de Nutrientes: USDA

USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 26

Full Report (All Nutrients) 11216, Ginger root, raw

Report Date: April 25, 2014 14:02 EDT

Nutrient values and weights are for edible portion

Food Group : Vegetables and Vegetable Products

Carbohydrate Factor: 3,84 Fat Factor: 8,37 Protein Factor: 2,78 Nitrogen to Protein Conversion Factor: 6,25

Refuse: 7% Refuse Description: Scrapings

Nutrient	Unit	1 Value Per 100 g	Data points	Std. Error	1.0 tsp 2g	0.25 cup slices (1" dia) 24g	5.0 slices (1" dia) 11g
Proximates							
Water	g	78.89	5	--	1.58	18.93	8.68
Energy	kcal	80	--	--	2	19	9
Energy	kJ	333	--	--	7	80	37
Protein	g	1.82	5	--	0.04	0.44	0.20
Total lipid (fat)	g	0.75	3	--	0.02	0.18	0.08
Ash	g	0.77	2	--	0.02	0.18	0.08
Carbohydrate, by difference	g	17.77	--	--	0.36	4.26	1.95
Fiber, total dietary	g	2.0	--	--	0.0	0.5	0.2
Sugars, total	g	1.70	--	--	0.03	0.41	0.19
Minerals							
Calcium, Ca	mg	16	3	--	0	4	2
Iron, Fe	mg	0.60	3	--	0.01	0.14	0.07
Magnesium, Mg	mg	43	2	--	1	10	5
Phosphorus, P	mg	34	3	--	1	8	4
Potassium, K	mg	415	2	--	8	100	46
Sodium, Na	mg	13	2	--	0	3	1
Zinc, Zn	mg	0.34	1	--	0.01	0.08	0.04
Copper, Cu	mg	0.226	1	--	0.005	0.054	0.025
Manganese, Mn	mg	0.229	1	--	0.005	0.055	0.025
Selenium, Se	µg	0.7	--	--	0.0	0.2	0.1
Vitamins							

Nutrient	Unit	1 Value Per100 g	Data points	Std. Error	1.0 tsp 2g	0.25 cup slices (1" dia) 24g	5.0 slices (1" dia) 11g
14:0	g	0.018	1	--	0.000	0.004	0.002
16:0	g	0.120	1	--	0.002	0.029	0.013
18:0	g	0.017	1	--	0.000	0.004	0.002
Fatty acids, total monounsaturated	g	0.154	--	--	0.003	0.037	0.017
16:1 undifferentiated	g	0.021	1	--	0.000	0.005	0.002
18:1 undifferentiated	g	0.119	1	--	0.002	0.029	0.013
20:1	g	0.007	1	--	0.000	0.002	0.001
22:1 undifferentiated	g	0.000	--	--	0.000	0.000	0.000
Fatty acids, total polyunsaturated	g	0.154	--	--	0.003	0.037	0.017
18:2 undifferentiated	g	0.120	1	--	0.002	0.029	0.013
18:3 undifferentiated	g	0.034	1	--	0.001	0.008	0.004
18:4	g	0.000	--	--	0.000	0.000	0.000
20:4 undifferentiated	g	0.000	--	--	0.000	0.000	0.000
20:5 n-3 (EPA)	g	0.000	--	--	0.000	0.000	0.000
22:5 n-3 (DPA)	g	0.000	--	--	0.000	0.000	0.000
22:6 n-3 (DHA)	g	0.000	--	--	0.000	0.000	0.000
Cholesterol	mg	0	1	--	0	0	0
Phytosterols	mg	15	1	--	0	4	2
Amino Acids							
Tryptophan	g	0.012	1	--	0.000	0.003	0.001
Threonine	g	0.036	1	--	0.001	0.009	0.004
Isoleucine	g	0.051	1	--	0.001	0.012	0.006
Leucine	g	0.074	1	--	0.001	0.018	0.008
Lysine	g	0.057	1	--	0.001	0.014	0.006
Methionine	g	0.013	1	--	0.000	0.003	0.001
Cystine	g	0.008	1	--	0.000	0.002	0.001
Phenylalanine	g	0.045	1	--	0.001	0.011	0.005
Tyrosine	g	0.020	1	--	0.000	0.005	0.002
Valine	g	0.073	1	--	0.001	0.018	0.008
Arginine	g	0.043	1	--	0.001	0.010	0.005
Histidine	g	0.030	1	--	0.001	0.007	0.003
Alanine	g	0.031	1	--	0.001	0.007	0.003
Aspartic acid	g	0.208	1	--	0.004	0.050	0.023

