



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA**

Eficacia antibacteriana de *Zingiber officinale* y *Propolis de Apis mellifera* sobre *Helicobacter pylori* comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Médico Cirujano

AUTORA:

Gabriela Horna Huamán (ORCID: 0000-0001-7643-8445)

ASESORES:

Dra. Goicochea Ríos, Evelyn Del Socorro (ORCID: 0000-0001-9994-9184)

Mg. Blgo. Polo Gamboa, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

TRUJILLO – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía, por darme fortaleza y esperanza, por permitirme ver la grandeza de su creación cada día, por rescatarme de cada una de mis caídas y sanar mis heridas, por haber permitido alcanzar mis sueños y por haber sido la motivación y perseverancia para concluir los estudios.

A mi madre CECILIA DEL PILAR HUAMÁN TORRES, por ser la autora intelectual de mi vida, por su amor abnegado, por haberme permitido nacer, por su entrega, por mostrarme la esencia de la vida, por ser una luchadora incansable y por ser mi motor y motivo.

A mi padre LUIS ALBERTO HORNA ÁVILA, por su amor y comprensión. por ayudarme a alcanzar mis objetivos, por contribuir a mi formación e inculcarme disciplina y valores

A mis hermanos ISOLDA DIANA HORNA HUAMÁN y ALEPH GOB HORNA HUAMÁN por brindarme su apoyo, por brindarme aliento y una mano amiga y sobre todo por ser cómplices en las aventuras de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios, el artífice de mis días, y por fortalecerme ante las adversidades.

A mi madre, mi padre y hermanos, por acompañarme en mis largas jornadas a diario y por sus cuidados en mi vida personal y profesional.

A mis profesores por contribuir a nuestra formación profesional y humanística, por tolerar nuestras ocurrencias y sobre todo por brindarnos ánimo y estímulo para la culminación de los estudios.

A mis asesores Dra. Evelyn Del Socorro Goicochea Ríos y Mg. Blgo. Polo Gamboa, Jaime Abelardo por brindarnos los lineamientos técnicos y operativos para el desarrollo de este trabajo de investigación, así como su dedicación y tolerancia.

A mis compañeros de facultad, con quienes compartí momentos inolvidables gracias por su amistad, en especial a Maricielo, Zoila, Diana, Kharol y Marcos.

A mis amigos, compañeros de trabajo y pacientes, por sus buenos deseos, por su apoyo y por permitirme trabajar en equipo en la búsqueda del bienestar del prójimo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	12
III. METODOLOGÍA	16
3.1. Tipo y diseño de investigación	16
3.2. Variables y operacionalización	16
3.3. Población, muestra.....	17
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	17
3.5. Procedimiento	17
3.6. Método de análisis de datos.....	19
3.7. Aspectos éticos	19
IV. RESULTADOS.....	20
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES	32
VII. RECOMENDACIONES	33
REFERENCIAS.....	34
ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción del efecto antibacteriano de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina sobre *H. pylori*, in vitro. _____ 20

Tabla 2. ANOVA de las medias de los halos de inhibición de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina, in vitro. _____ 22

Tabla 3. Tukey de comparación del efecto antibacteriano de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina, in vitro. _____ 23

Tabla 4. Descripción del efecto antibacteriano de *Propolis de Apis mellifera* sobre *H. pylori*, in vitro. _____ 24

Tabla 5. ANOVA de las medias de los halos de inhibición de *Propolis de Apis mellifera* y amoxicilina más claritromicina, in vitro _____ 26

Tabla 6. Tukey de comparación del efecto antibacteriano de *Propolis de Apis mellifera* y amoxicilina más claritromicina, in vitro. _____ 27

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Descripción del efecto antibacteriano de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina sobre *H. pylori*, in vitro _____ 21

Gráfico 2. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* y amoxicilina más claritromicina sobre *H. pylori*, in vitro. _____ 25

RESUMEN

El objetivo del estudio de investigación fue identificar el efecto antibacteriano del *Zingiber officinale* y el *Propolis* de *Apis mellífera* sobre *Helicobacter pylori* comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro. Presenta un diseño experimental, la población fueron todas las cepas de *Helicobacter pylori* y la muestra fue de 10 repeticiones. Se sembró la cepa de *Helicobacter pylori* en 10 placas petri, se usó aceite esencial de *Zingiber officinale*, se preparó extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellífera* (maceración) ambos a 100% y 50% de concentración aplicándolos en pocillos, y discos de papel filtro whatman N°41 de amoxicilina más claritromicina. El aceite esencial de *Zingiber officinale* fue eficaz al 100% de concentración, con una media de halos de inhibición de $25,10 \pm 1,29$ y el extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellífera* efectivo al 50% ($20,8 \pm 1,23$) y 100% ($25,9 \pm 1,73$). Presento una ANOVA significativamente diferente ($p=0,000$) y la prueba TUKEY confirmo la homogeneidad entre grupos y la amoxicilina más claritromicina presento la mayor zona de inhibición con una media de $32,40 \pm 1,35$ (*Propolis* de *Apis mellífera*) y $32,40 \pm 1,35$ (*Zingiber officinale*). Finalmente se verifico el efecto antibacteriano de *Zingiber officinale* y *Propolis* de *Apis mellífera* frente a *Helicobacter pylori*, sin embargo, fue menor al grupo control.

Palabras claves: *Zingiber officinale*, *Propolis* de *Apis mellífera*, *Helicobacter pylori*, aceite esencial, extracto etanólico

ABSTRACT

The objective of the research study was to identify the antibacterial effect of *Zingiber officinale* and *Propolis* from *Apis mellifera* on *Helicobacter pylori* compared to amoxicillin plus clarithromycin in vitro. It presents an experimental design, the population consisted of all *Helicobacter pylori* strains and the sample was 10 replicates. The *Helicobacter pylori* strain was seeded in 10 petri dishes, essential oil of *Zingiber officinale* was used, ethanolic extract of *Propolis* of *Apis mellifera* was prepared (maceration) both at 100% and 50% concentration by applying them in wells and filter paper discs. whatman # 41 of amoxicillin plus clarithromycin. The essential oil of *Zingiber officinale* was effective at 100% concentration, with a mean inhibition halos of 25.10 ± 1.29 and the ethanolic extract of *Propolis* from *Apis mellifera* effective at 50% (20.8 ± 1.23) and 100% (25.9 ± 1.73). I presented a significantly different ANOVA ($p = 0.000$) and the TUKEY test confirmed the homogeneity between groups and amoxicillin plus clarithromycin presented the highest zone of inhibition with a mean of 32.40 ± 1.35 (*Propolis* of *Apis mellifera*) and $32, 40 \pm 1.35$ (*Zingiber officinale*). Finally, the antibacterial effect of *Zingiber officinale* and *Propolis* of *Apis mellifera* against *Helicobacter pylori* was verified, however, it was lower than the control group.

Keywords: *Zingiber officinale*, *Apis mellifera propolis*, *Helicobacter pylori*, essential oil, ethanolic extract

I. INTRODUCCIÓN

El *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un agente que puede afectar aproximadamente al 50% de la especie humana en el mundo¹ y ocasionar gastritis crónica, diferentes tipos de úlcera y cáncer.² Se distribuye con mayor frecuencia en África, Latinoamérica, el Caribe y Asia, siendo inferior en Norte América y Oceanía.³

Es más frecuente en los países emergentes como Nigeria donde se encuentra un 93,6% a diferencia de Bélgica (11%). El Perú no se encuentra ajeno a esta realidad y en Lima se presenta una prevalencia de 45,5%.⁴

Los escasos recursos económicos se asocian con alta ocurrencia a infecciones por *H. pylori*, incluye factores como el nivel de higiene, el saneamiento ambiental, la densidad de vida y las oportunidades educativas.⁵ Se transmite de persona a persona, por la ruta oral - oral, fecal – oral, siendo la gastro - oral al parecer el modo principal.⁶ En Perú, probablemente la más importante es fecal-oral a través del agua contaminada con una prevalencia del 48% y está relacionado con el nivel socioeconómico, mayormente entre familias de bajos ingresos (56%) que entre los de familias de altos ingresos (32%) y los que cuentan con acceso externo de agua tienen tres veces mayor riesgo de infección.⁵

