



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Estudio fitoquímico de *Tagetes filifolia* Lag. y  
determinación de la actividad antimicrobiana de  
*Zingiber officinale* Roscoe. y *Tagetes filifolia* lag.

TESIS

Para obtener el título de:

**B I Ó L O G O**

P r e s e n t a :

**Tania Xochitl Torres Lemus**

Director de tesis:

Dr. Arturo Eduardo Cano Flores



México, CDMX.

2021.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

**Biól. Marco Antonio Hernández Muñoz.**  
Técnico Académico de la Carrera de Biología  
Carrera de Biología, FES Zaragoza.

**QFB. Patricia Vidal Millán**  
Laboratorio de Producción de Microbiología de la FES Zaragoza.  
Responsable de Laboratorio  
Carrera de QFB, FES Zaragoza.

**M. en C. Dora Alicia Pérez**  
Laboratorio de Microbiología Farmacéutica de la FES Zaragoza.  
Carrera de QFB, FES Zaragoza

## Índice

1. Introducción	1
2. Marco teórico	1
2.1 Generalidades de <i>Zingiber officinale</i>	1
2.2 Usos del Rizoma de <i>Zingiber officinale</i>	1
2.3 Descripción botánica de <i>Zingiber officinale</i>	1
2.4 Metabolitos secundarios de <i>Zingiber officinale</i>	2
2.5 Generalidades de <i>T. filifolia</i>	3
2.6 Usos de <i>Tagetes filifolia</i>	4
2.7 Descripción botánica de <i>Tagetes filifolia</i>	6
2.8 Estudio fitoquímico de <i>T. filifolia</i>	6
3 Justificación	9
4 Objetivos	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos particulares	10
5 Hipótesis	11
6 Metodología	12
6.1 Material vegetal	12
6.2 Microorganismos	12
6.3 Obtención del material biológico	12
6.4 Equipos	13
6.4.1 Material de laboratorio	13
6.4.2 Medios de cultivo	13
6.4.3 Disolventes	13
6.4.4 Reactivos	13
6.5 Preparación de los extractos crudos de diferente polaridad de <i>Zingiber officinale</i> y <i>Tagetes filifolia</i>	14
6.5.1 Extractos crudos de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe	14
6.5.2 Extractos crudos de <i>Tagetes filifolia</i> Lag.	15
6.6 Evaluación cualitativa de la actividad fungicida de los extractos de <i>Z. officinale</i> por el método de medio envenenado	16

6.6.1	Siembra de hongos_____	16
6.6.2	Preparación del medio envenenado ME_____	16
6.6.3	Preparación de la solución densa de esporas y siembra de hongos_____	16
6.7	Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe y <i>Tagetes filifolia</i> Lag., por el método de Mitscher____	16
6.7.1	Preparación de la solución para la siembra de los microorganismos_____	16
6.7.2	Preparación del medio envenenado_____	17
6.7.3	Prueba de Mitscher_____	18
6.8	Separación y purificación de los compuestos obtenidos a partir de los extractos —n-hexano y AcOEt— de <i>Tagetes filifolia</i> Lag._____	18
7	Resultados y analisis_____	19
7.1	Preparación de los extractos crudos de <i>Z. officinale</i> _____	19
7.2	Preparación de los extractos de <i>T. filifolia</i> _____	19
7.3	Resultados de la actividad antifúngica de los extractos <i>Z. officinale</i> seco y fresco_	19
7.4	Resultados de la actividad antimicrobiana por el método de Mitcher de los extractos <i>Z. officinale</i> seco y fresco_____	20
7.5	Resultados de la actividad antimicrobiana por el método de Mitcher de los extractos <i>Tagetes filifolia</i> Lag seco _____	22
7.6	Separación y purificación del extracto hexánico de <i>Tagetes filifolia</i> Lag._____	23
8	Resultados y análisis de los ensayos biológicos_____	32
9	Conclusiones_____	40
10	Sugerencias_____	41
11	Bibliografía_____	42

## Abreviaturas

CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
CG	Cromatografía de gases
CCV	Cromatografía en columna a presión reducida
HS-SPME	Micro-extracción en fase solida del espacio de cabeza
PN	Productos Naturales
MS	Metabolitos secundarios
n-hex.	n-hexano
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cloruro de metileno
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
APD	Agar papa dextrosa
AST	Agar soya triptona
CST	Caldo soya triptona
ME	Medio envenenado

## 1. Introducción.

“...La medicina tradicional se define como: el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados en materia de salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales...”[1], una de estas prácticas ha sido el uso de distintas especies vegetales, para tratar diversas molestias; costumbre que se viene realizando desde tiempos muy remotos por diferentes culturas, alrededor del todo el mundo. La tradición, herbolaria ha sido heredada y modificada en las distintas culturas que la practican a lo largo de todos estos años. Tal es el impacto de la herbolaria que hoy en día la OMS reporta que países como: Chile, India, China, Colombia entre otros países, un gran porcentaje de la población recurre a la medicina tradicional para tratar diversas enfermedades [2]. En México la medicina tradicional también ha jugado un rol importante desde la época prehispánica [3], ya que en nuestro país el uso de la etnobotánica actual es el resultado del sincretismo entre la medicina usada por las diferentes culturas del México prehispánico y las traídas en la conquista española [4].

México es el segundo país con mayor número de plantas medicinales registradas; aproximadamente 4000 especies, esta cantidad solo es superada por China donde se estima que existen 7000 especies de plantas con propiedades medicinales [5, 6]; Los principios activos presentes en este tipo de plantas se deben a compuestos químicos que son sintetizados por estas plantas, los cuales las hacen útiles como medicamento, y se pueden encontrar en todo el organismo o bien sólo en algunas de sus estructuras [5].

Estos compuestos químicos son conocidos como productos naturales (PN) o metabolitos secundarios (MS), los cuales se pueden dividir en: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides [7]. Los productos naturales han demostrado tener diversas actividades biológicas, como: antioxidantes, anticancerígenos, antiúrolíticos<sup>1</sup>, nefroprotectores<sup>2</sup>, antidiabéticos, citotóxicos<sup>3</sup>, antihelmínticos, antimicrobianos y antifúngicos entre otras.

---

<sup>1</sup> Antiúrolíticos: compuesto capaz de prevenir la formación de cálculos renales.

<sup>2</sup> Nefroprotectores: sustancias con actividad renal.

<sup>3</sup> Citotóxico: Sustancia, fármaco o cualquier otro agente que destruye o tiene efectos tóxicos sobre las células de un tejido.

En las últimas décadas los productos naturales con actividad antifúngica y antimicrobiana han cobrado importancia, dentro de la comunidad científica, debido al incremento de cepas resistentes a los distintos medicamentos presentes en el mercado, por lo cual es de suma importancia buscar nuevas alternativas, así como identificar los productos naturales responsables de esta actividad biológica.

La obtención de productos naturales es un procedimiento que se realiza mediante diferentes técnicas, las cuales varían dependiendo el objetivo y el proceso que se esté realizando. Algunas técnicas usadas para la obtención de los extractos son: la maceración, extracción mediante equipo Soxhlet y por arrastre de vapor [8]; las técnicas, dependiendo, el método se puede dividir en extracciones continuas y discontinuos, y a su vez estas se separan en extracciones sólido-líquido, líquido-líquido entre otras. Mientras que para la separación e identificación de compuestos la técnica más usada es la cromatografía, la cual puede ser: cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en columna (CC), cromatografía de gases (CG) entre otros [9].

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados obtenidos en la evaluación microbiana, cualitativa de los extractos crudos de *Zingiber officinale* Roscoe y *Tagetes filifolia* Lag., así como la identificación y obtención de los productos naturales mayoritarios en *T. filifolia*.

## 2 Marco Teórico.

### 2.1 Generalidades de *Zingiber officinale* Roscoe.

La familia Zingiberácea, es la más grandes del orden Zingiberales, comprende aproximadamente 50 géneros y entre 1000-1300 especies [10-12]. Muchas de las especies de la familia zingiberácea son conocidas debido a sus propiedades curativas, entre los que destacan *Alpinia galanga* (galanga), *Curcuma globosus*, *C. zedoria*, *C. longa*, *Z. officinale*, entre otras [13].

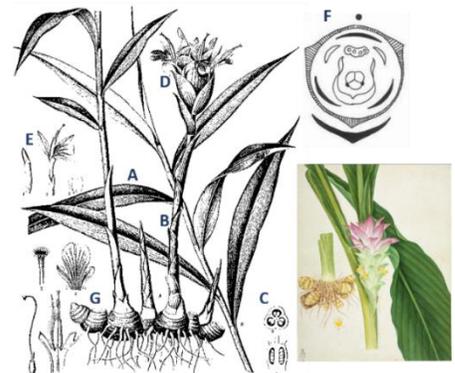
Una de las especies mejor conocidas a nivel mundial es *Z. officinale* Roscoe (jengibre), planta originaria de las zonas tropicales del sureste asiático (Indonesia) y naturalizada en diferentes partes del mundo, como: Jamaica, India, México, el Noreste de los Estados Unidos, entre otros [14]. Es famosa debido al gran número de actividades biológicas que presenta: analgésico, antiinflamatoria, antivertiginoso<sup>4</sup>, coagulante, gastro-protector, entre otras, jugando un papel importante en la medicina tradicional China, Japonesa e Hindú [15].

### 2.2 Usos del rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe.

El rizoma es la parte vegetal que se utiliza como especia o con fines medicinales. En la medicina tradicional China se ha usado desde hace 2500 años a.C., para tratar ciertas molestias como: náuseas, cólicos, calambres, entre otras. Dentro de las diversas actividades biológicas informadas en la literatura especializada para el rizoma, se describen las siguientes: analgésico, antiinflamatoria, antivertiginoso, coagulante, gastro-protector, antioxidante, antibacterial, fungicida, entre otras [16-18].

### 2.3 Descripción botánica de *Zingiber officinale*. Roscoe.

Es una planta de habito herbáceo con un tallo hojoso de 60 a 90 cm de altura (B) con rizomas ramificados y aromáticos, con hojas lanceoladas (A) que pueden medir de 15 a 30 cm de longitud, flores verdes con manchas purpuras dispuestas en espigas radicales (D) de hasta 7 cm de largo, pedúnculos de 30 cm de largo y fruto en forma de capsula; el rizoma del jengibre



**Figura 1.** Descripción de *Zingiber officinale*.

<sup>4</sup> Antivertiginosos: Sustancia que evita distintos tipos de mareo.

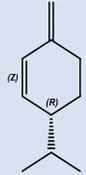
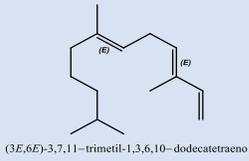
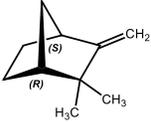
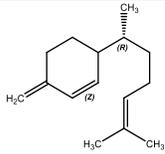
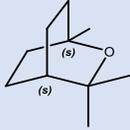
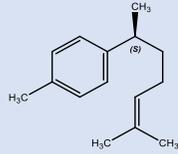
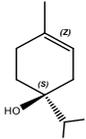
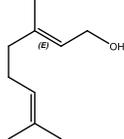
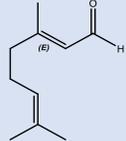
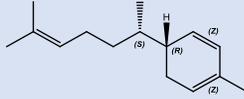
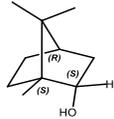
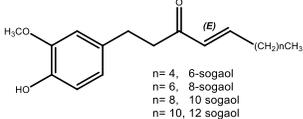
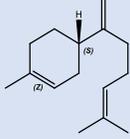
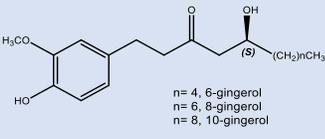
es de color beige aromático, el cual mide de 1 a 3.5 cm de grosor con forma irregular, ramificada [14, 19].

#### **2.4** Metabolitos secundarios de *Zingiber officinale* Roscoe.

La composición química del jengibre es diversa y depende del estado en el que se encuentre el rizoma seco o fresco, y la variedad con la que se esté trabajando, entre los principales compuestos del jengibre se encuentra sesquiterpenos como él (3*E*, 6*E*)- $\alpha$ -farneseno,  $\alpha$ -zingibereno,  $\alpha$ -curcumeno,  $\beta$ -bisaboleno, sesquifalandreno, entre otras, ver tabla 1 [17].

Las sustancias que le dan el sabor picante a la raíz son los gingeroles y los sogaol (cetoalcoholes), que son compuestos no volátiles con cadenas de diferente longitud, de los cuales los más importantes son el 6-gingerol y el 6-sogaol, ver tabla 1 [17, 20-21].

**Tabla 1. Compuestos mayoritarios, presentes en *Zingiber officinale* [17, 20-22].**

Compuesto	Estructura química	Compuesto	Estructura química
$\beta$ -felandreno		(3E 6E)- $\alpha$ -farneseno	 (3E,6E)-3,7,11-trimetil-1,3,6,10-dodecatetraeno
(+)-canfeno		$\beta$ -sesquifelandreno	
1,8-Cineol		(ar-curcumeno) [22]	
$\alpha$ -terpineol		Geraniol	
citral		zingibereno	
borneol		Sogaol	 n= 4, 6-sogaol n= 6, 8-sogaol n= 8, 10 sogaol n= 10, 12 sogaol
$\beta$ -bisaboleno		Gingerol	 n= 4, 6-gingerol n= 6, 8-gingerol n= 8, 10-gingerol

### 2.5 Generalidades de *Tagetes filifolia* Lag.

La familia Asterácea es una de más grandes con aproximadamente 960-1450 géneros y 20,000-30,000 especie [23]; dentro de esta familia se encuentra el género *Tagetes*, el cual comprende aproximadamente 56 especies, distribuidas desde el sureste de Estados Unidos hasta Argentina siendo México un importante centro de diversificación para el género [24-25].

Dentro del género la especie más representativa es *Tagetes erecta*, (fig. 2), mejor conocida como “cempaxúchitl” o “flor de muerto”. En México es usada durante la ceremonia de día de muertos; aunque no es la única especie del género, es la que más se emplea en estas actividades. Por otro lado *T. erecta* ha demostrado tener otros beneficios para el hombre, tanto en la industria (obtención de colorantes), como en la Medicina Tradicional Mexicana; debido a la presencia de abundantes carotenoides (luteína y zeaxantina) [26-27]. Además de estos compuestos, también contiene diversos aceites esenciales que le brindan ciertas actividades biológicas, como: antioxidante, fungicida, anticancerígeno, nematocida, entre otras [28].

Además de *T. erecta* se han informado de actividades biológicas en otras especies, como: *T. lucida*, *T. tenifolia*, *T. lunulata*, *T. filifolia*, entre otros, ver tabla 2.



**Figura 2.** *Tagetes erecta*.

*Tagetes filifolia*, conocida como: anisillo, anisillo del monte, anís mexicano, anís de campo o anís de sierra, esto debido a su aroma similar al del anís [24, 33-34] tiene una distribución desde el noreste de Estados Unidos hasta Argentina, En México esta especie se localiza en diversos hábitats, desde Baja California Sur hasta Chiapas en climas templados, semicálidos, cálidos y semisecos [35].

### **2.6** Uso de *Tagetes filifolia* Lag.

Las actividades biológicas que se reportan para esta planta se han atribuido a sus aceites esenciales; entre los usos medicinales que se le adjudican a esta planta son para aliviar el

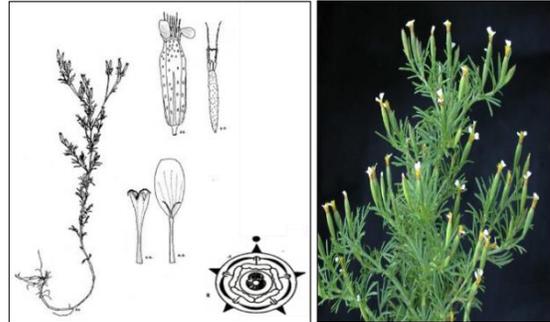
**Tabla 2. Usos y actividades biológicas de especies del género *Tagetes*.**

<b>Especie de <i>Tagetes</i></b>	<b>Usos</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencia</b>
<i>T. lucida</i>	Fiebre.		
	Problemas menstruales.		
	Diarrea.	Fungicida	[29-30]
	Contra los 'aires'.	Nematicida	
	Disentería por amibas, (giardiasis y ascariasis).	Antibiótica	
	Estimulante del sistema inmune.		
Ansiedad.			
Depresión			
<i>T. minuta</i>	Resfriados	Antimicrobiana Antifúngica.	[31-32]
	Inflamaciones respiratorias	Antiviral, Insecticida,	
	Problemas estomacales	Nematicida	
	Tratamiento contra la dermatitis	Repelente	
	Varices		
Conjuntivitis			
<i>T. terniflora</i>	Condimento	Antimicrobiano	[25-26]
		Antifúngica	
<i>T. patula</i>		Antioxidante	[25-26]
	Problemas renales	Citotóxica	
	Dolores musculares	Nematicida	
	Dolores de oídos	Insecticida	
	Oftalmia	Bactericida	
		Bioinsecticida	
	Fito remediador		
<i>T. lunulata</i>	Anticonceptivo	Fungicida	[25-26]
	Cólicos	Bactericida	
	Diarrea	Nematicida	
	Disentería	Larvicida	
	Piquetes de alacrán		
	Mordedura de víbora.		
<i>T. filifolia</i>	Dolor estomacal	Repelente	[25, 33]
	Heridas con infección	Insecticida	
	Llagas	Antifúngica	
	Trastornos	Bactericida	
	Dolores gastrointestinales		

dolor abdominal, cólicos digestivos o menstruales, diarrea, descongestionante, dolor gastrointestinal, como insecticida entre otros [36].

### 2.7 Descripción botánica de *Tagetes filifolia* Lag.

*Tagetes filifolia* es una planta de habito herbáceo, anual que puede llegar a medir de 10 a 50 cm de alto, generalmente muy ramificada, estriada con hojas opuestas de hasta 3 cm de largo, pinadas, con 3 a 9 foliolos lineares, cabezuelas generalmente numerosas sobre pedúnculos de 0.5 a 2 cm. Cabezuela con pequeñas flores sésiles, dispuestas sobre un receptáculo plano o convexo que no presenta brácteas sobre el involucre. Flores liguladas 0 a 3, corola blanca elíptica, de 1 a 1.5 mm de largo. su fruto es un aquenio con una sola semilla linear, de 3 a 6 mm de largo (Figura 3) [24, 36, 38].



**Figura 3.** *Tagetes filifolia*

### 2.8 Estudio fitoquímico de *Tagetes filifolia* Lag.

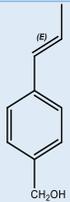
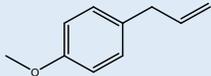
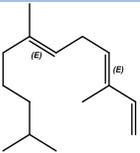
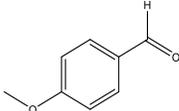
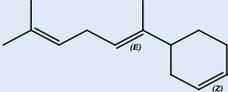
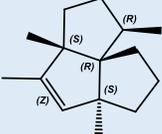
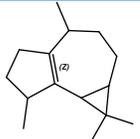
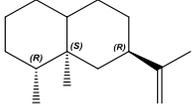
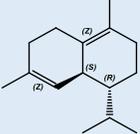
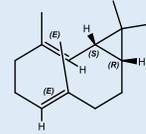
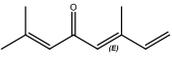
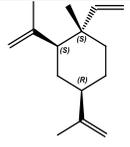
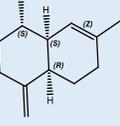
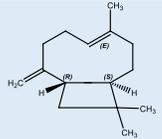
Los análisis fitoquímicos realizados a *T. filifolia*, en su mayoría se han enfocado en los compuestos volátiles de la planta, estos estudios han informado la presencia de diferentes químiotipos dentro de la misma especie, los cuales se relacionan con el origen de la planta [25,38, 39,]. Sin embargo, los químiotipos coinciden en que los compuestos mayoritarios de *T. filifolia* son el atenol (*cis o trans*) y el estragol [25].

En la tabla 3 se enlistan los componentes mayoritarios identificados por HS-SPME de *T. filifolia* colectada en Córdoba Argentina; de donde se lograron identificar 47 compuestos, de los cuales, los mayoritarios fueron el *trans*-atenol (38.05 %) y estragol (19.7 %); otros compuestos que se encontraron en cantidades considerables fueron el  $\alpha$ -farneseno (2.36 %),  $\alpha$ -bisanoleno (1.33 %), isocomeno (1.22 %), entre otros, ver tabla 3 [38].