Nutrient	1		Data points	Std. Error	1.0 tsp 2g	0.25 cup slices 24g	5.0 slices (1" dia) 11g
	Unit	Value Per100 g					
Glutamic acid	g	0.162	1	--	0.003	0.039	0.018
Glycine	g	0.043	1	--	0.001	0.010	0.005
Proline	g	0.041	1	--	0.001	0.010	0.005
Serine	g	0.045	1	--	0.001	0.011	0.005
Other							
Alcohol, ethyl	g	0.0	--	--	0.0	0.0	0.0
Caffeine	mg	0	--	--	0	0	0
Theobromine	mg	0	--	--	0	0	0

Language Code(s)

- A0113 SPICE OR HERB (US CFR)
- A1281 1100 VEGETABLES AND VEGETABLE PRODUCTS (USDA SR)
- B1265 GINGER
- C0240 ROOT, TUBER OR BULB, WITHOUT PEEL
- E0150 WHOLE, NATURAL SHAPE
- F0003 NOT HEAT-TREATED
- G0003 COOKING METHOD NOT APPLICABLE
- H0003 NO TREATMENT APPLIED
- J0001 PRESERVATION METHOD NOT KNOWN
- K0003 NO PACKING MEDIUM USED
- M0001 CONTAINER OR WRAPPING NOT KNOWN
- N0001 FOOD CONTACT SURFACE NOT KNOWN
- P0024 HUMAN FOOD, NO AGE SPECIFICATION

Anexo 3.

Propiedades Físicas de Disolventes Comúnmente Usados Como Fluidos Supercríticos

Nomenclatura IUPAC	Fórmula química	Masa molecular (g/mol)	Temperatura crítica ¹		Presión crítica ²			Densidad crítica (g/cm ³)
			(K)	(°C)	(bar)	(atm)	(psi)	
Metano	CH ₄	16.04	190.6	-82.6	46.0	46.6	667.2	0.162
Etileno	C ₂ H ₄	28.05	282.4	9.3	50.3	51.3	729.5	0.218
Propeno	C ₂ H ₆	42.08	365.0	91.9	46.2	47.1	670.1	0.233
Etano	C ₂ H ₆	30.07	305.4	32.3	48.8	49.5	707.8	0.203
Propano	C ₃ H ₈	44.09	369.8	96.7	42.5	43.1	616.4	0.217
n-Butano	C ₄ H ₁₀	58.12	425.2	152.1	38.0	38.5	551.1	0.228
n-Pentano	C ₅ H ₁₂	72.15	469.6	196.5	33.7	34.1	488.8	0.237
n-Hexano	C ₆ H ₁₄	86.18	507.4	234.3	30.1	30.5	436.6	0.230
Acetona	C ₃ H ₆ O	58.08	508.1	235.0	47.0	47.6	681.7	0.278
Metanol	CH ₄ O	32.04	513.1	240.0	80.9	82.0	1173.4	0.272
Etanol	C ₂ H ₆ O	46.07	516.2	243.1	61.4	62.2	890.5	0.276
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	60.10	508.8	235.7	47.6	48.2	690.4	0.273
Tolueno	C ₇ H ₈	92.14	591.7	318.6	41.1	41.9	596.1	0.292
Dióxido de carbono	CO ₂	44.01	304.2	31.1	73.8	74.8	1070.4	0.468
Amoniaco	NH ₃	17.03	405.4	132.3	113.5	115.0	1646.2	0.235
Oxido nitroso	N ₂ O	44.01	309.6	36.5	72.4	73.4	1050.1	0.453
Xenón	Xe	131.30	289.7	16.6	58.4	59.2	847.0	1.110
Agua	H ₂ O	18.02	647.4	374.3	221.2	224.1	3208.2	0.320
Hexafluoruro de azufre	SF ₆	146.05	318.7	45.6	37.6	38.1	545.3	0.740
Benceno	C ₆ H ₆	78.11	562.2	289.1	48.9	49.5	709.2	0.302

¹ La temperatura crítica se representa en dos unidades distintas.