La adquisición de la infección por *H. pylori* ocurre esencialmente a una edad temprana, probablemente siendo la más alta en la primera infancia y disminuyendo a partir de entonces. Esta transmisión es interhumana, y es más alta cuando ambos padres están infectados (madre mayor riesgo de transmisión) u otros miembros de la familia (hermanos, abuelos) o fuera de la familia, especialmente en el jardín de infantes.⁷

Con la evolución de la tecnología se han elaborado diversos esquemas de tratamiento contra el *H. pylori* y concomitante a ello las resistencias no se han hecho esperar, alcanzándose a la actualidad una eficacia de 60-70% en las terapias triples, en comparación con 90% o más del pasado.³

En tal sentido la OMS fomenta prácticas en medicina tradicional y complementaria (MTC), pues genera costos menores en los tratamientos y es innata en nuestra población.⁹

A nivel mundial esta práctica se ha extendido ampliamente, observándose que en Europa la práctica es creciente hasta en un 83%.¹⁰ Aunque en los países de bajos ingresos se han reportado un 5% en la frecuencia de uso, siendo importante en el mantenimiento de su salud.¹¹ En el Perú nuestra cultura ancestral andina es transmitida por generaciones; es así que un estudio realizado por ESSALUD en sus establecimientos de salud del primer nivel en Lima metropolitana concluyen que el 85% tiene conocimientos acerca de la MTC y la aceptan por que se integra a la terapia médica.¹²

En la búsqueda de tratamientos alternativos que contribuyan a la erradicación del *H. pylori* con productos naturales que han demostrado propiedades terapéuticas estables y poco tóxicos, se han encontrado plantas, raíces, extractos, miel y propóleo, que son productos utilizados desde la antigüedad por la MTC.¹³

Por lo antes mencionado se planteó el siguiente problema: ¿Tiene eficacia antibacteriana el *Zingiber officinale* y el *Propolis de Apis mellifera* sobre *Helicobacter pylori* comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro?

Al ser *H. pylori* una bacteria de distribución mundial que causa problemas gástricos leves y graves, que genera resistencia y las condiciones sanitarias inadecuadas favorecen la reinfección, la MTC investiga las propiedades antibacterianas de diversos productos buscando con escasos efectos negativos, así como contraindicaciones. Entre ellas el *Zingiber officinale* (*Z. officinale*) “jengibre” y *Propolis de Apis mellifera* (*P. A. mellifera*) “propóleo”; presentan efectos bactericidas en los bacilos Gram positivos y negativos, lo que motivo a investigar tratamientos alternativos contra *H. pylori* con un recurso natural al alcance de la población general e inocuo para tratar la gastritis y mejorar la salud de la población general.

Planteándose como objetivo general: Identificar el efecto antibacteriano del *Zingiber officinale* y *Propolis* de *Apis mellifera* sobre *Helicobacter pylori*, comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro.

Y los objetivos específicos: Establecer la eficacia antibacteriana del aceite esencial de *Zingiber officinale* al 100% y 50% sobre *H. pylori*, también explicar la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* al 100% y 50% sobre *H. pylori*, así como analizar la eficacia antibacteriana de amoxicilina más claritromicina. Por último, demostrar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Zingiber officinale* y el extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* sobre *H. pylori* comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro.

La hipótesis de investigación fue que el aceite esencial de *Zingiber officinale* y el extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* tienen efecto antibacteriano sobre *H. pylori* comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro.

II. MARCO TEÓRICO

En relación a los trabajos previos realizados por otros autores tenemos:

Vera J, *et al*¹⁵ (Ecuador, 2018), encontraron una mayor actividad antibacteriana según halos de inhibición presentado por los aceites esenciales (AE) de *Z. officinale* sobre el *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 a diluciones del 100%(7,56mm) y 50% (7,11mm). Así mismo la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 0,31%(100%) y de 1,25%(50%), verificándose que estos AE presentan actividad antibacteriana frente al mencionado microorganismo.

Romero M¹⁶ (Chile, 2017), determinó que los extractos del propóleo presentan actividad antibacteriana sobre *H. pylori* siendo el canferol y pinobansin-3-oacetato el de mayor efecto. Los compuestos mayoritarios (flavonoides y ácidos fenólicos) entre ellos la crisina/pinocembrina presenta sinergia y la pinocembrina/pinobansina-3-o-actetato es antagónico causando vesículas, alterando la membrana y causando lisis celular.

Villanueva M¹⁷ (Chile, 2015), evaluó la función inhibitoria de 22 extractos de propóleos procedentes de nueve zonas mielíferas de Chile, sobre 10 cepas de *H. pylori*; concluyendo que el 100% de los extractos presentaron halos inhibitorios mayores o iguales a 32mm siendo activos sobre las cepas ensayadas, tanto por método de difusión tanto en pocillos como en disco ($p < 0,05$; $p < 0,0001$ respectivamente).

Mahadyi G, *et al*¹⁸ (USA, 2003), encontró que El extracto de metanol de rizoma de jengibre inhibió el crecimiento de las 19 cepas in vitro con un rango de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 6.25-50 microgramos, demostrando su eficacia ya que los gingeroles inhiben el crecimiento de cepas de *H. pylori* in vitro.

A nivel nacional, Estrada J, *et al*¹⁹ (Perú, 2017), determinaron la eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico así como del AE del *Z. officinale* sobre *H. pylori* mediante la expresión de halos inhibitorios, encontrando respecto al AE que la cepa M16 presenta 14,7 mm ($p = 0,0045$) a 100% de

concentración, y para la cepa M18 fue de 14,3 mm ($p = 0,0040$). Respecto al extracto hidroalcohólico se presentó 6 mm de ($p = 0,1043$ y $p = 0,1034$) a 100% de concentración para ambas cepas. Por lo cual establecieron que sólo el aceite esencial ejerció efecto antibacteriano y es menor que los controles de amoxicilina y claritromicina.

Cruzado A²⁰ (Perú, 2016) identificó que el extracto etanólico (EE) de propóleo presentó escasa efecto contra *P. aeruginosa* con una diferencia significativa entre las diluciones ($p < 0.01$) según el análisis de varianza a diferencia de la amikacina 30 mcg que fue eficaz. Según la técnica de Tukey la homogeneidad del efecto de las diluciones del propóleo presenta un $p < 0.01$; evidenciándose que solo el propóleo al 100% presenta poco efecto a diferencia de las otras diluciones que no tiene efecto.

Alvaréz M, *et al*²¹ (Perú, 2014) señalaron que el EE de *P. A. mellífera* tiene acción antibacteriana sobre el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, hallando una diferencia representativa a concentraciones de 75% ($p=0.024$) y 100% ($p=0.025$).

H. pylori es una bacteria Gram negativa espiralada, de $0.3 \times 3.5 \mu\text{m}$ de tamaño, con tres a cinco flagelos polares lo que permite que se mueva en el ambiente de moco⁷⁻⁸, esto ocasiona un infiltrado inflamatorio de linfocitos y polimorfos, a predominio del antro. Comienza con una gastritis aguda, que generalmente no se reconoce clínicamente, y evoluciona a una gastritis crónica que puede durar toda la vida ocasionando alteraciones en la morfología de la mucosa gástrica, posiblemente conduciendo a condiciones premalignas y malignas. La pérdida de los componentes glandulares conduce a una secreción de ácido reducida presentando un mayor riesgo de infección entérica y disminuyendo la absorción de hierro y vitamina B12.⁷

Si bien es homogéneo en el medio gástrico, puede ser bastante heterogéneo en medios artificiales y se vuelve cocoidal, lo que representa su forma degenerativa. Es una bacteria microaerófila, con un crecimiento óptimo con un 5% de oxígeno, crece en medios enriquecidos en un mínimo de 3 días en la

primocultura, produciendo pequeñas colonias lisas. Es fenotípicamente homogéneo y exhibe una gran diversidad genómica.⁷

