



UNIVERSIDAD POPULAR AUTÓNOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

**Decanato de Ciencias Biológicas
Facultad de Biotecnología
Maestría en Biotecnología**

TESIS

Efecto de *Zingiber officinale Roscoe* y su componente 6-shogaol contra microorganismos resistentes y su daño genético en estudios *in vitro*.

Para obtener el grado de:

MAESTRO (A) EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

SAID MIRIAM TEOLOTITLA ROSALES

Director

Verónica Rodríguez Soria

Co-director

Lydia María Pérez Díaz.

Puebla, Pue.

Noviembre/2022



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de textos, imágenes, gráficas, 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 de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Decanato de Ciencias Biológicas

Facultad de Biotecnología

Maestría en Biotecnología

Efecto de *Zingiber officinale Roscoe* y su componente 6-shogaol contra microorganismos resistentes y su daño genético en estudios *in vitro*.

Tesis para obtener el grado de Maestro (a) en Biotecnología
Said Miriam Teolotitla Rosales

Dra. Verónica Rodríguez Soria
Director

Dra. Lydia María Pérez Díaz
Co-Director

Dra. Beatriz Pérez Armendariz
Asesor

Dr. Luis Daniel Ortega Martínez
Asesor

Dra. Laura Contreras Mioni
Asesor

Puebla, México.,

Noviembre/2022

Resumen: Efecto de *Zingiber officinale Roscoe* y su componente 6-shogaol contra microorganismos resistentes y su daño genético en estudios *in vitro*.

Introducción.

Zingiber officinale Roscoe (ZOR) es una planta perene que pertenece a la familia de las *Zingiberaceae*. Originaria del este y sureste de Asia, se ha utilizado en la medicina tradicional china desde hace 2500 años. Estudios recientes han encontrado más de 400 componentes bioactivos en ZOR, dentro de los cuales 194 son aceites volátiles, 85 tipos de gingerol y 28 tipos de compuestos diarilheptanoide que brindan un amplio espectro antimicrobiano contra diferentes microorganismos (Mele, 2019, Wang et al., 2017). Se ha evaluado la actividad antimicrobiana del aceite esencial, las oleorresinas y los extractos de ZOR convirtiéndolo en una interesante alternativa a los antimicrobianos sintéticos (Vawazola *et al.*, 2018, Sadidharan *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2016; Panpatil *et al.*, 2013; Yousfi *et al.*, 2021).

Planteamiento del problema.

Estudios realizados en países en desarrollo reportan que del 6 al 24% de las consultas se deben a enfermedades cutáneas y el 60% de los sujetos atendidos son personas en edad pediátrica. (González *et al.*, 2019). Los tratamientos habituales se han vuelto ineficaces desencadenando la persistencia de infecciones. Además diversos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia frente a los antimicrobianos que podrían desencadenar consecuencias importantes en salud pública (Conejo y Morada, 2016).

Objetivo.

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Zingiber officinale roscoe* y cuatro metabolitos aislados mediante el método de Kirby Bauer para determinar su capacidad inhibitoria frente a microorganismos causantes de infecciones en la piel.

Metodología.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de investigación, área de Biotecnoambiental de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, con una duración de veinte meses, en los cuales se extrajo el aceite esencial de *Zingiber officinale roscoe* y se purificaron cuatro metabolitos mediante técnicas cromatográficas para realizar las pruebas antimicrobianas, concentraciones

mínimas inhibitorias, además de pruebas citotóxicas y genotóxicas *in vitro*. Los microorganismos evaluados fueron cepas *ATCC* y de aislamiento clínico previamente caracterizadas y proporcionadas por el laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Puebla. Dichos microorganismos fueron propuestos como bacterias, levaduras y hongos causantes de infecciones en la piel. Los estudios espectrofotométricos de Infrarrojo y Resonancia magnética nuclear ^1H , ^{13}C y 2D RMN fueron realizados en las instalaciones del Centro de Servicios de Alta Tecnología de UPAEP y el laboratorio de Ingeniería Química BUAP respectivamente.

Resultados.

El extracto de *Zingiber officinale* y metabolitos aislados muestran actividad antimicrobiana con halos de inhibición que van de 8-11 mm contra los microorganismos evaluados, excepto para *P.aeruginosa* multiresistente. La concentración mínima inhibitoria del metabolito M11 fue de 1.349 ± 0.32 y 1.425 ± 0.15 para la cepa *S. aureus ATCC* y la cepa resistente *S. aureus CE12/04*. Para el metabolito M8 los valores obtenidos para la concentración mínima inhibitoria fueron similares, para la cepa *C. albicans ATCC* el valor obtenido fue de 2.112 ± 0.37 , mientras que para la cepa *C. albicans 619150* fue de 2.463 ± 0.87 . Al realizar la comparación entre los valores obtenidos de las concentraciones entre *S. aureus ATCC* y *P. aeruginosa ATCC*, se requiere mayor concentración de los metabolitos para *P. aeruginosa ATCC* M1 (CMI= 2.118 ± 0.03), M4 (CMI= 1.624 ± 0.21) y M8 (CMI= 1.698 ± 0.03). Sin embargo para el metabolito M11 se obtuvieron valores similares de 1.349 ± 0.32 y 1.423 ± 0.12 para la cepa *S. aureus ATCC* y *P. aeruginosa ATCC* respectivamente. El extracto de rizoma muestra efecto tóxico y genotóxico en todas las concentraciones (> 1000 ug/ml) pero no se observaron estos efectos en los metabolitos aislados a concentraciones inferiores a 30 ug/ml. Mediante las pruebas espectrofotométricas de IR y RMN se determinó que el metabolito M8 corresponde al 6-shogaol.

Conclusiones.

Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana muestran que *S. aureus ATCC* muestra mayor sensibilidad a los metabolitos M1, M4 y M8 respecto a *P. aeruginosa ATCC*. Los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad muestran que los metabolitos puros presentan estos efectos dependiendo de la concentración. Estos metabolitos pueden ser aprovechados para desarrollar productos biotecnológicos coadyuvantes en el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por bacterias gram positivas y levaduras.

Palabras clave.

Zingiber officinale, resistencia antimicrobiana, purificación, citotoxicidad, 6-shogaol.

***Summary: Effect of Zingiber officinale roscoe and its component
6- shogaol against resistant microorganisms and their genetic
damage in in vitro studies.***

Introduction.

Zingiber officinale Roscoe (ZOR) is a perennial plant that belongs to the *Zingiberaceae* family. Native to East and Southeast Asia, it has been used in traditional Chinese medicine for 2,500 years. Recent studies have found more than 400 bioactive components in ZOR, among which 194 are volatile oils, 85 types of gingerol and 28 types of diarylheptanoid compounds that provide a broad antimicrobial spectrum against different microorganisms (Mele, 2019, Wang et al., 2017). The antimicrobial activity of the essential oil, oleoresins and ZOR extracts has been evaluated, making it an interesting alternative to synthetic antimicrobials (Vawazola *et al.*, 2018, Sadidharan *et al.*, 2010; Sharma et al. 2016; Panpatil *et al.*, 2013; Yousfi *et al.*, 2021).

Problem Statement.

Studies carried out in developing countries report that from 6 to 24% of consultations are due to skin diseases and 60% of the subjects attended are people of pediatric age (González *et al.*, 2019). The usual treatments have become ineffective, triggering the persistence of infections. In addition, various microorganisms have developed resistance mechanisms against antimicrobials that could trigger important consequences in public health (Conejo y Morada, 2016).

Objective.

The present investigation aims to evaluate the antimicrobial effect of the essential oil of *Zingiber officinale roscoe* and four metabolites isolated by the Kirby Bauer method to determine its inhibitory capacity against microorganisms that cause skin infections.

Methodology.

This work was carried out in the research laboratory, Biotechno-environmental area of the Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, with a duration of twenty months, in which the essential oil of *Zingiber officinale roscoe* was extracted and four metabolites were purified by chromatographic techniques to perform antimicrobial tests, concentrations minimal inhibitory tests, and *in vitro* cytotoxic and genotoxic test. The microorganisms evaluated were ATCC and

clinical isolation strains previously characterized and provided by the State Public Health Laboratory of the state of Puebla. These microorganisms were proposed as bacteria, yeasts and fungi that cause skin infections. Infrared spectrophotometric studies and ^1H , ^{13}C and 2D NMR nuclear magnetic resonance were carried out at the facilities of the UPAEP high technology services center and the BUAP chemical engineering laboratory, respectively.

Results.

The *Zingiber officinale* extract and isolated metabolites show antimicrobial activity, the zone of inhibition was measured with a manual scaler ranging from 8-11 mm against Grampositive and Gramnegative bacteria, fungi and yeasts evaluated, except for multiresistant *P. aeruginosa*. The phytochemical test indicates that the isolated metabolites M8 and M11 belong to the group of terpenes. The minimum inhibitory concentration of the M11 metabolite was 1.349 ± 0.32 and 1.425 ± 0.15 for the *S. aureus* ATCC strain and the resistant *S. aureus* CE12/04 strain. For the M8 metabolite, the values obtained for the minimum inhibitory concentration were similar, for the *C. albicans* ATCC strain the value obtained was 2.112 ± 0.37 , while for the *C. albicans* 619150 strain the value was 2.463 ± 0.87 . The comparison of the values obtained from the concentrations between *S. aureus* ATCC and *P. aeruginosa* ATCC, a higher concentration of metabolites is required for *P. aeruginosa* ATCC M1 (CMI= 2.118 ± 0.03), M4 (CMI= 1.624 ± 0.21) y M8 (CMI= 1.698 ± 0.03). However, for the M11 metabolite, similar values of 1.349 ± 0.32 y 1.423 ± 0.12 were obtained for the strain *S. aureus* ATCC, respectively. The rhizome extract shows toxic and genotoxic effects at all concentrations (> 1000 ug/ml) but these effects were not observed in the metabolites isolated at concentrations below 30 $\mu\text{g/ml}$. The M8 metabolite was determined corresponds to 6-shogaol through IR and NMR spectrophotometric tests.

Conclusions.

Antimicrobial susceptibility assays show that *S. aureus* ATCC shows greater sensitivity to the metabolites M1, M4 and M8 compared to *P. aeruginosa* ATCC. Cytotoxicity and genotoxicity assays show that the pure metabolites can be used to develop coadjuvant biotechnological products in the treatment of skin infections caused by grampositive bacteria and yeasts.

Keywords.

Zingiber officinale, antimicrobial resistance, purification, cytotoxicity, 6-shogaol.

TABLA DE CONTENIDO

1	CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	16
1.1	INTRODUCCIÓN.....	16
1.2	PROBLEMÁTICA.....	17
1.3	JUSTIFICACIÓN	18
1.4	OBJETIVOS.....	21
1.4.1	<i>Objetivo general.....</i>	<i>21</i>
1.4.2	<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>21</i>
1.5	HIPÓTESIS.....	22
2	CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	23
2.1	<i>ZINGIBER OFFICINALE.....</i>	<i>23</i>
2.1.1	<i>Características botánicas.....</i>	<i>25</i>
2.1.2	<i>Rizomas</i>	<i>26</i>
2.1.3	<i>Siembra</i>	<i>28</i>
2.1.4	<i>Cosecha</i>	<i>29</i>
2.1.5	<i>Producción</i>	<i>29</i>
2.1.6	<i>Propiedades farmacológicas.....</i>	<i>30</i>
2.2	ACEITES ESENCIALES.....	31
2.2.1	<i>Aceite esencial de Zingiber officianle.....</i>	<i>33</i>
2.2.2	<i>Métodos de extracción</i>	<i>33</i>
2.2.3	<i>Destilación por arrastre de vapor.....</i>	<i>33</i>
2.2.4	<i>Extracción con solventes volátiles</i>	<i>34</i>
2.2.5	<i>Extracción con fluidos supercríticos.....</i>	<i>34</i>
2.2.6	<i>Extracción por maceración.....</i>	<i>35</i>
2.2.7	<i>Extracción por el método de Soxhlet</i>	<i>35</i>
2.3	EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE <i>ZINGIBER OFFICINALE</i>	35
2.3.1	<i>Factores a considerar para la extracción.....</i>	<i>35</i>
2.3.2	<i>Antecedentes de extracción</i>	<i>36</i>

2.3.3	COMPUESTOS IDENTIFICADOS.....	40
2.3.4	Actividad antimicrobiana.....	45
2.4	BACTERIAS SUCEPTIBLES DE LA PIEL	50
2.4.1	Microbiota de la piel.....	50
2.4.2	Infecciones bacterianas de la piel.....	53
2.4.3	Resistencia antimicrobiana.....	59
2.4.4	Bacterias de la piel resistentes a los antimicrobianos.....	61
2.4.5	Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	62
2.4.6	Técnica de difusión en agar empleando discos.....	62
2.5	TOXICIDAD	63
2.5.1	Ensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i>	64
2.5.2	Ensayo de toxicidad aguda con <i>Daphnia magna</i>	65
2.5.3	Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla <i>Allium cepa</i> L.....	65
2.5.4	Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario <i>Hydra attenuata</i>	65
2.5.5	Ensayo de toxicidad agua con semillas de lechuga <i>Lactuca sativa</i> L.	66
2.5.6	Ensayo de toxicidad con el nemátodo <i>Panagrellus redivivus</i>	67
3	CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	68
3.1	DISEÑO METODOLÓGICO.....	68
3.2	MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	68
3.3	OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL	69
3.3.1	Muestreo y recolección de la materia prima	69
3.3.2	Identificación taxonómica.....	69
3.3.3	Lavado.....	69
3.3.4	Rayado.....	69
3.3.5	Secado	70
3.3.6	Pesado	70
3.3.7	Macerado	70
3.3.8	Filtrado	70
3.3.9	Concentrado.....	70
3.3.10	Envasado	71
3.4	IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS	73

3.4.1 Plaqueo	73
3.4.2 Desarrollo	73
3.4.3 Revelado	73
3.5 PURIFICACIÓN DE METABOLITOS	74
3.5.1 Plaqueo	74
3.5.2 Desarrollo	74
3.5.3 Revelado	75
3.5.4 Remoción	75
3.5.5 Separación de sílica	75
3.5.6 Filtración	75
3.5.7 Evaporación	76
3.6 EVALUACIÓN DE EFECTO ANTIMICROBIANO	78
3.6.1 Preparación de agar Mueller Hinton	78
3.6.2 Preparación de discos	78
3.6.3 Preparación de microorganismos	78
3.6.4 Preparación del inóculo	78
3.6.5 Inoculación de placas.	79
3.6.6 Aplicación de discos	79
3.6.7 Incubación	79
3.6.8 Lectura de placas	79
3.7 DETERMINACIÓN DE LA CMI POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN PLACA	82
3.7.1 Preparación de las muestras	82
3.7.2 Preparación del inóculo	82
3.7.3 Diseño de placa	82
3.7.4 Preparación de la placa	83
3.7.5 Incubación	83
3.7.6 Lectura de microplacas	83
3.8 EVALUACIÓN FITOQUÍMICA	85
3.9 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE INFRARROJO	85
3.10 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H Y ^{13}C	85
3.11 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD	86

3.11.1 Preparación de las muestras.....	86
3.11.2 Bioensayo <i>Allium sativum</i>	86
4 CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
4.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA	90
4.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	90
4.2.1 Extracto acuoso.....	90
4.2.2 Extracto etanólico	90
4.2.3 Extracto diclorometano.....	91
4.2 IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS	91
4.2.1 Revelado con luz UV	91
4.2.2 Revelado con Molibdato	91
4.2.3 Revelado con yodo	92
4.3 PURIFICACIÓN	94
4.4 RENDIMIENTO DE EXTRACCIÓN	96
4.5 PRUEBAS FITOQUÍMICAS.....	97
4.6 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE INFRARROJO	98
4.7 ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹ H Y ¹³ C	101
4.8 PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD.....	107
4.9 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI 90).....	111
4.10 GENOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD	113
CONCLUSIONES.....	115
RECOMENDACIONES.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	117
ANEXOS	132
ANEXO A	133

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Zingiber officinale</i>	23
Tabla 2. Perfil nutricional de <i>Zingiber officinale</i>	27
Tabla 3. Antecedentes de extracción de aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	37
Tabla 4. Compuestos identificados en aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	40
Tabla 5. Evaluación de actividad antimicrobiana de <i>zingiber officinale</i>	45
Tabla 6. Microbiota presente en la piel	51
Tabla 7. Infecciones generadas por bacterias en la piel	55
Tabla 8. Identificación taxonómica de los rizomas adquiridos para esta investigación.	90
Tabla 9. Rendimiento de extracción de aceite esencial de <i>Zingiber officinale</i>	96
Tabla 10. Pruebas fitoquímicas del extracto y metabolitos de <i>Zingiber officinale</i>	97
Tabla 11. Actividad antimicrobiana del extracto y metabolitos aislados de los rizomas de <i>Zingiber officinale</i>	109
Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria 90 de los metabolitos aislados de <i>Zingiber officinale</i> contra microorganismos causantes de infecciones en la piel.	112
Tabla 13. Estudio de genotoxicidad y citotoxicidad del extracto de <i>Zingiber officinale</i> en bulbos de <i>A.sativum</i>	114
Tabla 14. Estudio de genotoxicidad y citotoxicidad de los metabolitos M8 y M11 de <i>Zingiber officinale</i>	114

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Partes de <i>Zingiber officinale</i> .	26
Figura 2. Diseño de microplaca.	84
Figura 3: Revelado de placas..	93
Figura 4 . Purificación de metabolitos.	95
Figura 5. Metabolitos identificados para aislamiento.	95
Figura 6. Espectro FT-IRmetabolito 1 y metabolito 4.	99
Figura 7. Espectro FT-IR metabolito 8 y metabolito 11..	100
Figura 8. Multiplicidad de las señales 6-shogaol en resonancia magnética nuclear ^1H .	102
Figura 9. Ampliación de la señal del C14 del 6-shogaol en resonancia magnética nuclear ^1H .	103
Figura 10. Ampliación de la señal del C15 del 6-shogaol en resonancia magnética nuclear ^1H .	103
Figura 11. Ampliación de la señal del C11 del 6-shogaol en resonancia magnética nuclear ^1H .	104
Figura 12. Ampliación de la señal del C10 y C8 del 6-shogaol en resonancia magnética nuclear ^1H .	104
Figura 13. Ampliación de la señal del C10 y C20 del 6-shogaol en resonancia magnética nuclear ^1H .	105
Figura 14. Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C del 6-shogaol.	105
Figura 15. Espectro de resonancia magnética nuclear COSY del 6-shogaol.	106
Figura 16. Gráficos con las diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con el extracto y metabolitos aislados contra bacterias y levaduras.	110

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama de flujo 1. Macerados de <i>Zingiber officinale</i>	72
Diagrama de flujo 2. Identificación de metabolitos presentes en macerados de <i>Zingiber officinale</i> por TLC.....	744
Diagrama de flujo 3. Purificación de metabolitos del macerado clorofórmico de <i>Zingiber officinale</i> por TLC.....	77
Diagrama de flujo 4. Antibiógramas de metabolitos presentes en el macerado con diclorometano de <i>Zingiber officinale</i>	81
Diagrama de flujo 5. Prueba de citotoxicidad y genotoxicidad de metabolitos puros y extracto clorofórmico de <i>Zingiber officinale</i> en <i>A. sativum</i>	88
Diagrama de flujo 6. Tinción de células meristemáticas de <i>A. sativum</i> en las pruebas de de citotoxicidad y genotoxicidad.	89

1 CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

Zingiber officinale Roscoe es una de las plantas medicinales más consumidas a nivel mundial (Beristain et al., 2019, Lui et al., 2019). Ha sido utilizado en la medicina tradicional china hace unos 2500 años. Los rizomas frescos triturados se aplican externamente para tratar el dolor de cabeza y su mezcla con sal negra y limón se usa para combatir las náuseas en la India y Nepal. Además se ha utilizado para aliviar el mareo y las náuseas matutinas durante el embarazo y reducir los cólicos estomacales en Estados Unidos (Semwal et al., 2015).