² La presión crítica se representa en tres unidades distintas.


Fuente: McHardy y Sawan (1998), Shen (1998) y Blanco *et al.*, (2006)



Anexo 4. Certificados de las Bacterias ATCC





Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-357 Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2		Expiration Date: 2015/11 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2013/12/5																																																																																																
Performance																																																																																																		
Macroscopic Features: Medium to large, gray, mucoid, convex. Microscopic Features: Gram negative straight rod.		Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)																																																																																																
Vitek GN (1) <table border="1"> <thead> <tr> <th>Phenotypic Features</th> <th>Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ADONITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-ARABITOL</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-CELLOBIOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>H2S PRODUCTION</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Glutamyl Arylamidase pNA</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-GLUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>FERMENTATION/GLUCOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-XYLOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>BETA-Alanine arylamidase pNA</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>LIPASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>PALATINOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td>+</td></tr> <tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-TAGATOSE</td><td>-</td></tr> <tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr> <tr><td>CITRATE (SODIUM)</td><td>-</td></tr> <tr><td>MALONATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>5-KETO-D-GLUCONATE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td>+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>SUCCINATE alkalization</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>Glycine ARYLAMIDASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>ORNITHINE DECARBOXYLASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>LYSINE DECARBOXYLASE</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-HISTIDINE assimilation</td><td>-</td></tr> <tr><td>COURMARATE</td><td>+</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCORONIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td>+</td></tr> <tr><td>Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE</td><td>-</td></tr> <tr><td>L-MALATE assimilation</td><td>-</td></tr> <tr><td>ELLMAN</td><td>+</td></tr> <tr><td>L-LACTATE assimilation</td><td>-</td></tr> </tbody> </table>		Phenotypic Features	Results	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-	ADONITOL	-	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-	L-ARABITOL	-	D-CELLOBIOSE	-	BETA-GALACTOSIDASE	+	H2S PRODUCTION	-	BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-	Glutamyl Arylamidase pNA	-	D-GLUCOSE	+	GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-	FERMENTATION/GLUCOSE	+	BETA-GLUCOSIDASE	-	D-MALTOSE	+	D-MANNITOL	+	D-MANNOSE	+	BETA-XYLOSIDASE	-	BETA-Alanine arylamidase pNA	-	L-Proline ARYLAMIDASE	+	LIPASE	-	PALATINOSE	-	Tyrosine ARYLAMIDASE	+	UREASE	-	D-SORBITOL	+	SACCHAROSE/SUCROSE	-	D-TAGATOSE	-	D-TREHALOSE	+	CITRATE (SODIUM)	-	MALONATE	-	5-KETO-D-GLUCONATE	-	L-LACTATE alkalization	+	ALPHA-GLUCOSIDASE	-	SUCCINATE alkalization	+	BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-	ALPHA-GALACTOSIDASE	+	PHOSPHATASE	+	Glycine ARYLAMIDASE	+	ORNITHINE DECARBOXYLASE	+	LYSINE DECARBOXYLASE	+	L-HISTIDINE assimilation	-	COURMARATE	+	BETA-GLUCORONIDASE	-	O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+	Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-	L-MALATE assimilation	-	ELLMAN	+	L-LACTATE assimilation	-	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive  Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE
Phenotypic Features	Results																																																																																																	
Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
ADONITOL	-																																																																																																	
L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
L-ARABITOL	-																																																																																																	
D-CELLOBIOSE	-																																																																																																	
BETA-GALACTOSIDASE	+																																																																																																	
H2S PRODUCTION	-																																																																																																	
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	-																																																																																																	
Glutamyl Arylamidase pNA	-																																																																																																	
D-GLUCOSE	+																																																																																																	
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	-																																																																																																	
FERMENTATION/GLUCOSE	+																																																																																																	
BETA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																	
D-MALTOSE	+																																																																																																	
D-MANNITOL	+																																																																																																	
D-MANNOSE	+																																																																																																	
BETA-XYLOSIDASE	-																																																																																																	
BETA-Alanine arylamidase pNA	-																																																																																																	
L-Proline ARYLAMIDASE	+																																																																																																	
LIPASE	-																																																																																																	
PALATINOSE	-																																																																																																	
Tyrosine ARYLAMIDASE	+																																																																																																	
UREASE	-																																																																																																	
D-SORBITOL	+																																																																																																	
SACCHAROSE/SUCROSE	-																																																																																																	
D-TAGATOSE	-																																																																																																	
D-TREHALOSE	+																																																																																																	
CITRATE (SODIUM)	-																																																																																																	
MALONATE	-																																																																																																	
5-KETO-D-GLUCONATE	-																																																																																																	
L-LACTATE alkalization	+																																																																																																	
ALPHA-GLUCOSIDASE	-																																																																																																	
SUCCINATE alkalization	+																																																																																																	
BETA-N-ACETYL-GALACTOSAMINIDASE	-																																																																																																	
ALPHA-GALACTOSIDASE	+																																																																																																	
PHOSPHATASE	+																																																																																																	
Glycine ARYLAMIDASE	+																																																																																																	
ORNITHINE DECARBOXYLASE	+																																																																																																	
LYSINE DECARBOXYLASE	+																																																																																																	
L-HISTIDINE assimilation	-																																																																																																	
COURMARATE	+																																																																																																	
BETA-GLUCORONIDASE	-																																																																																																	
O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)	+																																																																																																	
Glu-Gly-Arg-ARYLAMIDASE	-																																																																																																	
L-MALATE assimilation	-																																																																																																	
ELLMAN	+																																																																																																	
L-LACTATE assimilation	-																																																																																																	