Para la aclimatación ácida de *H. pylori*, presenta dos tipos de enzimas, la ureasa y la anhidrasa carbónica (CA) las cuales desempeñan una función cooperativa para mantener un pH neutro en las bacterias, citoplasma y periplasma, por la cual es importante el uso de inhibidores, pero al ser tóxicos e inestable se evita su uso para el tratamiento lo que conlleva al fracaso terapéutico⁶. Es así que el *H. pylori* ocasiona gastritis superficial crónica y se infiltra en la mucosa ocasionando una respuesta tisular en el estómago.⁵

En la actualidad los productos naturales son una alternativa a algunos problemas de salud, siendo el *Zingiber* un remedio antiguo con diversas propiedades y muy pocos efectos nocivos. Contiene 15 ml/kg de aceite esencial, el rizoma sin mondar tiene color pardo claro u oscuro, con o sin sùber con estrías longitudinales y transversales estrechas.²² Así mismo posee propiedades farmacológicas que incluyen acciones moduladoras beneficiando a la población en la mejora de la salud y vienen siendo estudiadas como parte de la medicina complementaria para el fortalecimiento de los esquemas terapéuticos actuales.¹⁴

El AE contenido en el rizoma, provee su aroma y está compuesto por sesquiterpenos y monoterpenos. También contiene resina que presenta gingeroles y los sogaoles que le dan sabor picante y son los principales principios activos. Además, contiene cuantiosa cantidad de almidón, lípidos, pròtidos y algunas vitaminas. Diferentes investigaciones han confirmado diversas actividades entre ellas la antimicrobiana.²³

El mecanismo antimicrobiano es ocasionado al disminuir los valores de glucosa sérica por aumento de colesterol debido al AE, así como produciendo hidrofobicidad por los terpenos presentes, los fenoles que ocasionan aumento de la acidez en la de la membrana plasmática y ocasiona destrucción de la bacteria.^{19, 24}

La miel y sus derivados producidos por las abejas; contiene casi 40–50% de resinas, 30% de cera, 5–10% de aceites esenciales y 3–10% son sustancias fenólicas, como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, etc.²⁵ El propóleo es una resina que protege las colmenas de enfermedades y amenazas, su composición dependerá de la fuente floral. Tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas.¹³ Así también contiene una serie de sustancias bioactivas, como los flavonoides que son los principales en el propóleo y están presentes como ésteres libres o alquil y fenil.²⁵

El *H. pylori* in vitro muestra sensibilidad a diversos antibióticos, pero in vivo no todos son eficaces. Dentro del esquema terapéutico los más eficaces son Amoxicilina y claritromicina.²⁶ La Amoxicilina; es un betalactámico que por sí sólo in vitro es beneficios en la infección por *H. pylori*, Además entre todos los de su grupo farmacológico es estable en medio ácido y con mayor distribución a nivel celular. Este medicamento interfiere en la síntesis de la pared bacteriana de los agentes patógenos.²⁶

La Claritromicina; es un macrólido ampliamente usado, in vitro es muy activo sobre *H. pylori*. Actúa inhibiendo la síntesis proteínica mediante su unión a las subunidades ribosómicas 50S, lo que genera un bloqueo en la transpeptidación, así como la translocación imposibilitando la elongación de la cadena peptídica ocasionando la muerte del germen.²⁶

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

- **Tipo:** Aplicada.²⁷
- **Diseño:** Experimental puro.²⁷

Se realizarán repeticiones múltiples, análisis factorial estímulo creciente representado de la siguiente manera:

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Dónde:

- ✓ X1: Dilución *Z. officinale* al 50% (500mg/ml).
- ✓ X2: Dilución *Z. officinale* al 100% (500mg/ml).
- ✓ X3: Dilución *Propolis de A. mellifera* al 50% (1000mg/ml).
- ✓ X4: Dilución *Propolis de A. mellifera* al 100% (1000mg/ml).
- ✓ X5: Control positivo: Amoxicilina (25 µg) más Claritromicina (15 µg)
- ✓ X6: Control negativo: Agua destilada.
- ✓ RG: Asignación al Azar (Grupos de estudio)
- ✓ O₁₋₆: Efecto antimicrobiano (Halo de inhibición).

3.2. Variables y operacionalización

(Anexo 1)

- **Variable independiente**
 - ✓ Agente antibacteriano no farmacológico:
 - a) Aceite esencial de *Zingiber officinale*
 - b) Extracto etanólico de *Propolis de Apis mellifera*
 - ✓ Agente antibacteriano farmacológico:

Amoxicilina más Claritromicina

- **Variable dependiente**

Efecto antibacteriano²⁹

- ✓ Sensible
- ✓ Resistente

3.3. Población, muestra

Población:

Todas las cepas de *H. pylori*.³¹

- **Criterios de inclusión:**

- ❖ Las placas petri donde crecieron las cepas cultivados en menos de 24 horas

- **Criterios de exclusión:**

- ❖ Placas contaminadas

Muestra:

Estuvo conformada por 10 repeticiones para cada grupo de experimentación. (Anexo 2)

Unidad de análisis: Cada cultivo de cepas de *H. pylori*.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se usó la técnica de observación directa³¹ del crecimiento de las cepas y se usó un formulario de registro para los datos encontrados según el número de repeticiones y halos inhibición en el laboratorio como instrumento, la cual no requiero validación para este estudio. (Anexo 3)

3.5. Procedimiento

Los procedimientos (Anexo 5) se realizaron en el laboratorio de microbiología San José (Anexo 6) teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad respectivas.³²

Para la obtención del EE de *P. A. mellifera*, se adquirió de la ciudad de Chiclayo (Anexo 4) 150 g de este en masa, cubierta con una funda oscura que contribuye a conservar sus beneficios naturales. Se colocó en un vaso de precipitación 20 g de propóleo fragmentado más alcohol a 96° (100ml), se tapó herméticamente, se cubrió con papel aluminio, luego se introdujo en un horno a 40° y fue movido cuatro veces al día por 10 días. Se filtró usando una gasa estéril y luego usando un papel filtro Whatman N°41 a este se le sometió a evaporación por convección con ayuda de un horno a 40°C y se obtuvo el extracto a concentraciones de 145mg/ml (100%) y se dispuso en un frasco de cristal ámbar a 4-6°C. Para la dilución al 50% se utilizó 500µL de EE y 500µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

El medio de cultivo agar Mueller – Hinton (5% de sangre de cordero) se sometió 15 minutos a 121°C haciendo uso de autoclave y se vertió en 10 placas Petri aprox. 17-20ml en cada una dejándolo solidificar al ambiente. Los resultados de la difusión en agar se evaluaron con el procedimiento de Kirby-Bauer y se utilizó estándares M100 de las normas del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).¹⁹

Para el inóculo, se inoculó el *H. pylori* (cultivado 24 horas) con un hisopo estéril en un tubo de ensayo esterilizado que contendrá 3 ml cloruro de sodio al 0,9% presentando turbidez de 0,5 según la escala de Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC/ml aprox.) y luego se sembró por estrías en las placas petri.

Utilizando un sacabocados de 6mm se preparó dos pocillos en cada caja petri, haciendo uso de una micropipeta se agregó 50 µL de EE (100% y 50% respectivamente), se humedeció un disco (papel filtro Whatman N° 1) para cada concentración con AE y se colocó el disco con amoxicilina (25 µg) más claritromicina (15 µg) a 1 cm del límite de cada placa Petri. Después de 15 minutos de dejar reposar las placas, fueron sometidas al humo de una vela (microaerofilia) en un depósito herméticamente cerrado, luego se colocaron en la estufa a 33-37°C para incubarlas, luego de 18 a 20 horas, se realizó la lectura mediante la observación y medición del diámetro inhibitorio con la regla de Vernier.¹⁹

Se adquirió el AE de *Z. officinale*, en la empresa EKALA, el cual presenta su certificación de pureza y calidad (Anexo 4). Para diluir al 50% se siguió el método usado para el extracto hidroalcohólico y se colocaron en los discos elaborados en cada caja petri.¹⁹

3.6. Método de análisis de datos

Los datos recogidos se procesaron en el programa SPSS 26.0. Se aplicó la prueba estadística para la homogenización de la muestra, se usó el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para valorar los tamaños de diámetros. Finalmente, el análisis post ANOVA Tukey permitió encontrar una dilución que generó tamaño notable del halo de inhibición.³¹