Los componentes del segundo químiotipo se enlistan en la tabla 4, donde Feo et al., 1998 encontró que los compuestos mayoritarios son el *cis*-atenol (68.2 %) y estragol (13.7 %). Sin embargo, el resto de los componentes mayoritarios difiere a los reportados por Vázquez et

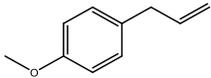
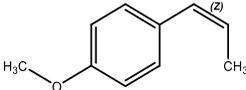
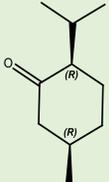
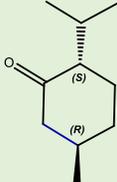
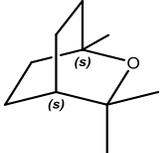
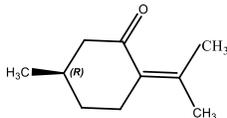
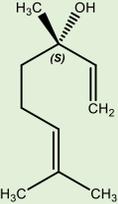
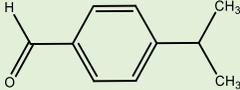
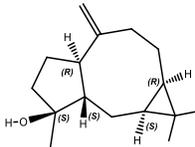
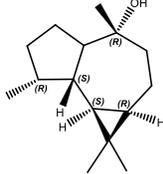
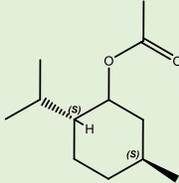
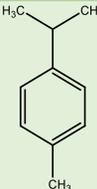
al., 2013; ya que Feo reporta a la isomentona (4.5 %), mentona (4.0 %), el 1,8-cineol (1.5 %) y la pulegone (1.1%), entre otros como compuestos mayoritarios [39].

**Tabla 3. Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Tagetes filifolia* [38].**

Compuesto químico	Estructura química	% <sup>a</sup>	Compuesto químico	Estructura química	% <sup>a</sup>
<i>trans</i> -atenol		57.06	estragol		22.3
$\alpha$ -farneseno		2.36	anisaldehído		1.98
$\alpha$ -bisaboleno		1.33	$\alpha$ -isocomeno		1.22
isoleveno		1.19	valenceno		1.03
$\delta$ -cadineno		0.99	biciclo germacrano		0.97
germacrano D		0.69	$\beta$ -elemeno		0.63
$\gamma$ -muroleno		61	$\beta$ -cariofileno		60

<sup>a</sup>: Rendimiento de los compuestos.

**Tabla 4. Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Tagetes filifolia* [39].**

Compuesto químico	Estructura química	% <sup>a</sup>	Compuesto químico	Estructura química	% <sup>a</sup>
estragol		13.7 %	<i>cis</i> -atenol		68 %
isomentona		4.5%	Mentona		4.0 %
1,8-cineol		1.5 %	Pulegona		1.1 %
linalol		0.5 %	cuminaldehído		0.5 %
espatulenol		0.5 %	Globulol		0.4 %
acetato de mentilo		0.4 %	<i>p</i> -cimeno		0.4%

<sup>a</sup>: Rendimiento de los compuestos.

### 3 Justificación.

El rizoma de *Zingiber officinale* es ampliamente utilizado como condimento en la cocina de diferentes países asiáticos, (Japón, China, entre otros), mientras *Tagetes filifolia* es utilizada en algunos municipios del Estado de México para condimentar y aromatizar algunos alimentos y bebidas, de acuerdo con estudios etnobotánicos. Además, en la medicina tradicional de las diferentes culturas de donde son originarias *Z. officinale* y *T. filifolia*, se emplean en el tratamiento de diferentes enfermedades bucales y algunas relacionadas con el aparato digestivo.

Según la OMS, las enfermedades bucodentales como la caries dental, la periodontitis (enfermedad gingival) y los cánceres de boca y faringe son un problema de salud a nivel mundial, que afecta a los países industrializados, y cada vez con mayor frecuencia a los países en desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres, donde la alimentación juega un papel importante y se centran en la denominado “*comida chatarra*”.

En la última década la resistencia que han adquirido diversos microorganismos –bacterias y hongos– frente a tratamientos convencionales, está generando la búsqueda de nuevos fármacos con actividades antimicrobianas y antifúngicas más potentes y de mayor espectro. Razón por la cual, la industria farmacéutica intensifica sus recursos en la búsqueda de nuevas sustancias prototipo que sirvan en el diseño de nuevos medicamentos. Es en este punto, es donde los productos naturales tienen un papel importante. De ahí, que actualmente se sigan realizando muchos proyectos enfocados al estudio químico de los recursos vegetales de los países considerados “megadiversos”, los cuales son potencialmente un reservorio de sustancias químicas desconocidas desde el punto de vista químico y biológico.

Con base en lo anterior se muestran los resultados obtenidos en el estudio químico de *T. filifolia*: el aislamiento, caracterización e identificación de los compuestos mayoritarios, obtenidos de los extractos de las partes aéreas de dicha planta. Además de los resultados de la evaluación cualitativa de los diferentes extractos del rizoma fresco y seco de *Z. officinale* y el aceite esencial de *T. filifolia* frente a diferentes microorganismos –bacterias, hongos y levadura– poniendo atención en microorganismos relacionados con alguna (s) enfermedad (es) bucal (es) para posteriormente determinar el CI<sub>50</sub> de aquellos extractos que muestren inhibición en el crecimiento de los diferentes microorganismos ensayados.

#### 4 Hipótesis.

Las enfermedades bucodentales –caries dental, periodontitis, cáncer de boca y faringe– según la OMS, son enfermedades con una incidencia cada vez mayor a nivel mundial, tanto en países industrializados y no desarrollados, debido principalmente a los hábitos relacionados con la alimentación y con alto consumo de grandes cantidades de azúcares y harinas. Bajo esta perspectiva es importante realizar la búsqueda de compuestos con propiedades antimicrobianas y antifúngicas más potentes y con un mayor espectro a partir de especies vegetales. Entonces con base en los usos descritos en la medicina tradicional de *Zingiber officinale* Roscoe y *Tagetes filifolia* Lag. se determinará de manera cualitativa la actividad antimicrobiana de los extractos del rizoma fresco y seco del *Z. officinale* (jengibre) y de los extractos crudos de las partes aéreas de *T. filifolia* (anisillo) frente a diferentes microorganismos asociados a una enfermedad bucodental para ponderar el uso de dichas plantas en el tratamiento y prevención de alguna enfermedad bucodental.

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivos General.

Realizar la identificación de diferentes hongos a nivel de género aislados a partir de materia orgánica en descomposición, Además, de evaluar cualitativamente los diferentes extractos del rizoma fresco y seco del *Z. officinale* (jengibre) y los extractos crudos de las partes aéreas de *T. filifolia* (anisillo) frente a diferentes microorganismos –bacterias, hongos y levadura–.

### 5.2 Objetivos Particulares

- 5.2.1 Obtener e identificación del material biológico de *Zingiber officinale* y *Tagetes filifolia*.
- 5.2.2 Preparar los extractos crudos —n-hex., AcOEt y MeOH—de *Tagetes filifolia* por maceración.
- 5.2.3 Preparar los extractos crudos de *Zingiber officinale* —n-hex., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH— por medio del equipo Soxleth, extracción sól -líq.
- 5.2.4 Evaluar la actividad antimicrobiana —de los extractos crudos de *Tagetes filifolia* y de *Zingiber officinale* por el método de Mistcher y halo de inhibición.
- 5.2.5 Analizar químicamente los extractos n-hexánico y de AcOEt de *Tagetes filifolia* empleando las diferentes técnicas cromatográficas.

## 6 Metodología.

### 6.1 Material vegetal.

- Rizoma de *Zingiber officinale*
- Partes aéreas de *Tagetes filifolia*

### 6.2 Microorganismos<sup>5</sup>.

- *Bacillus cereus*
- *Enterococcus faecalis*
- *Pseudomona aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus mutans*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Candida albicans*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Aspergillus brasiliensis*
- *Aspergillus niger*
- *Alternaria* sp.

### 6.3 Obtención del material biológico

El rizoma (1 kg) de *Zingiber officinale*, ver figura 4, fue adquirido en la Central de Abasto del Municipio de Ixtapaluca, Edo. de México, en abril y agosto de 2019.



**Figura 4.** Raíz de *Zingiber officinale*.

*Tagetes filifolia* (figura 5) fue colectada por el Dr. Robert Bye y el Biól. Eloy Arce en Ozumba, Estado de México, en agosto del 2017. Actualmente, se encuentra en proceso de identificación en el Herbario MEXU, Instituto de Biología, UNAM.



**Figura 5.** *Tagetes filifolia* Lag.

---

<sup>5</sup> Los microorganismos fueron proporcionados por el Laboratorio de Producción Microbiológica de la FEZ-Zaragoza, UNAM.

## 6.4 Equipos.

- Autoclave
- Incubadora
- Rotavapor BUCHI Waterbath modelo B-480
- Fischer-Johns
- Equipo *FT-IR Broker Tensor 750*
- Balanza analítica

### 6.4.1 Material de laboratorio.

- |                                |                             |
|--------------------------------|-----------------------------|
| ➤ Columnas cromatográficas.    | ➤ Guantes estériles         |
| ➤ Viales.                      | ➤ Jeringas estériles        |
| ➤ Cámara cromatográfica        | ➤ Cubrebocas estériles      |
| ➤ Cámara de vacío              | ➤ Papel de estraza          |
| ➤ Matraces Erlenmeyer          | ➤ Gradillas                 |
| ➤ Parrilla eléctrica           | ➤ Espátulas                 |
| ➤ Agitador magnético           | ➤ Tubos de ensaye con tapón |
| ➤ Vasos de precipitado         | ➤ Mangueras                 |
| ➤ Agitador magnético           | ➤ Mechero                   |
| ➤ Cajas Petri de 100 x 15 mm   | ➤ Gasas                     |
| ➤ Cajas Petri de 50 x 9 mm     |                             |
| ➤ Probetas                     |                             |
| ➤ Balanza granataria           |                             |
| ➤ Varilla de agitación         |                             |
| ➤ Equipo Soxhlet               | ➤ Me <sub>2</sub> CO        |
| ➤ Equipo de destilación simple | ➤ EtOH                      |
| ➤ Algodón                      | ➤ MeOH                      |

### 6.4.2 Medios de cultivos.

- Agar papa dextrosa (APD): MCD Lab, 30 g en un litro de H<sub>2</sub>O destilada
- Agar soya triptona (AST): OXOID, SM129. 30 g en un litro de H<sub>2</sub>O destilada
- Caldo soya triptona (CST): OXOID, SM129. 40 g en un litro de H<sub>2</sub>O destilada

### 6.4.3 Disolventes.

- n-hexano
- CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>
- AcOEt

### 6.4.4 Reactivos.

- Sulfato cérico amoniacal (NH<sub>4</sub>)<sub>4</sub>Ce (SO<sub>4</sub>)<sub>4</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O
- Vainillina (5 g) en MeOH (100 mL)
- Sol. FeCl<sub>3</sub>.5H<sub>2</sub>O (5 g) en MeOH (100 mL)
- Sol. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HAc/H<sub>2</sub>O (80:4:16)
- H<sub>2</sub>O destilada
- Sílica gel (SiO<sub>2</sub>), Marca Merck con tamaño de malla 70/273.
- Cromatofolios de SiO<sub>2</sub> de la marca Merck 60 F<sub>254</sub> (0.2 mm de espesor)
- Florosil
- Carbón activado

- Sulfato de sodio anhídrido (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- Sílica Flash tamaño de malla 230/400ASTM.
- Tween 80
- Eritromicina
- Fluconazol
- Itraconazol
- Dimetilsulfóxido (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO

### 6.5 Preparación de los extractos crudos de diferente polaridad de *Zingiber officinale* y *Tagetes filifolia*.

#### 6.5.1 Extractos crudos de *Z. officinale* Roscoe.

El extracto hexánico del jengibre fresco se obtuvo mediante una extracción sól-líq. continua, con ayuda del equipo Soxhlet, para lo cual el rizoma de jengibre (125-150 g) se colocó dentro de la cámara extractora durante 48 h, posteriormente el exceso de disolvente se eliminó mediante una destilación a presión reducida (rotavapor). Los rendimientos se enlistan en la tabla 5. Para la obtención de los extractos con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH se procedió de manera similar a la descrita anteriormente.

**Tabla 5. Rendimiento (%) de los extractos de *Z. officinale* (fresco).**

Rizoma	Extracto		
	n-hexano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
148.4 g	0.30	0.46	3.41

Debido a que los compuestos más abundantes del jengibre fresco son los gingeroles (ver tabla1), los cuales sufren una deshidratación cuando el material orgánico se seca; transformándose en sogaoles, por esta razón se procedió a la obtención de los extractos crudos –n-hex. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH– del rizoma seco.

El extracto n-hex. del rizoma de jengibre seco (70-85 g) se realizó por medio de una ext. sól-líq. continua mediante el equipo Soxhlet durante 48 h, posteriormente el exceso de disolvente se eliminó por destilación a baja presión, Los rendimientos obtenidos se muestran en la tabla 6.



**Figura 6.** Extracción continua, usando el equipo Soxhlet.

La preparación de los extractos con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y MeOH se realizaron de manera similar a la descrita anteriormente, ver tabla 6.

**Tabla 6. Rendimiento (%) de los extractos de *Z. officinale* (seco).**

Partes aéreas	Extracto		
	n-hexano	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	MeOH
Rizoma			
84.4 g	0.52	3	20.8

### 6.5.2 Extractos crudos de *Tagetes filifolia* Lag.

Los extractos crudos se obtuvieron mediante la técnica de maceración (extracción sól-líq. a temperatura ambiente); la extracción se realizó a partir de 1 Kg de material orgánico, previamente secado a temperatura ambiente y cortado en trozos pequeños, el cual se colocó en un recipiente de vidrio, con capacidad de 20 L, utilizando n-hex. (aprox. 8 L) durante 48 h, posteriormente se realizó una filtración a gravedad para eliminar restos de planta o sólidos que pudieran estar presente en el extracto. La eliminación del disolvente se realizó en un rotavapor y el disolvente restante se dejó evaporar a temperatura ambiente.



**Figura 7.** Extracción discontinua usando la técnica de maceración.

Para la preparación de los extractos con AcOEt y MeOH, se procedió de manera similar a la descrita en la obtención del extracto n-hex., ver tabla 7.

**Tabla 7. Rendimiento (%) de los extractos crudos de las partes aéreas de *T. filifolia*.**

Partes aéreas	Extracto		
	n-hexano	AcOEt	MeOH
1 kg	2.28	--- <sup>a</sup>	7.79

<sup>---a</sup>El rendimiento del extracto de AcOEt no fue determinado.

### 6.6 Evaluación cualitativa de la actividad fungicida de los extractos de *Z. officinale* por el método de medio envenenado [42].

La evaluación antifúngica se realizó con los extractos del jengibre fresco y seco. Y la evaluación microbiológica se realizó a concentración de 2 mg/mL de APD.

### 6.6.1 Siembra de los hongos.

Se preparó medio de cultivo APD (5.8 g de APD en 150 ml de H<sub>2</sub>O destilada) y se esterilizó a 120°C/1.5 lb/15 min. El medio de cultivo se colocó en matraces Erlenmeyer de 50 mL y se incubaron por 24 h, para verificar la esterilidad del medio y proceder a la resiembra de los cultivos puros por la técnica de punteo en APD, finalmente se incubaron por 72 h.

### 6.6.2 Preparación del medio envenenado ME.

Se agregó una mezcla de 0.2 mL de Tween 80 con 0.8 mL de sol. Salina (NaCl 0.9%) y 80 mg de los diferentes extractos del jengibre en 40 mL de APD previamente esterilizado; esta mezcla se agregó en dos cajas Petri de 100 x15 mm (20 mL por caja).

### 6.6.3 Preparación de la solución densa de esporas y siembra de los hongos.

La siembra de los hongos se realizó agregando una solución densa de esporas, que se preparó colocando 20 mL de H<sub>2</sub>O destilada en los matraces Erlenmeyer con las resiembras, este se agitó y posteriormente se tomó 1 mL de esta solución, el cual se adicionó en las cajas Petri con el medio envenenado y se incubó a 28 °C, observando el crecimiento de los diferentes microorganismos evaluados a las 24 y 48 h.

## 6.7 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de *Zingiber officinale* Roscoe y *Tagetes filifolia* Lag., por el método de Mitscher [43].

### 6.7.1 Preparación de la solución para la siembra de los microorganismos.

Para la resiembra de los diferentes microorganismos (*C. albicans*, *B. cereus*, *E. faecalis*, *S. cerevisiae*, *S. aureus*, *S. mutans* y *S. pyogenes*) se prepararon 60 ml de CST, según las instrucciones del fabricante<sup>6</sup>, este medio se colocó en tubos de ensaye (1 x 8 cm) y se esterilizó a 120°C/1.5lb/15 min. Después de la prueba de esterilidad (24 h), se procedió a la siembra de los diferentes microorganismos tomando un inóculo (asada del cultivo) de cada uno de ellos y se dejó en incubación por 24 h, transcurrido este tiempo se tomó 0.1 mL de CST, se diluyó en 9.9 mL de solución salina (0.9%, NaCl).

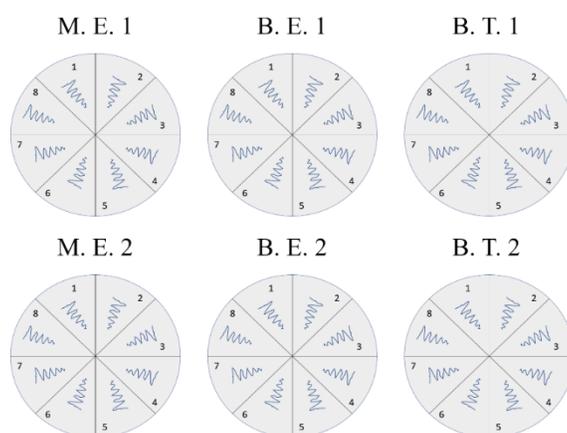
---

<sup>6</sup> OXOID, SM129. 30 g en un litro de H<sub>2</sub>O destilada.

La preparación del AST se realizó de acuerdo las indicaciones del fabricante<sup>7</sup> para un litro de H<sub>2</sub>O y se esterilizó a 120°C/1.5 lb/15 min, dejando por un periodo de 24 h, como prueba de esterilidad.

### 6.7.2 Preparación del medio envenenado (ME) [44].

Para la preparación del ME se pesaron 80 mg de extracto hexánico de *Z. officinale* y *T. filifolia* y se disolvieron en 0.2 mL de Tween 80 y 0.8 mL de sol. salina (NaCl 0.9%), hasta disolución total. Al disolver los extractos de *Z. officinale* no se observó ningún problema de solubilidad. Sin embargo, a la hora de disolver los extractos de *T. filifolia* no se llegó a la



**Figura 8.** M.E.) Medio envenenado, B.E.) Blanco de eritromicina, B.T.) Blanco del tween 80. 1) *C. albicans*, 2) *B. cereus*, 3) *E. faecalis*, 4) *P. aeruginosa*, 5) *S. cereviciae*, 6) *S. aureus*, 7) *S. mutans*, 8) *S. pyogenes*.

solubilidad total, debido a que ciertos compuestos presentes en los extractos no se lograron disolver, posteriormente se vertieron en 40 mL de AST, los cuales se repartieron en dos cajas Petri (10 x 2 cm) y se incubaron durante 24 h con el fin de realizar la prueba de esterilidad.

### 6.7.3 Prueba de Mitscher.

Después de la prueba de esterilidad, las cajas Petri que contenían el medio de cultivo envenenado fueron inoculados con los diferentes microorganismos. Para ello se dividió la caja en 8 sectores iguales, como se muestra en la figura 8, el sembrado de los microorganismos se realizó por medio de la técnica de estría, posteriormente, las cajas Petri fueron incubadas; el crecimiento de los microorganismos se observó a las 24 y 48 h.

<sup>7</sup> AST: 39 g en un litro de H<sub>2</sub>O destilada.

Debido a los resultados obtenidos en las pruebas del jengibre se tomó la decisión de realizar una segunda prueba con una concentración más alta de los extractos 4 mg/mL; esta prueba solo se realizó con los extractos del jengibre.

### 6.8 Separación y purificación de los compuestos obtenidos a partir de los extractos —n-hexano y AcOEt— de *Tagetes filifolia* Lag.

La separación de los compuestos mayoritarios se realizó mediante cromatografía en columna a presión reducida (CCV). Para el empaquetamiento de las columnas se usó florosil y sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) como adsorbentes y  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  como agente desecante; la elución de la columna se realizó mediante mezclas de disolventes de polaridad creciente (n-hexano, AcOEt y  $\text{Me}_2\text{CO}$ ).

El desarrollo cromatográfico de la columna se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF). La fase móvil estuvo constituida por diferentes mezclas de disolventes (n-hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt,  $\text{Me}_2\text{CO}$  y MeOH) y como reveladores químicos sulfato cérico amoniacal, vainillina,  $\text{FeCl}_3$  y HAc/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ / $\text{H}_2\text{O}$ .

En la purificación de los compuestos se realizó por medio de recristalizaciones sucesivas por par de disolventes y recristalización fraccionada, utilizando diferentes disolventes (n-hexano,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , AcOEt,  $\text{Me}_2\text{CO}$  y MeOH).