Estudios recientes han encontrado más de 400 componentes bioactivos en los rizomas de *Zingiber officinale*, su composición química incluye 194 tipos de aceites volátiles, 85 tipos de gingerol y 28 tipos de compuestos de diarilheptanoide que brindan un amplio espectro antimicrobiano contra diferentes microorganismos, sin embargo los principales compuestos bioactivos son los gingeroles y shogaols (Mele, 2019; Wang et al., 2017).

Ambos exhiben una serie de actividades farmacológicas pero la mayoría han sido atribuidas al 6-gingerol. El estudio de Suk et al, 2016 muestra que el 6-Shogaol tiene un efecto antiadipogénico más potente que el 6-gingerol, en adipocitos 3T3-L1 se ha observado que inhibe la expresión de PPAR γ y C/EBP α dos reguladores de la adipogénesis y también estimulan la lipólisis.

Además el 6-Shogaol se considera un agente terapéutico eficaz para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Park et al., 2013; Sapkota et al, 2019) con un mejor efecto que su análogo 6-gingerol al inhibir la liberación de óxido nítrico y la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducida por lipopolisacárido en la activación de microglía en BV-2 y cultivos de células microgliales primarias (Ha et al., 2012).

Numerosos estudios in vitro han evaluado la actividad antimicrobiana del aceite esencial, oleorresinas y extractos de *Zingiber officinale* (Bellik et al., 2014; Debbarma et al., 2013; Vawazola et al., 2018; Sadidharan et al., 2010; Sharma et al., 2016; Panpatil et al., 2013; Yousfi et al., 2021). La relación sinérgica entre los compuestos fenólicos, β -sesquiphellandrene, cis-caryophyllene, zingiberene, α -farnesene, α - y β -bisabolene son los responsables de este efecto y lo convierte en una interesante alternativa a los antimicrobianos sintéticos (Hasan et al., 2012).

1.2 Problemática

Las infecciones cutáneas son un motivo frecuente de consulta en la práctica diaria de medicina general o dermatología (Machet et al., 2018). Estudios realizados en países en desarrollo reportan que del 6 al 24% de la consulta pediátrica a nivel mundial se debe a enfermedades cutáneas y que hasta el 60% de los sujetos atendidos en la consulta dermatológica son personas en edad pediátrica (González *et al.*, 2019).

Las bacterias más frecuentes que causan enfermedades en la piel son *S. aureus* y *S. pyogenes* (Conejo y Moraga, 2016; Esperbet y Migliorati, 2017; Fariña *et al.*, 2017; del Tanago *et al.*, 2017; Dreno, 2019).

En los últimos cuatro años ha crecido la preocupación por la resistencia antimicrobiana, siendo el microorganismo mas emergente *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; esto se debe a que en la actualidad es una de las principales causas de infecciones adquiridas en comunidad (Pintado 2016; Esperbet y Migliorati, 2017; Fariña *et al.*, 2017). Particularmente *Staphylococcus aureus* codifica una enzima única SaHPPK (6-Hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfoquinasa) contra la cual no hay antibióticos reportados (Haag et al., 2012; Shi et al., 2012; Foster, 2017).

Los tratamientos habituales se han vuelto ineficaces desencadenado la persistencia de infecciones, las cuales podrían volverse incontrolables. Otras consecuencias que

ha traído es el aumento en las estancias hospitalarias, costos médicos y mortalidad (Pintado, 2016; OMS, 2018).

La resistencia a los antimicrobianos es progresiva y constituye un problema sanitario de primera magnitud, tanto para bacterias gramnegativas y grampositivas. Dichas bacterias resistentes son causantes de infecciones asociadas a una alta mortalidad y prolongada estancia hospitalaria que conlleva a un elevado coste económico (Pintado, 2016).

Acabar con el problema de la resistencia antimicrobina no es posible, sin embargo, esta latente amenaza si puede convertirse en un problema manejable. (Fariña *et al.*, 2017)

Dada la situación antes descrita, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Los metabolitos secundarios de *Zingiber officinale* tienen actividad antimicrobiana contra patógenos multiresistentes causantes de infecciones de la piel?

1.3 Justificación

Diversos microorganismos como bacterias, virus y algunos parásitos han desarrollado mecanismos que impiden que los llamados antimicrobianos como antibióticos, antivíricos y antipalúdicos actúen sobre ellos. Esta capacidad es denominada resistencia a los antimicrobianos o farmacoresistencia (OMS, 2017).

En los últimos años, la cantidad y el tipo de microorganismos resistentes se han visto incrementados; desencadenando un aumento en el número de casos en infecciones tales como neumonías, tuberculosis, gonorrea y salmonelosis o enfermedades de transmisión alimentaria, las cuales son cada vez más difíciles de tratar (OMS, 2018; Gonzáles *et al.*, 2019).

Este problema se está produciendo en todo el mundo y a su vez disminuye la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas; sin duda la resistencia a los antibióticos es un tipo de farmacorresistencia que más urge atajar (OMS, 2015).

Estimaciones hechas por la Organización Mundial de la Salud indican que para el 2050 se podrían tener consecuencias importantes en la salud pública y actividades agropecuarias (Esperbet y Migliorati., 2016).

Durante la 68^a Asamblea Mundial de la Salud celebrada en Mayo 2015, la Organización Mundial de la Salud aprobó un plan de acción mundial para luchar contra la resistencia a los antimicrobianos y la resistencia a los antibióticos.

Dos de los cinco puntos que plantea la Organización Mundial de la Salud en su plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos señalan reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación. Así mismo, aumentar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico vacunas y otras intervenciones (OMS, 2015).

Las empresas farmacéuticas que invierten en recursos para investigar nuevas moléculas de antibióticos son pocas, ya que no lo consideran rentable, además el mal uso y abuso de éstos favorece que nuevamente las bacterias generen mecanismos para evitar su acción. Todo esto ha propiciado que en las últimas tres décadas no se halla descubierto ninguna nueva familia de antibiótico (Pintado 2016; Esperbet y Migliorati, 2017; Fariña *et al.*, 2017).

Si bien existen algunos antibióticos nuevos en fase de desarrollo, se pronostica que ninguno de ellos sea eficaz contra las formas más peligrosas de algunas bacterias resistentes (OMS, 2018).

En los últimos años se ha propuesto desarrollar formulaciones derivadas del aceite esencial de *Zingiber officinale*, ya que los productos naturales tienen mucha aceptabilidad en el mercado nacional e internacional (Vera, 2018).

Una materia prima como el jengibre que es un producido en nuestro país, requiere de un proceso de innovación dándole valor agregado. El aceite de jengibre es muy cotizado en el mercado internacional, debido a sus multiples aplicaciones en la cosmética, sector médico y alimenticio. Se utilizan en perfumes, cosméticos, productos de baño y limpieza, aromatizar bebias y alimentos e incluso para la conservación de éstos (Lemma & Egza , 2019).

Desde la antigüedad ha sido utilizado como planta medicinal, ya que los rizomas contienen compuestos activos y con diversos efectos farmacológicos como antioxidante, analgésico, antiinflamatorio, antibacteriano, anticancerígeno y antipirético. (Zambrano-Blanco, 2015; Estrada y Romero, 2017; Limache, 2017; Pratap *et al.*, 2017; Quispe y Huamani, 2018; Castelán y Ponce, 2020).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antimicrobiana de *Zingiber officinale roscoe* y sus metabolitos frente a bacterias resistentes causantes de infecciones en la piel y sus efectos citotóxicos y genotóxicos en estudios in vitro.

1.4.2 Objetivos específicos

1.4.2.1 Extraer los compuestos activos de *Zingiber officinale roscoe* por maceración utilizando los disolventes agua, etanol y diclorometano para medir su capacidad de extracción.

1.4.2.2 Purificar los metabolitos secundarios por cromatografía en capa fina y cromatografía en columna para medir su actividad antibacteriana y antifúngica.

1.4.2.3 Caracterizar los compuestos extraídos mediante pruebas fitoquímicas y técnicas espectrofotométricas de Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C y COSY para identificar el metabolito secundario activo.

1.4.2.4 Evaluar la capacidad antibacteriana y antifúngica del extracto y metabolitos secundarios contra cepas tipo y de aislamiento clínico causantes de infecciones en la piel por el método de Kirby-Bauer.

1.4.2.5 Determinar la concentración mínima inhibitoria del metabolito secundario activo contra cepas tipo y de aislamiento clínico causantes de infecciones en la piel por el método de microdilución.

1.4.2.6 Evaluar la genotoxicidad y citotoxicidad de *Zingiber officinale roscoe* y sus metabolitos secundarios en *Allium sativum* para determinar la toxicidad que presentan.

1.5 Hipótesis

Los metabolitos secundarios de *Zingiber officinale roscoe* tienen actividad antimicrobiana contra patógenos resistentes causantes de infecciones de la piel y no generan daños genotóxicos y citotóxicos.

2 CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 *Zingiber officinale*

Es una planta herbácea perene que pertenece a la familia de las zingiberáceas (Castelán y Ponce, 2020). Debido a que su semilla posee una hoja embrionaria o cotiledón, es clasificada como una planta monocotiledónea. Se cultiva en áreas tropicales y su tallo subterráneo denominado rizoma es la parte útil y comercializada (Quispe y Huamani, 2018).

Su taxonomía se indica en la siguiente tabla 1.

Tabla 1. Taxonomía de *Zingiber officinale*.

Taxonomía	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Zingiberales
Familia	Zingiberaceae
Género	<i>Zingiber</i>
Especie	<i>Zingiber officinale</i>

Quispe y Huamani, 2018

Fue descubierta hace más de 2500 años, sin embargo el origen de las distintas especies del género *Zingiber* es incierto, diferentes autores señalan al Sudeste asiático como origen y a partir de ahí se dispersaron por regiones tropicales y subtropicales del mundo (Méndez y Amaya, 2015; Zambrano-Blanco, 2015; Kanadea y Bhatkhandeb, 2016; Estrada y Romero, 2017; Limache, 2017; Pratap *et al.*, 2017; Quispe y Huamani, 2018; Castelán y Ponce, 2020).

Es una planta naturalizada en Jamaica, África, en las Indias occidentales, México y en la Florida (Estrada y Romero, 2017; Limache, 2017).

Los principales productores de esta planta son China y la India, aunque Jamaica presenta cultivos de mejor calidad (Limache, 2017; Quispe y Huamani, 2018; Vera, 2018; Jácome, 2019). De todas las especies de *Zingiber*, el rizoma de *Zingiber officinale* es el más utilizado como especia para sazonar alimentos debido a su sabor y aroma característicos, también se emplea como aditivo alimentario en diversos alimentos y bebidas (Kanadea y Bhatkhandeb, 2016).

Es comunmente llamado Jengibre, palabra derivada del sánscrito y significa corniforme. Otros nombres comunes que recibe son ajengibre (Cuba), Kion (Perú), jengibre dulce (Puerto Rico), gingembre (Antillas Francesas), mangaratíá (Portugal) y shengjian (China) (Méndez y Amaya, 2015; Estrada y Romero, 2017; Limache, 2017; Quispe y Huamani 2018).

Es un producto que se consume poco en trozos frescos o polvo seco para condimentar, rodajas en almíbar o dulces cristalizados (Limache, 2017); no obstante la manera de consumirlo no permite explotar en su totalidad sus propiedades (Castelán y Ponce, 2020).

Su olor dulce con notas de madera y sabor ligeramente amargo y picante característico se deben a una mezcla de compuestos aromáticos, son sustancias fenólicas conocidas colectivamente como gingeroles (Méndez y Amaya, 2015; Wang et al, 2015; Limache, 2017; Pratap *et al.*, 2017).

Desde la antigüedad ha sido empleado con fines medicinales en la atención primaria de salud en la antigua India y China (Pratap *et al.*, 2017). Los productos comercializados a partir de esta planta son aceites esenciales y oleorresinas con aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica; empleandolos en perfumes, cosméticos, productos aromáticos y de limpieza (Méndez y Amaya ,2015; Castelán y Ponce, 2020).

La parte medicinal de *Zingiber Officinale* es el rizoma, ya que contiene fitoquímicos que presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y

anticancerígenas (Méndez y Amaya, 2015; Wang *et al.*, 2015; Zambrano-Blanco, 2015; Estrada y Romero, 2017; Guitiérrez y Neyra, 2017; Limache, 2017; Pratap *et al.*, 2017; Quispe y Huamani, 2018; Castelán y Ponce, 2020).

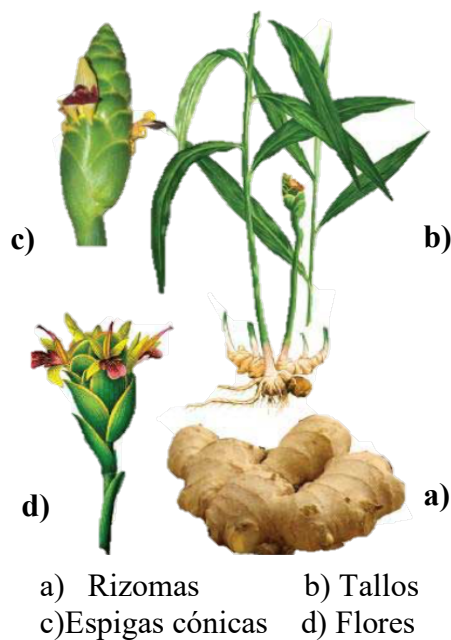
2.1.1 Características botánicas

Posee raíces tuberculosas que presentan forma de mano, denominados rizomas, son gruesos, carnosos y nudosos con dimensiones de entre 10 y 30 cm. Presentan una corteza de color gris amarillento con rugosidades transversales y un color amarillo en su interior; son muy aromáticos y poseen sabor picante (Herráiz, 2016; Morales, 2017; Quispe y Huamani, 2018;).

De los rizomas surgen los tallos de entre 60 - 90 cm de altura, de color rojizo envueltos por hojas que también brotan del rizoma, presentan un color verde claro, son subsésiles y lanceoladas de 10-20 cm de largo por 2-3 cm de ancho. Se desarrollan de forma alterna ya que nunca crecen una opuesta a la otra, su forma es estrecha y lineal formando un ángulo de 180° además desprenden un aroma agradable (Herráiz, 2016; Guitiérrez y Neyra, 2017; Morales, 2017; Pratap *et al.*, 2017, Quispe y Huamani, 2018).

También surgen tallos florales a partir del rizoma, los cuales no poseen hojas y en el extremo desarrollan un conjunto pequeñas flores asimétricas agrupadas de colores blanco, amarillo y violeta de aspecto similar a los lirios. Se encuentran dispuestas en espigas cónicas de 4-6 cm de largo, estas espigas están formadas por hojas de aspecto similar a las escamas, denominadas brácteas que protegen a las flores y pueden desarrollar una o más flores cada una (Herráiz, 2016; Guitiérrez y Neyra, 2017; Quispe y Huamani, 2018). En la siguiente figura 1 se ilustran las partes de *Zingiber officinale*.

Figura 1. Partes de *Zingiber officinale*.



2.1.2 Rizomas

Los rizomas se componen de carbohidratos, siendo el almidón es el componente más rico, ya que presenta 40-60% p/p del rizoma seco (Gutiérrez y Neyra, 2017). Otros componentes predominantes son proteínas, lípidos y fibra. Los porcentajes en que se encuentran presentes varían de acuerdo a la madurez de los rizomas, siendo de 6.2 - 19.8% para proteínas, 5.7 - 14.5% para lípidos y 1.1 - 7.0% para la fibra. Además contiene oleoresinas en un 4 - 7.5% y aceites esenciales 1 - 3%, los cuales pueden ser extraídos con solventes o destilación al vapor (Pratap *et al.*, 2017; Gutiérrez y Neyra, 2017).

En cuanto a su composición nutricional, el rizoma es un excelente fuente de fibras dietéticas, grasas, proteínas, vitaminas y minerales. El tipo, variedad, métodos de extracción y condiciones de almacenamiento pueden variar el perfil nutricional de los rizomas.

A continuación se muestra en la tabla 2 el perfil nutricional del rizoma de *Zingiber Officinale*.

Tabla 2. Perfil nutricional de *Zingiber officinale*

Componente	Ejemplos	Cantidad
Agua		78.9 g
Proteína		1.8 g
Carbohidratos	Carbohidratos totales	18 g
	Fibra dietética	2 g
	Azúcar	1,7 g
Grasas	Grasa total	750 mg
	Grasa saturada	203 mg
	Grasa monosaturada	154 mg
	Grasa poliinsaturada	154 mg
	Ácidos grasos Omega-3	34 mg
	Ácidos grasos Omega-6	120 mg
Vitaminas	Vitamina C	5 mg
	Vitamina E	260 mcg
	Vitamina K	mcg
	Tiamina	25 mcg
	Riboflavina	34 mcg
	Niacina	750 mcg
	Vitamina B6	160 mcg
	Ácido fólico	11 mcg
	Ácido pantoténico	203 mcg
	Colina	28,8 mg

Minerales	Calcio	16 mg
	Hierro	600 mcg
	Magnesio	43 mg
	Fosforo	34 mg
	Potasio	415 mg
	Sodio	13 mg
	Zinc	340 mcg
	Cobre	226 mcg
	Manganeso	229 mcg
	Selenio	0.7 mcg

Valor nutricional por cada 100g de hengibre.

2.1.3 Siembra

Para la siembra de *Zingiber Officinale* se requieren suelos profundos, libres de rocas y buen drenaje con temperaturas de entre 25 °C y 26 °C para su crecimiento (Méndez y Amaya, 2015). Se requiere de climas tropicales húmedos, con precipitaciones de 200 L/ m² (Limache, 2017), y sombra parcial o sol filtrado (Quispe y Huamani, 2018). Además deben ser ricos en materia orgánica y contar con un pH entre 5.5 y 6.5 (Méndez y Amaya, 2015).

Zingiber officinale no produce semilla, su propagación es vegetativa por medio de los rizomas; para que sean empleados en la siembra deben tener al menos 3 estructuras especiales denominadas yemas que se encargan de la propagación vegetativa; deben ser colocados a 15 - 20 cm de profundidad y a una distancia de 30 - 40 cm entre cada rizoma (Méndez y Amaya, 2015). La distancia de siembra más común entre surcos es 1.20 m, llegando a alcanzar con este sistema una densidad de 20,7050 plantas por hectárea (Morales, 2017).