3.7. Aspectos éticos

Se cumplió con lo establecido en el presente proyecto, sin embargo, se adquirió el AE preparado por dificultades de acceso por la pandemia COVID-19. Se siguieron los protocolos y se presentaron los resultados de manera imparcial, no se manipularon los datos y se evitó los conflictos de intereses, respetando el código de ética del CMP.³³

IV. RESULTADOS

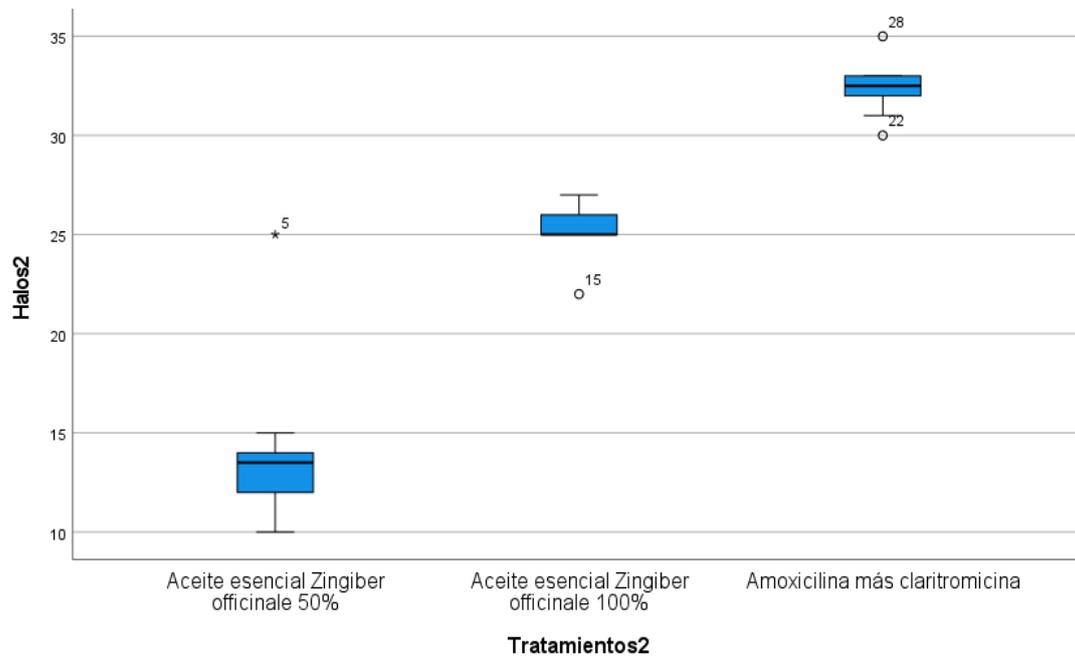
Tabla 1. Descripción del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina sobre *H. pylori*, in vitro.

Aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	Zona de inhibición							
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
50%	10	14,20	4,050	1,281	11,30	17,10	10	25
100%	10	25,10	1,287	,407	24,18	26,02	22	27
Amoxicilina más claritromicina	10	32,40	1,350	,427	31,43	33,37	30	35

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver.26

La media del efecto antibacteriano del Aceite esencial (AE) de *Zingiber officinale* (*Z. officinale*) al 100% fue de $25,10 \pm 1,29$ siendo eficaz contra *H. pylori*, pero menor al de amoxicilina más claritromicina que fue de $32,40 \pm 1,35$.

Gráfico 1. Descripción del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina sobre *H. pylori*, *in vitro*



Fuente: Tabla 1

El AE de *Z. officinale* al 100% presenta una media de halo de inhibición de $32,40 \pm 1,35$ que no alcanza al control positivo de amoxicilina más claritromicina que presento una media de $25,9 \pm 1,73$.

Tabla 2. ANOVA de las medias de los halos de inhibición presentada por el aceite esencial de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina, *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1677,800	2	838,900	126,609	,000
Dentro de grupos	178,900	27	6,626		
Total	1856,700	29			

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver.26

Se demuestra que los resultados son significativamente diferentes con un nivel alto de significancia ($p= 0,000$)

Tabla 3. Prueba Tukey de comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Zingiber officinale* y amoxicilina más claritromicina, *in vitro*.

Aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
50%	10	14,20		
100%	10		25,10	
Amoxicilina más claritromicina	10			32,40
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver.26

Al comparar los 3 tratamientos se puede observar que la amoxicilina más claritromicina tuvo mayor efecto ya que presento un halo de inhibición de 32,40 siendo este el mejor tratamiento en comparación con los tratamientos no farmacológicos.

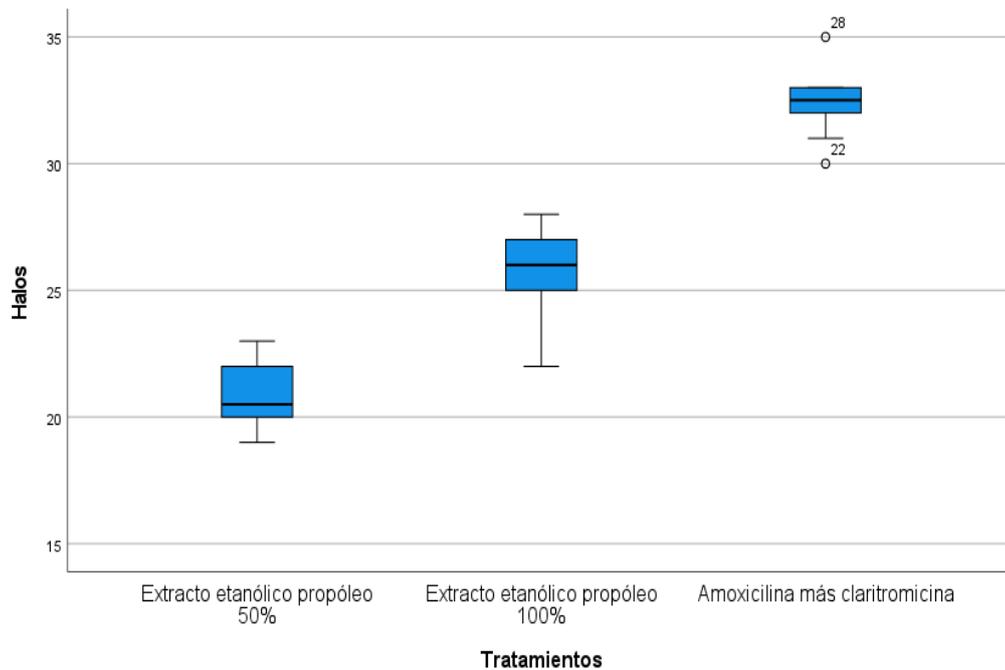
Tabla 4. Descripción del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* sobre *H. pylori*, in vitro.

Extracto etanólico de <i>Propolis</i> de <i>Apis mellifera</i>	Zonas de inhibición(mm)							
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
50%	10	20,8	1,229	,389	19,92	21,68	19	23
100%	10	25,9	1,729	,547	24,66	27,14	22	28
Amoxicilina más claritromicina	10	32,4	1,350	,427	31,43	33,37	30	35

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver.26

La media del efecto antibacteriano del extracto etanólico (EE) de *Propolis* de *Apis mellifera* (*P. A. mellifera*) al 100% fue de $25,9 \pm 1,73$ lo que confirma su eficacia frente a *H. pylori*, pero el valor se encuentra por debajo de la media del control farmacológico de amoxicilina más claritromicina que fue de $32,4 \pm 1,35$.

Gráfico 2. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* y amoxicilina más claritromicina sobre *H. pylori*, in vitro.



Fuente: Tabla 4

Se observa que el EE *P. A. mellifera* a diferentes concentraciones presento un menor efecto antibacteriano en comparación con amoxicilina más claritromicina frente a *H. pylori*.

Tabla 5. ANOVA de las medias de los halos de inhibición presentado por el extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* y amoxicilina más claritromicina, in vitro

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	676,067	2	338,033	160,402	,000
Dentro de grupos	56,900	27	2,107		
Total	732,967	29			

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver.26

Según el análisis de varianza del grupo en estudio (ANOVA) se demostró que los resultados son significativamente diferentes con un nivel alto de significancia ($p=0,000$). Hay una diferencia significativa entre los grupos de experimentación.