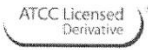



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-357 Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2015/11 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2013/12/5
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>TESTING CERT #2655.01</p>	



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-221 Reference Number: ATCC® 6538™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2</p>	<p>Expiration Date: 2016/01 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2014/2/24</p>
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="289 709 435 758">  </div> <div data-bbox="537 699 1398 735"> <p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 10px;"> <div data-bbox="289 783 488 926">  <p>TESTING CERT #2655,01</p> </div> <div data-bbox="537 783 862 800"> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> </div> </div>	

Anexo 5

Análisis fisicoquímico del jengibre



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA04113.000956

Nombre del Cliente	: VANESSA VARGAS AGUILAR
Dirección del Cliente	: CALLE VIENA 508 SANTA ROSA MARIANO MELGAR
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreo	: POR EL CLIENTE
Descripción	: GENJIBRE SECO
Tamaño de muestra	: 30 g
Fecha de Recepción	: 04/10/2013
Fecha de Inicio del Ensayo	: 05/10/2013
Fecha de Emisión de Informe	: 10/10/2013
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE GRASA (%) Adaptado del Metodo gravimetrico NTP 209.263.2001	5,47

OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-CRT

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DEL LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Anexo 6

Procedimiento Del Manejo Del Equipo De Fluidos Supercríticos

OPERACIONES BÁSICAS PARA UTILIZAR EL EQUIPO DE FLUIDOS
SUPERCRTICOS

1. Asegúrese que los botones en la parte de atrás del extractor y de la bomba estén en OFF (–), así como el botón que está debajo de la pantalla de visualización en la parte delantera de la bomba este en OFF. Las válvulas (manijas de color ROJO y NEGRO) deben estar cerradas, se encuentran en la parte delantera del extractor, se cierran girándolas hacia la derecha de la persona que las manipula. Las palancas de la temperatura del horno y de restricción deben estar también en OFF, se encuentran en la parte delantera del extractor.
2. Enchufe el extractor y la bomba, luego presione el botón en ON en la parte posterior del extractor y de la bomba. Después, presione en ON el botón debajo del visualizador en la parte delantera de la bomba. Finalmente mueva hacia arriba la palanca de la temperatura de restricción para que cargue hacia la temperatura programada que debe ser de 80 °C.
3. Una vez encendido el equipo, debe permanecer así durante 30 minutos, para que la bomba pueda enfriar el tubo de entrada de CO₂ y los cabezales de la bomba, también previene la vaporización del CO₂ líquido. Mientras transcurren estos 30 minutos, Ud. puede programar los parámetros de su investigación: temperatura del horno, presión y caudal; y también puede colocar la muestra en el contenedor.
4. Programe la temperatura del horno, manteniendo presionado el botón izquierdo y presionando al mismo tiempo el botón con la flecha hacia arriba o el botón con la flecha hacia abajo para aumentar o disminuir, respectivamente, la temperatura según los parámetros de su investigación. Estos botones se encuentran en la pantalla que corresponde a la visualización de la temperatura del horno en la parte delantera del extractor.
5. Programe el caudal, en la parte delantera de la bomba en el visualizador, presione el botón MODE hasta que la luz naranja se desplace a la primera ubicación en la que la luz permanece constante al costado de ml/min. Luego, presione el botón con la flecha hacia arriba o el botón con la flecha hacia abajo para que aumente o disminuya, respectivamente, el caudal que desea programar.