La identificación y caracterización de los compuestos se obtuvo por medio de la determinación de su punto de fusión (pf), factor de retención ( $R_f$ ) y solubilidad. La presencia de los diferentes grupos funcionales presentes en los diferentes compuestos se logró por medio de su espectro de IR (Equipo *FT-IR Broker Tensor 750*).

## 7 Resultados y Análisis.

### 7.1 Preparación de los extractos crudos de *Z. officinale*.

Se prepararon los extractos —hexánico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH— del rizoma de *Z. officinale* fresco y seco, los rendimientos se muestran en la tabla 8 y 9.

**Tabla 8. Rendimiento (%) de los extractos de *Z. officinale* (fresco).**

Rizoma	Extracto		
	n-hexano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
148.4 g	0.30	0.46	3.41

**Tabla 9. Rendimiento (%) de los extractos de *Z. officinale* (seco).**

Partes aéreas Rizoma	Extracto		
	n-hexano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
84.4 g	0.52	3	20.9

### 7.2 Preparación de los extractos de *T. filifolia*.

De igual manera se prepararon los extractos —hexánico, AcOEt y MeOH— de *T. filifolia* por la técnica de maceración, los rendimientos se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10. Rendimiento (%) de los extractos crudos de las partes aéreas de *T. filifolia*.**

Partes aéreas	Extracto		
	n-hexano	AcOEt	MeOH
1 kg	2.28	--- <sup>a</sup>	7.79

---<sup>a</sup>El rendimiento del extracto de AcOEt no fue determinado.

### 7.3 Resultados de la actividad antifúngica de los extractos *Z. officinale* seco y fresco.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas antifúngicas de los extractos del jengibre en *A. brasiliensis*, en esta prueba se observó que los extractos que mostraron cierta inhibición fueron los extractos de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del jengibre fresco y el seco; sin embargo, se observa que el crecimiento de *A. brasiliensis* fue mayor en comparación con los blancos del Itraconazol, esto se puede observar en los anexos 3 y 4.

**Tabla 11. Resultados de la inhibición de *Aspergillus brasiliensis*.**

	Extractos frescos de <i>Z. officinale</i>			Extractos secos de <i>Z. officinale</i>		
	hexanico	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	hexanico	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
24 h	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>
48 h	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>

++<sup>a</sup>: inhibición, -+<sup>c</sup>: mediana inhibición, --<sup>b</sup>: Sin inhibición. controles: Itraconazol y *A. brasiliensis*.

**Tabla 12. Resultados de la inhibición de *Aspergillus niger*.**

	Extractos frescos de <i>Z. officinale</i>			Extractos secos de <i>Z. officinale</i>		
	hexanico	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	hexanico	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
24 h	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>
48 h	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>

++<sup>a</sup>: inhibición, -+<sup>c</sup>: mediana inhibición, --<sup>b</sup>: Sin inhibición. controles: Itraconazol y *A. niger*.

Con ninguno de los extractos se logró inhibir completamente el crecimiento de *A. niger*. Los extractos que mostraron actividad fueron: el extracto hexanico del jengibre fresco y los extractos hexanicos y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del jengibre seco, como se muestra en la tabla 12, ver anexos 5 y 6. (pp. 57-58)

**Tabla 13. Resultados de la inhibición de *Alternaria sp.***

	Extractos frescos de <i>Z. officinale</i>			Extractos secos de <i>Z. officinale</i>		
	hexanico	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH	hexanico	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	MeOH
24 h	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>
48 h	++ <sup>a</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>

++<sup>a</sup>: inhibición, -+<sup>c</sup>: mediana inhibición, --<sup>b</sup>: Sin inhibición. Controles: Itraconazol y *Alternaria sp.*

Con base en las tablas 11, 12 y 13 se observó que el extracto hexanico del jengibre fresco a las 24 y 48 h mostro mayor actividad frente a *Alternaria sp*, mientras el extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del jengibre fresco mostro cierta inhibición.

Con respecto a los extractos del jengibre seco se pudo observar que los tres extractos –n-hex., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH– mostraron inhibición a las 24 h, mientras que a las 48 h se observó una disminución en el crecimiento con respecto al control del hongo en los extractos hexanico y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

#### 7.4 Resultados de la actividad antimicrobiana por el método de Mitcher de los extractos *Z. officinale* seco y fresco.

La evaluación realizada de los extractos de *Z. officinale* seco y fresco por el método de Mitcher se realizó con dos levaduras, una bacteria Gram-negativa y cinco bacterias Gram-positiva. En la tabla 11, se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana de los distintos extractos del jengibre (fresco y seco).

**Tabla 14. Resultados de la Evaluación Antimicrobiana por el Método de Mitcher (2 mg/mL).**

	Extractos frescos				Extractos secos			
	n-hexano		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		n-hexano		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>B. cereus</i>	-+ <sup>c</sup>	nd	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>
<i>C. albicans</i>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	nd	nd	nd	nd	Nd	nd
<i>P. aeruginosa</i>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	nd	nd	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>
<i>S. aureus</i>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>
<i>S. mutans</i>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>
<i>S. pyogenes</i>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	nd	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>

++<sup>a</sup>: inhibición, --<sup>b</sup>: Sin inhibición, -+<sup>c</sup>: mediana inhibición, nd: no determinado, controles: Eritromicina y microorganismos.

Durante las evaluaciones realizadas a una concentración de 2 mg/mL AST se observó que los extractos del rizoma de jengibre fresco y seco (n-hex. y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), inhibieron el crecimiento de *C. albicans* y *S. cerevisiae*. Mientras que en la determinación antibacteriana con, *S. aureus*, *S. mutans* *B. cereus* y *S. pyogenes* se observó cierta actividad en comparación con los testigos de la eritromicina y de la bacteria correspondiente. Ninguno de los extractos mostro actividad frente *P. aeruginosa*. Con respecto a *E. faecalis* se recomienda realizar nuevamente la evaluación. Con respecto a la actividad antibacteriana de los extractos del rizoma seco y fresco se observó mayor inhibición con *B. cereus*.

Con base en los resultados anteriores se realizó la evaluación a una mayor concentración 4 mg/mL AST (80g /20 mL), frente a *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. mutans* y *B. cereus*, ver tabla 15. Con respecto a *B. cereus* se observó una moderada actividad del extracto n-hexanico del rizoma fresco y seco, mientas que el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del rizoma seco y fresco inhibió a dicho microorganismo.

A la concentración de 4 mg/mL AST, se observó una mayor inhibición de *S. aureus*, *S. mutans* y *E. faecalis*. Donde se observa que *S. aureus* mostró una actividad de moderada a alta con cualquiera de los extractos.

**Tabla 15. Resultados de la Evaluación Antimicrobiana por el Método de Mitcher (4 mg/mL).**

	Extractos frescos				Extractos secos			
	n-hexano		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>		n-hexano		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>B. cereus</i>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	++ <sup>a</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	++ <sup>a</sup>	++ <sup>a</sup>
<i>E. faecalis</i>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>	++ <sup>a</sup>	-- <sup>b</sup>	++ <sup>a</sup>	-- <sup>b</sup>	-+ <sup>c</sup>	-- <sup>b</sup>
<i>S. aureus</i>	++ <sup>a</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	-+ <sup>c</sup>	++ <sup>a</sup>	-+ <sup>c</sup>	++ <sup>a</sup>	-+ <sup>c</sup>
<i>S. mutans</i>	++ <sup>a</sup>	-- <sup>b</sup>	++ <sup>a</sup>	-- <sup>b</sup>	++ <sup>a</sup>	-- <sup>b</sup>	++ <sup>a</sup>	-+ <sup>c</sup>

++<sup>a</sup>: inhibición, --<sup>b</sup>: Sin inhibición, -+<sup>c</sup>: mediana inhibición, controles: Eritromicina y microorganismos.

Por otro lado, *S. mutans* mostró alta actividad a las 24 h de la evaluación con todos los extractos; sin embargo, trascurridas 48 h se observó una disminución en su actividad en el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del jengibre seco. Las pruebas realizadas con el resto de los extractos a las 48 h no mostraron actividad (se observó un crecimiento similar al control de la bacteria).

Con respecto a *E. faecalis* en general se puede observar que los diferentes extractos inhibieron su desarrollo de manera moderada.

### 7.5 Resultados de la actividad antimicrobiana por el método de Mitcher de los extractos *Tagetes filifolia* Lag seco.

La evaluación antimicrobiana de *T. filifolia* se realizó con una concentración de 2.5 mg/mL con los tres diferentes extractos —n-hexano, AcOEt y MeOH—; los resultados se observan en la tabla 16.

**Tabla 16. Resultados de la Evaluación Antimicrobiana por el Método de Mitcher (2.5 mg/mL).**

	n-hexano		AcOET		MeOH	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>B. cereus</i>	-- <sup>b</sup>					
<i>C. albicans</i>	-- <sup>b</sup>					
<i>E. faecalis</i>	-- <sup>b</sup>					
<i>P. aeruginosa</i>	-- <sup>b</sup>					
<i>S. ceveviciae</i>	-- <sup>b</sup>					
<i>S. aureus</i>	-- <sup>b</sup>					
<i>S. mutans</i>	-- <sup>b</sup>					
<i>S. pyogenes</i>	-- <sup>b</sup>					

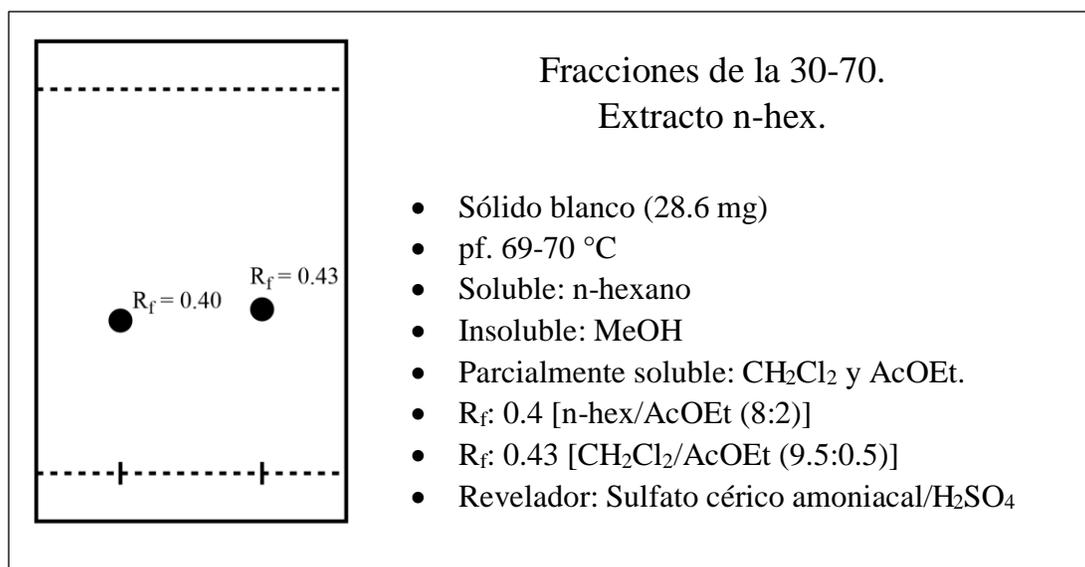
--<sup>b</sup> Sin inhibición, controles: Eritromicina y microorganismo.

En los dos ensayos realizados con *T. filifolia* no se observó actividad frente a ninguno de los microorganismos de prueba ensayados, ver anexos del 15-17.

### 7.6 Separación y purificación del extracto hexánico de *Tagetes filifolia* Lag.

De la separación cromatográfica del extracto hexánico del "anisillo", se obtuvieron 4 sólidos que a continuación describen.

A partir de la fracción 30-70 eluidas con n-hex (100%) cristalizó espontáneamente a temperatura ambiente un sólido, el cual fue purificado por cristalización por par de disolventes [AcOEt/n-hex], obteniéndose 28.6 mg de un sólido blanco de pf. 69-70 °C y con  $R_f$  0.40 [n-hex/AcOEt (8.0:2.0)] y 0.43 [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (9.5:0.5)]. Con base en los datos obtenidos de su espectro de IR (ver figura 14, pp 28) y pf, se llegó a la conclusión que se trataba de una cera, ver figura 9.

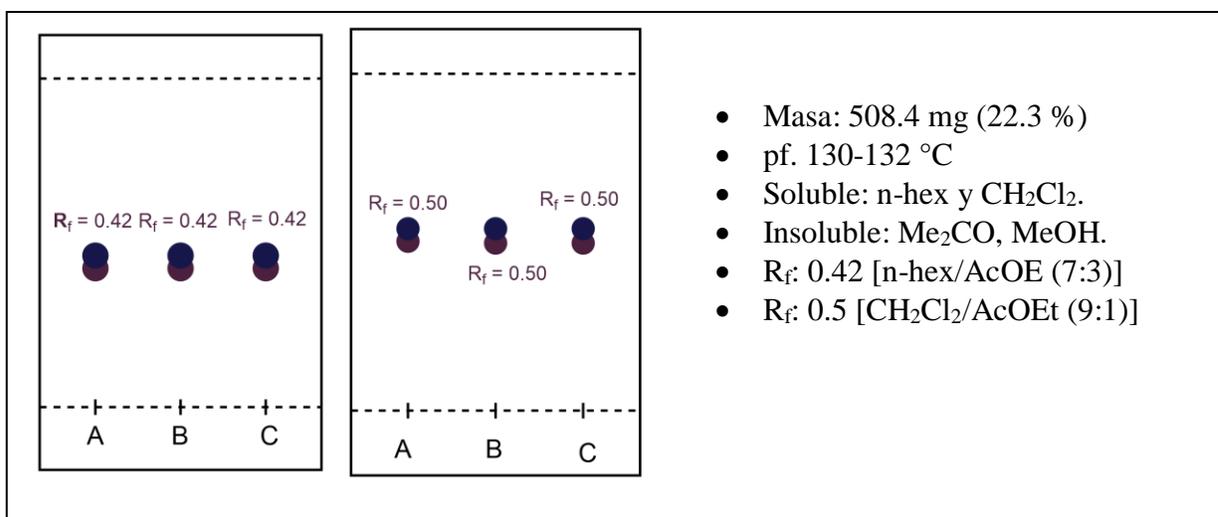


**Figura 9.** Propiedades físicas del sólido obtenido con n-hex. (100%).

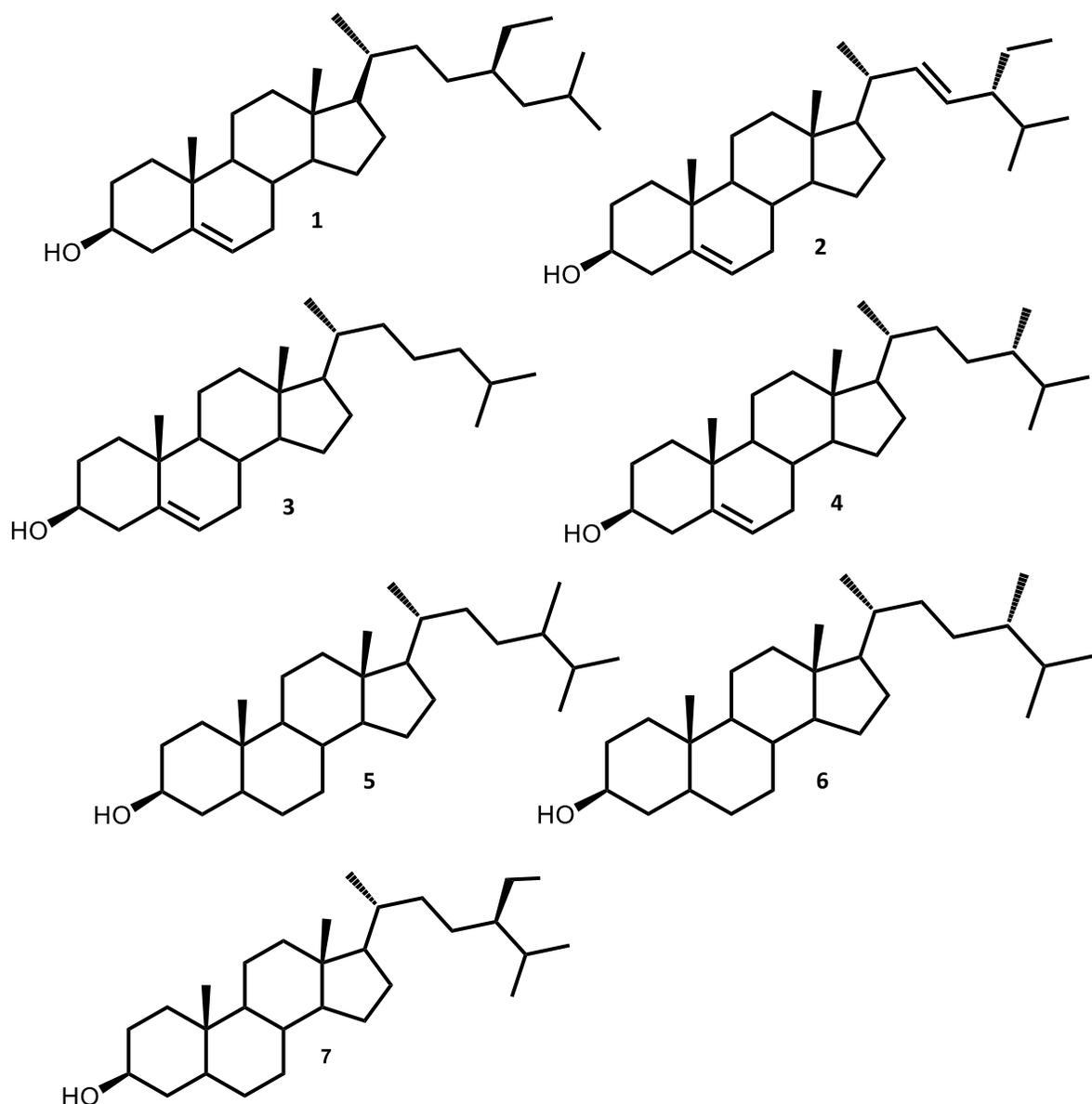
De las fracciones 76-175 obtenidas de la separación cromatográfica del extracto n-hexánico con una mezcla de elución n-hex/AcOEt (9:1), se obtuvo la mezcla de  $\beta$ -sitoesterol (**1**) y estigmasterol (**2**), la cual fue identificada en CCF con sulfato cérico amoniacal/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y utilizando una referencia auténtica. Dicha mezcla está constituida por dos compuestos que pertenecen al grupo de los fitoesteroles, los cuales cumplen una función estructural en la membrana celular de los vegetales [45]. Los fitoesteroles y fitoestanoles son esteroides vegetales (compuestos de 28 o 29 átomos de C), de estructura similar al colesterol (27 C, figura 10), los cuales derivan del ciclopentano perhidrofenantreno, diferenciándose en la cadena hidrocarbonada lateral en C-24. El colesterol (**3**) presenta una cadena formada por

ocho carbonos saturados. En cambio, los fitosteroles presentan 9 o 10 átomos de C ( $\beta$ -sitosterol **1** y campesterol **4**), algunos presentan doble enlace como el estigmasterol **2**. Los fitoestanoles están en menor proporción en el reino vegetal, pero se preparan por reducción química de los fitoesteroles, obteniendo sitostanol (**5**), campestanol (**6**) y stigmastanol (**7**). [46-47] Estos metabolitos secundarios son beneficiosos para el hombre tanto así que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria recomienda consumir entre 1.5 a 2.4 g/día de fitoesteroles y/o estanoles para reducir el colesterol en sangre. Además, la FDA ha aprobado el papel de los alimentos que contienen fitoesteroles dentro de una dieta baja en grasas saturadas y colesterol para reducir el riesgo de enfermedades cardíacas, especialmente el consumo de al menos 1.3 g/día de esteroides, dos veces al día. También se ha reportado actividad antibacteriana del estigmasterol y del  $\beta$ -sitosterol [48-49]. Y otras investigaciones han indicado que el estigmasterol puede ser útil en la prevención de ciertos cánceres, incluidos los de ovario, próstata, mama y colon además de presentar propiedades antioxidantes, hipoglucémicas e inhibidoras de la tiroides [50].

La mezcla de fitoesteroles también se obtuvo de la separación cromatográfica del extracto con AcOEt de *T. filifolia*, a partir de las fracciones de la 32-78 con una mezcla de elución de n-hex/AcOEt (9:1), obteniéndose un total de 508.4 mg (22.3 %).