2.1.4 Cosecha

La época más recomendable para la siembra son los meses de marzo a mayo, siendo los meses de julio a febrero donde existe una alta cosecha, aunque el resto de los meses también existe en menor cantidad (Quispe y Huamani, 2018). Cuando sus hojas se amarillan y marchitan después de la floración, está listo para ser recolectado (Morales, 2017). Sin embargo en algunas zonas productoras, la floración no se da, por lo que es necesario considerar de 7 a 10 meses entre la plantación y recolección (Méndez y Amaya, 2015).

Factores como la luz, calor, humedad y disponibilidad de nutrientes pueden afectar el desarrollo de esta planta, así mismo la naturaleza del suelo, las condiciones ecológicas y atención prestada influyen en los rendimientos y calidad del producto obtenido (Morales, 2017).

2.1.5 Producción

Los principales productores son China y la India, seguidos por el Norte de Australia, Hawai e Indias Occidentales (Limache, 2017, Quispe y Huamani, 2018). Siendo Australia, India y Jamaica los países que producen las variedades más caras y de mejor calidad; mientras que China y Perú producen las más comercializadas (Gutiérrez y Neyra, 2017; Limache, 2017).

La producción mundial de *Zingiber officinale* en el 2016, fue liderada por China con un 42%, seguida por Perú con un 41% (Agroexportaciones, 2017).

México es un país con diversidad de ecosistemas que reúnen las características necesarias para el cultivo de jengibre (Castelán y Quiroz, 2020). A pesar de esto, la producción anual de jengibre en nuestro país ha tenido fluctuaciones ya que para los

años 2016, 2017 y 2018 se produjeron 1,084.08 toneladas, 2,585.14 toneladas y 1,080 toneladas respectivamente (Forbes, 2018).

2.1.6 Propiedades farmacológicas

La parte medicinal de *Zingiber Officinale* es el rizoma, ya que contiene fitoquímicos que presentan propiedades farmacológicas y antimicrobianas importantes (Zambrano-Blanco, 2015; Estrada y Romero, 2017; Limache, 2017; Pratap *et al.*, 2017; Quispe y Huamani, 2018; Castelán y Ponce, 2020).

Dentro de los fitoquímicos se incluyen componentes volátiles: canfeno, β -felandreno, curcumeno, cineol, acetato de geranilo, terpineol, borneol, geraniol, limoneno, β -elemeno, zingiberol, linalool, α -zingibereno, β -sesquiphellandreno, β -bisarenol, α -biberenoleno, α -Farnesene (Wang *et al.*, 2015; Pratap *et al.*, 2017); y fitoquímicos no volátiles como gingeroles, shogaols, paradols y zingerone (Quispe y Huamani, 2018).

Siendo el 6-gingerol (1- [4'-hidroxi-3'-metoxifenil]-5-hidroxi-3-decanona) el compuesto más abundante y farmacológicamente activo (Wang *et al.*, 2015); ya que posee propiedades anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes plaquetarias, antibacterianas y antimicóticas (Ghasemzadeh y Rahmat, 2015; Wang *et al.*, 2015; Kanadea y Bhatkhandeb, 2016; Bhattarai *et al.*, 2018; Lemma y Egza, 2019).

Sus usos medicinales son diversos como antiinflamatorio y analgésico, ya disminuye la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de las ciclooxigenasas 1 y 2 (Herráiz, 2016); por lo que es empleado para aminorar síntomas de dolor e inflamación en procesos como artritis, dolores de espalda y articulaciones, cólicos menstruales y migrañas (Quispe y Huamani, 2018).

Es empleado para aliviar síntomas de resfriado debido a las propiedades antihistamínicas, antitusivas y antipiréticas que presenta (Wang *et al.*, 2015; Quispe y Huamani, 2018).

Presenta otras propiedades como antiespasmódico y estimula la motilidad; estimula el metabolismo, facilita la digestión, elimina la hinchazón, gases y dolor abdominal. Además se ha visto que puede controlar la glucosa, lo que puede regular el nivel de ansiedad por comer (Quispe y Huamani, 2018).

Mediante ensayos clínicos, se ha respaldado el uso de preparaciones de *Zingiber Officinale* para prevenir el mareo y vómitos durante el embarazo. Sin embargo la evidencia es ambigua para el empleo en trastornos musculoesqueléticos (Herráiz, 2016).

Estudios realizados en población del sudeste asiático muestran un riesgo menor a padecer cáncer de colon, gastrointestinal, de próstata y de mama; esto es atribuido a la dieta rica en frutas, verduras y sustancias fenólicas de plantas medicinales (Wang *et al.*, 2015).

2.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son compuestos formados por componentes orgánicos volátiles como alcoholes, acetonas, cetonas, ésteres, aldehídos; los cuales son producidos y almacenados en canales secretores de diferentes partes de las plantas como hojas, tallos, raíces, flores, cáscaras de frutos y cortezas (Herráiz, 2016).

Los aceites esenciales constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. Son líquidos que poseen escasa solubilidad en agua pero son solubles en alcoholes y disolventes orgánicos (Quispe y Huamani, 2018). La mayoría presenta una densidad menor a la del agua pero mayor viscosidad y un alto índice de refracción (Limache, 2017; Quispe y Huamani, 2018).

Son inflamables e ino cuos mientras las dosis administradas no superen los límites de toxicidad. Presentan degradación química en presencia de luz solar, aire, calor, ácidos y bases fuertes (Quizpe y Huamani, 2018).

La agencia de drogas y Alimentos de EEUU los ha aceptado como sustancias seguras (GRAS) (Code of Federal Regulations, 2019).

El uso principal de los aceites esenciales es en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes, cremas dentales, enmascaradores de olores en procesos industriales como plásticos y punturas, o para impregnar fragancias a targetas, papel higiénico o toallas faciales; también se emplean como conservadores para alimentos, especialmente productos cárnicos, preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas como los refrescos y en la producción de caramelos o golosinas. Además por sus propiedades insectividas y acaricidas que llegan a presentar, son usados en el control ecológico de algunas plagas (Quispe y Huamani, 2018).

Sin embargo en las últimas décadas se ha despertado interés por los aceites esenciales debido a la creciente popularidad de una rama de la medicina alternativa denominada aromaterapia, la cual emplea aceites esenciales de plantas, cortezas, hierbas y flores; los cuales poseen efectos curativos al inhalarlos o aplicarlos sobre la piel (Vera,2018).

El 85% de la medicina tradicional se deriva de extractos de plantas, y para países en desarrollo el 80% de su población depende de la medicina tradicional para su atención primaria de salud según un informe de la Organización Mundial de la Salud.

Si mismo, el creciente interés por lo natural y orgánico ha propiciado la comercialización de los extractos naturales y ha generado nuevas líneas de investigación (Méndez y Amaya, 2015).

Las dosis a las que son empleados pueden ocasionar alergias en forma de inflamación, colvulsiones, alteraciones psíquicas u otro tipo de efecto de intoxicación en el organismo, por tal motivo los aceites esenciales se clasifican en siete grupos principales : convulsionantes, fototóxicos o irritantes de la piel, hepatotóxicos,

estupefacientes, abortivos, nefrotóxicos e irritantes de la mucosa gástrica (Vera, 2018).

2.2.1 Aceite esencial de *Zingiber officinale*

A partir de los rizomas se obtiene el aceite de esencial de *Zingiber Officinale*, el cual contiene una variedad de compuestos acuosos y biológicamente activos, como compuestos fenólicos, flavonoides, zingerone, 6-shogaol, 6-gingerol; siendo este último el más abundante y presenta propiedades antioxidantes, analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas (Ghasemzadeh y Rahmat, 2015; Guitiérrez y Neyra, 2017; Bhattarai *et al.*, 2018; Lemma y Egza 2019).

Es un producto con gran demanda en los mercados locales e internacionales, siendo Estados Unidos es el principal país demandante con un 74% de la demanda mundial (Limache, 2017); por lo que se requiere de métodos de bajo costo para la extracción de estos aceites esenciales (Guitiérrez y Neyra, 2017). En 2017, la administración de alimentos y medicamentos (FDA) reconoció su aceite esencial, oleorresinas y extractos naturales como seguros.

2.2.2 Métodos de extracción

Existen varios métodos y tecnologías para extraer los aceites esenciales, cada uno de estos métodos influye en la calidad y el valor comercial del aceite resultante (Quispe y Huamani, 2018). Los procesos de extracción de las sustancias aromáticas varían según la naturaleza de la esencia, sus propiedades y la parte de la matriz vegetal en la que se encuentra contenida. Algunos de los métodos empleados con la destilación, extracción mediante solventes volátiles, extracción por enflorado o enfleurage, extracción por prensado, extracción por fluidos supercríticos, maceración e hidrodifusión. A continuación se explican brevemente algunas técnicas de laboratorio para la extracción de compuestos naturales.

2.2.3 Destilación por arrastre de vapor

Es un método económicamente sustentable y el más empleado para la extracción de aceites esenciales. La muestra vegetal fresca es depositada en una cámara inerte y se somete a una corriente de vapor de agua para ser sobrecalentada. Este vapor de agua es impregnado por la esencia y es condensado en la serpentina donde circula agua fría, obteniendo el aceite esencial. Como producto de la destilación se obtienen dos fases líquidas distintas: el hidrolato conformado por agua aromática y la otra fase representada por el aceite esencial. Debido a su alto rendimiento, la pureza de los aceites que se pueden obtener y la tecnología no tan sofisticada que se requiere, esta es una técnica muy utilizada a nivel industrial (Caballero & Rodríguez, 2019; Martínez et al., 2020).

2.2.4 Extracción con solventes volátiles

Esta técnica emplea muestras secas y molidas en contacto con solventes para solubilizar o extraer esencias que no se pueden extraer por otro procedimiento y con ello se obtiene una mayor producción. Esta técnica no produce aceites esenciales puros ya que los solventes utilizados pueden extraer compuestos lipofílicos adicionales como grasas y ceras. A diferencia de la destilación por arrastre de vapor, esta técnica no es implementada a nivel industrial debido al alto riesgo de explosión e incendios de los solventes orgánicos, únicamente es implementada a escala de laboratorio (Sierra et al., 2018).

2.2.5 Extracción con fluidos supercríticos

En esta técnica se evita la descomposición térmica de los compuestos presentes en los extractos debido a las bajas temperaturas que se emplean. En una cámara de acero inoxidable se empaca la muestra vegetal previamente cortada y molida y a través de cual se hace circular dióxido de carbono líquido, el cual actúa como solvente extractor de las esencias. Este líquido supercrítico es eliminado progresivamente al alcanzar la presión y temperatura ambiente. La extracción con fluidos supercríticos permite obtener un alto rendimiento, no obstante a pesar de ser un proceso ecológicamente compatible que permite mantener las propiedades de la esencia a bajas temperaturas,

no es una técnica óptima debido a los altos costos que se requieren como las bombas de alta presión y sistemas de extracción especiales (Elizalde, 2020; Melo et al., 2020).

2.2.6 Extracción por maceración

En esta técnica la materia vegetal fresca es sumergida generalmente en disolventes por periodos de tiempo definidos. La materia vegetal compuestos de diferente polaridad y solubilidad de acuerdo al solvente de extracción. Existen dos variantes de esta técnica de acuerdo a la temperatura empleada: caliente y frío.

La recuperación de los extractos se realiza mediante el rotavapor para eliminar los disolventes empleados. Aunque es comúnmente usada a nivel laboratorio, su uso está limitado en la industria de alimentos, cosmética y farmacéutica ya que presenta ciertas desventajas como la presencia de trazas de disolventes (Escobar, 2021; Flores, 2020).

2.2.7 Extracción por el método de Soxhlet

Es uno de los métodos más usados a nivel laboratorio para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Esta técnica emplea un dedal poroso de celulosa o vidrio donde se deposita la muestra y a través de él fluye un disolvente orgánico. El método de Soxhlet ofrece varias ventajas como simplicidad, bajo costo, contacto continuo de la muestra con una porción fresca y el procesamiento de cantidades grandes de muestra. Sin embargo el tiempo y volúmenes de disolventes muy elevados en comparación con otras técnicas son algunas de sus desventajas (Alvarado, 2018; Viera & Morales, 2020).

2.3 Extracción de aceite esencial de *Zingiber officinale*.

2.3.1 Factores a considerar para la extracción

El rendimiento y la abundancia de los componentes en los aceites esenciales dependen de la materia prima, los solventes usados y las condiciones de extracción como temperatura, presión y técnica de extracción (Méndez y Amaya, 2015). La obtención

del aceite esencial se realiza mediante procesos no costosos como la destilación con arrastre de vapor o extracción Soxhlet, sin embargo pueden inducir transformaciones de algunos de sus componentes por medio una degradación térmica y oxidativa (Quizpe y Huamani, 2018).

2.3.2 Antecedentes de extracción

Tradicionalmente la obtención del aceite esencial de *Zingiber officinale* se realiza por destilación con arrastre de vapor o extracción por Soxhlet (Castelán y Ponce, 2020); siendo esta última la más empleada en la mayor parte de investigaciones realizadas sobre este aceite esencial; ya que a través de un disolvente afín permite extraer compuestos de naturaleza lipídica contenidos en una muestra sólida.

Esta extracción realiza una separación de los compuestos presentes en una muestra, dado que cada compuesto presenta diferente volatilidad cuando son sometidos a temperaturas de ebullición. Los compuestos son solubilizados en el disolvente que posteriormente es convertido en vapor y condensado nuevamente en líquido (Ghasemzadeh y Rahmat, 2015).

En la siguiente tabla 3 se muestran otras técnicas empleadas para la extracción de aceite esencial de *Zingiber officinale*.

Tabla 3. Antecedentes de extracción de aceite esencial de *Zingiber officinale*.

Técnica	Tipo de muestra	Solvente	Relación	Métodos de extracción			Observaciones	Referencia
				Temperatura	Tiempo	Cantidad obtenida		
Soxhlet	Polvo	Etanol	10 g-100 mL	76.9 °C	3-4 h	-----	La presencia de metabolitos depende de la temperatura.	Ghasemzadeh y Rahmat., 2015
Maceración	Polvo	Etanol	10 g-200 mL	Ambiental	8 h	258.4 mg/L	Maceración etanólica produce significativamente menor 6-gingerol.	Sharif y Bennet, 2016
Reflujo			2.5 g-50 mL	95 °C	30 min	226.3 mg/L		
Soxhlet	Láminas frescas 1-2mm	Acetona	50 g-200 mL	80 °C	4 h	28.5 mL	El aumento de temperatura disminuye la cantidad de extracción y el color se desvanece.	Kanadea y Bhatkhandeb, 2016
Destilación por arrastre de vapor	Cortes frescos 0.5-1.0 cm	Agua	7 kg-7 L	100 °C	16 min	5.8 mL	Método de Soxhlet presenta un mejor rendimiento.	Gutiérrez y Neyra, 2017)
Soxhlet		Etanol	60 g-250mL	-----	93 min	9 mL		
Destilación por arrastre de vapor	Polvo (55 °C por 10 h)	Agua	-----	100 °C	90 min	10.043 mL	La temperatura y el tiempo de secado de la muestra pueden influir en el olor del producto final.	Limache et al.,2017
Destilación por arrastre de vapor	Rayado y seco 20%H	Agua	1000 g/L	100 °C	120 min	7.5 mL	Evitar áreas muertas, distribuir uniformemente.	Quizpe y Huamani, 2018
Soxhlet	Polvo	n-hexano	35 g-350 mL	67 °C	4 h	5.75 mL	A mayor temperatura, menor extracción.	Lemma y Egza, 2019

Ghasemzadeh y Rahmat (2015) realizaron un estudio para optimizar las condiciones de extracción de reflujo y lograr altos contenidos de 6-gingerol y 6-shogaol, así como una alta actividad antioxidante de *Zingiber officinale* var. *rubrum* Theilade. Los factores evaluados fueron la temperatura de extracción (50–80 °C) y el tiempo (2-4 h). Los contenidos de 6-gingerol y 6-shogaol se midieron usando cromatografía líquida de ultra rendimiento, mientras que la actividad antioxidante del extracto de rizoma se determinó mediante el ensayo de 1,1-difenil-2-picrylhidrazilo. Sus resultados muestran que la condición de extracción óptima para todas las respuestas fue a 76,9 °C durante 3,4 h. Los valores de 6-gingerol, 6-shogaol y la actividad antioxidante fueron 2,89 mg / g DW, 1,85 mg / g DW y 84,3%, respectivamente. Además, el extracto se mostró actividades anticancerígenas contra las células de cáncer HeLa en una concentración de 40 µg / mL ($P < 0.01$) sin toxicidad para las células normales.

Sharif y Bennet (2016) llevaron a cabo dos métodos diferentes de extracción (reflujo y maceración), utilizando 3 solventes diferentes para determinar su efecto sobre el TPC, la actividad antioxidante y el contenido de 6-gingerol presente en *Zingiber officinale*. El reflujo se realizó durante 30 minutos a 95 °C y la maceración se realizó a temperatura ambiente durante 8 horas. Entre los diferentes métodos, los extractos de maceración generalmente mostraron mejor TPC (contenido fenólico total), contenido de 6-gingerol y actividad antioxidante. El etanol fue significativamente el mejor disolvente de extracción debido a su mayor índice de polaridad, seguido por acetona y metanol respectivamente. Mientras que los extractos de maceración con etanol tuvieron significativamente el mayor contenido de TPC y 6-gingerol, sin embargo, su actividad antioxidante no fue significativamente diferente de los extractos de reflujo de etanol.

Kanadea y Bhatkhandeb (2016) evaluaron la extracción de aceite de jengibre (*Zingiber officinalis*, Roscoe) utilizando diferentes técnicas: Soxhlet, extracción asistida por ultrasonido y el agitador de autoclave; emplearon diferentes solventes

como acetona, metanol, etanol, agua, n-hexano y diferentes condiciones como rangos de temperatura (70-80 °C) y presión (14.69 - 15.19 Psi), tiempo de extracción (1- 8 h). El método de Soxhlet muestra un mayor rendimiento, simplicidad de proceso, estabilidad térmica y bajo requerimiento de energía. Para este estudio, la acetona muestra un mejor rendimiento para la extracción de aceite de jengibre a una temperatura de 80 °C, en comparación con otros. También se observó que cuando se modifica el aumento de temperatura y presión, la cantidad de extracción disminuye y también el color se desvanece. Además, para tener un consumo mínimo de energía, 4 horas son suficientes para hacer la extracción.

Guitierrez y Neyra (2017) realizan la obtención de aceite esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*) por arrastre de vapor usando agua como solvente y Soxhlet con solvente etanol. Comparando ambos métodos se determinó que con el método de Soxhlet se obtiene un mayor rendimiento. Se encontró que el tamaño de partícula, la cantidad de masa de Jengibre y cantidad de solvente influyen en las condiciones del proceso de extracción; ya que utilizando 60 gramos de jengibre, de 1 cm con 250 mL de etanol se obtiene un rendimiento de extracción de 15%, en un tiempo de 93 minutos. Mientras que para la destilación por arrastre de vapor de 7 kilogramos de Jengibre, de 0.5 cm con 7 litros de agua, se obtiene un rendimiento de 0.083% en un tiempo de 16 minutos de extracción.