Tabla 6. Prueba Tukey de comparación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Propolis* de *Apis mellifera* y amoxicilina más claritromicina, in vitro.

Extracto etanólico de <i>Propolis</i> de <i>Apis mellifera</i>	N	Zona de inhibición		
		Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
50%	10	20,80		
100%	10		25,90	
Amoxicilina más claritromicina	10			32,40
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver.26

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos, α . utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Al comparar los 3 tratamientos se puede observar que la amoxicilina más claritromicina tuvo mayor efecto ya que presentó un halo de inhibición de 32,4 siendo este el mejor tratamiento en comparación con los tratamientos no farmacológicos.

V. DISCUSIÓN

La infección por *H. pylori* se distribuye mundialmente en más de la mitad de la población ocasionando enfermedades gástricas que pueden desencadenar el cáncer gástrico si no existe una respuesta adecuada en el tratamiento. Es más prevalente en países en desarrollo, en las que las condiciones sanitarias, así como las prácticas inadecuadas causan las transmisiones desde la infancia y se prolonga hasta la edad adulta, frecuentemente por vía gastro - oral ya sea por cuidador o la persona que manipula los alimentos, entre otros factores destacan el bajo nivel socioeconómico y la falta de agua intadomiciliaria.^{5,6,7}

Productos no farmacológicos como *Zingiber officinale* y el *Propolis de Apis mellífera* son comúnmente utilizados en nuestra cultura ya sea como parte de la culinaria como parte de las practicas ancestrales para atender problemas de salud como dolor abdominal o infecciones gastrointestinales o respiratorias, por la cual se le confiere propiedades antibacterianas contra bacterias Gram negativas y positivas.

Es así que nuestro estudio busca identificar el efecto antibiótico del rizoma de *Zingiber officinale* (*Z. officinale*) y el *Propolis de Apis mellífera* (*P. A. mellífera*) sobre *H. pylori* comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro.

Para lo cual se utilizó las normativas de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) la cual establece la eficacia frente a *H. pylori* al presentar un halo de inhibición ≥ 18 mm relativa a la técnica de Kirby Bauer utilizada en el presente estudio.²⁹

La tabla 1 muestra que la media del halo de inhibición generado por aceite esencial (AE) de *Z. officinale* al 100% fue de $25,10 \pm 1,29$ en comparación con el 50% que fue de $14,20 \pm 4,050$; lo que demuestra una actividad antibacteriana a un 100% de concentración frente a la cepa de *H. pylori*

según lo establecido por el CLSI, pero que es menor al grupo control de amoxicilina más claritromicina que fue de $32,40 \pm 1,35$.

Estos resultados son mayores que los obtenidos en el estudio realizado por Estrada E, *et al*¹⁹ (Perú, 2016) en el cual se observó una zona de inhibición de aceite esencial *Z. officinale* de 14,3mm (100%) y no se consideró eficaz frente a la cepa en estudio. En este estudio se realizó la lectura a las 72 horas, en el nuestro fue antes de las 24 horas, y se utilizó las mismas concentraciones del grupo control. Por otro lado, Mahady G, *et al*¹⁸ (USA, 2003) determinó que como extracto metanólico presentaba eficacia antibacteriana al inhibir el crecimiento de las cepas con una CMI de 0,78 a 12,5 µg / ml y además es activo frente a las cepas CagA +, al suprimir la proliferación de células cancerosas humanas mediante la inducción de apoptosis y anula la metástasis.

La capacidad antibacteriana se debe a que los sesquiterpenos y monoterpenos producen hidrofobicidad, además los fenoles como gingeroles y sogaoles²³ aumento de la acidez en la membrana plasmática.^{19,24}

En la tabla 2 La prueba ANOVA muestra que existe diferencia significativa en los promedios de halos de inhibición en los grupos analizados ($p=0,000$) de AE de *Z. officinale* a concentraciones de 50 y 100% y amoxicilina más claritromicina). En la tabla 3 se presenta la prueba post hoc TUKEY, en donde se observa que la amoxicilina más claritromicina tuvo mayor efecto antibacteriano que los productos no farmacológicos, presentando eficacia in vitro con una media de halos de inhibición de $32,40 \pm 1,35$.

Por otro lado, la tabla 4 muestra que la media de la actividad antibacteriana del extracto etanólico (EE) de *P. A. mellifera* tanto al 50% ($20,8 \pm 1,229$) como 100% ($25,9 \pm 1,73$) verifican la eficacia antibacteriana contra *H. Pylori* según lo establecido por la CLSI. Sin embargo, estos resultados son inferiores a los encontrados en la investigación realizada por Villanueva M, *et al*¹⁷ (Chile,

2015), quienes estudiaron 22 propóleos sobre 10 cepas de *H. pylori*, dichos propóleos son provenientes de nueve zonas mielíferas de Chile en la época de otoño, sometidos a microaerofilia por 72 horas (35°C) y encontraron halos de inhibición de 32mm empleando 1,5 mg/ml de *P. de A. mellifera*.

Resultados semejantes obtenidos por Nimet B, *et al*²⁵ (Turquía, 2016); quienes trabajaron con 15 extractos etanólicos de propóleo de diferentes regiones, quienes encontraron halos de inhibición entre 31 y 47mm, estos fueron sometidos a 5-7 días de microaerofilia (37°C) con respecto a 0,75mg/ml de Propóleo. Identificaron que 2 muestras presentaban altos contenidos de flavonoides y que en las regiones de procedencia prevalecía la flora del castaño. Nuestro estudio fue realizado en época de primavera, empleo un propóleo con 18-20 horas de microaerofilia a 33-37°C con respecto a 145mg/ml y pertenece a una zona de algarrobos que es rico en diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides y oligosacáridos en diferentes partes de la planta.³⁵

Las diferencias encontradas podrían deberse a que, la calidad y composición y propiedades de los propóleos varía según la región geográfica, de la forma de colecta, de las condiciones climáticas (temperatura, humedad) y del periodo en el cual este ha sido adquirido, así mismo se mezclan con otros elementos propios de la colmena que hacen que lleven consigo impurezas podrían interferir en su eficacia antibacteriana.¹⁴

La actividad antibacteriana del *P. de A. mellifera* le confieren los fenóles (ácido cinámico), taninos, terpenos, flavonoides como ésteres libres o alquil y fenil inhiben el crecimiento de *H. pylori* a concentraciones de 25 µg/ml, además producen hidrofobicidad e hiperacidificación de la membrana plasmática.^{14,25}

Luego de realizar la prueba de ANOVA se verifico que existe diferencia significativa en los promedios de halos de inhibición en los grupos analizados (p=0,000) a concentraciones de 50 y 100% de EE de *P. A. mellifera* y

amoxicilina más claritromicina (Tabla 5). Así mismo se realizó la prueba post hoc TUKEY (Tabla 6) en donde se muestra que la amoxicilina más claritromicina tuvo mayor efecto antibacteriano una media de halo de inhibición de $32,40 \pm 1,35$.

Dichos resultados son opuestos a los encontrados por Cruzado A²⁰ (Perú, 2016) quien identificó que el EE de *P. A. mellifera* presentó escaso efecto contra *P. aeruginosa* con respecto a la amikacina 30 mcg que fue eficaz, concluyendo que solo el propóleo al 100% presenta poco efecto a diferencia de las otras diluciones que no tienen efecto.

El control positivo utilizado fue amoxicilina más claritromicina que conforma el esquema terapéutico actual, son fármacos activos y estables frente a bacterias Gram negativas como *H. pylori* además son ampliamente utilizados ya que son de fácil acceso en el Perú, sin embargo, muestran una resistencia de 4,6% y 52,3% respectivamente, razón por la cual el presente estudio busco alternativas en las prácticas tradicionales de la cultura peruana.³⁴

Por lo tanto, luego del análisis de los resultados se contrasto la hipótesis de que el EE de *P. mellifera* y el AE de *Z. officinale* tiene efecto antibacteriano lo cual queda demostrado en el presente trabajo de investigación.