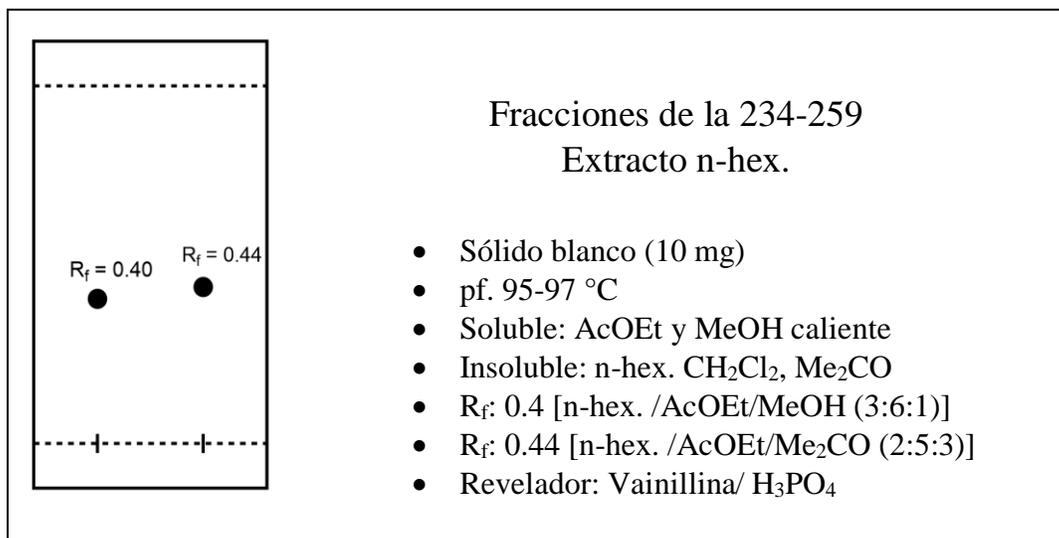


**Figura 10.** CCF de la mezcla de  $\beta$ -sitosterol (**1**) y estigmasterol (**2**). A) referencia de la mezcla de **1** y **2** pura, B) La mezcla de **1** y **2** obtenido del extracto n-hexánico y C) la mezcla de **1** y **2** obtenida del extracto de AcOEt.

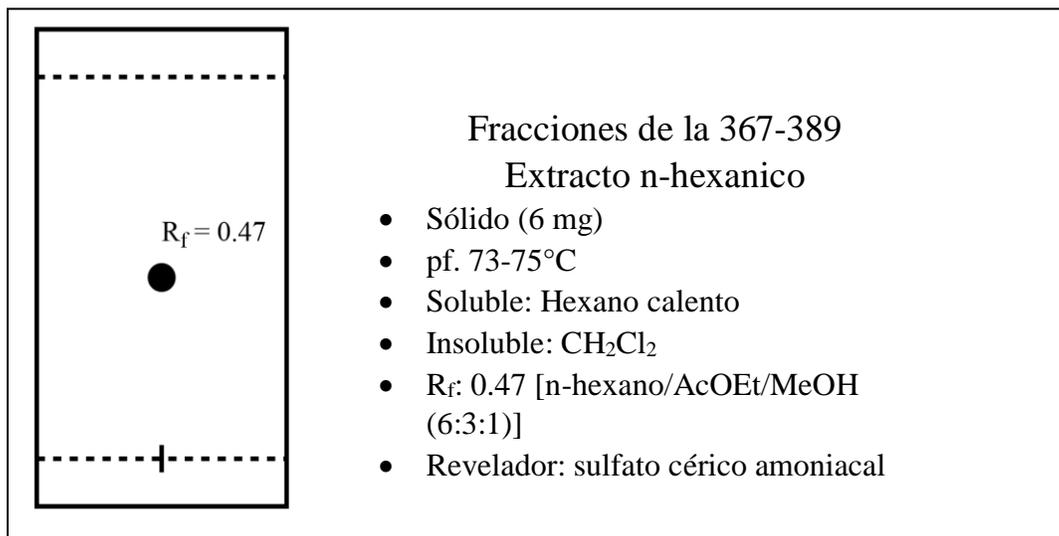


**Figura 11.** estructuras químicas de los fitoesteroles y fitoestanoles, 1) β-sitosterol, 2) Estigmasterol, 3) Colesterol, 4) Campesterol, 5) sitosterol, 6) campestanol, 7) Estigmasteranol.

De la separación cromatográfica del extracto hexánico se obtuvieron las fracciones 557-589 eluídas con AcOEt (100 %), donde se observó la cristalización espontánea de un sólido de pf. de 64°C, el cual fue soluble en n-hex., CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y AcOEt. Con base en su punto de fusión y sus datos de IR, permitieron concluir que se trata de una cera, ver figura 13.



**Figura 12.** CCF del sólido obtenido de la fracción 234-259 del extracto n-hexánico.



**Figura 13.** CCF del sólido obtenido de las fracciones 367-389 del extracto n-hexánico de *T. filifolia*.

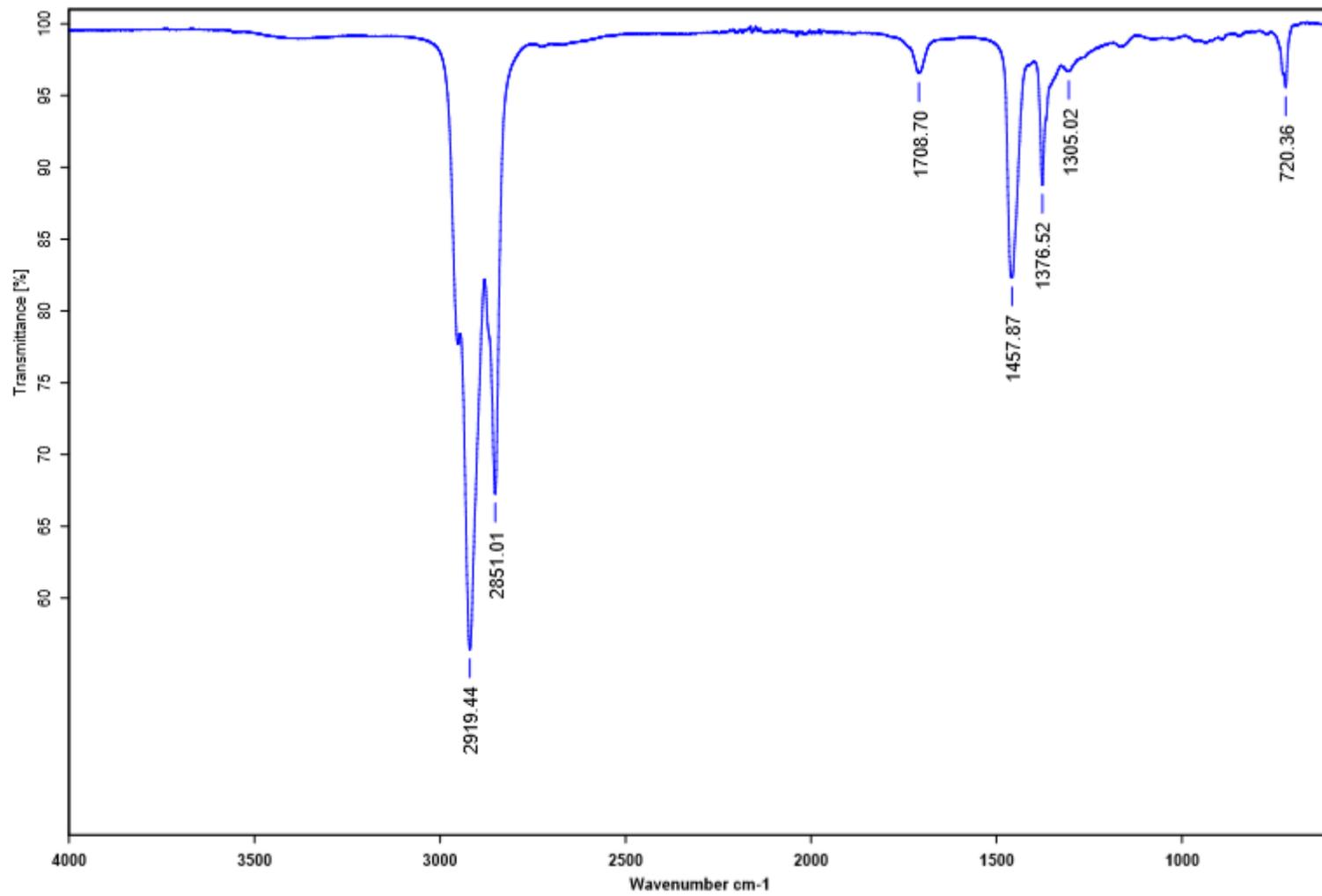
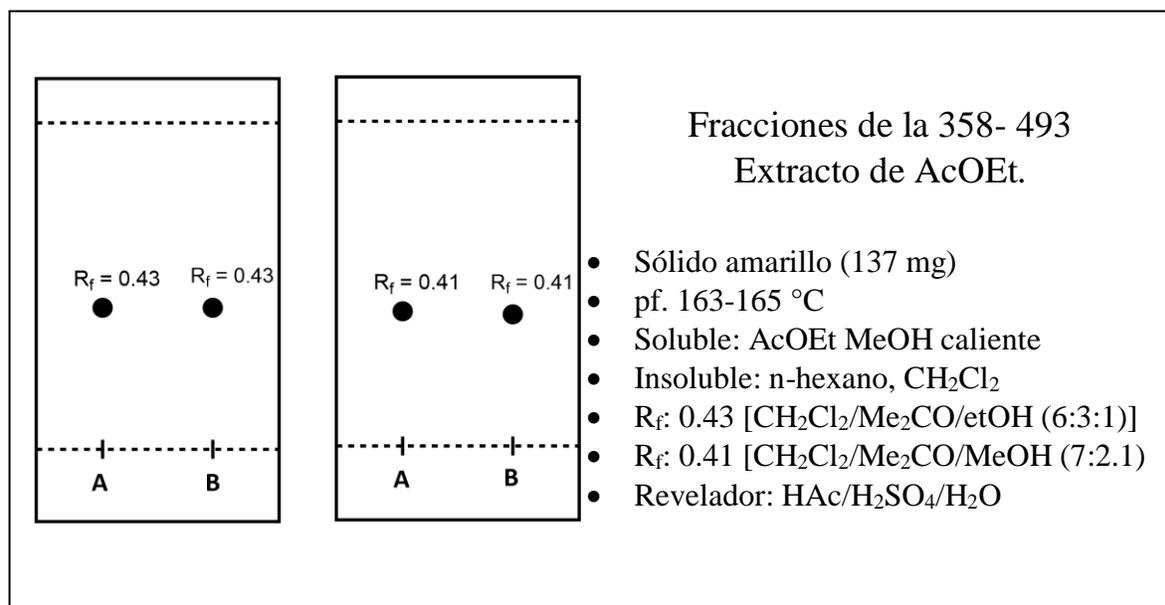


Figura 14. Espectro de IR (nujol) de las fracciones 30-70.

La columna del extracto de AcOEt presentó problemas durante la separación, ya que debido a la gran cantidad de pigmento presente en las fracciones se tuvo que recurrir a la decoloración con carbón activado en una columna con sílica gel.

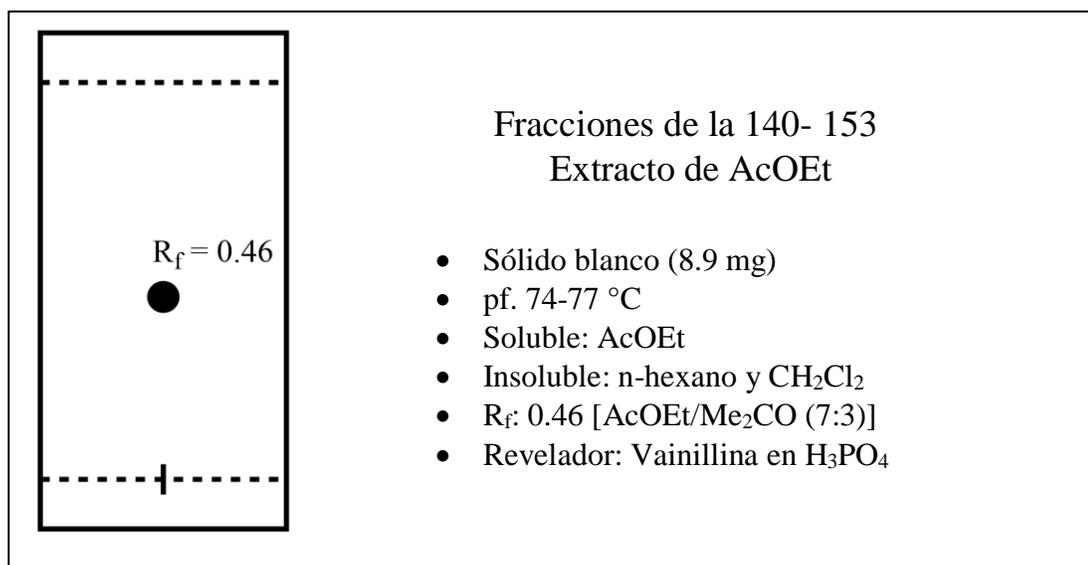
De la decoloración de dichas fracciones se obtuvo un sólido de pf. de 95-97°C y  $R_f$  de 0,4 y 0,44 con mezclas de n-hex. /AcOEt/MeOH (3:6:1) y n-hex./AcOEt/Me<sub>2</sub>CO (2:5:3) respectivamente.



**Figura 15.** CCF del sólido obtenido de las fracciones 358- 493 del extracto de AcOEt de *T. filifolia*.

El sólido obtenido de las fracciones 358-493 (137 mg) con mezclas de n-hexano/AcOEt (1:1 a 3:7), presentó un pf. de 163-165 °C, este sólido es soluble en disolventes polares, como MeOH caliente (68 °C). Con base en sus propiedades físicas y espectros de IR se infirió que se trata de un derivado glicosilado de los fitoesteres descritos previamente en este trabajo (pp.31).

El último sólido se obtenido con AcOEt, a partir de la fracción 140-153, n-hexano/AcOEt (8:2), de pf. 74-77°C, este compuesto mostró ser insoluble en disolventes poco polares, como el n-hexano y el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. De dicho sólido no se obtuvieron datos adicionales para su identificación y caracterización.



**Figura 16.** CCF del sólido obtenido de las fracciones 140-153 del extracto de AcOEt de *T. filifolia*.

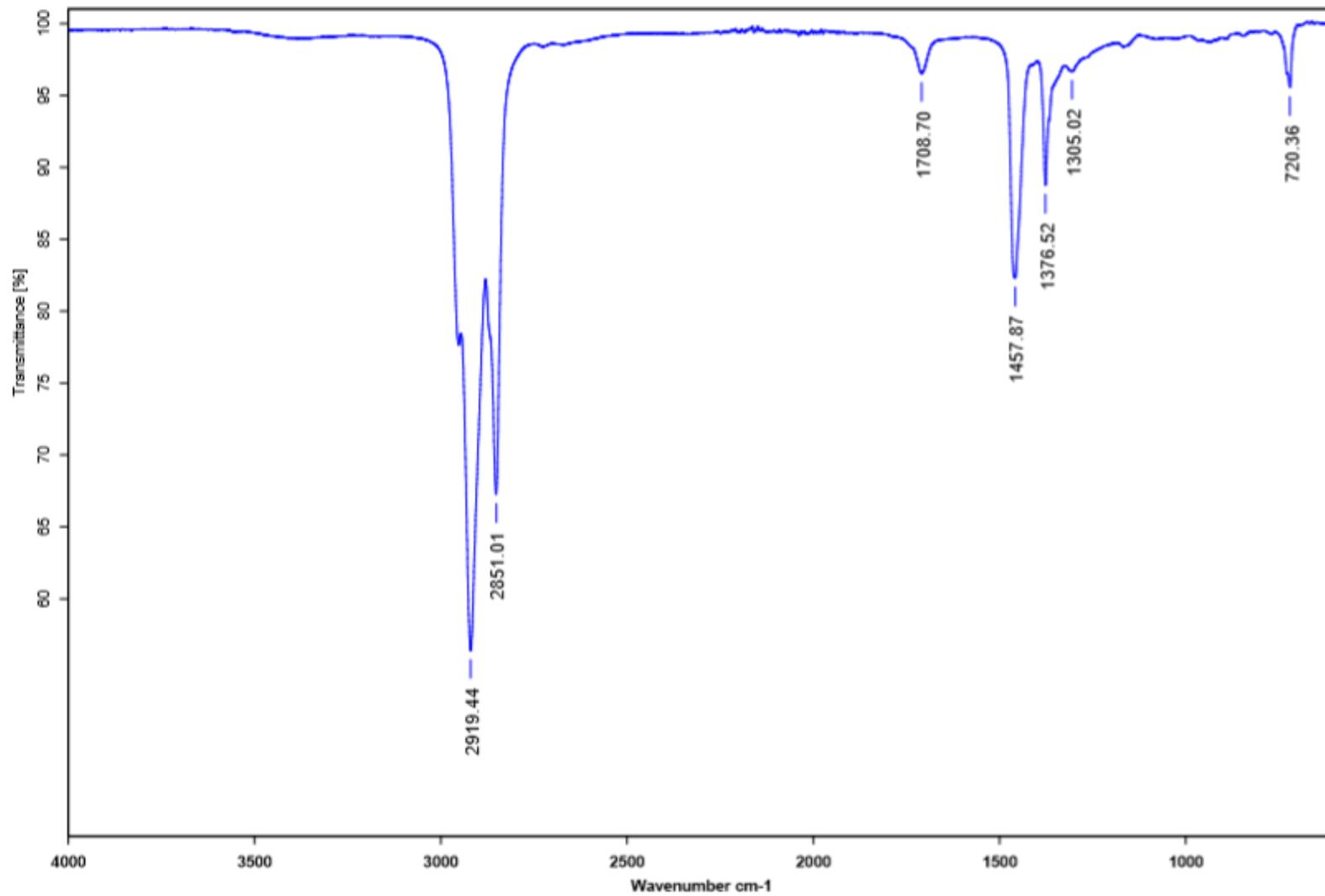


Figura 17. Espectro de IR (nujol) de las fracciones 358-493.

## 8. Resultado y análisis de los ensayos biológicos.

En este trabajo se evaluó principalmente, la actividad antimicrobiana de tres organismos relacionados con diferentes infecciones bucodentales los cuales son *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*.

*Streptococcus mutans* es un coco gran positivo, anaerobio facultativo. *S. mutans* se encuentra en el microbiota bucal de manera común. Sin embargo, bajo ciertas condiciones este microorganismo comienza a desplazar al resto de las poblaciones bacterianas, cambiando el pH bucal de 7-4.2, provocando la desmineralización del tejido duro y generando caries bucales. Aunque *S. mutans* no es el único microorganismo responsable de la caries dental se encuentra en mayor proporción en pacientes con dicho padecimiento. Además, de las caries dentales, esta bacteria se encuentra asociada con otras enfermedades, como endocarditis, periodontitis, entre otras [50-54].

El tratamiento utilizado para controlar las infecciones relacionadas con *S. mutans* comúnmente son los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (amoxicilina, penicilina o bien una mezcla de amoxicilina con ácido clavulánico). Sin embargo, en los últimos años se ha observado que la resistencia de *S. mutans* hacia este tipo de medicamentos ha ido en aumento [55].

El grupo de los *Enterococcus* son bacteria Gram positivas, anaerobias facultativas, no esporulantes. Este grupo de microorganismo se puede encontrar de manera ubicua en el H<sub>2</sub>O o suelo; sin embargo, también se encuentra comúnmente en el tracto gastrointestinal de animales como organismo comensales, sin causar ningún daño al huésped [56]. Las especies pertenecientes a este género suelen ser organismos hostiles, llegando a soportar pH extremos (pH 9.6), altas concentraciones salinas, metales pesados, desecación y temperaturas elevadas [57], siendo solo *E. faecium* y *E. faecalis*, las principales especies del género asociadas con enfermedades de importancia médica [58].

A pesar de que *E. faecalis* suele habitar el tracto gastrointestinal, la cavidad oral y los tractos genitales humanos, solo bajo ciertas condiciones y debido a que es un patógeno oportunista, se ha relacionado con diversas patologías, las cuales en los últimos años han causado interés médico, convirtiéndose en el tercer microorganismo aislado con mayor frecuencia en muestras hospitalarias, siendo responsable de diversas enfermedades, tales como:

endocarditis, sepsis, infecciones del tracto urinario. Este microorganismo también se encuentra con mucha frecuencia en infecciones secundarias del conducto radicular en pacientes con y sin antecedentes de endodoncia, muchos autores argumentan que su alta resistencia es la que ocasiona que su población aumente en un sistema inmunocomprometido y no a su virulencia. Un estudio realizado por M. M. Cassal indica que la resistencia de *E. faecalis* a diversos antibióticos va en aumento, siendo el tratamiento más exitoso hasta el momento en infecciones bucodentales con enjuagues de hipoclorito de sodio (NaClO) [58-59].