Limache (2017) determina la influencia de la temperatura (55, 65 y 75 °C) y el tiempo de secado (6, 8 y 10 h) en la extracción del aceite esencial de *Zingiber officinale* por arrastre de vapor. Determinó que las condiciones óptimas para la obtención de un mayor rendimiento se encuentran cuando el tiempo de secado es de 10 horas a temperaturas menores a 65 °C. El modelo explica que estas variables ejercen una influencia significativa sobre el olor pero no sobre la aceptabilidad del sabor.

Quizpe y Huamani (2018) determinaron el rendimiento en la extracción por arrastre de vapor del aceite esencial de *Zingiber officinale*; evaluando el tiempo de extracción, factor de empaquetamiento y humedad de los rizomas. Los resultados muestran que para un mejor nivel de rendimiento en la extracción de aceite se debe

considerar lo siguiente: Humedad del rizoma 20%, factor de empaquetamiento 1000g/L, tiempo de extracción 120 min y un tipo de corte rayado. De todos los factores evaluados, determinan que la humedad es el que presenta mayor contribución y significancia.

Lemma y Egza (2019) realizaron un estudio sobre la extracción de aceite de jengibre (*Zingiber officinale*) mediante el método de Soxhlet, utilizando diferentes solventes como acetona, etanol, agua y n-hexano; así mismo evaluaron el efecto que tenía el tiempo de extracción, realizando la extracción por 6 horas. Concluyeron que el n-hexano con un punto de ebullición de 67 °C mostró un rendimiento más alto, obteniendo 5.75 mL de aceite. Se observó que la mayor cantidad de aceite de jengibre se destilaba en 4 horas y que prolongar el tiempo de extracción logrará un valor constante del aceite de jengibre recogido. Por lo tanto, para tener un consumo mínimo de energía, 4 horas de proceso son suficientes para hacer la extracción.

2.3.3 Compuestos identificados

En la siguiente tabla 4. Se muestran los compuestos identificados en el aceite esencial de *Zingiber officinale*

Tabla 4. Compuestos identificados en aceite esencial de *Zingiber officinale*.

Muestra	Método de extracción	Compuestos identificados	Técnica	Referencia
Aceite esencial	Soxhlet	6-gingerol 2.74 mg/g Dw 6-shogaol 1.59 mg/g Dw	UHPLC Ultra High Performance Liquid Chromatography	Ghasemzadeh y Rahmat, 2015
Aceite esencial	Destilación por Arrastre de vapor	Geraniol 27.42% Neral 20.11% 1,8-cineol 13.35% Canfeno 4.61%	GC-MS Cromatografía acoplada al detector de	González <i>et al.</i> , 2017
	Soxhlet	E-geraniol 3.92%	espectrofotometría de masas	

Extracto acuoso	Fluidos supercríticos	Azúcares, dioles, ácidos fenólicos, compuestos fenólicos, péptidos, terpenoides, alcoholes aromáticos y compuestos orgánicos como el ácido cítrico.	HPLC	Svar <i>et al.</i> , 2017
Extracto etanólico	Reflujo	α -Zingiberene (24.96%) β -sesquiphellandrene (12.74%), sesquisabinene hydrate (6.19%), camphene (5.90%), zingiberenol (4.26%), E-citral (3.93%), sabinene (3.75%), (E)-farnesene (3.73%), and italicene (3.21%).	GC-MS	Tanaka <i>et al.</i> , 2017
Aceite esencial	Soxhlet	Glucósidos, flavonas, azúcares reductores, esteroides y terpenoides α -Funebrene, α -Farnesene, β -Phellandrene, Sesquisabienene, Camphene, α -Pinene, Linalool, Borneol, Geraniol, Geranial, Neral, Citronellol	GC-MS Cromatografía acoplada al detector de espectrofotometría de masas	Bhattarai <i>et al.</i> , 2018
Aceite esencial	Destilación por Arrastre de vapor	Monoterpenos (Camphene 7.8%) Terpeno (Borneol 4.76%) Aldehído (Tridecanal 2.12%) Sequiterpeno (Zingibereno 17.16%)	Cromatografía de gases	Quispe y Huamani, 2018
Aceite esencial	Soxhlet	[6]-Gingerol [8]-Gingerol [10]-Gingerol [6]-Shogaol [8]-Shogaol [10]-Shogaol (3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>) - [6]-Gingerdiol (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>) -[6]-Gingerdiol (3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>) -[8]-Gingerdiol (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>) -[8]-Gingerdiol (3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>) -[10]-Gingerdiol (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>) -[10]-Gingerdiol [6]-Gingerdiol 3,5-diacetate [8]-Gingerdiol 3,5-diacetate [10]-Gingerdiol 3,5-diacetate	LC-MS Cromatografía líquida de espectrometría de masas	Nishidomo <i>et al.</i> , 2018
Aceite esencial	----	α -Zingiberene (24.96%) β -sesquiphellandrene (12.74%), sesquisabinene hydrate (6.19%), camphene (5.90%), zingiberenol (4.26%), E-citral (3.93%), sabinene (3.75%), (E)-farnesene (3.73%), italicene (3.21%).	GC-MS	Noori, <i>et al.</i> , 2018

Aceite esencial	Soxhlet Extracción supercrítica com CO ₂	Soxhlet Decanal Benzene, 1-(1,5-dimethyl-4- hexenyl)-6-methylene α -Farnesene Cyclohexene,3-(1,5-dimethyl-4- hexenyl)-6methylene Spathulenol Butan-2-one,4-(hydroxy-2- methoxyphenyl) 2-Naphthalenemethanol,decahydro, α , α ,4a-trimethyl-8- methylene 7-epis-cis-squisabinene hydrate Cycloisolongifoine, 7-bromo- methyl Gingerol Fluidos supercríticos Benzeno,1-(1,5-dimethyl-4- hexenyl)-4-methyl- methylene-(1 α ,4 α β ,8 α α) Di-epi- α -cedrene Naphthtalene 1,2,3,4,4a,5,6,8a- octahydro-7- methyl-4- methylene-, (1a,4 β a, 8 α α) α -Fernesene Cyclohexene-3-(1,5dimethyl-4- hexenyl)-6- methylene p-Menthane,2,3-dibromo-8-phenyl) 2-Butanone-4-(4-hydroxy-3- methoxyphenyl Spiro(4,5)-decn-7-one,1,8- dimethyl-8-9-epoxy-4- isopropylene Carophylene oxide Colymbol one 3-Decanone,1-(4-hydroxy-3- methoxyphenyl) Gingerol Nonivamide 6-(3-5-Dimethyl-furan-2-yl)-6- methyl-hept-3-en- 2-one 3-(6-Hidroxy-3,7-dimethyl-octa- 2,7-dienyl)-4- methoxy-phenol	HPLC	Castelán y Ponce, 2020
--------------------	--	--	------	---------------------------

Ghasemzadeh y Rahmat (2015) realizaron un protocolo para la extracción óptima de los componentes activos del aceite esencial de *Zingiber officinale*. Este diseño evaluó la temperatura y el tiempo de extracción sobre las propiedades de los extractos. El contenido de dichos compuestos se determinó mediante cromatografía líquida de ultra alto rendimiento. Finalmente determina que estas variables influyen significativamente en la cantidad de compuestos extraídos. Los rizomas secos se sometieron a temperaturas de 80 ° C y tiempo de extracción de 4 h, observando que el contenido de 6-shogaol aumentó; mientras que a temperaturas de 30 °C en muestras liofilizadas se presentó un contenido bajo.

González *et al.*, (2017) realizaron un estudio para caracterizar la composición química del aceite esencial de *Zingiber officinale* obtenido de rizomas cultivados en San Carlos, Costa Rica; con el objetivo de estandarizar los cultivos. Se identificaron 39 compuestos principales, los cuales pueden clasificarse como terpenos, cetonas, alcoholes, ésteres y aldehídos; siendo los terpenos los compuestos predominantes.

Svarc *et al.*, (2017) revela la composición química de los extractos de *Zingiber officinale* por medio de fluidos supercríticos y extractos acuosos a presión atmosférica, mediante HPLC-ESI-TOF-MS. Las muestras analizadas tenían una composición compleja con compuestos extraídos y compuestos neoformados ya que el agua subcrítica actúa como reactivo y catalizador al proporcionar iones hidrógeno e hidroxilo. Componentes típicos como zingerona, gingeroles, shogaols y gingerdiones no lograron identificarse, por otro lado, se reveló la presencia de derivados de curcumina: octahidrocurcumina y meso-octahidrocurcumina probablemente formado a través de procesos de hidrogenación del gingerol. Así mismo se identificaron derivados de 3,5-heptanodiol y cuatro derivados de catecol (1,2-bencenodiol) con sustituciones de metoxifenil, hidroxifenil, hidroxil y acetoxil probablemente formados en el curso de la conversión hidrotermal.

Tanaka *et al.*, 2017 realiza una investigación de las propiedades químicas de extractos metanólicos de *Zingiber officinale*, utilizando un enfoque de espectrometría de masas

por cromatografía líquida (LC-MS). Se identificó 6-gingerol, 6-shogaol como los componentes principales, otros compuestos identificados fueron el gingerdiol, acetoxi-6-gingerdiol y diacetoxi-6-gingerdiol.

Bhattarai *et al.*, (2018) determina la composición química de rizomas de *Zingiber officinale* provenientes de tres regiones del Nepal: Sindhupalchhowk, Tanahu y Gorkha, identificando 105, 85 y 88 componentes respectivamente, mediante Cromatografía acoplada al detector de espectrofotometría de masas. Los mayores constituyentes encontrados fueron monoterpenos y sesquiterpenos derivados.

Por su parte Nishidomo *et al.*, (2018) identifica los componentes químicos de cuatro variedades de rizomas de *Zingiber officinale*: "Shokyo" (rizoma seco de *Z. officinale* var. *Rubens*), "Kankyo" (rizoma seco y al vapor de *Z. officinale* var. *Rubens*), "jengibre rojo" (rizoma seco indonesio de *Z. officinale* var. *Rubrum*) y "jengibre blanco" (rizoma seco indonesio de *Z. officinale* var. *Amarum*); a su vez se identificaron los compuestos responsables de la termogénesis, se sugiere que "Kankyo" posee propiedades termogénicas más fuertes.

En el trabajo realizado por Quispe y Huamani (2018) para evaluar la extracción de aceite esencial por medio de arrastre de vapor, realizan la caracterización de los componentes activos por cromatografía de gases, siendo el zingibereno el componente más representativo (17.16%).

Dentro del trabajo realizado por Noori *et al.*, (2018) al aplicar revestimientos comestibles de caseinato de sodio emulsionados con aceite esencial de jengibre sobre filetes de pollo, se realizó un análisis de GC-MS que demostró que el aceite esencial de *Zingiber officinale* contenía en su mayoría zingibereno (24.96%) y β -sesquifellandreno (12.74%). Dichos recubrimientos demostraron un potencial antibacteriano a base de nanoemulsión con un 6% que logró disminuir significativamente las bacterias psicrófilas aeróbicas de los filetes.

En el trabajo realizado por Castelán y Ponce (2020) para determinar el método óptimo de extracción del aceite esencial de *Zingiber officinale*, emplean muestras frescas, liofilizadas y secadas al sol, las extracciones se realizan por soxhlet y fluidos supercríticos; además identifican los compuestos de los extractos liofilizados para ambas técnicas mediante cromatografía de gases. Se concluye que para la obtención de un aceite que presente las características fisicoquímicas propias de *Zingiber officinale* y mayores concentraciones del compuesto activo gingerol, además de terpenos de importancia; se deben emplear muestras liofilizadas las cuales deben ser sometidas a una extracción supercrítica con CO₂.

2.3.4 Actividad antimicrobiana

En la siguiente tabla 5 se muestran los trabajos realizados para evaluar la actividad antimicrobiana de *Zingiber officinale*.

Tabla 5. Evaluación de actividad antimicrobiana de *Zingiber officinale*.

Componente	Tipo de estudio	Microorganismo	Concentración	CMI	Resultados	Referencia
Extracto	<i>In vitro</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	8, 16, 32, 64 y 128 µg / mL	256 µg/ mL	Inhibición de la formación de biopelículas, síntesis y adherencia de glucano.	Hasan <i>et al.</i> , 2015.
Aceite esencial	<i>In vitro</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 y 150 µg / mL	50 µg/ mL	Reducción de la biosíntesis de ergosterol que afecta la integridad de la membrana inhibiendo la producción de aflatoxina.	Nerilo <i>et al.</i> , 2016.
Extracto	<i>In vitro</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50, 100, 150 y 200 µg / mL	-	Afecta la integridad de las membranas, inhibición de la	Chakotiya <i>et al.</i> , 2017.

					formación de biopelículas.	
Aceite esencial	<i>In vitro</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	100%, 50%, 10%	-	La actividad antimicrobiana en los compuestos extraídos depende del tipo de solvente. Solventes orgánicos presentan mejor actividad.	Estrada y Romero, 2017.
Extracto						
Aceite esencial	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	0,1% - 50%	25% 30%	Presenta un efecto inhibitorio y fungicida a concentraciones bajas.	Suquillo, 2017.
Gingerenona-A y shogaol	<i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	25, 50 y 75 µg/mL	25 µg/mL	Inhibición de la actividad de la 6-hidroximetil-7,8-dihidropterina pirofosfatasa.	Rampogu <i>et al.</i> , 2018.
Aceite esencial	<i>In vitro</i>	<i>Escherichia coli</i>	25%, 50%, 75% y 100%	-	Los sesquiterpenos son los compuestos antimicrobianos, actúan directamente a nivel de la pared celular, síntesis de proteínas, reducen niveles intracelulares de ATP, pH y cambios en el citoplasma.	Rengifo, 2018.
Aceite esencial	<i>In vitro</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	25%, 50% y 100%	1,25 %	Los aceites esenciales poseen	Vera, 2018.

					propiedades antimicrobianas en concentraciones relativamente bajas.	
Aceite esencial	<i>In vitro</i>	<i>Xanthomona hortorum</i>	60, 150 y 300 µg / mL	75 µg/mL	Alta capacidad antibacteriana a concentraciones mayores a 150 µg/ml.	Contreras, 2019.
Aceite esencial	<i>In vitro</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	100%	-	Bacterias grampositivas tienden a ser más susceptibles frente a gramnegativas. Interviene en la síntesis de enzimas y provocan daños en la pared bacteriana.	Jácome, 2019.

Hasan *et al.*, (2015) emplea extracto de *Z. officinale* para evaluar su capacidad antimicrobiana *in vitro* contra *S. mutans* a niveles sub-CMI. En un estudio previo, se encontro que la CMI del extracto fue de 256 µg/mL. La cinetica del efecto antimicrobiano en este estudio muestra que a 128 µg/mL se muestra una actividad antimicrobiana con una disminución de 5 log UFC/mL después de 24 horas de incubación. Así mismo se encontro una inhibición hacia propiedades de virulencia como la reducción en la formación de biopelículas durante las fases de crecimiento y la inhibición de la síntesis y adherencia de glucano.

Nerilo *et al.*, (2016) realizó un estudio para reducir el crecimiento de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas con el aceite esencial de *Zingiber officinale*. Mediante el análisis de cromatografía de gases y de espectroscopía de resonancia magnética nuclear se determinó que los componentes principales eran α -zingibereno (23.85%) y geranial (14.16%). Los resultados mostraron que a una concentración de 150 µg/ml de aceite esencial, se redujo significativamente el crecimiento micelial de

Aspergillus flavus; mientras que a la concentración de 10 µg/mL se presentó una inhibición completa de la germinación conidial. Por otra parte, los resultados sugieren que el aceite esencial de *Zingiber officinale* inhibe completamente la producción de aflatoxinas producidas por el mismo *A. flavus* a concentraciones bajas de 15 µg/mL.

En el estudio de Chakotiya *et al.*, (2017) se determina que el extracto de *Z. officinale* muestra capacidad de eliminar aislados clínicos de *P. aeruginosa*, ya que afecta su fisiología celular e inhibe la formación de biopelículas. Se presentó una disminución importante en las Unidades Formadoras de Colonias a las 12 horas de tratamiento. La capacidad de inhibición para la formación de biopelículas se encontró en el rango de $68.13 \pm 4.11\%$ a $84.86 \pm 2.02\%$.

Estrada y Romero (2017) determinaron el efecto antimicrobiano del extracto y del aceite esencia del *Zingiber officinale* obtenidos por maceración y arrastre de vapor respectivamente; en cepas de *Helicobacter pylori*. Sus resultados muestran que el aceite esencial a concentraciones de 100%, 50% y 10% muestra halos de inhibición de 14,7 mm , 9,3 mm y 6 mm; mientras que el extracto hidroalcohólico para las mismas concetraciones mostró halos de inhibición de 6 mm. Este trabajo concluye que el extracto no presenta efecto antibacteriano en cepas de *Helicobacter pylori*, mientras que el aceite esencial si presenta este efecto, sin embargo es inferior a los controles de amoxicilina 25 µg y claritromicina 15 µg.

Suquillo (2017) determina que el aceite esencial de *Zingiber officinale* presenta la mayor actividad antifúngica en concetraciones relativamente bajas en comparación de los aceites de *Pimpinella anisum* y *Syzygium aromaticum*, el aceite de *Zingiber officinale* presenta una concentración fungicida inhibitoria de 23% v/v sobre *Aspergillus niger* y de 30% v/v sobre *Penicillium chrysogenum*. En base a estos resultados se eligió el aceite esencial para la elaboración de una emulsión antifúngica, la cual mostró un porcentaje de reducción de UFC de 77.62% al ser aplicada sobre colecciones bibliográficas.

Rampogu *et al.*, (2018) realiza un análisis antimicrobiano *in vitro* de fitoquímicos de *Zingiber officinale*: gingerenona-A y shogaol frente *Staphylococcus aureus* (MTCCB 737). Se observó que la zona media de inhibición del shogaol esta entre 6 y 12 mm; mientras que para la gingerenona A está entre 2 y 8 mm. Estas lecturas fueron comparadas con Amoxicilina, el cual mostró una inhibición de 4-16 mm. La concentración mínima inhibitoria se observó a 25 µg / mL.

Rengifo (2018) compararon el efecto bactericida de ciprofloxacino con el aceite esencial de *Zingiber officinale roscoe* sobre cepas de *Escherichia coli* ATTC 25922; obteniendo que el aceite esencial a concentraciones de 75% y 100% fueron eficaces y mostraron resultados similares al aplicar ciprofloxacino. Los mayores halos de inhibición con ciprofloxacino a 5 µg fueron de 33.5 mm, mientras que para el aceite esencial al 100% y 75% fueron de 21.9 y 18.5 respectivamente. Se concluye que la capacidad antimicrobiana de *Zingiber officinale* sobre *Escherichia coli* es menor que ciprofloxacino, pudiendo ser utilizado como coadyuvante en el tratamiento de dicha bacteria.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Vera (2018), se corrobora que el aceite esencial de *Zingiber officinale* posee propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus* ATCC 12600 que podrían considerarse en formulaciones. Mediante este trabajo se observó un mayor porcentaje de inhibición en concentraciones del 100% y 75%, observando halos de 7 y 6.78 mm respectivamente. Se determinó que la CMI mediante dilución en caldo fue de 1,25%.