VI. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de *Zingiber officinale* a una concentración de 100% presenta eficacia antibacteriana
2. El extracto etanólico de *Propolis de Apis mellifera* a concentraciones mayor o igual al 50% tiene efecto antibacteriano
3. La amoxicilina más claritromicina tienen mayor efecto antibacteriano sobre *H. pylori* comparado con los productos no farmacológicos

VII. RECOMENDACIONES

1. Comparar eficacia antibacteriana del aceite esencial de *Zingiber officinale* y *Propolis de Apis mellifera* de diferentes zonas del país sobre *H. pylori*.
2. Realizar estudios in vitro comparando el efecto antibacteriano del aceite esencial *Zingiber officinale* obtenido por arrastre al vapor con el fin de evaluar su eficacia.
3. Evaluar el aceite esencial *Zingiber officinale* y extracto etanólico de *Propolis de Apis mellifera* sobre *H. pylori* y otros agentes patógenos in vivo con animales para valorar su efectividad, toxicidad y así poder obtener una dosis terapéutica humana.
4. Realizar investigaciones sobre la sinergia de extracto etanólico de *Propolis de Apis mellifera* y aceite esencial de *Zingiber officinale* con amoxicilina más claritromicina.
5. Realizar estudios farmacológicos y Bioquímicos para *Propolis de Apis mellifera* y *Zingiber officinale* con *H. pylori* y otros microorganismos para determinar el componente antibacteriano eficaz

REFERENCIAS

1. Vale F, Oleastro M. Overview of the phytomedicine approaches against *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol [revista en línea] 2014 mayo 21. [acceso 2019 julio 24]; 20(19): 5594-5609. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024768/pdf/WJG-20-5594.pdf>
2. Bayona M, Gutiérrez A. *Helicobacter pylori*: vías de transmisión. Med [revista en línea] 2017 septiembre. [acceso 2019 julio 24]; 39 (3): 210-220. Disponible en: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/09/877820/1256-texto-del-articulo-5680-1-10-20171022.pdf>
3. Otero W, Otero L, Gómez M, Tres A. *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata en el 2018? Rev Gastroenterol Perú [revista en línea] 2018 enero. [acceso 2019 julio 24]; 38(1): 54-63. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1022-51292018000100009&lng=es.
4. Velásquez B, Montenegro S. Antimicrobial activity of ethanolic extracts of propolis obtained from *Apis Mellifera* bees. Rev Investig Agrar Ambient [revista en línea] 2017 [acceso 2019 julio 24]; 8(1):185–93. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=126111521&lang=es&site=eds-live>
5. Tirado I, Lancho L, Carlos C, Ponce R, Schwarz L, Alfaro A, et al. *Helicobacter pylori*: History and facts in Peru. Crit Rev Oncol Hematol [revista en línea] 2019 febrero. [acceso 2019 agosto 14]; 134:22-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.12.005>
6. Kheyre H, Ferro A, Morais S, Norton P, Lunet N, Costa AR, et al. The occupational risk of *Helicobacter pylori* infection: a systematic review. Int Arch Occup Environ Health [revista en línea]. 2018 agosto [acceso 2019 agosto 16]; (6):657. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edsgao&AN=edsgcl.546414441&lang=es&site=eds-live>
7. Megraud F, Lehours P, *Helicobacter pylori*. [Internet] 2° ed. In: Encyclopedia of Gastroenterology. Kuipers E. 2a ed. Elsevier; 2020. 24-31. [acceso 2020 enero 08]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65770-7>

8. Atherton JC, Blaser M. Infecciones por *Helicobacter pylori*. En: Longo DL, Kasper DL, Jameson JL, Fauci AS, Loscalzo J, Hauser SL, *et al.* editores. Harrison Principios de medicina interna. Vol 2. 20a ed. México: McGraw-Hill; 2018. pp.1162-1166
9. OMS. WHO Strategy on Traditional Medicine 2014-2023. Geneva: World Health Organization [Internet]. 2013. pp. 22-29 [acceso 2019 agosto 08]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=97466614AAF01229F305836D9BAB08B8?sequence=1
10. Fischer F, Witt C, Lewith G, Von K, Cardini F, Linde K, *et al.* High prevalence but limited evidence in complementary and alternative medicine: guidelines for future research. BMC Complement Altern Med [revista en línea] 2014 febrero 06. [acceso 2019 agosto 08]; 14:46. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3931324/>
11. Oyeboode O, Lilford R, Chilton P, Kandala N. Use of traditional medicine in middle-income countries: a WHO-SAGE study. Health Policy Plan [revista en línea] 2016 marzo 30. [acceso 2019 octubre 15]; 31(8):984–91. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5013777/>
12. Mejía J, Carrasco E, Miguel J, Flores S. Knowledge, acceptance and use of traditional Peruvian medicine and alternative / complementary medicine in outpatient users in Metropolitan Lima. ESSALUD. Rev Perú Med Integrativa [revista en línea] 2017 [acceso 15 de octubre del 2019]; 2(1):47-57. Disponible en: <http://rpmi.pe/ojs/index.php/RPMI/article/view/44/43>
13. Nostro A, Bartolomeo S, Cellini L, Campi E, Procopio F, Cannatelli M, *et al.* Effects of combining extracts (from *propolis* or *Zingiber officinale*) with clarithromycin on *Helicobacter pylori*. Phytother Res [revista en línea]. 2006 Mar 01 [acceso 2019 Jul 25]; 20(3):187–90. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=eoh&AN=8610747&lang=es&site=ehost-live>
14. Salamanca G. Origin, nature, physicochemical properties and therapeutic value of *propolis*. 1° ed. Ed. Universidad del Tolima. [Internet]. 2017 [acceso 2019 agosto 14]. Disponible en: <http://repository.ut.edu.co/handle/001/3130>
15. Vera J, Malo I. Evaluation of the antimicrobial effect of essential oils of ginger (*Zingiber Officinale*) and curcuma (*Curcuma Longa*) against the bacteria

- Staphylococcus Aureus* ATCC: 12600. [Tesis pre grado]. Ecuador: Universidad Técnica Salesiana sede la Cuenca. 2018. [acceso 2019 agosto 08]. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15045>
16. Romero M. Interactions between major anti-*Helicobacter pylori* compounds present in *propolis* from the Biobío region. [Tesis maestría]. Chile. Universidad de Concepción. 2017. [acceso 2019 agosto 02]. Disponible en: <http://repositorio.udec.cl/handle/11594/2643>
 17. Villanueva M, Wilson M, González M, Manquián N, Otth C, Fernández H, et al. In vitro antibacterial activity of Chilean *propolis* on *Helicobacter Pylori*. Rev Chil Infectol [revista en línea] 2015 octubre. [acceso 2019 agosto 02]; 32(5): 530-535. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182015000600007&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182015000600007>.
 18. Mahady G, Pendland S, Yun G, Lu Z, Stoia A. El jengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) y los gingeroles inhiben el crecimiento de las cepas Cag A + de *Helicobacter pylori*. Anticancer Res. [revista en línea] septiembre-octubre 2003. [acceso 2019 agosto 02]; 23 (0): 3699–3702. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3761965/>
 19. Estrada E, Romero J. Efecto Antibacteriano del Extracto Hidroalcohólico y Aceite Esencial del rizoma de *Zingiber Officinale* Jengibre en cepas de *Helicobacter Pylori* in Vitro. [Tesis pre grado]. Perú. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. 2017. [acceso 2019 agosto 02]. Disponible en: <http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/476/FYB-021-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 20. Cruzado A. Eficacia Antibacteriana del Extracto de *Propolis* de *Apis Mellífera* “Propóleo” Sobre *Pseudomonas Aeruginosa*, Estudio in Vitro. [Tesis pre grado]. Perú. Universidad Cesar Vallejo. 2016. [Citado 2019 agosto 08]. Disponible en: <http://repositorio.ucv.edu.pe/handle/UCV/5583.65770-7>
 21. Álvarez M. Efecto Antibacteriano In Vitro Del Extracto Etanólico De *Propolis* De *Apis Mellífera* (propóleo) Frente a *Enterococcus Faecalis Atcc 29212*. [Tesis maestría]. Perú. Repositorio Digital de la Universidad Privada Antenor Orrego.