Por otro lado, *Candida albicans* es un organismo comensal presente en las mucosas digestivas, genitales, respiratoria y bucal en un gran número de la población mundial. Sin embargo, debido ciertas alteraciones en el microbiota y el sistema inmunitario del hospedador se transforma en un agente patógeno, causando candidiasis, la cual pueden ser superficial o profunda. La candidiasis superficial podría ser oral (pseudomembranosa) y genital (vulvovaginal o balantis<sup>8</sup>). Mientras que las candidiasis profundas producen lesiones agudas o crónicas que pueden afectar uno o más órganos, estas infecciones se presentan con mayor frecuencia en personas con un sistema inmune comprometido (VIH, diabetes, con tratamientos como quimioterapia y radioterapia, entre otros). Los principales factores de virulencia de *C. albicans* son la síntesis de moléculas de adhesión, la secreción de enzimas hidrolíticas, variabilidad antigénica, cambios fenotípicos y el dimorfismo. El tratamiento convencional para tratar infecciones por candidiasis es antifúngico azólicos (ketoconazol, fluconazol y miconazol) y los poliénicos (nistina y anfotericina) [60-64].

Los resultados de este trabajo mostraron que el jengibre podría ser una alternativa para tratar infecciones bucodentales, esto se puede observar en las tablas 11 y 12. Así como, en los anexos del 7 al 14, donde se observa una actividad considerable de los extractos n-hexánico y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> del jengibre fresco y seco. Un estudio realizado donde se evaluó el extracto EtOH del jengibre fresco en *C. albicans*, *S. mutans* y *E. faecalis* observó la inhibición de estos tres microorganismos a las concentraciones de 25 y 75 µL. A la concentración de 75 µL se observó una inhibición en *S. mutans* (8 mm), *E. faecalis* (14 mm) y *C. albicans* (11 mm).

---

<sup>8</sup> Balantis: Término médico que se usa para hacer referencia a la inflamación del glande o, menos frecuente, el clítoris.

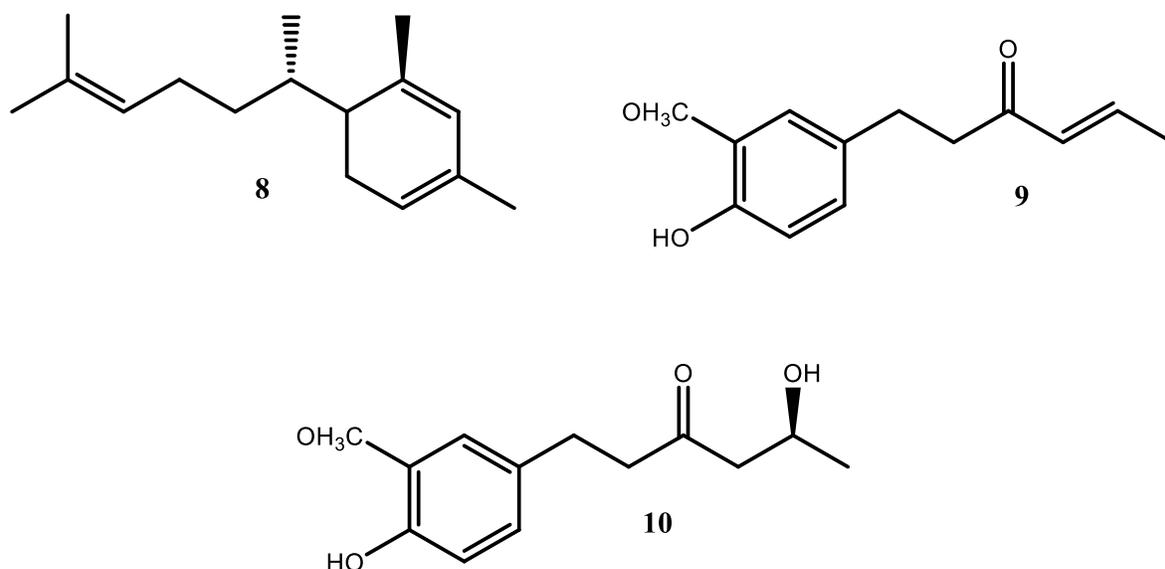
Adicionalmente en la literatura se ha informado de la evaluación antimicrobiana del jengibre en estos tres microorganismos [65].

Otros trabajos que evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos del jengibre en *S. mutans*, son el aceite esencial de las hojas [66], el extracto EtOH del rizoma seco [67], y los diferentes extractos —MeOH, EtOH, Et<sub>2</sub>O, CHCl<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O— del rizoma seco, siendo el extracto MeOH el que mostró mayor actividad (23 mm) [68].

El aceite esencial del rizoma fresco mostró actividad frente a *E. faecalis* [69-70]. Por otro lado, se encontró que el aceite esencial del rizoma del jengibre mostro actividad bacteriostática [71-72].

Por otro lado, se determinó que el extracto EtOH del rizoma fresco y el extracto EtOH del polvo de la raíz del jengibre mostraron importante actividad frente a *C. albicans* [20, 73].

De la evaluación de diferentes extractos del rizoma seco —n-hex., AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, Me<sub>2</sub>CO y Et<sub>2</sub>O— se observó que el extracto con AcOEt mostró una mayor inhibición (14.6 mm). Del análisis químico del extracto n-hex. se encontró que contenía grandes cantidades de zingibereno (**8**), por lo que se atribuye esta actividad a la presencia de dicho compuesto [74]. En otro estudio se evaluó la actividad fungicida y su capacidad de formar biofilm de los diferentes gingeroles y sogaos con diferentes longitudes en la cadena (6, 8 y 10) frente a *C. albicans* [75], encontrándose que la degradación del biofilm por parte de los gingeroles y sogaos se relaciona con el número de carbonos de la cadena lateral; mientras más grandes sea la cadena menor actividad. Además, de esto se encontró que el 6-gingerol y 6-sogaol (**9** y **10**) suprimieron la formación de pseudohifas en *C. albicans*, siendo el 6-sogaol (**9**), el que mostro mayor efecto en una cepa resistente al fluconazol.



**Figura 18:** Estructuras químicas con actividad antimicrobiana reportadas en el jengibre 8) Zingibereno, 9) 6-sogaol, 10) 6-gingerol.

*Pseudomona aeruginosa* es una bacteria Gram negativo, anaerobio facultativo muy común en el medio ambiente –agua, suelo, plantas y lugares debido con bajo requerimiento nutricional–. Además, crece a temperaturas variables, desde los 20-43 °C, siendo capaz de desplazarse gracias a que posee un flagelo [76]. *P. aeruginosa* es un organismo oportunista; responsable de diversas infecciones en pacientes inmunocomprometidos. La capacidad infecciosa de esta bacteria se debe a que posee una gran variedad de factores de patogenicidad tales como: adaptabilidad fisiológica, potencial metabólico y mecanismo de virulencia, convirtiéndose en un problema a nivel mundial. Otro factor que convierte a *P. aeruginosa* en un riesgo para la salud, es la resistencia que ha adquirido a diferentes antibióticos de amplio espectro –ampicilina, amoxicilina, cefotaxima, entre otras– [77-78].

En el presente trabajo no se observó actividad de *Z. officinale* frente a *P. aeruginosa*, como se describe por otros autores [79-80], mientras que el aceite esencial del rizoma mostró actividad (18h, 27 mm) [81]. Sin embargo, se han descrito evaluaciones donde se muestra la actividad de diferentes extractos del jengibre frente a *P. aeruginosa* [82-83].

*Streptococcus pyogenes* es un estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A, es un bacilo Gram positivo, inmóvil; esta bacteria es responsable de diversas infecciones entre las que se puede citar faringitis, impétigo<sup>9</sup>, celulitis, escarlatina, fiebre reumática, toxico entre otras

<sup>9</sup> Impetigo: Infección de la piel causada por bacterias.

enfermedades [84-86]. El tratamiento que se usa para tratar infecciones de *S. pyogenes* son antibióticos del grupo de los macrólidos, principalmente la eritromicina y la lincosamida [87].

En estudios realizados con *S. pyogenes* se evaluó la actividad del jengibre en contra de este microorganismo donde se comparó el efecto de los extractos EtOH y acuoso del jengibre con respecto a antibióticos de uso convencional [88], siendo el extracto EtOH de las hojas del jengibre, el de mayor actividad, (logrando alcanzar una zona de inhibición de 30 mm en una concentración de 100 mg/ml). Otro estudio se enfocó en la evaluación de cinco diferentes extractos del jengibre (MeOH, etanol, H<sub>2</sub>O, CHCl<sub>3</sub> y eter dietilico) a partir del rizoma seco del jengibre contra *S. pyogenes* [68], siendo el extracto MeOH el más activo (halo de inhibición de 24.9 mm), mientras que con el extracto acuoso la inhibición fue menor. Por otro lado, se demostró que el extracto acuoso de la raíz fresca del jengibre a diferentes concentraciones mostro resultados positivos a la concentración de 0.3 y 0.4 mg/mL [51],

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo es común en alimentos contaminados, causando infecciones estomacales causadas por diferentes toxinas. Debido a su gran adaptabilidad puede generar diversas Infecciones de piel, neumonía, intoxicación alimentaria, endocarditis, entre otras [89-91]; el gran espectro de infecciones que puede causar *S. aureus* y la cantidad de cepas resistentes a distintos antimicrobianos es un problema alarmante en la comunidad científica, se estima que entre el 90 al 93% de *S. aureus* es resistente a la penicilina, y un 60 % aproximadamente a la meticilina y vancomicina [92].

Estudios recientes han informado que el extracto EtOH es más activo que el extracto acuoso de las hojas y rizoma del jengibre [93], otro estudio reporta un halo de inhibición de 23 mm con el aceite esencial de las hojas del jengibre [18], otro estudio similar [74] evaluó el rizoma del jengibre con cinco extractos diferentes —hexano, AcOEt, CHCl<sub>3</sub>, MeCO<sub>2</sub> y Et<sub>2</sub>O— se encontró que el extracto hexanico mostró mayor actividad (15.3 mm de halo de inhibición), y a partir del análisis químico de dicho extracto, se encontró que los zingiberenos son los principales constituyentes de dicho extracto, además de esto existen otros trabajos que también han reportado actividad del jengibre con respecto a *S. aureus* [83, 94].

*Bacillus cereus* es una bacteria gran positiva, anaerobia facultativa, móvil gracias a la presencia de flagelos periticas<sup>10</sup>, este microorganismo forma una endospora, la cual lo hace muy resistente a diferentes condiciones de temperaturas (4-40 °C), pH (4.9- 9.2), concentraciones altas de NaCl (7%), humedad y a los tratamientos de pasteurización o procesos de cocción. *B. cereus* se encuentra frecuentemente de forma saprofita en el suelo, agua, vegetación y aire de donde se transfiere a los alimentos [93,95]. La intoxicación de este microorganismo se debe a diferentes toxinas, las cuales son responsables de dos cuadros clínicos, la primera de ellas es la toxina emética (cereulida) responsable del síndrome emético, el cual se caracteriza por náuseas agudas y vomito, esta intoxicación se desarrolla después de 1 a 6 h después de ingerir los alimentos contaminados. El segundo cuadro clínico se le atribuye a la enterotoxina, la cual, se produce durante la fase estacionaria de *B. cereus*, es altamente hidrofóbica y termoestables, solo se inactiva a 121°C por 90 minutos, siendo activa en un pH de 2 a 11, por lo cual es resistente el ácido presente en el estómago. Las enterotoxinas se producen una vez que *B. cereus* coloniza el intestino delgado y son responsables del síndrome diarreico [96-98]. Debido a que la sintomatología causada por la intoxicación de *B. cereus* es temporal se usan antibióticos –clorafenicol, clindamicina, vancomicina, gentamicina, estreptomycin, eritromicina–, mostrando resistencia a los antibioticos β-lactámicos [96-97].

En este trabajo se observó que la actividad de los extractos —hexánico y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>— del jengibre mostro muy buena actividad contra *B. cereus*, esto se puede observar en las tablas 11 y 12 así como en los anexos 7-14; Chand, 2013 [94] evaluo el extracto acuoso del rizoma fresco y observo un halo de inhibición de 6.67 mm, mientras que Tagoe et al en 2010 [98] mostro que en concentraciones que van de los 50 a los 500 µg no había inhibición del extracto acuoso en *B. cereus*, Los resultados de esta investigación se realizaron por duplicado con cada una de las concentraciones y se observó actividad de los extractos frente a *B. cereus* desde la concentración más baja que se usó en esta prueba (2 mg/mL), mientras que en la concentración más alta una inhibición completa con los extractos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a las 24 h, mientras que con el extracto realizado a partir del rizoma seco se observó una inhibición completa transcurridas las 48 h [99].

---

<sup>10</sup>Flagelos ubicados en toda la superficie celular.

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en el suelo y en las plantas, siendo la levadura más benéfica para el ser humano, ya que es empleada en la elaboración de diversos productos alimentarios. Sin embargo, este microorganismo también es capaz de colonizar el tracto gastrointestinal y respiratorio en humanos, raramente provoca infecciones personas con un sistema inmunocomprometido. Se tienen informes que *S. cerevisiae* presenta una sensibilidad reducida a la mayoría de los azoles como por ejemplo el fluconazol, volviéndose un problema en la minoría de personas afectadas por este microorganismo [100-102].

En la literatura se encontró muy poca información acerca de la actividad del jengibre frente a *S. cerevisiae*; sin embargo, los resultados cualitativos obtenidos del presente mostraron una excelente actividad contra las dos levaduras (*C. albicans* y *S. cerevisiae*) que se evaluaron, ya que se llegó a una inhibición completa a partir de la menor concentración 2 mg/mL.

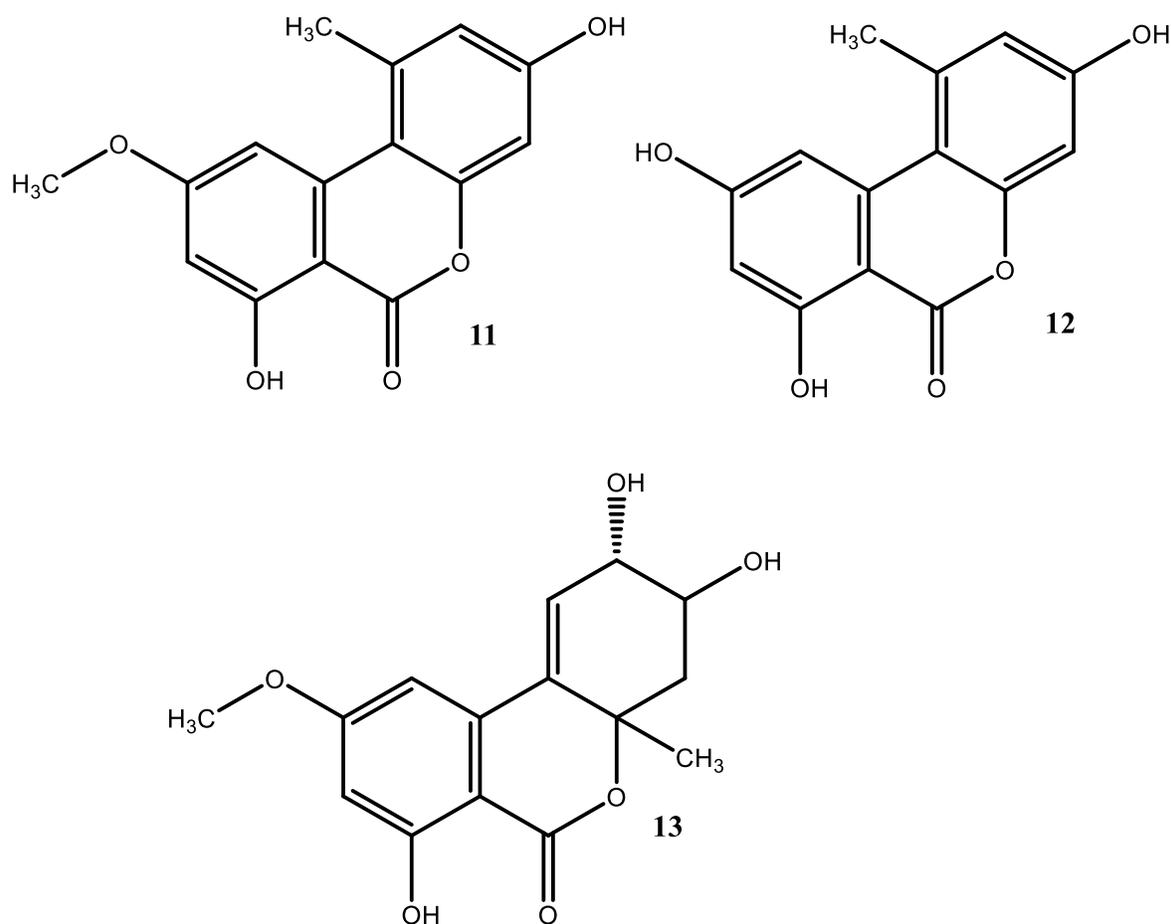
En este trabajo también se evaluaron tres hongos filamentosos; dos especies de *Aspergillus* y una de *Alternaria* sp.

La última clasificación que se realizó del género *Aspergillus* fue la realizada por Samson en 2014 [103]. Según esta clasificación las dos especies con las que se trabajó pertenecen a la sección de *Nigri*, esta sección se diferencia del resto, principalmente a la tonalidad de las colonias que se forman, las cuales son de color negro, además de esto se han usado criterios bioquímicos y moleculares [104-108].

*A. niger* es un hongo benéfico para el hombre, mientras que *A. brasiliensis* es una especie relativamente nueva [108-110], esta descripción se realizó con base en análisis moleculares. A pesar de que *A. niger* se considera como un microorganismo benéfico para el hombre también es responsable de causar aspergilosis un problema de salud relacionado, principalmente con personas con un sistema inmune comprometido [111-112].

Los resultados obtenidos del presente proyecto mostraron no tener actividad frente a ninguna de las dos especies de *Aspergillus* ensayadas, resultados que coinciden con los informados en la literatura [18]. Mientras que para *A. brasiliensis* no se encontró literatura que evaluara la actividad de esta planta contra esta especie de hongo.

El género de *Alternaria* pertenece al grupo de hongos imperfectos”, este género se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, es común encontrarlo en el suelo, plantas, madera y alimentos, causando graves daños a las plantaciones de diversos cultivos (fresa, tomates, cítricos, entre otros). Entre las principales micotoxinas producidas por *Alternaria* sp se pueden mencionar tres: el alternariol un derivado de la dibenzopirona, el monometil éter (11), alternariol (12) y el altenueno (13), los cuales se relacionan con problemas en la salud cuando son ingeridos; entre los diversos problemas a la salud se encuentran alergias, cánceres de esófago los cuales se reportan principalmente en África [113-115].



**Figura 19.** Estructuras de los metabolitos secundarios de especies del género *Alterinaria*.

El extracto EtOH del rizoma seco mostro actividad contra *Alternaría* sp. [20], mientras que el extracto EtOH (5 %) [116] se aplicó en plantaciones infectadas por *Alternaria* sp, sin embargo, este tratamiento no mostro ninguna actividad frente a dicho problema. Por otro lado, la evaluación del aceite esencial del rizoma d el jengibre reporto actividad contra

*Alternaria* a partir de las 200 ppm, observándose alteraciones morfológicas y malformaciones en las esporas, mientras que a 500 ppm se observó la pérdida de citoplasma en las hifas [117-119].

Con respecto a la actividad antimicrobiana de los extractos —hexánico, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y MeOH—de *T. filifolia* se encontró que no tenían actividad frente a ninguno de los microorganismos ensayados, resultados similares a los informados en la literatura [120]. Donde el extracto EtOH de *T. filifolia* fue evaluado frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum* y *Klebsiella pneumoniae* sin observarse actividad antimicrobiana alguna. Otro estudio [121] evaluó la actividad del extracto EtOH (70 %), así como del aceite esencial de *T. filifolia* frente a *Candida albicans* observándose que ambos extractos fueron capaces de inhibir el crecimiento de *C. albicans* con 11.55 mm y 13.28 mm respectivamente.

Con respecto a la actividad antimicrobiana de *T. filifolia* Barajas [28] reporta actividad fungicida contra *Sclerotium rolfsii* y *Monilinia fructicola* por parte del aceite esencial. Otro autor que hace referencia a actividades biológicas en el aceite esencial en Camarillor, 2009 [34], quien evaluó el extracto acuoso, así como el aceite esencial en *Trialeurodes vaporariorum*, un insecto del orden hemiptera, donde solo observo actividad insecticida con el aceite esencial, esto permite inferir que el responsable de la actividad biológica muy probablemente corresponda a los compuestos presentes en el aceite esencial. En *T. filifolia* los compuestos mayoritarios del aceite esencial son el *cis* ó *tran*-atenol y el estragol [38-39].

## 8 Conclusiones.

- A partir del material orgánico se obtuvieron los extractos del rizoma de *Z. officinale* fresco y seco y de las partes aéreas de *T. filifolia*.
- Se realizaron las pruebas microbiológicas frente a hongos levaduras y bacterias, de las cuales los extractos con mayor actividad fueron los que se realizaron a partir del rizoma seco. Los extractos del rizoma seco fueron más efectivos en levaduras —*C.*

*albicans* y *S. cerevisiae*— que en las bacterias con las que se trabajó, donde los extractos resultaron ser muy activos en *C. albicas*.