El trabajo realizado por Contreras (2019) emplea aceite de *Pinus* y *Zingiber officinale* para evaluar la actividad antimicrobiana contra *Xantomonas hortorum*. Siendo el aceite de este último el que presente mayor capacidad inhibitoria, pues se obtuvieron mayores halos de inhibición (18 mm, 19 mm y 15mm) a una concentración de 300 µg/mL; los halos más bajos de inhibición se obtuvieron a una concentración de 60 µg/mL sin superar los 12 mm. Mientras que para el aceite de *Pinus*, los halos de inhibición no superan los 17 mm a concentraciones de 150 y 300

µg/mL. Este estudio determina que para ambos aceites, las concentraciones iguales o mayores a 150 µg/mL son eficaces para el control de la bacteria.

Jácome (2019) realiza un estudio para determinar el efecto bactericida en cepas *ATTC* y que fueron propuestas como bacterias que se localizan en la mucosa bucal. Se obtuvieron halos de inhibición de 9,22 mm para *E. coli* ; 10,44 mm para *S. aureus* y 8,44 mm para *E. faecalis*. Se expone que el aceite esencial de *Zingiber officinale* combinado con el aceite de *Cinnamomum verum* presenta mayor efecto bactericida frente a *E. coli* y *S.aureus* con un halo de inhibición de 27,11 mm y 40,33 mm respectivamente. Sin embargo empleándolo solo no presenta efecto bactericida grente a *E. faecalis*, no obstante puede ser un prometedor agente terapéutico profiláctico para caries dental.

2.4 Bacterias susceptibles de la piel

2.4.1 Microbiota de la piel

El órgano más extenso de nuestro cuerpo es la piel, la cual representa hasta el 10% del peso corporal de un individuo (González *et al.*, 2019). Esta constituida por barrera denominada epidermis, ésta barrera física resite la penetración de microorganismos y toxinas. (del Tanago *et al.*, 2017). Otro componenete son las glándulas ecrinas, las cuales acidifican la piel para evitar la colonización de microorganismos (Dreno, 2019).

En la piel se encuentra un complejo ecosistema de bacterias, hongos y parásitos con una relación 1 a 10 con las células humanas, las cuales realizan una simbiosis con el huésped (Prieto *et al.*, 2018; Dreno, 2019).

Cada vez más esta asociación se ve como una parte integral en la unidad funcional de la piel, ya que su interacción con tejidos y redes inmunes influye en la salud y

funcionamiento del huésped al actuar como barrera física e inmunológica (Manrique *et al.*, 2017; del Tanago *et al.*, 2017).

Dentro de la microbiota de la piel se pueden encontrar cocos aerobios, bacterias corineiformes aerobias y anaerobias, bacterias gramnegativas y levaduras (del Tanago *et al.*, 2017).

La microbiota bacteriana se divide en dos grupos, microbiota residente y transitoria. En el primer grupo se encuentran bacterias habituales de la piel como bacterias corineiformes y estafilococos; aunque también se encuentran en menor proporción micrococcos. El microorganismo aislado más frecuentemente de la piel es *Staphylococcus epidermidis*, ya que conforma aproximadamente el 90% de la microbiota residente (Patiño y Andrés, 2015; Prieto *et al.*, 2018).

Mientras que en el segundo grupo se conforma por bacterias no establecidas permanentemente, pero persisten horas o días en la superficie de la piel. Esta conformada principalmente por bacterias gram positivas como estreptococos del grupo A (Patiño y Andrés, 2015).

En la siguiente tabla 6. se muestran las bacterias que conforman estos grupos.

Tabla 6. Microbiota presente en la piel.

Grupo	Microorganismo
Microbiota Residente	Bacterias <i>Acinetobacter:</i> <i>A. calcoaceticus</i> var. <i>anitratus</i> <i>A. calcoaceticus</i> var. <i>iwoffi</i> <i>Brevibacterium</i> spp. <i>Dermatobacter</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp. <i>Malassezia</i> spp.

	<i>Corynebacterium:</i> <i>C. minutissimum</i> <i>C. bovis</i> <i>C. hofman</i> <i>C. xerosis</i> <i>C. minutissimum</i> <i>Propionibacterium:</i> <i>P. acne</i> <i>P. granulosum</i> <i>P. avium</i> <i>Staphylococcus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. hominis</i> <i>S. capitis</i> <i>S. cohnii</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. wamery</i> <i>S. xylosus</i> <i>S. simulans</i> <i>Micrococcus</i> <i>M. luteus</i> <i>M. varians</i> <i>M. lylae</i> <i>M. nishinomiyaensis</i> <i>M. kristinae</i> <i>M. roseus</i> <i>M. sedentarius</i> <i>M. agilis</i> Levaduras <i>Candida:</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. albicans</i> Ácaros <i>Demodex folliculorum</i> <i>Demodex brevis</i>
Microbiota Transitoria	<i>Klebsiella spp.</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>S. aureus</i>

2.4.2 Infecciones bacterianas de la piel

Un desequilibrio en el ecosistema genera consecuencias negativas que predisponen y causan la aparición de enfermedades (Dreno, 2019; Prieto *et al.*, 2018). Los cambios ambientales, ocupacionales, hábitos de higiene inadecuados o la exposición a antibióticos generan alteraciones en la microbiota. La elevación del pH de la piel favorece el crecimiento de *S. aureus* y *S. pyogenes*, ya que se estimula la actividad de las proteasas de serina (Conejo y Moraga, 2016).

Cambios significativos en la permeabilidad de la barrera son producidos por cambios extremos en la humedad cutánea. Por su parte, el estrés psicológico genera un aumento de glucocorticoides endógenos que perjudican la permeabilidad y homeostasis de la barrera, así como la integridad del estrato córneo y la defensa antimicrobiana (Dreno, 2019).

El uso frecuente de jabones y antisépticos en las manos modifica la presencia de diferentes especies de bacterias. Los taxones *Propionibacterium*, *Neisseria*, *Burkholderiales* y *Pasteurellaceae* son abundantes cuando los lavados de manos se realizan cada 4 horas, mientras que los grupos *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae* se encuentran presentes en manos recién lavadas (Prieto *et al.*, 2018; Dreno, 2019).

Otro factor que altera la microbiota cutánea son los medicamentos como los retinoides, ya que disminuyen la producción de sebo, reducen el recuento de *Propionibacterium spp.* e incrementan el de *S. aureus* (Esperbet y Migliorati, 2017). Por su parte los corticoides pueden incrementar la presencia y colonización de microbiota patógena, debido a que suprimen la actividad del sistema inmunitario (Fariña *et al.*, 2017).

Así mismo, los antibióticos tópicos pueden erradicar la microbiota e inducir resistencia y colonización de otras bacterias; un ejemplo es *S. epidermidis*, su eliminación puede resultar perjudicial ya que se suprime gran cantidad de péptidos

antimicrobianos permitiendo colonización por agentes patógenos (Manrique *et al.*, 2017).

En su mayoría, las infecciones cutáneas bacterianas son procesos leves; no obstante se pueden desarrollar casos de afección cutánea profunda y sistémica cuando se encuentran presentes factores de riesgo como piel deteriorada, heridas, falta de higiene, hacinamiento, humedad e inmunodeficiencias (Conejo y Moraga, 2016).

En general, cualquier lesión en la piel como quemaduras provocadas por el sol, arañazos, inflamaciones y otros traumatismos predispone a las personas a padecer una infección (del Tanago *et al.*, 2017). El tratamiento para infecciones superficiales, suele ser únicamente tópico (Conejo y Moraga, 2016).

En la siguiente tabla 7 se muestran las infecciones generadas por bacterias en la piel.

Tabla 7. Infecciones generadas por bacterias en la piel.

Infección	Etiología	Localización	Factores predisponentes	Clínica	Tratamiento
Antrax	<i>S. aureus</i>	Folículo piloso	Diabetes, tratamiento farmacológico prolongado con citostáticos, inmunosupresores o corticoides.	Placa única, muy inflamatoria y dolorosa. Formada por afectación profunda y confluyente de múltiples folículos, al presionar sobre dicha zona se muestra material purulento.	Farmacológico a base de antibióticos tópicos y sistémicos
Celulitis no necrosante	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i>	Tejido celular subcutáneo	Diabetes mellitus, inmunocompromiso.	Placa eritematosa, caliente si límites definidos, edema intenso y profundo ocasionando ampollas y abscesos.	Tópico y sistémico mediante el empleo de analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos y antibioterapia como penicilina, cefalosporina y eritromicina.
Dactilitis ampollosa	<i>S. pyogenes</i> <i>Menos frecuente: S. aureus S. agalactiae</i>	Pulpejos de los dedos de las manos. Infrecuente: otras superficies palmares o plantares	Heridas, dermatitis atópica, humedad	Ampolla con líquido purulento, poco dolorosa, con base eritematosa.	Higiene y farmacológico tópico como antisépticos o fármacos sistémicos con empleo de penicilina o eritromicina por vía oral.
Ectima	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i>	Miembros inferiores y superiores	Lesiones pruriginosas: picaduras, sarna, pediculosis, falta de higiene, malnutrición	Úlcera con escara negruzca que se cronifica y cura dejando cicatriz.	En lesión pequeña (<2cm) ácido fusídico/ muprosina tópicos.

Eritrasma	<i>Corynebacterium minutissimum</i> <i>S. pyogenes</i>	Pliegues corporales húmedos: espacios interdigital es de los pies, ingles, axilas, áreas inframamaria e interglútea .	Calor, humedad, obesidad, maceración cutánea, diabetes mellitus, escasa higiene.	Lesiones de color rojo/marrón de bordes irregulares y bien definidos, algo descamativas. Prurito leve.	Amoxicilina-ác.clavulánico. Lesión localizada: peróxido de benzoilo al 5% o clindamicina tópica al 2%. En lesión a varias zonas se administra antibioterapia oral con eritromicina.
Erisipela	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i>	Dermis y vasos linfáticos superficiales	Infección de vías respiratorias altas por estreptococos. Traumatismos, desnutrición, diabetes mellitus, escasa higiene.	Placa eritematosa, caliente, de límites marcados, edema intenso, dolor, piel irritante. Pueden aparecer úlceras.	Reposo absoluto, tratamiento tópico y sistémico con analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos y antibioterapia como penicilina, cefalosporina y eritromicina.
Fascitis necrotizante	<i>S. pyogenes</i>	Fascia muscular	Edad avanzada, obesidad, influencia vascular, quemaduras, neoplasias malignas, inmunodepresión, intervenciones quirúrgicas recientes.	Se origina una necrosis que destruye el tejido subcutáneo y la fascia superficial. Aparece crepitación bajo la piel, lo cual demuestra la existencia de gas en la zona en el 25% de los casos.	Utilización de fármacos antibióticos de amplio espectro. Cuidado local de las heridas mediante limpieza con agua oxigenada, solución salina y agente antiséptico tipo

Foliculitis	<i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>Malassezia furfur</i>	Folículo piloso: cuero cabelludo. Cara, pliegues axilares e inguinales y piernas.	Exposición a agua caliente, sudoración profusa, Diabetes, acné, dermatitis, depilación y afeitado.	Pápulas eritematosas que evolucionan a pústulas foliculares rodeadas de un halo inflamatorio eritematoso, posteriormente la pústula adquiere color verdoso.	povidona yodada. Antisépticos como clorhexidina y povidona yodada y utilización de antibióticos tópicos.
Gangrena gaseosa	<i>Clostridium perfringens</i> Otras: <i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>Vibrio vulnificus</i>	Músculo	Traumatismo o heridas quirúrgicas recientes. Enfermedad vasculas subyacente, diabetes o cáncer de colon.	Aire bajo la piel, ampollas con secreción sanguinolenta de olor fétido, dolor moderado a severo alrededor de la lesión, piel negruzca, edema progresivo. Ocasiona destrucción del tejido.	Extirpación de tejido muerto Tratamiento sistémico para control de dolor con analgésicos. Antibioterapia como penicilina.
Impétigo Ampollos o y no ampolloso	<i>S. pyogenes</i> <i>S. aureus</i>	Epidermis de cara, extremidades, zona dorsal e interdigital del pie y pliegues cutáneos.	Calor y humedad, escasa higiene, lesiones en la piel.	Ampolloso: Ampollas flácidas y purulentas que se rompen con facilidad ocasionando erosiones superficiales con abundante exudación y ampollas costras. No ampolloso: Frágil vesícula pustulosa que se rompe inmediatamente, dando lugar a	Tratamiento tópico para lograr curación. Compresas humedecidas en permanganato, vaselina salicilica, antisépticos o pomadas antibióticas (mupirocina, ác. Fusídico)

				costras más gruesas.	
Paroniquia aguda	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	Pliegues ungueales	Microtraumatismos, humedad, irritantes, dermatitis de contacto.	Pliegue caliente, rojo, hinchado, doloroso y con frecuencia pus.	Administración tópica de mupirocina o polimixina B, ciprofloxacino en solución tópica o sulfadiacina argéntica.
Queratólisis punctata Queratólisis plantaris sulcatum	<i>Corynebacterium sp.</i>	Plantas de los pies. Raro en palmas de las manos.	Humedad: hipersudoración, calzado cerrado, sumersión prolongada en agua.	Depresiones superficiales de la epidermis (punctata) a veces con patrón lineal (sulcatum), mal olor, a veces picor, escozor.	En lesión localizada se trata con peróxido de benzoilo al 5% o clindamicina tópica al 2%. Afección en varias zonas: antibioterapia oral con eritromicina.

Las bacterias más frecuentes que causan enfermedades en la piel son *S. aureus* y *S. pyogenes* (Conejo y Moraga, 2016; Esperbet y Migliorati, 2017; Fariña *et al.*, 2017; del Tanago *et al.*, 2017; Dreno, 2019).

Las infecciones cutáneas son producidas por inoculación directa en piel sana, diseminación hematógena y por la producción de toxinas desde el foco de infección al torrente sanguíneo (Conejo y Moraga, 2016).

2.4.3 Resistencia antimicrobiana

En una infección gran parte de los microorganismos mueren al ser expuestos a los antimicrobianos pero algunos otros sobreviven por medio de mutaciones que se producen en respuesta a la exposición de estos fármacos, dichas mutaciones son a su vez transmitidas a su descendencia (Esperbet y Migliorati., 2016; OMS, 2018). Este mecanismo puede transferir genes de resistencia a individuos de la misma especie y a especies diferentes (Esperbet y Migliorati., 2016).

Diversos microorganismos como bacterias, virus y algunos parásitos han desarrollado mecanismos que impiden que los llamados antimicrobianos como antibióticos, antivíricos y antipalúdicos actúen sobre ellos. Esta capacidad es denominada resistencia a los antimicrobianos o farmacorresistencia (OMS, 2017).

En los últimos años, la cantidad y el tipo de microorganismos resistentes se han visto incrementados; desencadenando un aumento en el número de casos en infecciones tales como neumonías, tuberculosis, gonorrea y salmonelosis o enfermedades de transmisión alimentaria, las cuales son cada vez más difíciles de tratar (OMS, 2018; González *et al.*, 2019).

Aunque la resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural, diversos factores han influido en la aceleración de este proceso como el empleo inadecuado de antimicrobianos que abarca el su uso excesivo, insuficiente o inapropiado, siendo un factor determinante de la farmacorresistencia, el cual es consecuencia de del fácil acceso a antibióticos sin receta médica y de uso generalizado (OMS, 2017).

Por otro lado, en algunos países la falta de acceso a medicamentos de calidad obliga a los pacientes a seguir tratamientos incompletos o a la búsqueda de alternativas, entre las que pueden estar el uso de medicamentos de baja calidad; de esta manera los pacientes son expuestos a concentraciones no óptimas, creando condiciones que favorecen la farmacorresistencia (OMS, 2017).

Así mismo las deficiencias en la prevención y control de infecciones amplifican la farmacorresistencia; siendo los pacientes hospitalizados el principal reservorio de infecciones farmacorresistentes (OMS, 2017).

Otra fuente de resistencia a los antibióticos es la ganadería, en la cual se utilizan dosis subterapéuticas para reventar enfermedades, propiciando la generación de microorganismos resistentes con alto potencial de ser transmitidos al ser humano (Fariña *et al.*, 2017; OMS, 2017).

Los tratamientos habituales se han vuelto ineficaces desencadenando la persistencia de infecciones, las cuales podrían volverse incontrolables. Otras consecuencias que ha traído es el aumento en las estancias hospitalarias, costos médicos y mortalidad (Pintado, 2016; OMS, 2018).

Estos microorganismos resistentes pueden propagarse rápidamente por todo el mundo a través de actividades como el comercio mundial y viajes internacionales; por otra parte las deficiencias en la prevención y control de estas infecciones también favorecen la propagación hacia la población sin importar edad o país (OMS, 2017).

Algunos países presentan carencia de laboratorios apropiados para identificar con exactitud microorganismos resistentes, lo que dificulta su detección y la inmediata implementación de medidas sanitarias (OMS, 2017).

Ante la pérdida de eficacia de los antibióticos existentes, las inversiones en el desarrollo de nuevos antimicrobianos son insuficientes, lo mismo ocurre con las pruebas diagnósticas y vacunas; convirtiendo a la resistencia a los antimicrobianos en una amenaza cada vez mayor para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo (OMS, 2018; Gonzáles *et al.*, 2019).

Estigmatizaciones hechas por la Organización Mundial de la Salud indican que para el 2050 se podrían tener consecuencias importantes en la salud pública y actividades agropecuarias (Esperbet y Migliorati., 2016).

2.4.4 Bacterias de la piel resistentes a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es progresiva y constituye un problema sanitario de primera magnitud, tanto para bacterias gramnegativas y grampositivas. Dichas bacterias resistentes son causantes de infecciones asociadas a una alta mortalidad y prolongada estancia hospitalaria que conlleva a un elevado coste económico (Pintado, 2016).

En los últimos cuatro años ha crecido la preocupación por la resistencia antimicrobiana, siendo el microorganismo mas emergente *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; esto se debe a que en la actualidad es una de las principales causas de infecciones adquiridas en comunidad (Pintado 2016; Esperbent y Migliorati, 2017; Fariña *et al.*, 2017).

Hasta hace unos años el antibiótico de elección contra esta bacteria era la cefalexina pero no presenta actividad sobre la cepa meticilino resistente; los betalactámicos tampoco pueden ser empleados para el tratamiento de infecciones por esta bacteria, ni combinandolos con inhibidores betalactamasas como amoxicilina, sulbactam y tazobactam (Fariña *et al.*, 2017).

Por todo lo anterior, en mayo de 2015 durante la 68 asamblea Mundial de la Salud, la OMS pidió a sus estados miembro la elaboración de planes que atiendan esta problemática, los cuales deben que garantizar la continuidad de tratamientos y prevención de enfermedades infecciosas con medicamentos eficaces, seguros, de calidad, empleados de manera responsable y que sean accesibles a todas las personas que los necesiten (OMS, 2015).