6. Programe la presión, en la parte delantera de la bomba en el visualizador, presione el botón MODE hasta que la luz naranja se desplace a la segunda ubicación en la que la luz permanece constante al costado de psi. Luego, presione el botón con la flecha hacia arriba o el botón con la flecha hacia abajo para que aumente o disminuya, respectivamente, la presión que desea programar.
7. El siguiente procedimiento describe como colocar su muestra dentro del contenedor:
 - a. El contenedor de alta presión debe estar a una presión ambiente antes de ser abierto. Para asegurarse de esto, presione el botón MODE en el visualizador de la parte frontal de la bomba para desplazarse a través del menú y confirmar la presión real, que se indicará con la luz naranja intermitente al costado de psi. La presión debe indicar cero (0) psi. Si la lectura indica algún otro dato diferente a cero (0), Ud. debe abrir las válvulas STATIC/DYNAMIC y RESTRICTOR (MANIJAS NEGRA y ROJA, respectivamente)

girándolas hacia la izquierda de la persona que las manipula y permitir a la unidad evacuar completamente. Cuando indique cero (0) psi durante 2 minutos, vuelva a cerrar la válvulas.

- b. Para acceder al contenedor, eleve la cubierta del horno en el extractor y retire los tornillos de forma manual que están en el lateral derecho del gabinete del horno para que retire la tapa cuadrada y pueda tener una mejor manipulación del contenedor. Cuidadosamente desconecte las líneas de entrada y salida de gas del contenedor, desenroscando primero la “tapa” superior por completo, ayudándose del tornillo ajustador central para bajar el contenedor a medida que desenrosque la parte superior. Luego, mueva cuidadosamente esta “tapa” superior hacia un lado del contenedor para que pueda desenroscar la “tapa” inferior por completo, puede subir el contenedor ayudándose del tornillo ajustador central. Retire cuidadosamente el contenedor del gabinete por la entrada lateral derecha del horno para limpiarlo.
- c. Asegúrese que los aros negros de jebes en las roscas de las líneas de entrada y salida de CO₂ estén lubricados con la sustancia blanca que está en un recipiente cerrado dentro de la caja de accesorios del equipo.
- d. Ingrese el contenedor por la parte lateral derecha del horno y cuidadosamente enrosque la “tapa” inferior de forma manual, hasta cerrar esa entrada por completo. Luego, coloque un trozo pequeño de algodón por el extremo abierto del contenedor, y empujelo hacia abajo. Coloque su muestra (el peso es variable) presionando poco a poco, sin mover el contenedor, para que la muestra este compacta y sea mejor la extracción. No debe ensuciar la rosca superior. Deje un espacio prudente después de ingresada su muestra para colocar otro pequeño trozo de algodón en la parte superior del contenedor, debe colocarse dentro del área donde el diámetro del cilindro es más pequeño (por debajo de los agujeros) para que el cerrado sea óptimo. Enrosque cuidadosamente la “tapa” superior de forma manual.
- e. Asegúrese que la línea superior de salida del CO₂ forme 90°.
- f. Cierre la cubierta del horno. Cierre la tapa lateral derecha del horno con sus respectivos tornillos.
8. Transcurridos los 30 minutos iniciales y después de haber hecho todas las operaciones de programación de parámetros y de colocar su muestra en estudio, diríjase hacia el visualizador de la bomba. Presione el botón MODE y seleccione la presión real en psi (luz intermitente naranja) que debe indicar cero (0) psi.
9. Abra la válvula del tanque de CO₂ para que ingrese a la bomba. La presión real en psi se incrementará poco a poco.
10. Después de haber alcanzado una presión real mayor a 740 psi, presione el botón RUN del visualizador de la bomba, se encenderá una luz verde en la parte superior del mismo botón. La presión real se incrementará poco a poco hasta la presión que Ud. programó inicialmente.
11. Una vez alcanzada la presión programada, debe contar el tiempo de saturación de la muestra con CO₂, que es otro parámetro que Ud. establece.