- Los resultados cualitativos obtenidos del presente mostraron una excelente actividad contra las dos levaduras (*C. albicans* y *S. verevisae*) que se evaluaron, ya que se llegó a una inhibición completa a partir de la menor concentración 2 mg/mL,
- Del estudio químico de los extractos n-hex. y AcOEt se obtuvo como productos mayoritarios la mezcla de  $\beta$ -sitosterol/estigmasterol.
- Ninguno de los extractos de *T. filifolia* presento una actividad microbiológica importante.

## 9 Sugerencias

- Evaluar la actividad del aceite esencial del jengibre con referencias de los gingeroles o shogaoles. O bien una mezcla del aceite esencial con gingeroles y sogaoles, ya que se ha informado que los gingeroles y los sogaoles son los compuestos activos en dicha especie vegetal.
- Evaluar a nivel cuantitativo los diferentes extractos del jengibre con muestras auténticas de los gingeroles y sogaoles disponibles de manera comercial.
- Los resultados cualitativos obtenidos del presente mostraron una excelente actividad contra las dos levaduras (*C. albicans* y *S. cerevisae*) que se evaluaron, ya que se llegó a una inhibición completa a partir de la menor concentración 2 mg/mL,

## 10 Bibliografía.

1. Organización Mundial de la Salud. (2000) General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Recuperado de: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66783/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2000.1.pdf;jsessionid=6F315B45DAE15FCB4A7E1C7B1464F982?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66783/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf;jsessionid=6F315B45DAE15FCB4A7E1C7B1464F982?sequence=1)
2. Organización Mundial de la Salud. (2004) Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Recuperado de: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
3. Lozoya, X.; Zoila, C., Medicina tradicional en México. IMSS, **1984**, 360-364.

4. Anzuarez, B. M. C., Medicinas tradicionales y antropológicas. *Anales de Antropología.*, UNAM, **1978**, *15*, 132-162.
5. Ocegueda, S.; Moreno, E.; Koleff, P., Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su investigación científica. *CONABIO*, **2005**, *62*, 12-15.
6. López, L. T. M., Las plantas medicinales en la medicina tradicional China. *Fitoterapia*, **2003**, *22*, 100-102.
7. Jiménez, C., El Papel de los Productos Naturales en el Mercado Actual. *An. Quím* **2013**, *109*, 134-141.
8. Hotmeister, G. E.; Schatz, P. F.; Hammond, C. N., (2014). *Laboratory Techniques in Organic Chemistry*, New York, USA: W. H. Freeman and Company.
9. Hostettmann, K.; Marston, A.; Hostettmann, M., (1998). *Preparative chromatography techniques*, Berlin, Springer.
10. Andrew, P. V., Zingiberaceae, Rendowski, J. y Andrew, P. V., de Rendowski (eds). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes, Fascículo 18. Instituto de Ecología, A. C. Xalapa Veracruz México, 10-14.
11. Azizi, A.; Aghayan, S.; Zaker, S.; Shakeri, M.; Entezari, N.; Lawaf, S., In vitro effect of *Zingiber officinale* extract on growth of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Int. J. Dent.* **2015**, 489842.
12. Hurrell, J. A. (2008), *Flora Rioplantence* Buenos Aires, República Argentina, LOLA.
13. Ficker, E. C.; Smith, L. M.; Siti, S.; Leaman, J. D.; Irawati, C.; Arnason, T. J., Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenya (Borneo) Indonesia. *J. Ethnopharmacol*, **2003**, *85*, 289-293.
14. . Peláez, L.; Zavala, O., (2016). *Efecto del extracto etanólico de los rizomas de Zingiber officinale (jengibre) en el crecimiento de cepas patógenas de Streptococcus pyogenes*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
15. White, B., Ginger: An Overview. *Am. Fam. Physician*, **2007**, *75*, 1689-1691.
16. Tchombé, N. L.; Louajri, A.; Benajiba, M. H., Therapeutic effects of ginger (*Zingiber officinale*). *J. sci. technol*, **2012**, *14*, 64-69.
17. Bardelin, H.; Gerald, B.; Musbah, O.; Abderrahim, N., Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale*): A review of recent research. *Food Chem. Toxicol.*, **2008**, *46*, 409-420.

18. Hassan, A. M.; Abutalib, A. A.; Almagboul, A. Z.; Kabbashi, A. S., Antimicrobial activity of the rizome essential oil de *Zingiber officinale* Roscoe. *Adv. Med. Plant. Res.*, **2017**, *5*, 5-10.
19. Du, X.; Geng, Y.; Huang, Z.; Chen, Y.; Zhang, H.; Liu, H.; Chen, Z.; Wu, Z.; Song, T.; Sheing, X., Effects of *Zingiber officinale* extract antioxidation and lipid peroxidation in mice after exposure to  $^{60}\text{Co-}\gamma$ - ray. *Afr. J. Biotechnol.*, **2012**, *11*, 2609-2615.
20. Ficker, C.; Smith, M. L.; Akpagana, K.; Gbeassor, M.; Zhang, J.; Durst, T.; Assabgui, R.; Arnason, T., Bioassay-guided isolation, and identification of antifungal Compound from Ginger. *Phytother. Res.*, **2003**, *17*, 897-902.
21. Jolad, S. D.; Lantz, R. C.; Solyom, A. M.; Chen, J. G.; Bates, R.; Timmermann, B. N., Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE2 production. *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 1937-1954
22. Weyerstahi, P.; Marschall, H.; Christiansen, C., Constituents of the acidic part of comercial *Brazilian lantana* oil. *Flavour. Frag. J.*, **2001**, *16*, 50-60.
23. Bercht, P. J. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Fascículo 89, Asteraceae.en: Rendonda, M. R.; Villaseñor, R. J. L. (eds), Departamento de Botánica del Instituto de biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 2012, 3.
24. Villarreal, Q. J. A. Familia Compositae, **2003**, Tribu Tageteae. Rendowski J. y G. Villarreal, Q. J. A. de Rendowski (eds) Flora del Bajío y de Regiones adyacentes, fascículo 113. Departamento de Botánica, Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro Buenavista, Saltillo, Coahuila,47-53.
25. Salehi, B.; Valussi, M.; Bezarra, M. M. F.; Pereira, C. J. N.; Alves, B. L. A. L.; Melo, C. H. D.; Vitalini, S.; Kregiel, D.; Antolak, H.; Sharifi-Rad, M.; Cirone, S. N. C.; Yousaf, Z.; Martorell, M.; Iriti, M.; Carradori, S.; Sharifi-rad, J., *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecule* **2018**, *23*, 1-35.
26. Rincón, E. G.; Quiñones, A. E. E.; Serrato, C. M. A.; Qui, Z. J. A. (2012). Efectividad biológica de los extractos de *Tagetes* spp sobre bacterias fitopatógenas. SNICS-SINAREFI, CIATEJ, México. Recuperado de: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225097/Folleto\\_tagetes\\_vs\\_bacterias\\_fitopatogenas\\_VF.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225097/Folleto_tagetes_vs_bacterias_fitopatogenas_VF.pdf).

27. Serrato, C. (2004). Cempoalxóchitl diversidad biológica y usos, México, Ciencia y desarrollo en Internet. Recuperado en: <https://studylib.es/doc/8336087/diversidad-bi%C3%B3logica-y-usos>.
28. Barajas, P. J. S.; Montes, B. R.; Castrejón, A. F.; Flores, M. H. E.; Serrato, C. M. A., Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*, **2011**, *34*, 85-91.
29. Juárez, S. H. E. (2015). *Caracterización de los principales componentes activos presentes en hojas y flores de la planta pericon (Tagetes lucida) por GC-MS*. Tesis Ingeniero Químico Industrial. IPN, Cd. México.
30. Zarate, E. J.; Castañeda, G. E. L.; Cuevas, S. J. A.; Carrillo, F. C. L.; Ortiz, T. C.; Ibarra, E. E.; Serrato, C. M. A., Aceite esencial de algunas poblaciones de *Tagetes lucida* cav. de las regiones norte y sur del Estado de México. *Rev. Fitotec. Mex.*, **2018**, *4*, 199-209.
31. Moradalizadeh, M.; Mehrabpanah, M.; Salajeghe, M.; Nayebli, M., Chemical constituents of the essential oils from the leaves, flowers, and seeds of *Tagetes minuta* L. BY GC/MS. *Int J Adv Biol Biom Res.*, **2013**, *9*, 1124-1128.
32. Cussa, L. (2017). Toxicidad del aceite esencial de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) obtenido de poblaciones silvestres y cultivadas, Tesis de licenciatura, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
33. Sánchez, H. R.; Ruíz, B. A. M.; Ruíz, B. C. G.; Ruíz, C. G. M; Sairitupac, P. D. R.; Aguirre, L. G.; Salazar, G. A.; Loja, H. B., Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de *Tagetes filifolia* Lag. “pacha anís”. *Horiz. Med.*, **2017**, *17* 18-24.
34. Camarillo, R. G.; Ortega, D. L.; Serrato, C. M. A.; Rodríguez, H. C., Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeuroides vaporariorum* (Hemiptera: aleyrodidae). *Rev. Colomb. Entomol.*, **2009**, *35*, 177-184.
35. Serrano, C. M. A.; Díaz, C. F.; Barajas, P. J. S., Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la Región Centro-Sur de México. *AGROCIENCIA*, **2008**, *42*, 277-285.
36. Serrano, C. M. A.; Díaz, C. F.; Barajas, P. J. S., Población Silvestre de *Tagetes filifolia* Lag En el Centro Sur de México. *AGROCIENCIA*, **2006**, *29*, 7-12
37. Hanan, A. A.; Mondragón, P. J (2009) *Tagetes filifolia* Lag. México, Malezas de México. Recuperado en:

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetesfilifolia/fichas/ficha.htm>

38. Vázquez, A. M.; Aimar, M. L.; Demmel, G. I.; Cabalen, M. E.; Criado, S. G.; Cantero, J. J.; Velasco, M. I.; Rossi, L. I., Determination of volatile organic compounds of *Tagetes filifolia* Lag. (Asteraceae) from Córdoba (Argentina) using HS-SPME analysis. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromát*, **2013**, *12*, 143-149.
39. Feo, V.; Della, P. G.; Urrunaga, S. E.; Urrunaga, S. R.; Senatore, F., Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag. *Flavour. Fragr. J.*, **1998**, *13*, 145-147.
40. Barnett, H. L.; Hunter, B. B. (1995). *Illustrated genera of imperfect fungi*, Minnesota, USA, The American Phytopathological Society, 82. 170. 94. 196.
41. Kliffer, E.; Morelet, M. (1997). *The Deuteromycetes*, USA. Science Publishers, 231-241.
42. Rivas, M. C.; Orandar, C. M. A.; Verde, S. M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*, México, Omnia Publisher, 6-18.
43. Mitscher, L.; Leu, R.; Bachala, M. W.; Beal, J., Antimicrobial agents from higher plants. 1 introduction rationale and methodology. *Lloydia*, **1972**, *35*, 157-66.
44. Navarro, V.; González, A.; Fuentes, M.; Avilés, M.; Rios, A.; Zepeda, D.; Rojas, M.; Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol*, **2003**, *87*, 85-88.
45. Lokadi, P. L.; Namboole, M. M., Isolation, and characterization of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). *JIPBS*, **2015**, *2*, 88-95.
46. Bid, S. M. S.; Rezaul, K. S. M.; Sharmin, T.; Monzur, M. M., Critical analysis on characterization systemic effect and therapeutic potential of beta-sitosterol: a plant-derived orphan phytoosterol. *Medicines*, **2016**, *3*, 2-25.
47. Hung, L. B. R.; Falero, M. A.; Perez, B. C.; Tirado, M. S.; Bolcinda, Q. Y.; Piñeda R. M., Fitoesteroles, Parte 1. Tendencias actuales y aplicaciones biomédicas. *Rev. CENIC, Cienc. Biol.*, **2005**, *36*, 23-30.
48. Khanam, S.; Sultana, R., Isolation of  $\beta$ -sitosterol & stigmasterol as active immunomodulatory constituents from fruits of *Solanum xanthocarpum*, (Solanaceae). *IJPSR*, **2012**, *3*, 1057-1060.

49. Muñoz, J. A. M.; Alvarado, O. U. C.; Encina, Z. C., Fitoesteroles y fitoestanoles propiedades saludables. *Rev. Horiz. Med.*, **2011**, 93-99.
50. Saeidnia, S.; Manay, A.; Gohari, A. R.; Abdollahi, M., The story of  $\beta$ -sitosterol a review. *European J. Med. Plants.*, **2014**, 5, 590-609.
51. Ahmed, S. A.; Jabbar, I. I.; Addul, W. H. E., Study the Antibacterial Activity of *Zingiber officinale* roots against Some of Pathogenic Bacteria. *Al-Mustansiriya J. Sci*, **2012**, 3, 63-70.
52. Gamboa, F., Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Univ Odontol.*, **2014**, 33, 65-73.
53. Ojeda, G. J. C.; Oviedo, G. E.; Andres S. L.; *Streptococcus mutans* and dental caries. *Rev. CES Odont.*, **2013**, 26, 44-56.
54. Gamboa, F.; Herazo, A. B.; Martínez, M. C., Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica. *Univ. Sci*, **2004**, 9, 45-55.]
55. Barrientos, S.; Serna, F. S.; Díez H.; Rodríguez, A., Resistencia a la amoxicilina de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibioticoterapia previa y sin esta. *Univ Odontol.* **2015**, 34, 19-24.
56. Weckwerth, P. H.; Ordinola, Z. R.; Ricci, V. R.; Tanomaru, F. M.; Garcia, A. M. A.; Hungaro, D. M. A., In vitro alkaline Ph resistance of *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J*, **2013**, 24, 474-476.
57. Stuart, H. C.; Schwarts, A. S.; Beeson, J. T.; Owatz, B. C., *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *JOE*, **2006**, 32, 93-98
58. Kayaoglu, G. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med*, **2004**, 15, 308-320.
59. Casal, M. M.; Causse, M.; Solís, F.; Rodríguez, F.; Casal, M., Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. *Rev Esp Quimioter*, **2009**, 22, 117-119.
60. Aguirre, U. J. M., Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol.*, **2002**, 19, 17-21.
61. Mujica, M. T.; Finkelievich, J. L.; Jewtuchowicz, V.; Iovannitti, C. A., Prevalencia de *Candida albicans* y *Candida no albicans* en diferentes muestras clinicas. Periodo 1999-2001. *Rev. Argent. Microbiol.*, **2004**, 36, 107-112.
62. Laforet, A. L., (2009). Estudio de Pga26, una proteína implicada en la arquitectura de la pared celular de *Candida albicans*. Tesis doctoral, Universidad de Valencia, Valencia, 1-40.

63. Ciudad, R. A., Infecciones vaginales por *Candida*: diagnóstico y tratamiento. *Rev per Ginecol Obstet.*, **2007**, *53*, 159-166.
64. Cannon, R. D.; Chaffin, W. L., Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Orañ Biol Med*, **1999**, *10*, 359-383.
65. Giriraju, A.; Yunus, G. Y., Assessment of antimicrobial potential of 10 % ginger extract against *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and *Enterococcus faecalis*: an *in vitro* study. *Indian J Dent Res*, **2013**, *24*, 397-400.
66. Mostafa, N. M., Antibacterial activity of ginger (*Zingiber officinale*) leaves essential oil nanoemulsión against the cariogenic *Streptococcus mutans*. *JAPS*, **2018**, *8*, 34-41.
67. Hiregoudar, M.; Suubramaniam, R; Mittal, S.; Muralikrishna, K. S.; Sakeenabi, B.; Prashant, G. M.; Chandru, G. N., Antibacterial activity of some ápice extracts on *Streptococcus mutans*: an invitro study. *JIAPHD*, **2011**, *17*, 347-351
68. Siddiq, M.; Sakina, G.; Arshad, M.; Anjum, M., Antibacterial potential of *Zingiber Officinale* and *Curcuma longa*. *Int J. Botany Stud.* **2017**, *2*, 33-37.
69. Zainal, A. Z.; Abdul, W. N A.; Ghazi, A. M. K.; Mohd, S. S., *Invitro* antibacterial activity of *Zingiber officinale* and *Orthosiphon stamineus* on *Enterococcus faecalis*. *J Agric Sci*, **2017**, *13*, 112-121.
70. Azhar, R.; Julianti, E.; Natasasmita, S.; Adhita, D. H. D., Antibacterial activity of *Zingiber officinale* Roscoe extract as a potential root canal irrigation solution against *Enterococcus faecalis*. *Padjadjaran J Dent.* **2018**, *30*, 124-129.
71. Mohd, S. S.; Wee, K. W.; Yi, T. C.; Zainal, A. Z; Adnalizawati, A. S. A.; Baharin, E. S. A., In vitro inhibitory and biofilm disruptive activities of ginger oil against *Enterococcus faecalis* [versión 1; referees: awaiting per review], *F1000Research*, **2018**, *7*, 1856: <https://doi.org/1.12688/11000research.16851.1>.
72. Sharma, A.; Sankhla, B.; Parkar, S. M.; Mathur, S., Antimicrobial activity of clave and ginger poder extracts on *Streptococcus mutans*. *Sch. Acad. J. Biosci*, **2014**, *2*, 953-956.
73. Supreetha, S.; Sharadadevi, M.; Sequeira, P. S.; Jithesh, J.; Shreyas, T.; Amit, M., Antifungal activity of ginger extracto n *Candida albicans* an *in vitro* study. *J. Dent Sci*, **2011**, *2*, 18-21.
74. Murugesan, A.; Sivapathasundharam, B., Inhibitory effects og ginger extract on *Candida albicans*, *Staphylococcus aureis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Int Dent J*, **2016**, *2*, 1-5.

75. Lee, J. H.; Kim, Y. G.; Choi, P.; Ham, J.; Park, J. G.; Lee, J., Antibiofilm and antivirulence activities of 6-gingerol and 6-shogaol against *Candida albicans* due to hyphal inhibition, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2018**, 8, 1-10.
76. Paz, Z. V. M; Mangwani, M. S.; Martínez, M. A.; Álvarez, H. D.; Solano, G. S. G.; Vázquez, L. R., *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Rev Chilena Infectol*, **2019**, 36, 180-189.
77. Lujan, R. D. A., *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, **2014**, 48, 465-74.
78. Esnard, C. S.; Moya, A.; Cedré, B.; Valmaseda, T.; Pino, N. Y.; Sierra, G. G., *Pseudomonas aeruginosa*. Vacunas: un reto a la investigación. *VacciMonitor*, **2004**, 13,1-13.
79. Adeshina, G. O.; Jibo, S.; Agu, V. E.; Ehinmidu, J. O., Antibacterial activity of fresh juices of *Allium cepa* and *Zingiber officinale* against multidrug resistant bacteria. *Int J Pharma. Bio. Sci.*, **2011**, 2, 289-294.
80. Han, S. K.; Hee, D. P., Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLOS ONE*, **2013**, 8, 2-14.
81. Yousefi, N. N.; Eslami, G.; Hashemi, A.; Sadredinamin, M.; Tarasshi, S.; Roshani, M.; Yazdansetad, S., In vitro antimicrobial activity of *Cinnamomum verum*, *Allium sativum*, and *Zingiber officinale* extracts on metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: A potential therapeutic approach. *ISSUE*, **2019**, 64, 25-32.
82. Azu, N.; Onyeagba, R.; Nworie, O.; Kalu, J., Antibacterial activity *Allium cepa* (onions) and *Zingiber officinale* (ginger) on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from high vaginal swab. *The Internet Journal of Tropical Medicine*, **2006**, 3, 1-7.
83. Azadpour, M.; Azadpuor, N.; Bahmani, M.; Hassanzadazar, H.; Kopaei, R. M.; Naghdi, N., Antimicrobial effect of Ginger (*Zingiber officinale*) and mallow (*Malva sylvestris*) hydroalcoholic extracts on four pathogen bacteria. *Der Pharm. Lett.*, **2016**, 8, 181-187.
84. Bournon, C. R. A.; Bournon, R. M. T.; López, N. M.; Bournon, R. C.; Vera, U. R.; Camacho, J. L.; Arcos, A. L., Síndrome de choque tóxico secundario a fascitis necrosante por *Streptococcus pyogenes*: informe de un caso clínico. *Med. Int. Mex.*, **2010**, 26, 397-400.