Las empresas farmacéuticas que invierten en recursos para investigar nuevas moléculas de antibióticos son pocas, ya que no lo consideran rentable, además el mal uso y abuso de éstos favorece que nuevamente las bacterias generen mecanismos para evitar su acción. Todo esto ha propiciado que en las últimas tres décadas no se halla

descubierto ninguna nueva familia de antibiótico (Pintado 2016; Esperbent y Migliorati, 2017; Fariña *et al.*, 2017).

Los logros de la medicina moderna estan en riesgo ante la creciente resistencia a los antibióticos, ya que si no se dispone de antibióticos eficaces para prevenir y tratar las infecciones las intervenciones quirúrgicas como los trasplantes de órganos o la quimioterapia, se volverán mas riesgosas de lo que son actualmente (OMS, 2018).

Acabar con el problema de la resistencia antimicrobiana no es posible, sin embargo esta latente amenaza si puede convertirse en un problema manejable (Fariña *et al.*, 2017).

2.4.5 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana tienen como objetivo fundamental detectar si un microorganismo causante de un proceso infeccioso posee resistencia ante diferentes antibióticos mediante pruebas in-vitro. Estas pruebas se realizan partiendo de un cultivo primario en medio sólido, en el cual las colonias aisladas de un microorganismo patógeno son evaluadas mediante métodos de laboratorio fenotípicos como los antibiogramas que incluyen las técnicas de dilución que proporciona resultados cuantitativos determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la técnica de difusión que proporciona resultados cualitativos. Los resultados obtenidos mediante esta técnica nos permiten clasificar a los microorganismos en categorías clínicas: sensibles, intermedios o resistentes, por lo que su interpretación es crucial (Mederos, *et al.*, 2018, Larrosa *et al.*, 2022).

2.4.6 Técnica de difusión en agar empleando discos

La técnica de difusión en agar está basada en el método descrito por Kirby Bauer, el cual sigue los lineamientos y protocolos establecidos por Clinical Laboratory Standards institute (CLSI) y la organización mundial de la salud (OMS). Esta técnica evalúa la concentración de antibiótico a emplear y la relación que existe entre los

halos de inhibición que ésta produce sobre la superficie de una placa que contiene preferentemente el agar Mueller Hinton. Este medio de cultivo es el más idóneo para pruebas de sensibilidad de bacterias no fastidiosas dada la buena reproductibilidad de la mayoría de los patógenos, además de tener bajas cantidades de inhibidores para trimetoprima, tetraciclinas y sulfonamidas. En esta técnica se emplean placas de agar previamente inoculadas con la suspensión bacteriana y sobre la superficie se disponen discos de papel que están previamente impregnados con una solución estandarizada de antibiótico. Posterior a un periodo de incubación de 18-24 horas se puede visualizar y medir el diámetro del halo formado correspondiente a la sensibilidad del microorganismo (Coronell *et al.*, 2017, Granja *et al.*, 2022).

Para que pueda establecerse una correlación con los valores de CMI así como diferenciar los microorganismos sensibles de los resistentes, se debe tomar en cuenta la cantidad de antibiótico que está presente en el disco. La presencia de halos pequeños se relaciona con valores altos de CMI, es decir, microorganismos resistentes y halos grandes con CMI bajas indican microorganismos sensibles (Serra, 2017).

2.5 Toxicidad

Los compuestos activos producidos por las plantas medicinales han sido utilizados para combatir diferentes enfermedades. Aproximadamente el 80% de la población emplea plantas medicinales como atención primaria de salud pues creen que al ser de origen natural es amigable con el organismo; sin embargo muchos de estos compuestos son altamente tóxicos, razón por la cual es importante determinar la toxicidad de estos compuestos para validar su uso seguro, no obstante es difícil determinarlo ya que la dosis administrada está estrechamente relacionada con la toxicidad. A pesar de esto, un extracto o compuesto activo puede ser utilizado a dosis subtóxicas cuando se conoce la toxicidad, ya que se puede determinar su índice terapéutico. Este último término refleja la seguridad relativa y por lo general se calcula a partir de las curvas de dosis-efecto obtenidas en animales de experimentación, las cuales nos permiten obtener la razón de la dosis letal en 50% de la población (DL_{50}) y la dosis requerida

para producir el efecto terapéutico deseado en 50% de esta población (DE₅₀) (López *et al.*, 2022; Zamora, 2022).

Los productos químicos pueden ejercer su toxicidad a través de dos modos principales, los cuales son efectos locales y sistémicos. Los primeros tienen lugar en la zona del cuerpo donde hayan estado en contacto, mientras que los segundos tienen lugar después de que el producto haya sido absorbido y distribuido en el organismo. Por lo general casi todos los compuestos causan efectos sistémicos, aunque algunos pueden causar ambos (Acosptupa *et al.*, 2019).

Hoy en día los métodos *in vitro* permiten evaluar la toxicidad aguda de un producto, empleando la menor cantidad de animales. Razón por la cual ocupan la primera línea para la búsqueda de nuevas moléculas con potencial biológico. A continuación se describen diferentes técnicas para la determinación de toxicidad en distintos modelos de organismos (Mostacero *et al.*, 2020).

2.5.1 Ensayo de letalidad en *Artemia salina*

El fundamento de este ensayo se basa en la habilidad de un extracto o compuesto de ser tóxico para las artemias cultivadas en el laboratorio. El ensayo en *A. salina* ofrece diversas ventajas como un bajo costo, facilidad de almacenamiento, requerimientos mínimos para llevarse a cabo los ensayos, prácticamente en cualquier lugar pero sobre todo disponibilidad, ya que estos crustáceos de cuerpo blando son comúnmente comercializados como quistes en tiendas de mascotas como alimento para peces. Fue empleado en un inicio como una pre-evaluación de extractos vegetales con compuestos antitumorales y permitió determinar la correlación entre la mortalidad de larvas de artemia y la citotoxicidad frente a las células 9KB. Es utilizado para la evaluación preliminar de la toxicidad, detección de toxinas fúngicas y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y en el ensayo de toxicidad de materiales dentales, entre otros (Aranda *et al.*, 2018; Saetama *et al.*, 2018).

2.5.2 Ensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna*

El género *Daphnia* es utilizado exclusivamente en pruebas de toxicidad ya que permiten detectar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, entre otros. La toxicidad agua con esta clase crustácea se determina mediante la inhibición de la movilidad (IC_{50} 24h). Se contabiliza el número de organismos inmóviles de *D.magna* de 24 h de nacidos, presumiéndose su muerte al exponerlos a diferentes concentraciones de la sustancia a evaluar y sin alimentación por 24 horas (Perez *et al.*, 2022; Barrera *et al.*, 2019).

2.5.3 Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L

La toxicidad aguda se determina mediante la inhibición del crecimiento promedio de las raíces de *Allium* sp. En este ensayo los bulbos de cebolla se rehidratan en presencia de sustancias tóxicas. La rehidratación produce una estimulación del crecimiento de las células y con ello el crecimiento de las raíces de la planta. Sin embargo la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse en presencia de sustancias tóxicas, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este efecto se determina comparando la elongación de las raíces de cebollas después de 72 horas de exposición al compuesto tóxico con las no expuestas. El cálculo se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control (Carbonero & Meza, 2020; Quintero, 2022).

2.5.4 Ensayo de toxicidad aguda con el cnidario *Hydra attenuata*

El género *Hydra* pertenece a la clase Hydrozoa de amplia distribución geográfica, son pólipos de agua dulce microinvertebrados. Son animales pluricelulares cuyas células se disponen en dos capas: la epidermis y la gastrodermis, separadas por una mesoglea gelatinosa. Los ensayos de toxicidad con esta especie permiten determinar la subletalidad y letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, entre otros.

Algunas ventajas que ofrece este modelo son la facilidad de cultivo en el laboratorio, rápida reproducción, su estructura que favorece el intercambio intra e intercelulas y su potencial para la detección de compuestos tóxicos, así como por presentar cambios morfológicos fácilmente reconocibles bajo condiciones progresivas de intoxicación (Velandia et al., 2019).

El tiempo de exposición de los organismos al compuesto tóxico es de 96 h, durante el cual se registran los cambios morfológicos producidos de manera diaria mediante un examen al microscopio. Estos cambios morfológicos son indicadores de efectos subletales dependientes de la concentración. Mediante este ensayo se puede establecer la estimación de la CL₅₀ y la CE₅₀, los efectos letales (LOEC), efectos subletales (NOEC) y la concentración umbral de efectos observables (Threshold Observable Effect Concentration, TOEC) (Espinosa & Hernández, 2018).

2.5.5 Ensayo de toxicidad agua con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L.

Este ensayo permite evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas de lechuga *Lactuca sativa*, así como en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. La toxicidad aguda se evalúa mediante la inhibición en la germinación y en la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo. Algunas de las ventajas que ofrece es la sensibilidad de esta especie, el reducido tiempo de exposición de las semillas con los compuestos a evaluar, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado. Este ensayo puede ser incorporado en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reúso de biosólidos (Ccuno, 2021; Paucar 2021).

2.5.6 Ensayo de toxicidad con el nemátodo *Panagrellus redivivus*.

P.redivivus es una especie dioica y ovovivípara con 5 estadios de desarrollo con una duración de 94 h. Cada estadio se caracteriza por la longitud del organismo pero bajo condiciones adversas los organismos responden al mostrar alteraciones en su periodo de desarrollo o muriendo. Estas manifestaciones son monitoreadas mediante la medición del crecimiento a una población de 100 organismos en el estadio J2, en el cual los nemátodos emergen de los huevos y son expulsados como nadadores libres. A través del número de organismos muertos es posible determinar efectos letales y a través del número de organismos estancados en etapas retardadas de desarrollo o en etapas adultas es posible determinar los efectos subletales crónicos y de genotoxicidad. Este ensayo se ha usado para la detección de toxicidad de muestras ambientales complejas como aguas residuales, suelos, sedimentos y lodos contaminados (Quizhpe, 2019; Hernández *et al.*, 2018).

3 CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño metodológico

La presente investigación se realizó en el laboratorio de investigación, área de Biotecnoambiental de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, con una duración de veinte meses. Rizomas frescos de *Zingiber officinale* fueron adquiridos de un mercado local de Puebla, fueron identificados taxonómicamente en el jardín botánico de la BUAP y de los cuales se extrajo el aceite esencial y se purificaron cuatro metabolitos para realizar las pruebas antimicrobianas *in vitro*, concentraciones mínimas inhibitorias, además de pruebas citotóxicas y genotóxicas *in vitro*.

Los microorganismos evaluados fueron cepas *ATCC* y de aislamiento clínico previamente caracterizadas y proporcionadas por el laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de Puebla. Dichos microorganismos fueron propuestos como bacterias, levaduras y hongos causantes de infecciones en la piel.

Los estudios espectrofotométricos de Infrarrojo y Resonancia magnética nuclear fueron realizados en las instalaciones del Centro de Servicios de Alta Tecnología de UPAEP y el laboratorio de Ingeniería Química BUAP respectivamente.

Se realizó un diseño de bloques completamente al azar para analizar el efecto antimicrobiano, genotóxico y citotóxico de los tratamientos los cuales se evaluaron por duplicado.

3.2 Métodos de análisis de datos

Los resultados obtenidos fueron tabulados en el programa Microsoft Excel 2020 y sometidos a pruebas estadísticas en el software estadístico GraphPad Prism v.8. Se aplicaron las prueba de ANOVA y Dunnet para analizar el comportamiento de las zonas de inhibición al aplicar los distintos tratamientos en la prueba e Kirby-Bauer, así como en las pruebas para determinar las Concentraciones Mínimas inhibitorias. Para las pruebas de genotoxicidad y citotoxicidad se aplicó la prueba de ji-cuadrado para contrastar las frecuencias observadas con las frecuencias esperadas de acuerdo con la hipótesis nula.

3.3 Obtención de aceite esencial

Se obtuvo aceite esencial de *Zingiber officinale* mediante la técnica de maceración descrita a continuación.

3.3.1 Muestreo y recolección de la materia prima

El muestreo de los rizomas de *Zingiber officinale* se realiza de forma aleatoria en un mercado local de Puebla, tomando en cuenta los siguientes indicadores:

- Consistencia firme.
- Ausencia de afectaciones por podredumbre o deterioro.
- Ausencia de daños causados por plagas que afecten al aspecto general del producto.
- Ausencia de cualquier materia extraña visible.
- Estar exento de abrasiones, salvo abrasiones ligeras que se hayan cicatrizado apropiadamente.
- La piel, tallos y cortes debidos a la recolección deberán estar totalmente secos.

3.3.2 Identificación taxonómica

Este material fue proporcionado al Jardín botánico de la BUAP para la identificación taxonómica la cual fue realizada a través de la observación de las características morfológicas por el curador Mphil Allen J. Coombes.

3.3.3 Lavado

Se realizó un lavado de los rizomas con agua corriente, para limpiar y retirar cualquier cuerpo extraño de las superficies. Una vez lavados los rizomas, se dejaron secar por 5 minutos sobre papel absorbente.

3.3.4 Rayado

Se cortaron los rizomas en láminas de 2-4mm de espesor para un mejor secado.

3.3.5 Secado

Se procederá a secar la materia prima en bandejas cubiertas de aluminio, a condiciones ambientales de la Ciudad de Puebla.

El lugar de secado deberá contar con buenas condiciones de circulación de aire, poca luz, temperatura relativamente alta y baja humedad relativa.

3.3.6 Pesado

Se pesaron 71g de rizoma en una balanza semianalítica.

3.3.7 Macerado

Se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se agregaron 250 mL de disolvente correspondiente: Agua destilada, Etanol o Diclorometano. Se dejó macerar a temperatura ambiente por una semana en el caso de los disolventes agua y etanol; mientras que la maceración con diclorometano se realizó por 24 horas. Los tres macerados se sometieron a agitación magnética durante el tiempo mencionado.

3.3.8 Filtrado

Se realizaron dos filtrados, el primero con un colador para sustraer los trozos grandes de rizoma presentes en el macerado, el segundo con un papel filtro (Whatman 42) para retirar pequeñas partículas y sedimentos que no se retuvieron previamente.

3.3.9 Concentrado

El líquido filtrado se colocó en un matraz bola de 250 mL seco y previamente pesado. El matraz se colocó en el rotavapor R-100 marca Büchi® switzerland, empleando los siguientes parámetros para evaporar los disolventes utilizados:

Agua: 45 °C / 41 mbar

Etanol: 45 °C / 32 mbar

Diclorometano: 25 °C / 235 mbar

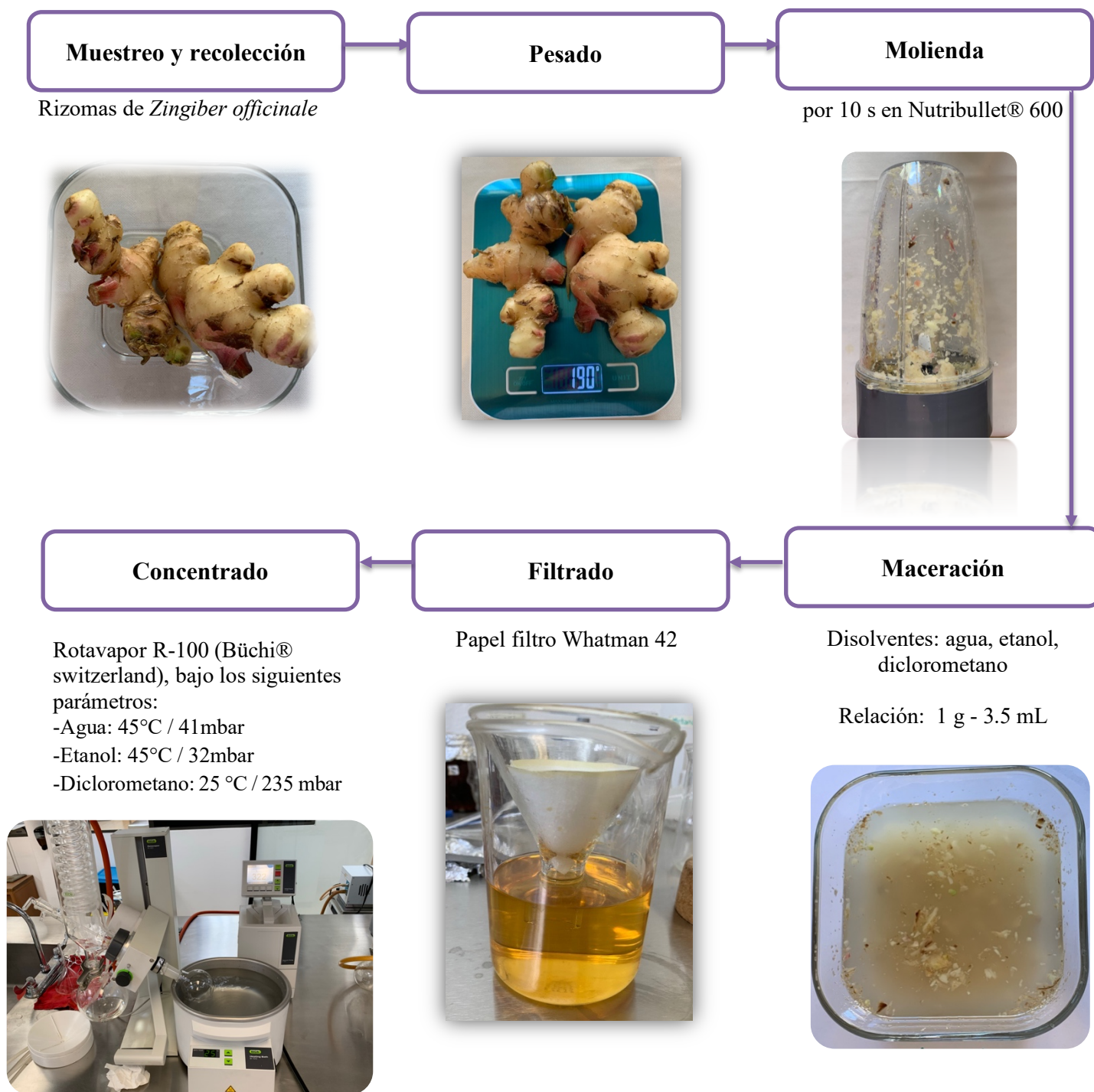
Una vez evaporado, los matraces fueron pesados nuevamente para el cálculo de rendimiento.

3.3.10 Envasado

Los aceites esenciales obtenidos se colocaron en frascos de vidrio de color ámbar con tapón en un ambiente protegido de la luz, el aire y con temperaturas menores a 20 °C con la finalidad de evitar su degradación. Como se indica en la Norma Técnica NTP 319.095.

En cada frasco se rotuló con la fecha y las condiciones de extracción usadas. En el siguiente diagrama de flujo 1. se muestra el proceso para la obtención de macerados de *Zingiber officinale*.

Diagrama de flujo 1. Macerados de *Zingiber officinale*.



3.4 Identificación de metabolitos

3.4.1 Plaqueo

Se utilizaron placas de aluminio TLC silica gel 60 F₂₅₄ marca Merck kGaA de 2 x 5 cm . Las muestras se aplicaron en la parte inferior con un tubo capilar, dejando una distancia entre el borde inferior y el punto de aplicación de un centímetro aproximadamente.