2014. [Citado 2019 agosto 08]. Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/1130>
22. Srinivasan, K. Rizomas de jengibre (*Zingiber officinale*): una especia con múltiples potenciales beneficiosos para la salud. Pharm Nutrition [revista en línea] 2017 enero 05. [acceso 2019 setiembre 2019]. 5 (1), 18–28. Disponible en: sci-hub.tw/10.1016/j.phanu.2017.01.001
23. García E. Manual de fitoterapia. [Internet] 2° ed. Ed. Elsevier 2006. [Citado 2019 agosto 14]. Disponible en: <https://www.plantassaludables.es/wp-content/uploads/2017/10/Manual-de-fitoterapia.-Encarna-Castillo-Garcia.pdf>
24. Ñahuis N, Enciso L. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico del *zingiber officinale* (kión) en cepas de *Escherichia coli*. [Tesis pre grado]. Perú. Universidad Inca Garcilaso De La Vega. 2018 [acceso 2019 setiembre 2019]. Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/3507/TEISIS_LISSE%20GABY%20%C3%91AHUIS%20SANDOVAL_Y_NOEM%C3%8D%20ENCISO%20YUPANQUI.pdf?sequence=3&isAllowed=y
25. Nimet B, Cemre T, Sevgi K, Sengul K. Efecto del propóleo en los trastornos gástricos: estudios de inhibición sobre el crecimiento de *helicobacter pylori* y la producción de su ureasa. Enzyme Inhib Med Chem [revista en línea] 2016 mayo 26. [acceso 2019 setiembre 2019]; 31: sup2, 46- 50, Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14756366.2016.1186023>
26. Agudo S. Molecular study of virulence factors and resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* infection. [Tesis doctorado]. España: Repositorio de la producción académica en abierto de la UCM; 2007. [acceso el 10 de octubre del 2019]. Disponible en: <http://eprints.sim.ucm.es/11520/1/T32212.pdf>
27. Hernández S, Fernández C, Baptista M. Metodología de la investigación. 6ª ed. Ed. Mc. Graw Hill. 2014. México
28. Mamani D. efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Malva sylvestris l.* sobre *Escherichia coli* ATCC 8739 comparado con gentamicina estudio in vitro. [tesis pregrado]. Perú: Repositorio digital internacional Universidad Cesar Vallejo 2019. [acceso 2019 setiembre 2019]. Disponible en: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/29789/mamani_ad.pdf?sequence=1&isAllowed=y

29. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI [revista en línea] 2019; [acceso 13 setiembre 2019]; 39 (1). Disponible en: https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf
30. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data 2005. [acceso 23 agosto 2019] Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
31. García J, Jiménez F, Del Rosario M, Ramírez Y, Lino L. Introducción a la metodología de la investigación en ciencias de la salud. 1° ed. Ed. Mc. Graw Hill. 2011. México.
32. MINSA. Manual de bioseguridad en los laboratorios de ensayo, biomédicos y clínicos. 3° ed. Ed. INS. 2005. Perú.
33. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. (Citado: 17 octubre 2019). Disponible en: http://cmp.org.pe/wpcontent/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf
34. Guzmán J, Castillo D, Ojeda M, Sauvain M. Susceptibilidad antimicrobiana y mutaciones en el gen ARNr 23S de *Helicobacter pylori* en pacientes dispépticos. Rev Per Med Exp y Sal Púb [revista en línea] 2019 junio. [acceso 2020 diciembre 09]; 36(2): 270-274, Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/3901/3324>
35. Alzate L, Arteaga L, Jaramillo D. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria. Rev Lasall de Inv [revista en línea] 2008 julio. [acceso 2020 diciembre 10]; 5(2): 100-111, Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/695/69550213.pdf>

ANEXOS

ANEXO 1

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE DE ESTUDIO	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
V.I: Agente antibacteriano	<p>Sustancia natural o sintética que inhibe y/o destruye microorganismos sin ser tóxico para huésped²⁸</p> <p>Agente farmacológico: AE <i>Z. officinale</i> y EE <i>P. A. mellifera</i></p> <p>Agente farmacológico: Amoxicilina más claritromicina</p>	<p>El <i>Z. officinale</i> será fraccionado en las subsecuentes diluciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ 50% ❖ 100% <p>El <i>P. A. mellifera</i> será fraccionado en las subsecuentes diluciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ 50% ❖ 100% <p>Control positivo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Amoxicilina (25 µg) más Claritromicina (15 µg) <p>Control negativo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Agua destilada 	<p>RG1</p> <p>RG2</p> <p>RG3</p> <p>RG4</p> <p>RG5</p> <p>RG6</p>	<p>Cualitativa nominal</p>
VD: Efecto antibacteriano	<p>Inhibición del crecimiento, desarrollo o destrucción bacteriana sin afectar el huésped²⁸</p> <p>Determinado por el halo de inhibición mediante la técnica Kirby Bauer.³⁰</p>	<p>Se medirá el área donde no ha crecido la cepa; considerándose las normas del CLSI²⁹</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Sensible ❖ Resistente 	<p>≥ 18mm</p> <p><18mm</p>	<p>Cualitativa nominal</p>

ANEXO 2

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

Para estudio de promedio se trabajará estadísticamente con la fórmula de diferencia de dos medias sobre halos de inhibición³¹:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2S^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

$$Z_{\alpha} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 0.84$$

$$\bar{X}_1 = 18 \text{ mm}^{29}$$

$$\bar{X}_2 = 14.7 \text{ mm}^{19}$$

$$S = 0.8^{19} \text{ (Es la varianza de ambas distribuciones)}$$

$n = 2,3$ (Cantidad mínimo de repeticiones, pero se usará 10 placas Petri por recomendación de expertos).

ANEXO 3

INSTRUMENTO

N° Repetición	DIAMETRO DE HALO DE INHIBICIÓN(mm)					
	AE de <i>Z. officinale</i>		EE de <i>P. A. mellifera</i>		Controles	
	100%	50%	100%	50%	Positivo(+)	Negativo(-)
					Amoxicilina más claritromicina	Agua destilada
1	25	14	26	21	33	0
2	25	10	25	23	30	0
3	26	13	28	20	33	0
4	25	12	22	20	32	0
5	22	25	26	20	32	0
6	25	14	26	22	33	0
7	27	14	27	19	32	0
8	25	13	25	20	35	0
9	26	12	28	22	31	0
10	25	15	26	21	33	0
Promedio	25,1	14,2	25,9	20,8	32,4	0

ANEXO 4

CERTIFICACIÓN DEL *Propolis* de *Apis mellifera* Y AE. *Zingiber officinale*



HB Productos honeybee

"Abejas Curativas Guardianas de su Salud"

De: MSc. Luis Felipe Carcelén Romero.

RUC N° 10166556886

CERTIFICADO

Luis Felipe Carcelén Romero, Gerente General de HB Productos honeybee, certifica que:

El Propoleo entregado a la Srta. Gabriela Horna Huamán, corresponde al recojo artesanal de dicho producto en los apiarios de *Apis mellifera*, ubicados en el "Santuario Histórico Bosque de Pómac", distrito de Pítipo, provincia de Ferreñafe, región Lambayeque.

Se expide el presente certificado a solicitud de la interesada y para los fines convenientes.