85. Galeano, F.; Sanabria, G.; Lovera, D.; Araujo, P.; Irala, J. J. D.; Guillén, R.; Rodríguez, F.; Arbo, A., Caracterización molecular de un caso fatal por *Streptococcus pyogenes*. *Rev. Inst. Med. Trop*, **2015**, *10*, 26-30.
86. Mateo, R. C.; Santamaría, R. B.; Rodríguez, D. T.; Manzano, C. A.; Gómez, S. J. N. J.; Aguilera, C. L., Meningitis fulminante por *Streptococcus pyogenes*. *Gac. Med Bilbao*, **2011**, *108*, 114-116.
87. Rodríguez, R. S.; Calderón, J. E.; Gómez, B. D.; Espinosa, M. L. E., Características de la resistencia antimicrobiana de una colección clínica de *Streptococcus pyogenes*. *Salud Públ. Méx.*, **2000**, *42*, 226-229.
88. Sebiomo, A.; Awofodu, A. D.; Awosanya, A. O.; Awotona, F. E.; Ajayi, A. J., Comparative studies of antibacterial effect of some antibiotics and ginger (*Zingiber officinale*) on two pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Antimicrob.* **2011**, *3*, 18-22.
89. Cervantes, G. E.; García, G. R.; Salazar, S. P. M., Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*, **2014**, *61*, 28-40.
90. Zendejas, M. G. S.; Avalos, F. H.; Soto, P. M. Y., Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev. Biomed.* **2014**, *25*, 129-143.
91. Bustos, M. J. A.; Hamdan, P. A.; Gutierrez, C. M., *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed.* **2006**, *17*, 287-305.
92. Gil, D. M., *Staphylococcus aureus*: microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Rev. Chil. Infect.* **2000**, *17*, 145-152.
93. Chand, B., Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* and *Bacillus cereus*. *JMBFS*, **2013**, *2*, 2481-2491.
94. Sánchez, J.; Correa M.; Castañeda, S. L. M., *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Rev. Fac. Nac. Salud Publica*, **2016**, *34*, 2230-242.
95. Pérez, P. I., *Bacillus cereus* y su papel en las intoxicaciones alimentarias. *Rev. Cub. Salud pública*, **2012**, *38*, 98-108.
96. Ultee, A.; Slumo, R. A.; Steging, G.; Smid, E. J., Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot.*, **2000**, *63*, 620-624.

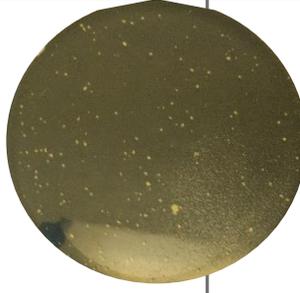
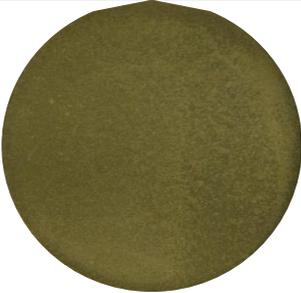
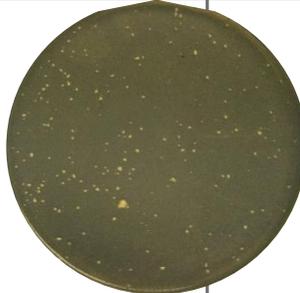
97. Jensen, G. B.; Hansem, B. M.; Eilenberg, J.; Mahillon, J., The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.*, **2003**, *5*, 631-640.
98. Tagoe, D.; Gbadago, F.; Acomparison of the antimicrobial effectiveness of aqueous extracts of garlic, ginger and leme and two conventional antibiotics on *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. *Shigella* spp. and *Bacillus cereus*. *The Internet Journal of Microbiology*, **2010**, *8*, 1-6.
99. Karuppiyah, P.; Rajaram, S., Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, **2012**, *2*, 597-601
100. Sanz, F.; Pazaos, C., Infeccion vaginal causada por *Saccharomices cerevisiae*: aspectos clínicos. *Toko-Gin Pract*, **2002**, *61*, 291-293.
101. Suárez, M. C.; Garrido, C. N. A.; Guevara, R. C. A., Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA*, **2016**, *50*, 20-28.
102. De Martín, B. A. M. (2005). Control del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* en la síntesis de glutatión. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Granada, 15-16.
103. Zaghetto, A. P. (2015). Diversidade do potencial amilolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*, Maestra en ciencias, Universidad de São Paulo, Ribeirao Preto, 27-28.
104. Accensi, A. F. (2000). Aportación al conocimiento de *Aspergillus* sección *Nigri*, grado Doctor en Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, 2-16.
105. González S. A. (2009). Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de ocratoxina A., Universidad Complutense de Madrid, Tesis doctoral, Madrid, 15-21.
106. Carrillo, L. (2003), *Los hongos de los alimentos y forrajes*, Salta Argentina, Universidad de Salta, 44-58.
107. Martínez, P. H. Y.; Hernández, D. S.; Reyes, M. C. A.; Vázquez C. G., El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz de México: problemática y perspectivas. *Rev. Mex. Fitopatol.*, **2013**, *32*, 126-146.
108. Varga, J.; Kocsubé, S.; Tóth, B.; Frisvad, J. C.; Perrone, G.; Susca, A.; Meijer, M.; Samson, R. A., *Aspergillus brasiliensis* sp. Nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2007**, *57*, 1925-1932.

109. Zaghetto, A. P. (2015). Diversidade do potencial amilolítico de fungos filamentosos: purificação e caracterização de glucoamilase de *Aspergillus brasiliensis*, Maestra en ciencias, Universidad de São Paulo, Ribeirao Preto, 27-28.
110. Canteros, C. E.; Rivas, M. C.; Soria, M.; Lee, D.; Perrotta, D.; Rodero, L.; Davel, G., Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: Estudio multicéntrico en la República Argentina. *Rev. Argent. micol.*, **2004**, *36*, 68-74.
111. Tangarife, C. V. J.; Muñoz, F. S. V.; Mesa, A. A. C., Diagnostico micológico de los métodos convencionales a los moleculares. *Medicina y Laboratorio*, **2015**, *21*, 211-242.
112. Fabrega, A.; Agut, M.; Calvo, M. A., El género *Alternaria*: características morfológicas y capacidad de producción de micotoxinas. *Anales de la Real Academia de Doctores*, **2002**, *6*, 357-367.
113. Dall' Asta, C.; Cirlini, M.; Falavigna, C., Mycotoxins from *Alternaria*: Toxicological Implications. *Adv. Mol. Toxicol.*, 2014, *8*, 107-121.
114. Töfoli, J. G.; Domingues, R. J.; Ferrari, J. T., Divulgação técnica *Alternaria* spp em oleráceas: sintomas, etiología, manejo e fungicidas. *Biológico, São Paulo*, **2015**, *77*, 21-34.
115. Mahapatra, S.; Das, S., Evaluation of fungicides and botanicals against *Alternaria* leaf blight of mustard. *Indian J. Plant Prot.*, **2013**, *41*, 61-65.
116. Eram, D.; Arthikala, M.; Melappa, G.; Santoyo, G., *Alternaria* species: endophytic fungi as alternative sources of bioactive compounds. *Ital, J. Mycol.*, **2018**, *47*, 40-54.
117. Sharma, N.; Tiwari, R., Biological effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) essential oil on *Alternaria alternata* (FR) keiss. *IJRSR*, **2013**, *4*, 827-831.
118. Osman, E. H. B.; Algam, S. A. E.; Osman, T. M. T.; Ali, M. E.; Abbo, A. S.H.; Elhassan, S. M., Antifungal effect of camel urine and ginger wáter extract against *Alternaria alternta* the casual agente f early blight disease of tomato in vitro. *IJAFLS*, **2016**, *2*, 261-269.
119. Rea, M. J. L., (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreo y clorofórmico de: *Drymaria ovata*, *Senna macrophylla* y *Tagetes filifolia* Lag, Bioquímico farmacéutico, Escuela superior Politecnica de Chimborazo, Ecuador.

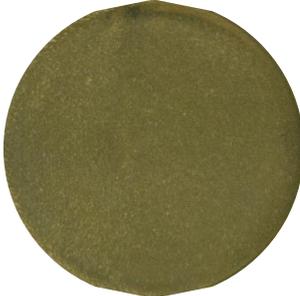
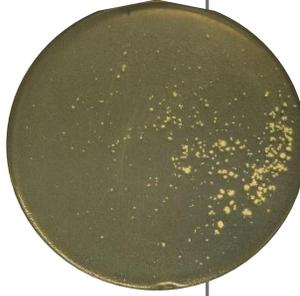


## ANEXOS

### Anexo 1. Evaluación de *Alternaria*, por el método de medio envenenado (2 mg/mL de APD).

	Extractos frescos de <i>Z. officinale</i> .			Blancos	
	Extracto hexánico.	Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Extracto de MeOH	Hongo	Itraconazol
24 h					
48 h					

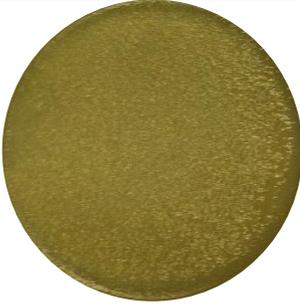
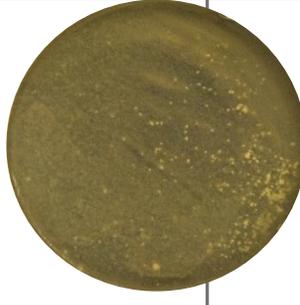
**Anexo 2. Evaluación de *Alternaria*, por el método de medio envenenado (2 mg/mL de APD).**

	Extractos secos de <i>Z. officinale</i> .			Blancos	
	Extracto hexánico.	Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Extracto de MeOH	Hongo	Itraconazol
24 h					
48 h					

**Anexo 3 Evaluación de *A. brasiliensis*, por el método de medio envenenado (2 mg/mL de APD).**

	<b>Extractos frescos de <i>Z. officinale</i>.</b>			<b>Blanco</b>	
	Extracto hexánico.	Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Extracto de MeOH	Hongo	Itraconazol
<b>24 h</b>					
<b>48 h</b>					

**Anexo 4. Evaluación de *A. brasiliensis*, por el método de medio envenenado (2 mg/mL de APD).**

	<b>Extractos secos de <i>Z. officinale</i>.</b>			<b>Blanco</b>	
	Extracto hexánico.	Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Extracto de MeOH	Hongo	Itraconazol
24 h					
48 h					

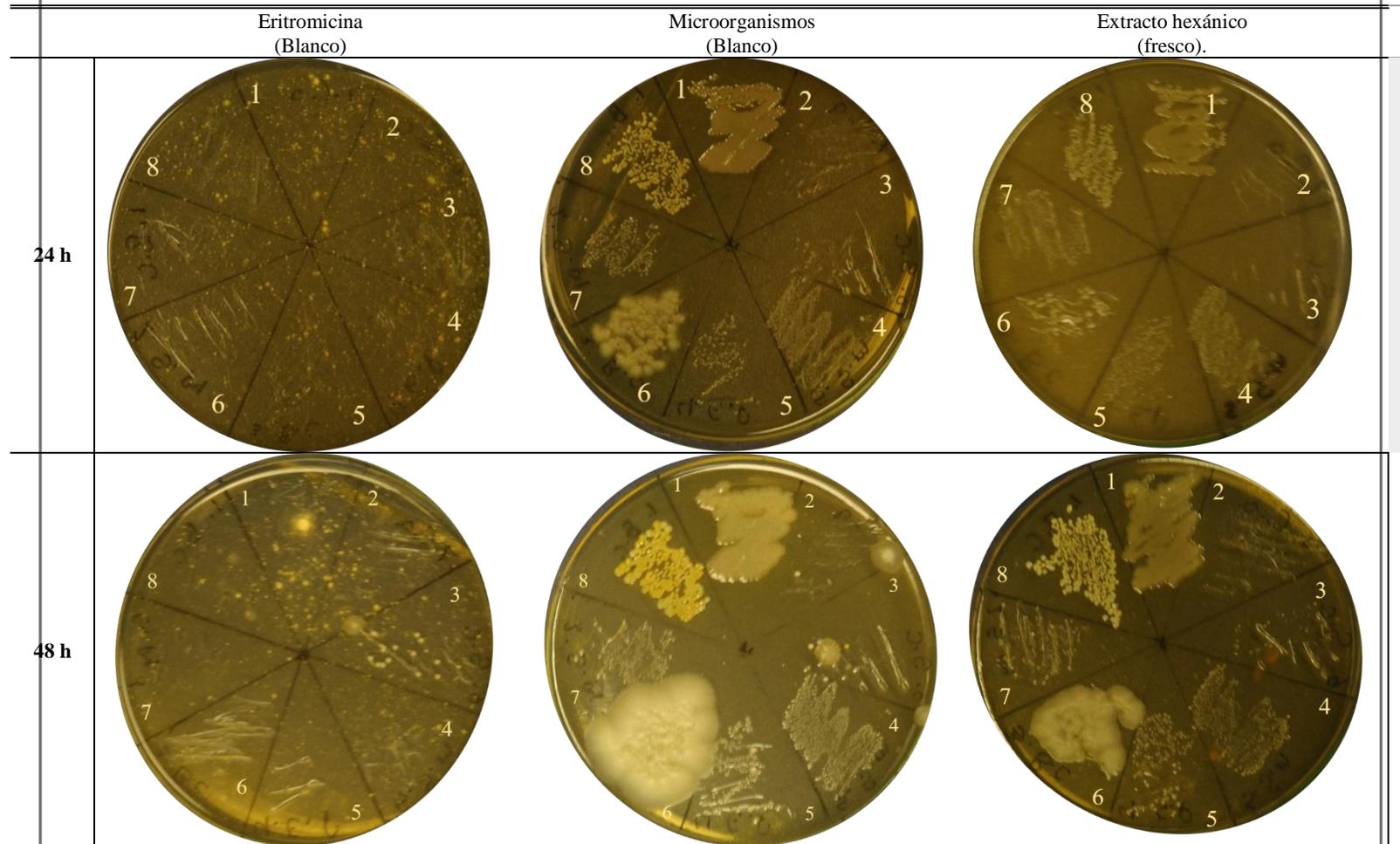
**Anexo 5. Evaluación de *A. niger*, por el método de medio envenenado (2 mg/mL de APD).**

	<b>Extractos frescos de <i>Z. officinale</i>.</b>				<b>Blanco</b>
	Extracto hexánico.	Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Extracto de MeOH	Hongo	Itraconazol
<b>24 h</b>					
<b>48 h</b>					

**Anexo 6. Evaluación de *A. niger*, por el método de medio envenenado (2 mg/mL de APD).**

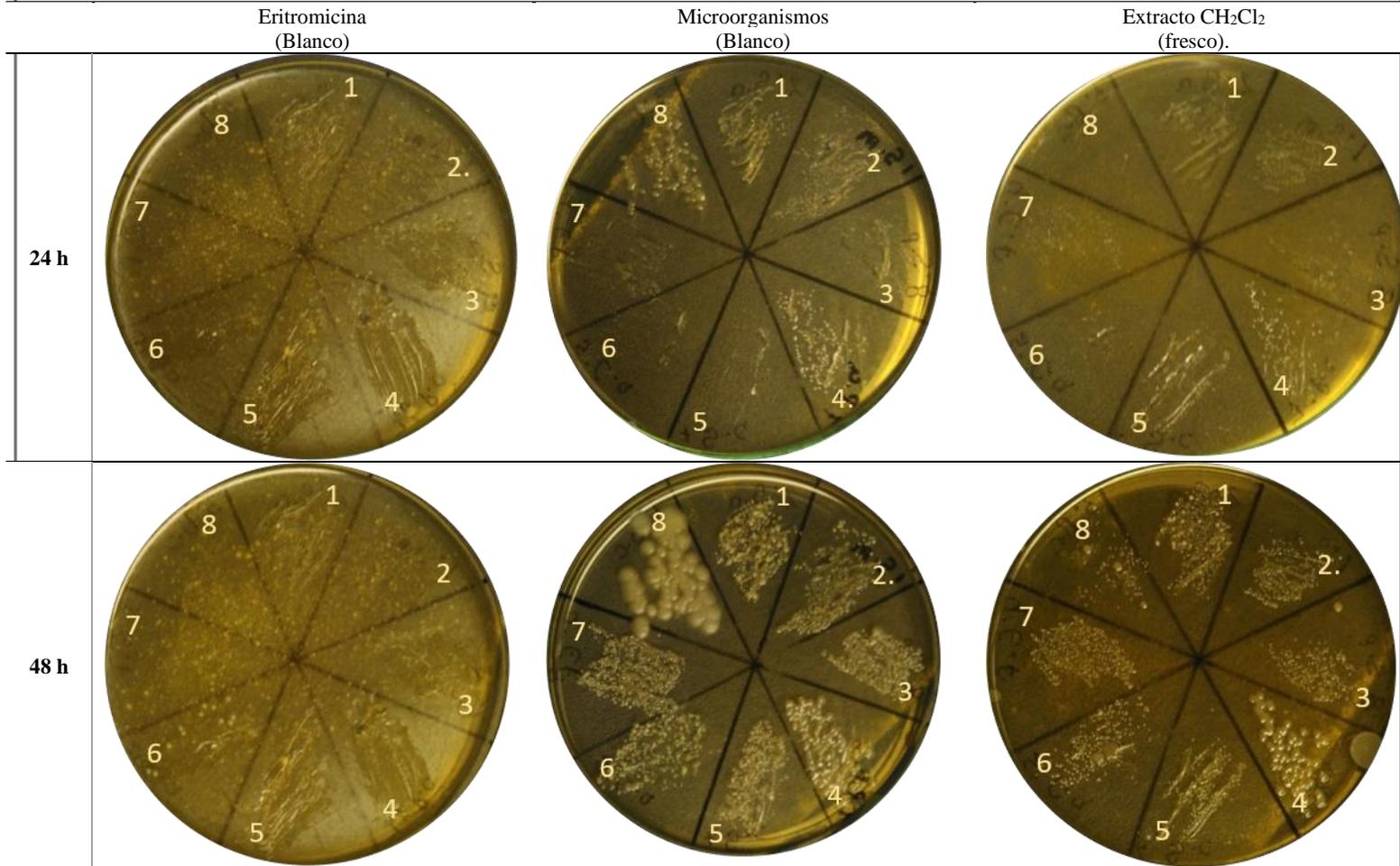
	<b>Extractos secos de <i>Z. officinale</i>.</b>				<b>Blanco</b>
	Extracto hexánico.	Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Extracto de MeOH	Hongo	Itraconazol
<b>24 h</b>					
<b>48 h</b>					

**Anexo 7. Determinación antimicrobiana del extracto de n-hexano de *Z. officinale* (80 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**



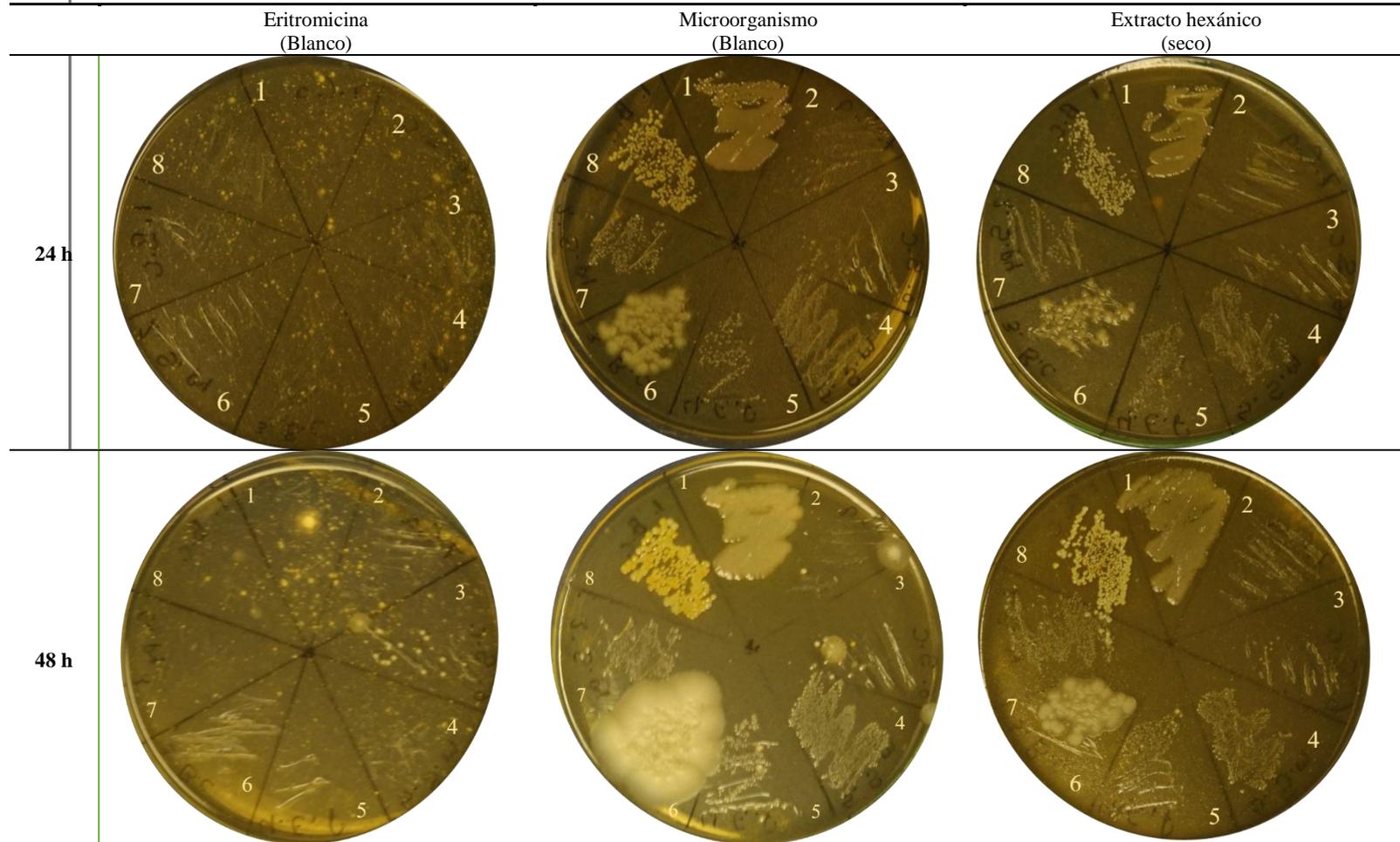
1) *P. aeruginosa*, 2) *C. albicans*, 3) *S. cerevisiae*, 4) *S. mutans*, 5) *E. faecalis*, 6) *B. cereus*, 7) *S. pyogenes*, 8) *S. aureus*