Se realizó un toque con un tubo capilar en el borde inferior de la placa, cuidado que las siembras no superaran un diámetro de 2-3 mm y que la separación entre ellas guardara 1,0 cm. Posteriormente se dejaron secar.

3.4.2 Desarrollo

Las placas se colocaron en una cuba previamente saturada con el eluyente, el cual estaba conformado por una mezcla de solventes hexano-acetato de etilo (8:1).

Una vez colocadas las placas, se tapó la cuba para permitir que el eluyente ascendiera por capilaridad y se retiraron a 1 cm de distancia entre el eluyente y el borde superior. Posteriormente se dejaron secar.

3.4.3 Revelado

Una vez desarrolladas las placas, se reveló la presencia de compuestos de la siguiente manera.

- Luz UV: observación de placas bajo luz UV a 254 y 365 nm.
- Molibdato de amonio: Las placas se introdujeron en el reactivo correspondiente , se quitó el exceso y se coloraron en la estufa a 80-100 °C por unos minutos, hasta la visualización de manchas azules.
- Yodo: Las placas se introdujeron en una cámara saturada con yodo sólido por unos minutos, hasta la visualización de manchas color marrón.

Posteriormente se realizó la lectura de *rf* de los metabolitos que fueron visualizados en cada revelador. En el siguiente diagrama de flujo 2 se muestra el proceso de identificación de metabolitos presentes en macerados de *Zingiber officinale*.

Diagrama de flujo 2. Identificación de metabolitos presentes en macerados de *Zingiber officinale* por TLC.



3.5 Purificación de metabolitos

3.5.1 Plaqueo

Las muestras purificadas fueron los extractos clorofórmicos. Se utilizaron placas de aluminio TLC silica gel 60 F₂₅₄ marca Merck kGaA de 20 x 20 cm . La muestra se aplicó en la parte inferior con un tubo capilar, dejando una distancia entre el borde inferior y el punto de aplicación de un 1.5 cm y 1cm en bordes laterales.

La aplicación se realizó 8 veces o hasta la saturación completa de la sílica.

3.5.2 Desarrollo

La placa se corrió un total de 4 veces, las tres primeras utilizando hexano para eliminar contaminantes y posteriormente con un sistema hexano-acetato de etilo (9:1) para lograr una mejor separación de metabolitos.

La placa se colocó en una cuba previamente saturada con 20 mL del eluyente correspondiente, fue herméticamente cerrada para permitir que el eluyente ascendiera por capilaridad y se retiró después de 45- 55 min hasta que la distancia entre el eluyente y el borde superior fuera de 1 cm aproximadamente para las corridas con hexano y 5 cm para el sistema hexano-acetato de etilo. Posteriormente se dejó secar.

3.5.3 Revelado

El revelado de placa se realizó con luz UV a 254 nm después de cada corrida para observar el progreso en la separación de metabolitos. Después de la última corrida con el sistema hexano-acetato de etilo, los metabolitos fueron señalados con lápiz HB no.2 en la placa para posterior obtención y se tomó la lectura de los R_f de los metabolitos señalados.

3.5.4 Remoción

Los metabolitos identificados en la placa fueron extraídos removiendo la sílica donde se había señalado su presencia y fueron colocados y etiquetados por separado en matraces Erlenmeyer de 250 mL.

3.5.5 Separación de sílica

Se agregaron 15 mL de diclorometano a cada uno de los matraces que contenían los metabolitos extraídos, posteriormente se colocaron en agitación magnética por 24 horas para realizar su separación de la sílica.

3.5.6 Filtración

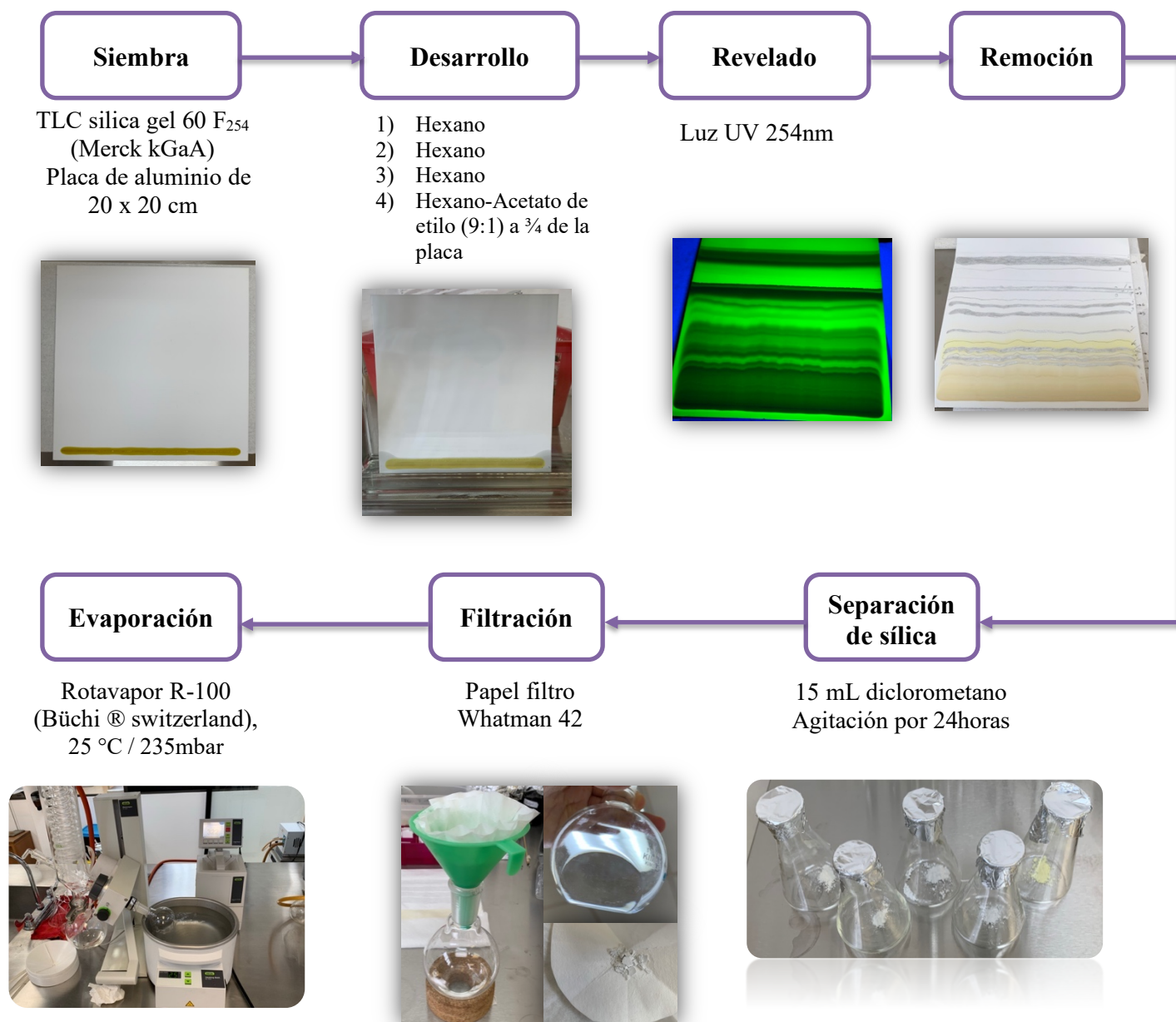
Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se filtraron empleando papel filtro (Whatman 42). La recolección del filtrado se realizó en matraces redondos de 250 mL, los cuales fueron pesados previamente y se verificó que las muestras filtradas no tuvieran remanentes de sílica. Cada matraz fue etiquetado con su metabolito correspondiente.

3.5.7 Evaporación

Los matraces fueron colocados en el rotavapor R-100 marca Büchi® switzerland, empleando los siguientes parámetros para evaporar el diclorometano: 25 °C / 235 mbar. Una vez secos, los matraces se pesaron nuevamente y posteriormente fueron almacenados a temperaturas inferiores a 20 °C en viales previamente pesados y cubiertos con papel aluminio con la finalidad de evitar su degradación.

En el siguiente diagrama de flujo 3 se muestra el proceso para la purificación de metabolitos presentes en el extracto clorofórmico de *Zingiber officinale*.

**Diagrama de flujo 3. Purificación de metabolitos presentes en macerado
clorofórmico de *Zingiber officinale* por TLC.**



3.6 Evaluación de efecto antimicrobiano

3.6.1 Preparación de agar Mueller Hinton

Se preparó el medio a partir de la base deshidratada de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Posteriormente se esterilizó en el autoclave y se dejó enfriar en baño de agua hasta alcanzar una temperatura de 45 °C – 50 °C. El medio se repartió en placas petri de 150 mm o 100 mm de diámetro interno, vertiendo 25-30 mL del mismo para obtener un grosor de la placa de 4 mm. Además se realizaron pruebas de esterilidad incubando una o dos placas a 30-35 °C durante 24 horas o más.

3.6.2 Preparación de discos

De acuerdo a las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el diámetro de los discos debe ser de 6 mm, para ello se empleó una perforadora manual y papel filtro Whatman 42.

Los discos fueron esterilizados con etanol al 99% y posteriormente se depositó el aceite esencial y metabolitos a probar con ayuda de una pipeta pasteur.

3.6.3 Preparación de microorganismos

Los microorganismos a probar fueron resembradas en medios de cultivo selectivos y enriquecidos respectivamente para comprobar la viabilidad celular y obtener colonias que no excedieran de 18- 24 horas de aislamiento.

3.6.4 Preparación del inóculo

Se seleccionaron de dos a tres colonias aisladas con ayuda del asa bacteriológica, procurando realizar este procedimiento cerca del mechero para evitar contaminación. El inóculo fue suspendido dentro de un vial con solución salina y se agitó por un minuto en el vortex hasta su completa homogenización.

Posteriormente se verificó el grado de turbidez de la suspensión de acuerdo a la escala de McFarland igual a 0,5 y 0,8 para bacterias y levaduras respectivamente (correspondiente a 1.5×10^8 UFC/ mL), mediante un nefelómetro semiautomatizado.

3.6.5 Inoculación de placas.

Las placas con agar Mueller-Hinton fueron colocadas a temperatura ambiente durante dos horas para reducir los niveles de condensación y fueron rotuladas con la fecha, microorganismo y tratamiento.

El procedimiento de siembra se efectuó en la cámara de flujo laminar. Se inoculó la superficie seca de las placas con agar Mueller Hinton con la suspensión correspondiente. Con el asa bacteriológica se inoculó la placa desde la parte superior estriando de arriba hacia abajo desde un extremo a otro; enseguida se giró la placa por dos ocasiones más a 60° repitiendo el procedimiento para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

3.6.6 Aplicación de discos

Finalmente se colocaron discos individuales de papel filtro estéril, previamente impregnados con el extracto y metabolitos a evaluar, sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar previamente inoculado con el microorganismo correspondiente. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada tratamiento.

Los discos se distribuyeron de manera uniforme, a una distancia mínima de 25 mm uno del otro para evitar la superposición de zonas de inhibición.

3.6.7 Incubación

Las placas fueron colocadas en posición invertida en la incubadora ECOSHEL 9065 a 35 °C por 24 horas como indica la técnica.

3.6.8 Lectura de placas

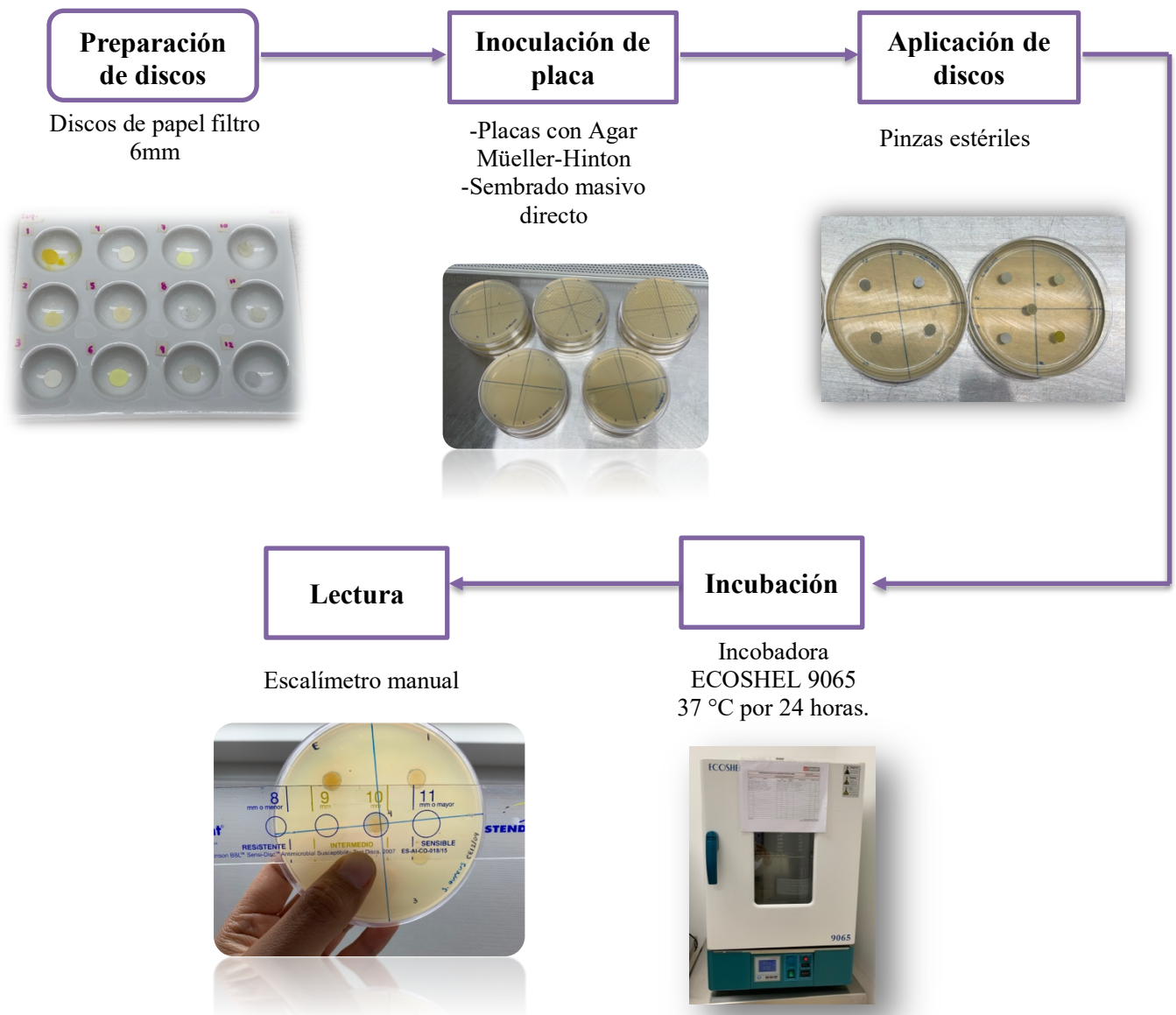
Después del tiempo recomendado de incubación, se examinó cada placa y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco usando una

regla y un escalímetro manual. Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro.

El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas. La sensibilidad de las cepas evaluadas fue reportada como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de acuerdo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016).

En el siguiente diagrama de flujo 4 se muestra el proceso para la realización de antibiogramas de los metabolitos presentes en el extracto clorofórmico de *Zingiber officinale*.

Diagrama de flujo 4. Antibiógramas de metabolitos presentes en el macerado con diclorometano de *Zingiber officinale*.



3.7 Determinación de la CMI por el método de microdilución en placa

3.7.1 Preparación de las muestras

De acuerdo a los trabajos previamente reportados se consideró evaluar las concentraciones de 125, 100, 75, 50, 25 y 12.5 µg/ µL de aceite esencial y metabolitos secundarios previamente identificados con actividad antimicrobiana. Para estos últimos se realizó su dilución en solución salina y posteriores diluciones hasta obtener las concentraciones correspondientes aplicando la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Donde:

C_1 =Concentración inicial

V_1 =Volumen inicial

C_2 =Concentración final

V_2 = Volumen final

3.7.2 Preparación del inóculo

Se estandarizó un inóculo con el microorganismo correspondiente al estándar de McFarland 0,5 y 0,8 para bacterias y levaduras respectivamente (correspondiente a 1.5×10^8 UFC/ mL), siguiendo la metodología descrita en la norma ISO 20776-1.

El inóculo fue suspendido dentro de un vial con solución salina y se agitó por un minuto en el vortex hasta su completa homogenización. Posteriormente se verificó el grado de turbidez de la suspensión mediante un nefelómetro semiautomatizado.

3.7.3 Diseño de placa

Se emplearon microplacas esteriles de 96 pocillos con capacidad de 200 µL cada uno. Las columnas 1-12 fueron empleadas para cada tratamiento con su triplicado.

Mientras que las filas A-F se agregaron las diferentes concentraciones de cada tratamiento de mayor a menor concentración. La fila G se empleo como control positivo, mientras que la fila H se empleo como blanco.

3.7.4 Preparación de la placa

Deacuerdo a la concentración inicial de la dilución realizada con el metabolito y la solución salina, se realizaron los cálculos para tomar una alícuota con la concentración correspondiente.

Con una micropipeta se colocó el volumen correspondiente de aceite esencial o metabolito secundario y se colocó en el primer pocillo. Posteriormente se colocaron 25 μ L del inóculo correspondiente a evaluar y se ajustó el volumen del pocillo con caldo Mueller Hinton.

Deacuerdo a las concetraciones empleadas, el volumen de aceite esencial y metabolito secundario se vería disminuido, para no alterar los microlitros establecidos de inóculo y caldo Mueller Hinton en el primer pocillo, el volumen faltante en los pocillos siguientes se ajustó con solución salina.

En el pocillo correspondiente al blanco unicamente se depositarn 200 μ L de caldo Mueller Hinton, mientran que en el pocillos pocillos que contenian al control positivo se depositaron 25 μ L de inóculo y 175 μ L de caldo Mueller Hinton.

3.7.5 Incubación

Finalmente las microplacas fueron cubiertas con su tapa para evitar su desecación y fueron colocadas en la incubadora ECOSHEL 9065 a 35 °C por 24 horas.

3.7.6 Lectura de microplacas

Trascurrido el tiempo de incuabación las microplacas fueron colocadas en un lector de microplacas Multiskan FC. Se emplearon las longitudes de onda de 540 nm y 630 nm para los inóculos de bacterias y levaduras respectivamente.

En la siguiente figura 2 se muestra el diseño de la microplaca, las concentraciones utilizadas, los metabolitos probados y las replicas realizadas.

	M1			M4			M8			M11		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
125 ug	A											
100 ug	B											
75 ug	C											
50 ug	D											
25 ug	E											
12.5 ug	F											
Blanco	G											
Control positivo	H											

Figura 2. Diseño de microplaca. Pozos A-F: Cantidad necesaria de Metabolito puro, 25 μ L de suspensión bacteriana, 67 μ L de caldo Mueller-Hinton, cantidad necesaria de solución salina para ajustar el volumen a 200 μ L. Control positivo: 25 μ L de suspensión bacteriana, 175 μ L caldo Mueller Hinton ; Blanco: 200 μ L caldo Mueller Hinton.