12. Coloque el recipiente receptor del extracto en la parte frontal del extractor. En esta zona se encuentra un tubo delgado que proviene del interior del horno, que expulsará el extracto que estudiará y CO_2 gaseoso residual. Conecte su recipiente receptor con este tubo delgado y con el tubo en 90° que viene del flujómetro externo. El tubo de 90° ayudará en la expulsión del CO_2 residual del recipiente receptor hacia el exterior, colaborará también con una medida del caudal de salida.
13. Finalizado el tiempo de saturación, comience con la extracción. Cuidadosamente abra la válvula STATIC/DYNAMIC (MANIJA NEGRA) girándola por completo hacia la izquierda de la persona que la manipula. Luego, con mayor cuidado aún, abra lentamente la válvula RESTRICTOR hacia la izquierda de la persona que la manipula (MANIJA ROJA) para que pueda salir el extracto y el CO_2 residual. Esta vez, Ud. graduará hasta donde debe abrir la válvula RESTRICTOR, no debe abrirla por completo porque ocasionará accidentes.
14. Debe ser muy cuidadoso al manipular la válvula RESTRICTOR (MANIJA ROJA).
15. Presionen el botón MODE del visualizador de la bomba para que pueda tomar nota del caudal real y de la presión real a medida que transcurre el tiempo.
16. Finalizado el tiempo de extracción, cierre primero la válvula del tanque de CO_2 , luego presione RUN en el visualizador de la bomba, se apagará la luz verde.
17. Puede retirar su el recipiente receptor del extracto.
18. Coloque otro recipiente receptor en la misma zona de recepción del extracto y conectado también al flujómetro.
19. Cuidadosamente, abra lentamente la válvula RESTRICTOR (MANIJA ROJA) girándola hacia la izquierda de la persona que la manipula. Esto sirve para eliminar residuos y para descargar el CO_2 residual del contenedor. Poco a poco verá como disminuye la presión real del sistema.
20. Debe llegar a cero (0) psi la presión real y después de 2 minutos de estar así, presionen a OFF el botón que está debajo del visualizador en la bomba.
21. Mueva las palancas a OFF de la temperatura del horno y de restricción.
22. Descargue la muestra del contenedor de la misma manera que hizo para limpiar el contenedor.
23. Limpie el contenedor antes de colocarlo de nuevo al horno.
24. Cierre las válvulas del extractor.
25. Presione en OFF el botón en la parte posterior del extractor y de la bomba.
26. Desenchufe el extractor y la bomba.