MSc. Luis Felipe Carcelén Romero

GERENTE GENERAL

HB Productos honeybee

Como se trata de un documento generado electrónicamente no requiere firma



CERTIFICADO DE ANALISIS

Aceite Esencial	Jengibre
Nombre Botánico	Zingiber officinale
Codigo de Producto	PEO1079
CAS #	8007-08-7 ; 84696-15-1
FEMA #	2522
EINECS #	283634-2
Nombre INCI	Zingiber Officinale (Jengibre) Aceite de raíz
Lote #	10791911
Fecha de Destilación	Noviembre 2019
Fecha de Vencimiento	Octubre 2021
Parte de la planta	Rizomas
Método de Extracción	Arrastre de vapor
Calidad	100% Puro y Natural
Nota Aromática	Nota media

PROPIEDADES	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Apariencia	Líquido de color amarillo a marrón/naranja	Conforme
Olor	Aroma cálido, suave, dulce y picante que recuerda al jengibre recién cortado	Conforme
Índice de refracción	1.480 - 1.495 @ 20°C	1.488
Gravedad específica	0.865 - 0.894 @ 20°C	0.880
Rotación óptica	-52° to -10°	Conforme
Solubilidad	Soluble en alcoholes y aceites fijos; insoluble en el agua	Conforme
Comentarios	Calidad aromática es excelente	

ANÁLISIS MICROBIAL	ESPECIFICACIONES	ESTANDARES	RESULTADOS
Conteo de Bacterias mesófilas aeróbicas	< 100 CFU/g	ISO 21149	Conforme
Levadura y moho	< 10 CFU/g	ISO 16212	Conforme
Candida albicans	AUSENTE / 1g	ISO 18416	Conforme
Escherichia coli	AUSENTE / 1g	ISO 21150	Conforme
Pseudomonas aeruginosa	AUSENTE / 1g	ISO 22717	Conforme
Staphylococcus aureus	AUSENTE / 1g	ISO 22718	Conforme

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444 www.ekala.ape



PRUEBA DE METALES PESADOS	ESPECIFICACIONES	ESTÁNDARES	RESULTADOS
Plomo: Pb (mg/kg o ppm)	< 10 ppm	NA	Conforme
Arsenicp: As (mg/kg o ppm)	< 2 ppm	NA	Conforme
Mercurio: Hg (mg/kg o ppm)	< 1 ppm	NA	Conforme

ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO:

Manténgalo en un recipiente bien cerrado en un lugar fresco y seco, protegido de la luz solar.

Noviembre 2019

Descargo de responsabilidad y precaución: Por favor, consulte toda la información técnica relevante específica del producto, antes de su uso. La información contenida en este se obtiene de fuentes actuales y fiables. Ethereal Ingredients (P) Ltd. proporciona la información contenida en este documento, pero no hace representación en cuanto a su amplitud o exactitud. Los individuos que reciben esta información deben ejercer su juicio independiente para determinar su idoneidad para un propósito particular. El usuario del producto es el único responsable del cumplimiento de todas las leyes y reglamentos aplicables al uso del producto, incluidos los derechos de propiedad intelectual de terceros. Dado que el uso o los usos ordinarios o de otro tipo de este producto están fuera del control de Ethereal Ingredients (P) Ltd, no se hace ninguna representación o garantía -expresada o implícita- en cuanto a los efectos de tal uso o usos, (incluyendo daños o de la lesión), o los resultados obtenidos. La responsabilidad de Ethereal Ingredients (P) Ltd. se limita al valor de los bienes y no incluye ninguna consecuencia pérdida. Ethereal Ingredients (P) Ltd. no será responsable de ningún error o retraso en el contenido, o de ninguna acción tomada en relación con el mismo. Ethereal Ingredients (P) Ltd. no será responsable de ningún daño resultante del uso o la confianza en esta información.

Como se trata de un documento generado electrónicamente, no se requiere de una firma

NOTA: ESTE CERTIFICADO ES UNA TRADUCCION LITERAL DEL CERTIFICADO ORIGINAL EMITIDO POR EL LABORATORIO

ES AROMATERAPIA EIRL – Calle Venecia 147, Dpto. 201, San Borja
Teléfono: 337-2290 Celular: 977 779 444 www.ekala.ape

ANEXO 5 PROCEDIMIENTO

Preparación y filtración del extracto etanólico de *P. Apis mellifera*



Extracto etanólico de *P. Apis mellifera*



Preparación de las diluciones de *P. Apis mellifera* y *Z. officinale*



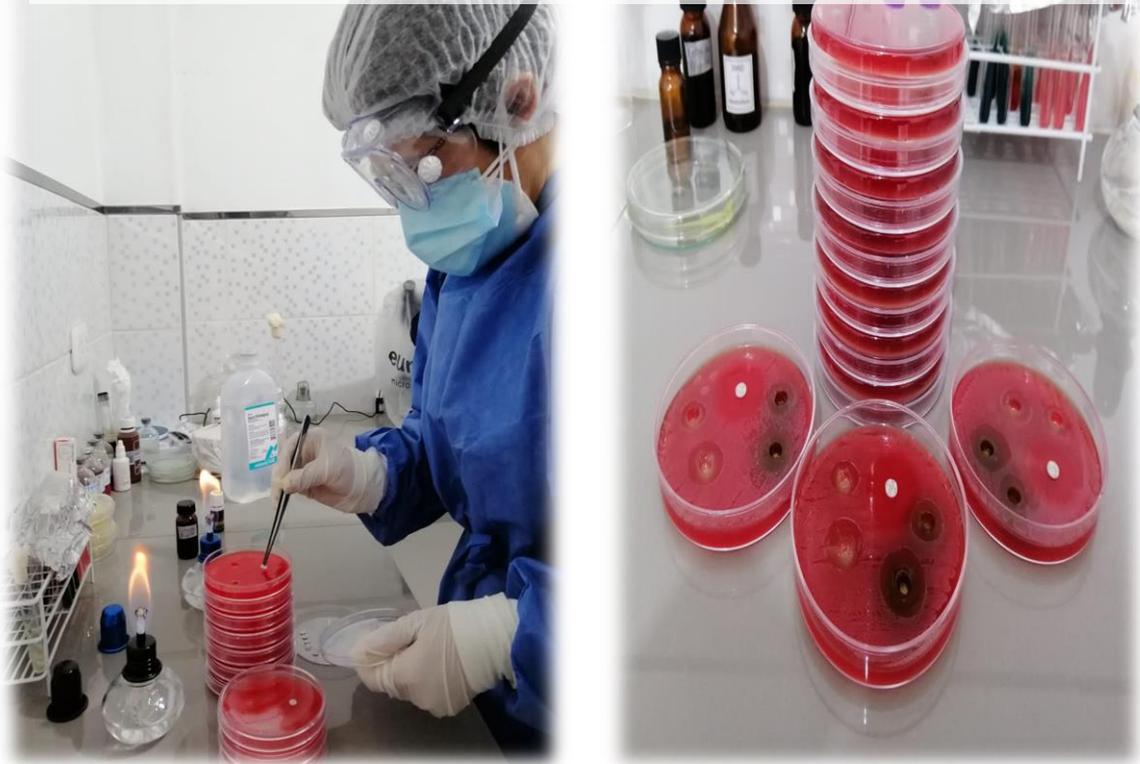
Preparación del inóculo de *H.pylori* y siembra en estrias en cajas petri con agar sangre



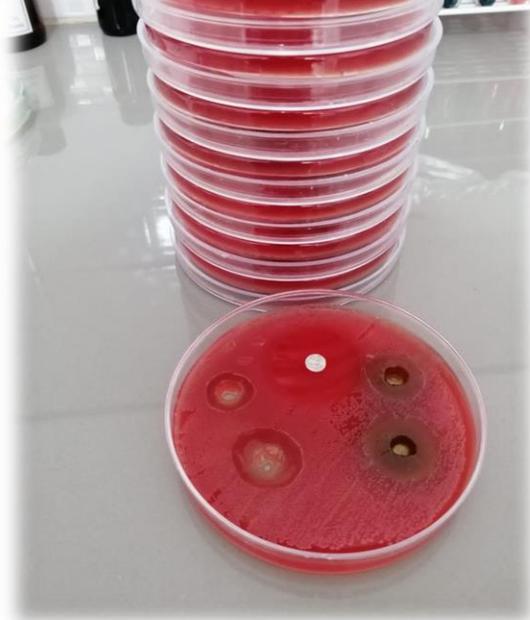
Disposición de los pocillo con extracto estanoico y discos de sensibilidad para amoxicilina más claritromicina



Colocacion de los discos de sensibilidad de amoxicilina más claritromicina en el medio de cultivo con *H. pylori* y observación del crecimiento bacteriano



Halos de inhibición de *Propolis* de *Apis mellifera* y *Zingiber officinale*



ANEXO 6

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO



San José
LABORATORIO CLÍNICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde GABRIELA HORNA HUAMÁN, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Eficacia antibacteriana de *Zingiber officinale* y Propolis de *Apis mellifera* sobre *Helicobacter pylori* comparado con amoxicilina más claritromicina in vitro", durante los días 23 al 31 de octubre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 10 días del mes de noviembre de 2020.


José Luis Calta Quevea
BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0301

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - 📠 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/