**Anexo 8. Determinación antimicrobiana del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Z. officinale* (80 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**



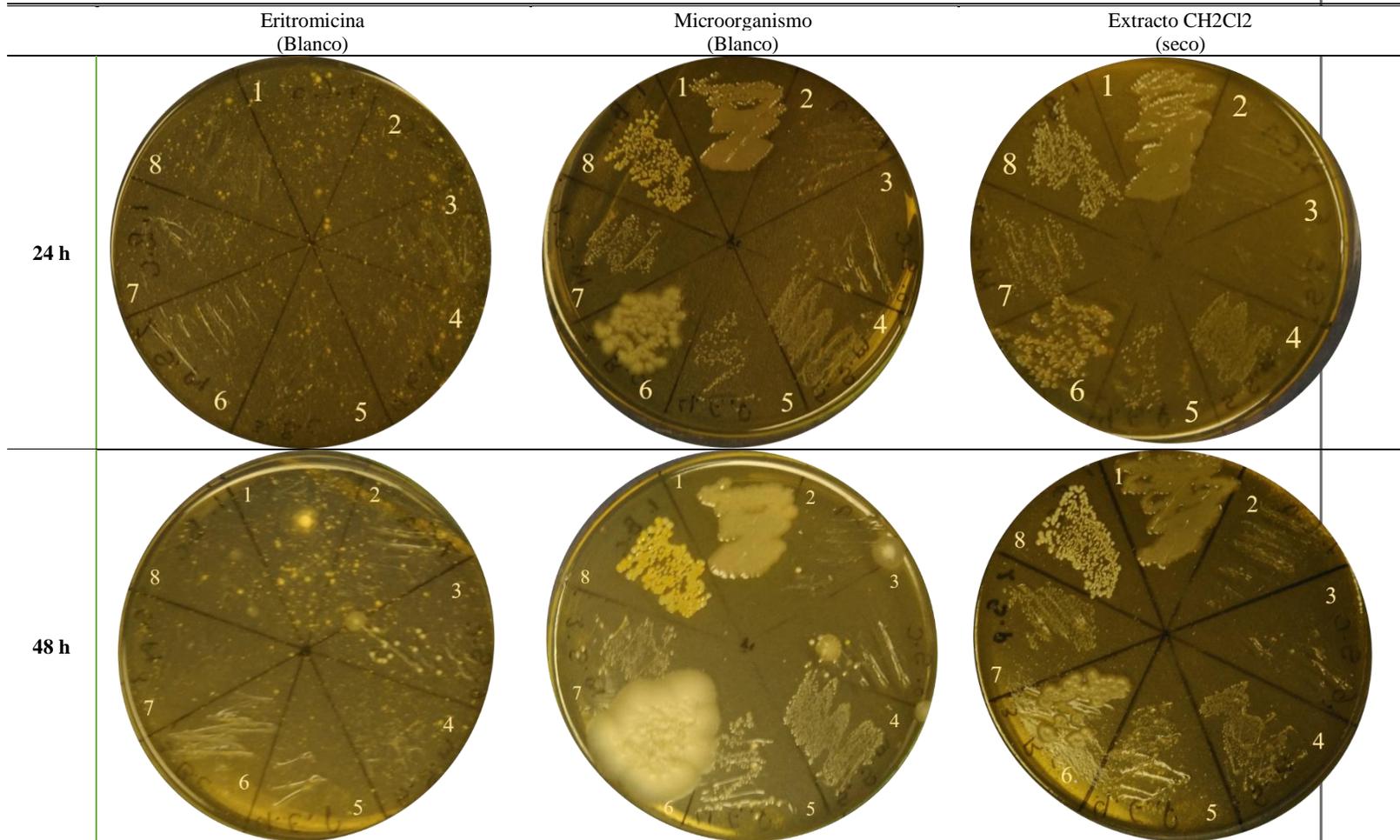
1) *S. aureus*, 2) *S. mutans*, 3) *S. pyogenes*, 4) *P. aeruginosa*, 5) *S. cevericiae*, 6) *C. albicans*, 7) *E. faecalis*, 8) *B. cereus*j

**Anexo 9. Determinación antimicrobiana del extracto de n-hexano de *Z. officinale* (80 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**



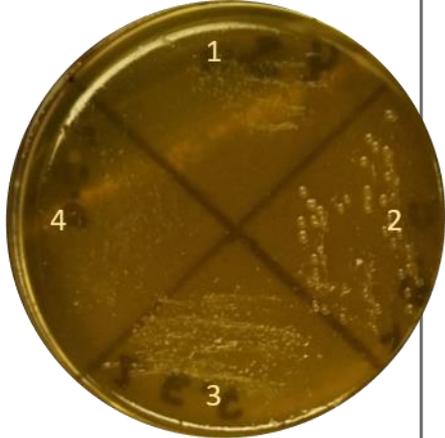
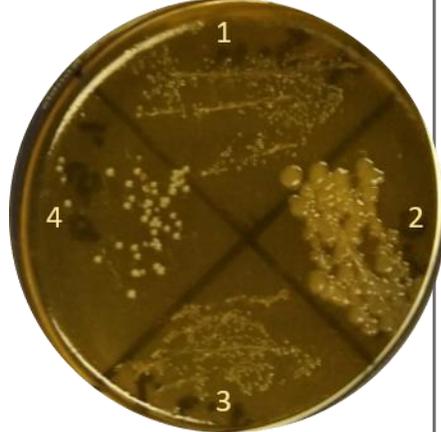
1) *P. aeruginosa*, 2) *C. albicans*, 3) *S. cerevisiae*, 4) *S. mutans*, 5) *E. faecalis*, 6) *B. cereus*, 7) *S. pyogenes*, 8) *S. aureus*

**Anexo 10. Determinación antimicrobiana del extracto de CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> de *Z. officinale* (80 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**



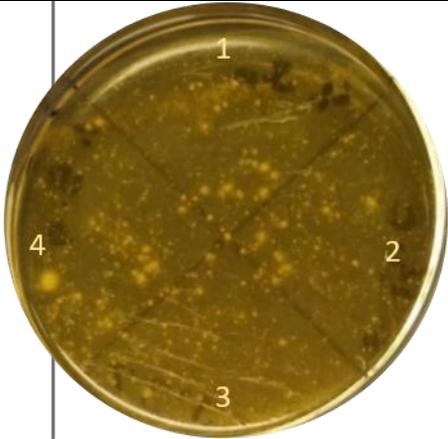
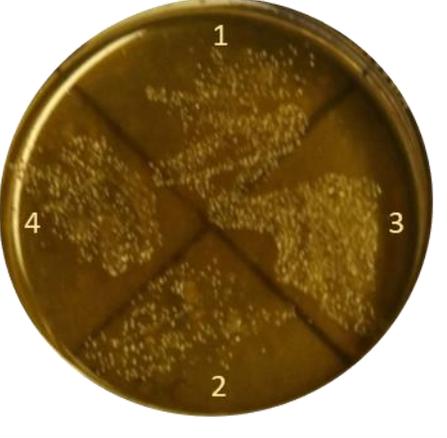
1) *P. aeruginosa*, 2) *C. albicans*, 3) *S. cerevisiae*, 4) *S. mutans*, 5) *E. faecalis*, 6) *B. cereus*, 7) *S. pyogenes*, 8) *S. aureus*

**Anexo 11. Determinación antimicrobiana del extracto de n-hexano de *Z. officinale* (20 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**

	Eritromicina (Blanco)	Microorganismos (Blanco)	Extracto hexánico (fresco)
24 h			
48 h			

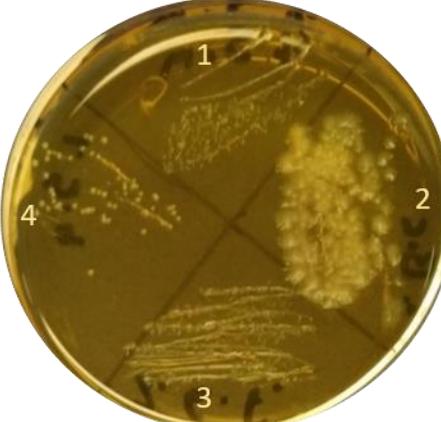
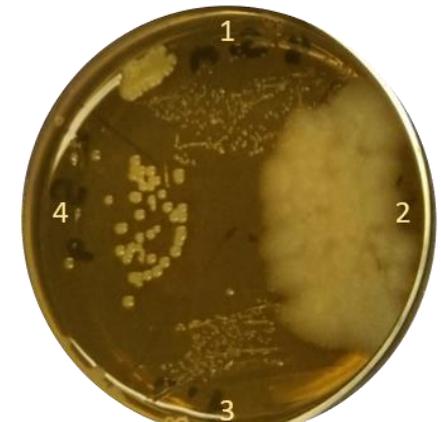
1) *S. mutans*, 2) *B. cereus*, 3) *E. faecalis*, y 4) *S. aureus*

**Anexo 12. Determinación antimicrobiana del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *Z. officinale* (20 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**

	Eritromicina (Blanco)	Microorganismos (Blanco)	Extracto CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (fresco.)
24 h			
48 h			

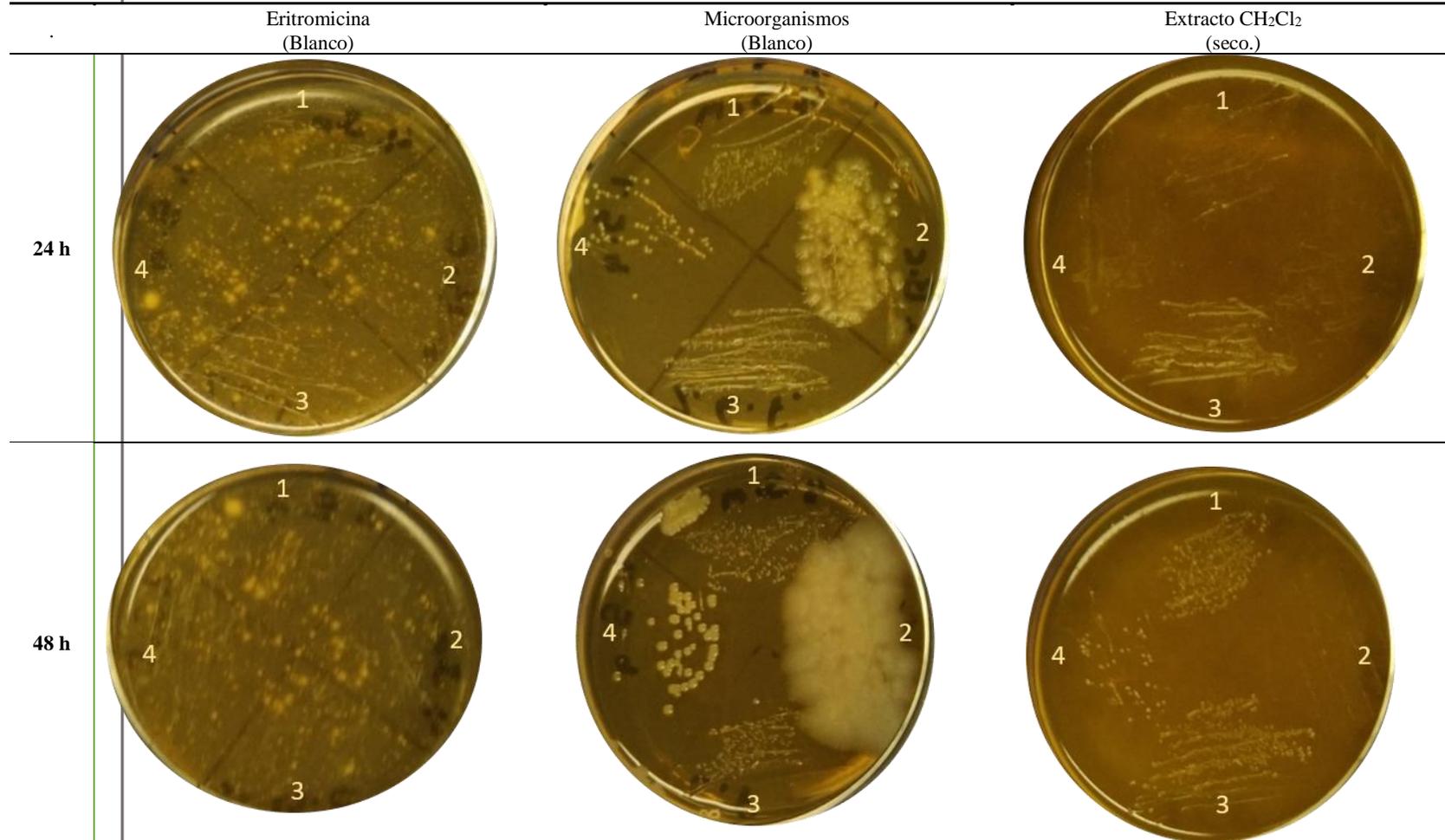
1) *S. mutans*, 2) *B. cereus*. 3) *E. faecalis*, y 4) *S. aureus*.

**Anexo 13. Determinación antimicrobiana del extracto de n-hexano de *Z. officinale* (20 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**

	Eritromicina (Blanco)	Microorganismos (Blanco)	Extracto hexánico (seco.)
24 h			
48 h			

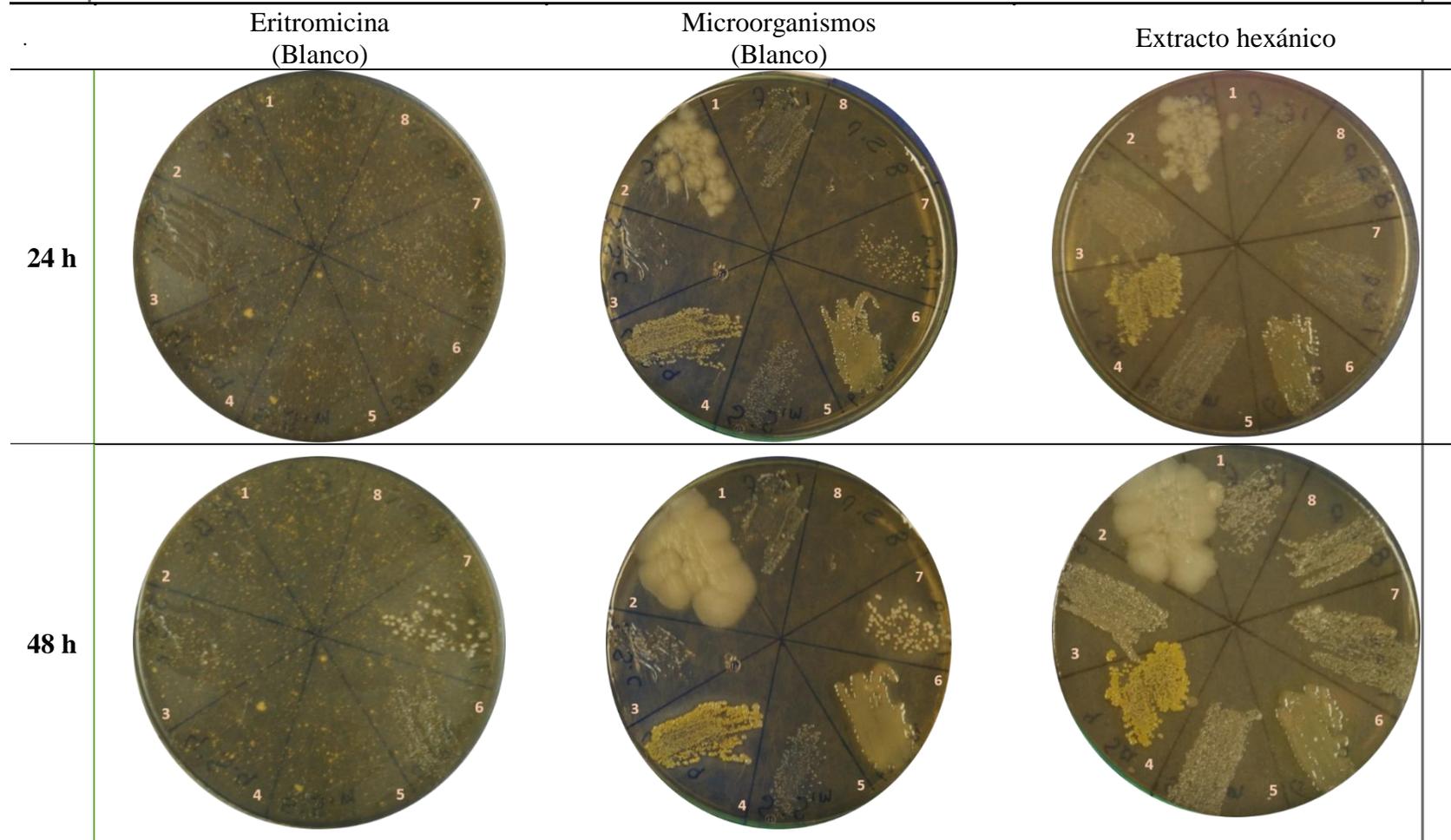
*S. mutans*, 2) *B. cereus*. 3) *E. faecalis*, y 4) *S. aureus*

**Anexo 14. Determinación antimicrobiana del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>  
(20 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**

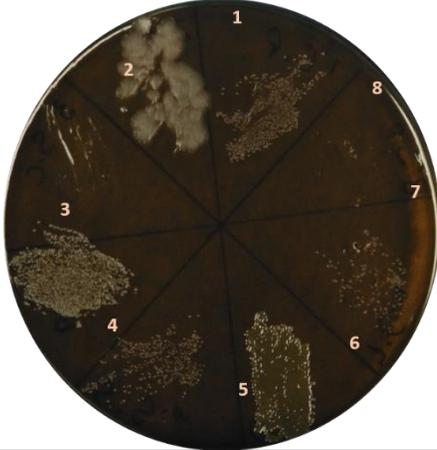
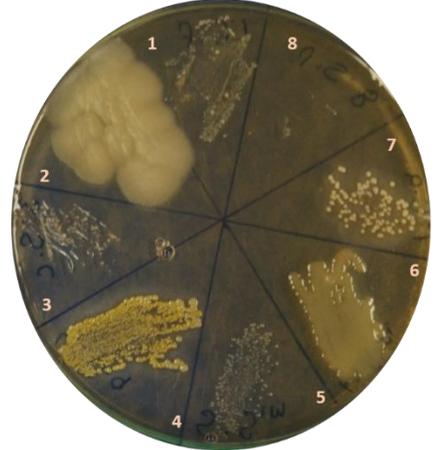
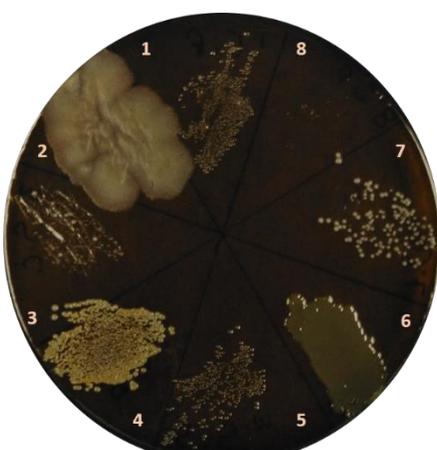


*S. mutans*, 2) *B. cereus*. 3) *E. faecalis*, y 4) *S. aureus*

**Anexo 15. Determinación antimicrobiana del extracto de n-hexano de *T. filifolia* (80 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**



**Anexo 16. Determinación antimicrobiana del extracto de AcOEt de *T. filifolia* (80 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**

	Eritromicina (Blanco)	Microorganismos (Blanco)	Extracto de AcOEt
24 h			
48 h			

**Anexo 17. Determinación antimicrobiana del extracto de MeOH de *T. filifolia* (80 mg/40 mL AST), mediante el método de Mitscher.**