Anexo 7

**DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE OLEORRESINA
EXTRAIDA CON LOS PARAMETROS PRELIMINARES**

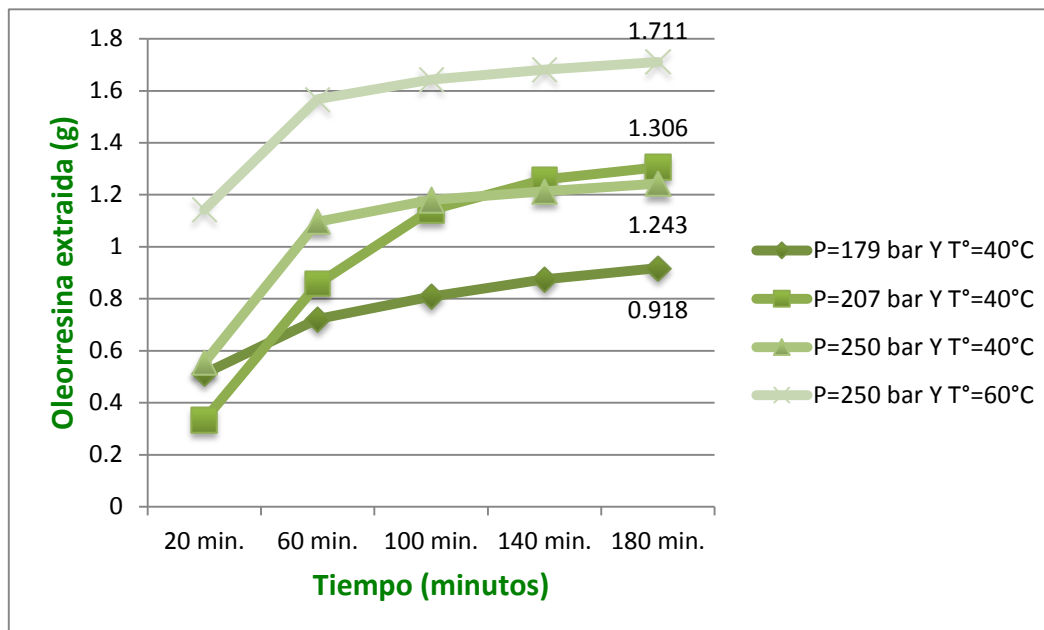


Gráfico 1 Oleorresina extraída en (g), en función del tiempo con diferentes presiones y temperaturas.

En este gráfico se puede observar la cantidad (g) de oleorresina extraída con diferentes parámetros de temperatura y presión, antes de definir las condiciones óptimas de extracción. Se alcanzan valores altos (1.711g) con una presión de 250bar y con una temperatura de 60°C; que casi llega a ser el doble de lo extraído (0.918g) con una presión de 179bar y con una temperatura de 40°C.

Anexo 8

Tabla 28 Preparación de las Microdiluciones

Micropozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Características											
Sol. Madre (µl)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Caldo (µl)	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Inóculo 10 ⁶ (µl)	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
Vol. Final (µl)	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
Cc. Final (mg/ml)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150

Fuente: Elaboración propia

En la tabla **28** se pueden observar los componentes empleados para realizar las microdiluciones como: la Solución Madre (300mg/ml) que se prepara con la oleorresina de jengibre, obtenida con dióxido de carbono supercrítico. O la oleorresina obtenida con el equipo de extracción Soxhlet; esta se mezcla con ayuda de un emulsionante (tween 20) para tener una emulsión agua en aceite (w/o). También se empleó una suspensión de bacterias utilizando la escala de Mac Farland como patrón y caldo peptonado para completar el volumen final de nuestras microdiluciones.

Anexo 9

Modelo de reporte de extracción de la presente investigación

CO2 SUPERCRITICO PARA EXTRACCION DE ACEITE DE POLVILLO DE ARROZ									
Código de extracción:	Hora inicio (hr:min):		Hora fin (hr:min):						
Fecha (dd/mm/aa):	TIEMPO DE EXTRACCION			BOMBA					
Peso de muestra (g):	Estático (min):		20		Presion inicial (psi):				
Vial colector (g):	Dinámico (hr):		4		Presion (psi):				
Algodón (g):	FLUJO								HORNO
Peso final muestra (g):	Flujo interno (ml/min):		24		Temperatura horno (°C):				
	Flujo externo (m3/h):		8		Temperatura restrictir (°C):				
					80				
REGISTRO									
Extracción	Dinámica	Tiempo real	Horno	Bomba	Bomba	Peso Total	Extracto	Parcial	
hr	min	hr:min	°C	ml/min	psi	g	g	g	
1	0								
	5								
	10								
	15								
	20								
	0								
	5								
	10								
	15								
	20								
	0								
	5								
	10								
	15								
	20								
	2	0							
5									
10									
15									
20									
0									
5									
10									
15									
20									
0									
5									
10									
15									
20									
3		0							
	5								
	10								
	15								
	20								
	0								
	5								
	10								
	15								
	20								
	0								
	5								
	10								
	15								
	20								
	4	0							
5									
10									
15									
20									
0									
5									
10									
15									
20									
0									
5									
10									
15									
20									