3.8 Evaluación fitoquímica

Se realizaron pruebas fitoquímicas al extracto clorofórmico de *Zingiber officinale* y los metabolitos aislados mediante diferentes pruebas. Se utilizó la prueba de Meyer, Wagner y Dragendorff para los alcaloides, la prueba de Shioda, Pew y el reactivo alcalino para los flavonoides. Para la determinación de saponinas se utilizó la prueba de Rosenthaler y espuma. Los taninos se determinaron con prueba de gelatina y prueba de cloruro férrico.

Las cumarinas se determinaron mediante la prueba de hidróxido de sodio. Se utilizó la prueba de Lieberman-Burchard para determinar los terpenoides. También se utilizó la prueba de Baljet, Legal, Keller-Kiliani y Grignard para glucósidos cardíacos.

3.9 Análisis espectroscópico de Infrarrojo

Se empleó la técnica de Espectroscopía de Infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Brunker, en el rango de longitud de 4000- 400 cm^{-1} y se utilizó la punta de líquidos. Este estudio se llevó a cabo en el Centro de Servicios de Alta Tecnología de UPAEP.

3.10 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C

Los análisis de RMN ^1H y ^{13}C se realizaron en un espectrómetro Varian- 400 (400 MHz) en una solución de CDCl_3 utilizando TMS como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan como δ en ppm a mayor frecuencia respecto al TMS, las constantes de acoplamiento se expresan como J y están dadas en Hz. Para la multiplicidad de las señales de un espectro de RMN ^1H , se utilizan las abreviaturas: s (simple), d (doble), t (triple), c (cuádruple), m (múltiple), dd (doble de doble). Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Ingeniería Química de la BUAP.

3.11 Ensayos de Citotoxicidad y Genotoxicidad

3.11.1 Preparación de las muestras

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio para determinar la CMI por el método de microdilución en placa se determinaron las concentraciones a evaluar de aceite esencial y metabolitos secundarios previamente identificados con actividad antimicrobiana. Se evaluaron tres concentraciones: una concentración base, el doble, la mitad y un cuarto de dicha concentración. Para ello, se pesaron los metabolitos correspondientes y realizó una emulsión con tween 20 y se agitó de manera vigorosa con una batidora braun de mano hasta su completa disolución en agua.

3.11.2 Bioensayo *Allium sativum*

Se utilizaron células meristemáticas de las raíces de *A. sativum* para evaluar las anormalidades nucleares (AN) y el índice mitótico (IM).

3.11.2.1 Selección de bulbos

Se seleccionaron bulbos orgánicos de *A. sativum* de tamaño uniforme de 3 cm de diámetro, consistencia firme, ausencia de afectaciones por podredumbre o deterioro, ausencia de daños causados por plagas que afecten al aspecto general del producto. Dichos bulbos fueron sometidos a la prueba de flotabilidad como control de calidad.

3.11.2.2 Cultivo de bulbos

Los bulbos se cultivaron en recipientes de vidrio de 50 mL de capacidad por 120 horas, con concentraciones de 1000, 1500 y 2000 ppm para el extracto y concentraciones de 2.5, 5, 10, 30 y 35 ppm para los metabolitos purificados, dichas concentraciones eran renovadas cada 24 horas y se mantuvieron a una temperatura de 18- 20 °C, como control se utilizó agua.

Finalizada la exposición, se midió la longitud y el número de tallos para posteriormente examinarlas y detectar anomalías morfológicas visibles, cambios en

la consistencia, así como el índice de toxicidad general mediante la presencia de ganchos o torsiones en las raíces (Çelik & Aslantürk, 2010).

En el siguiente diagrama de flujo 5 se muestra el proceso para las pruebas de citotoxicidad y genotoxicidad del extracto y metabolitos puros de *Zingiber officinale*.

3.11.2.3 Evaluación de raíces

Las células se fijaron con una mezcla de metanol-ácido acético (3:1). La hidrolización del ADN y su tinción se realizaron mediante la reacción de Feulgen. Se observaron 1000 células por lámina en un microscopio de campo claro a 100X para determinar los índices mitótico y de fases, así como el porcentaje de figuras mitóticas alteradas en la población meristemáticas como células binucleadas, picnosis, cromatina condensada, brotes nucleares y cariólisis.

En el siguiente diagrama de flujo 6 se muestra el proceso para la tinción de células meristemáticas de *A.sativum*.

Diagrama de flujo 5. Prueba de citotoxicidad y genotoxicidad de metabolitos puros y extracto clorofórmico de *Zingiber officinale* en *A. sativum*.

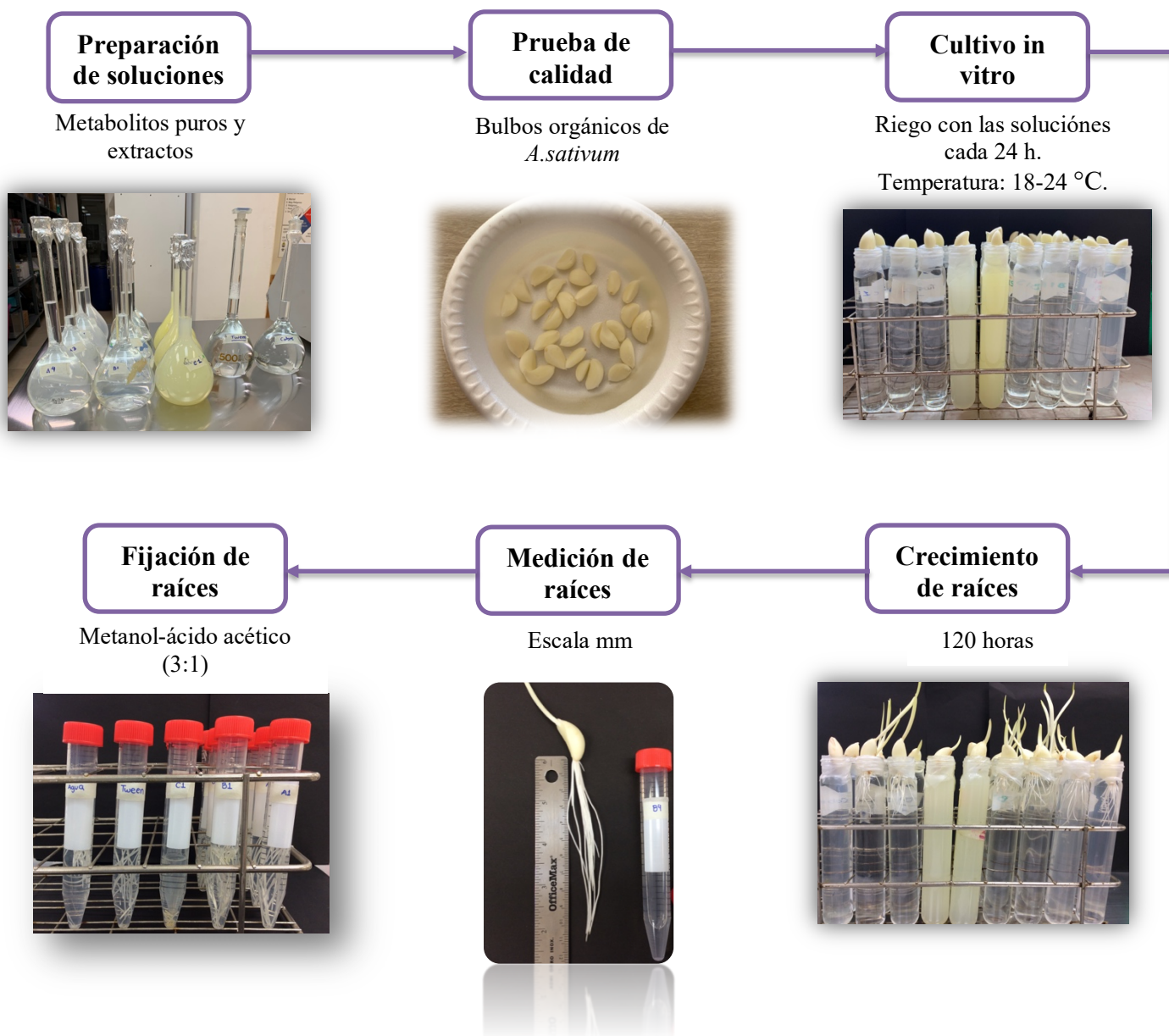
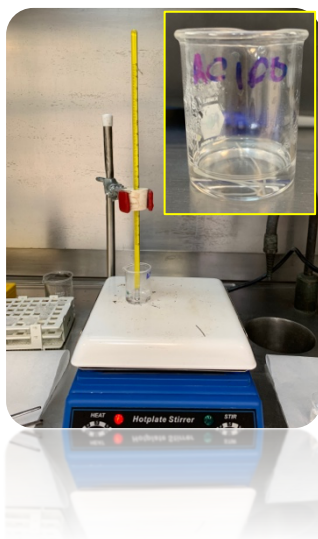


Diagrama de flujo 6. Tinción de células meristemáticas de *A. sativum* en las pruebas de de citotoxicidad y genotoxicidad.

Hidrolización del ADN

HCl 0.1M
30 min
60 °C



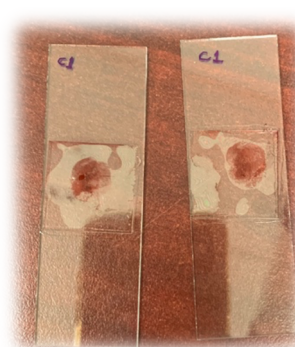
Tinción de raíces

Orceína acética-clorhídrica



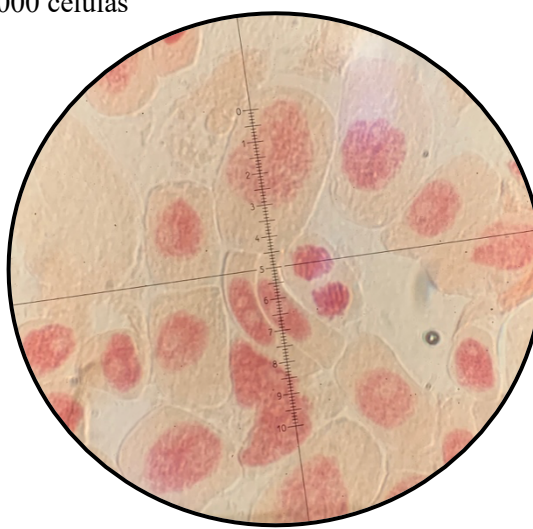
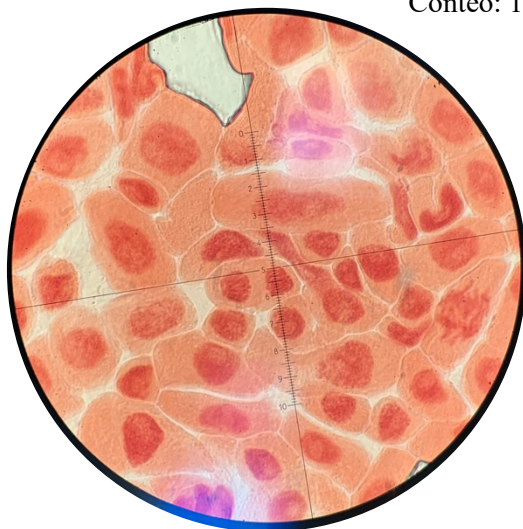
Fijación en porta objetos

Técnica de squash



Observación al microscopio

Objetivo 100X
Conteo: 1000 células



4 CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Identificación taxonómica

Los resultados de la identificación taxonómica realizada por Mphil Allen J. Coombes, curador del jardín botánico de la BUAP fueron los siguientes (tabla 8).

Tabla 8. Identificación taxonómica de los rizomas adquiridos para esta investigación.

Nombre científico	Familia
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe, Trans.Linn. Soc.London	Zingiberaceae

El documento otorgado por la dependencia se localiza en el anexo A.

4.2 Obtención de extractos

Se obtuvieron tres extractos de aceite esencial de *Zingiber officinale*, los cuales presentaron las siguientes características.

4.2.1 Extracto acuoso

El extracto presentó un aspecto turbio, color marrón con olor característico del jengibre.

4.2.2 Extracto etanólico

El extracto presenta un aspecto transparente, color amarillento y olor característico del jengibre y ligero olor a alcohol.

4.2.3 Extracto diclorometano

El extracto presenta un aspecto transparente, color ámbar y olor característico del jengibre y presencia ligera del olor del disolvente.

4.2 Identificación de metabolitos

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada extracto con los tres revelados: luz UV, molibdato y yodo.

4.2.1 Revelado con luz UV

Las placas de macerados agua y etanol fueron corridas en un sistema hexano-acetato de etilo 6:1, los metabolitos presentes en los macerados son compuestos polares que interactúan débilmente con la fase estacionaria, se logra observar su separación del punto de siembra, pero no se observan de forma muy definida en la placa al revelar con luz UV 254 nm. Fueron plaqueados y corridos en un sistema hexano-acetato de etilo (8:1), observando una mejor separación de bandas en luz UV 254 nm.

En el macerado con agua, no se logró apreciar la presencia de metabolitos, mientras que para el macerado con etanol se logran apreciar 3 bandas separadas poco definidas y otras más agrupadas en el inferior.

En el macerado con diclorometano se logran apreciar 6 metabolitos, de los cuales 2 se observan como bandas grandes intensas y 4 se observan como bandas pequeñas no tan intensas. En la siguiente figura 3 se muestra el revelado de placas TLC sílica gel con luz UV 254 nm.

4.2.2 Revelado con Molibdato

4.2.2.1 Extracto Agua

No se logró apreciar la presencia de metabolitos.

4.2.2.2 Extracto Etanol

Se pueden apreciar 3 bandas grandes, intensas y definidas con R_f : 0,97 , 0,72 y 0,57 ; las 2 primeras también se observaron con luz UV 254 nm, mientras que la tercera solo se observó con este revelador.

4.2.2.3 Extracto Diclorometano

En el macerado con diclorometano se pueden observar 8 bandas, de las cuales destaca una 1 banda grande, intensa y definida en el borde superior con R_f 0,87. Por debajo de esta, se observan una banda pequeña, tenue y poco definidas con R_f 0,72.

Se observan dos bandas pequeñas, intensas y definidas con R_f : 0,35 y 0,42; esta última fue observada con un tamaño mayor en luz UV probablemente en esta banda se encontraban dos metabolitos, de los cuales, solo uno reaccionó con molibdato.

Así como 4 bandas pequeñas con R_f : 0,62 , 0,52 , 0,47 , 0,37.

En la siguiente figura 3 se muestra el revelado de placas TLC sílica gel con molibdato.

4.2.3 Revelado con yodo

4.2.3.1 Extracto Agua

No se logró apreciar la presencia de metabolitos.

4.2.3.2 Extracto Etanol

Se pueden observar bandas en el borde inferior, sin embargo las bandas observadas en luz UV 254 nm no se observan utilizar este revelador, por lo que los metabolitos presentes no reaccionaron con el yodo.

4.2.3.3 Extracto Diclorometano

Se observan 6 bandas, de las cuales destaca una 1 banda grande, intensa y definida en el borde superior con R_f 0,84 ; la cual es observada al revelar con UV 254 nm y

Molibdato. Se puede observar la presencia de bandas no tan intensas pero juntas a lo largo de la placa.

Se identifican 3 bandas pequeñas y no tan intensas con R_f 0,61 , 0,41 y 0,25. Las cuales fueron previamente identificadas con UV 254 nm, sin embargo una de ellas (R_f 0, 41) se observa con un tamaño mayor, probablemente en esta banda se encontraban dos metabolitos, de los cuales, solo uno reaccionó con yodo.

En la siguiente figura 3 se muestra el revelado de placas TLC sílica gel con yodo.

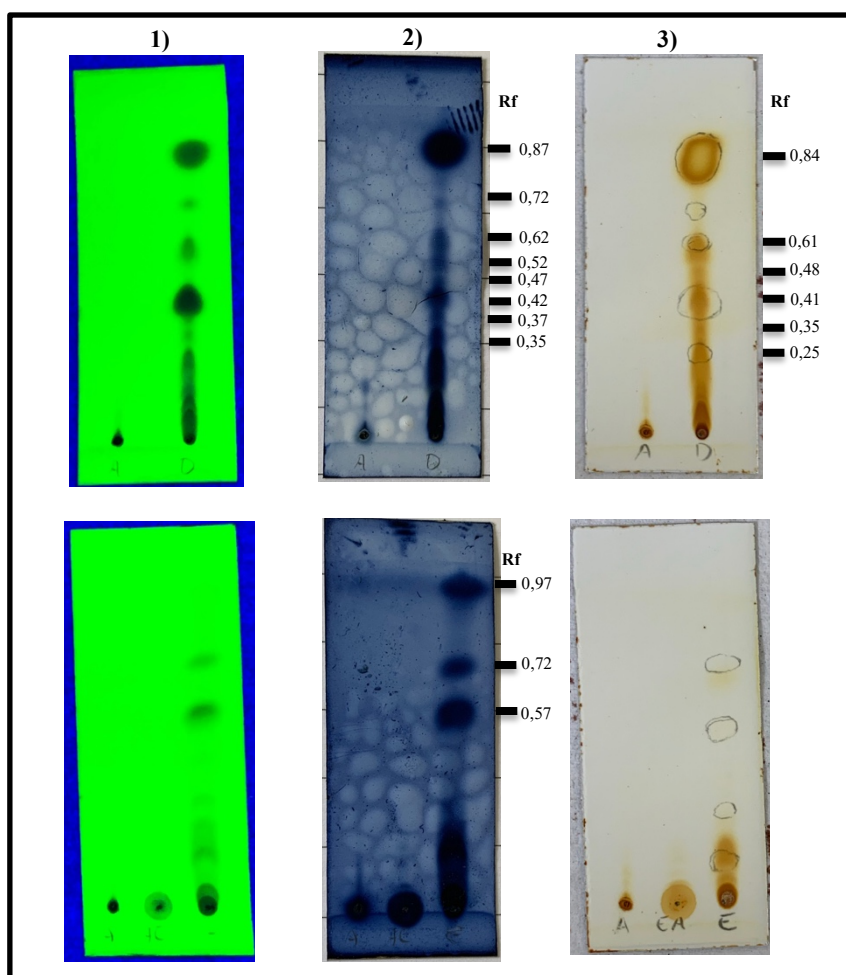


Figura 3: Revelado de placas. TLC sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck kGaA), Placas de aluminio de 2x 5 cm, sistema hexano-acetato de etilo 8:1. Reveladores: 1) UV 254 nm, 2) Molibdato de amonio, 3) Yodo. Las muestras corresponden a: A (extracción con agua), D (extracción con diclorometano), E (extracción con etanol).

4.3 Purificación

Debido a la presencia de más metabolitos en TLC de los extractos con diclorometano, se decidió purificarlos. En la primer corrida con hexano se logra apreciar una banda ancha, intensa y definida en el borde superior (R_f 0,96). También se observa la presencia de bandas intensas y juntas en el borde inferior (Figura 4).

En la segunda corrida con hexano se logra observar una banda tenue y estrecha por debajo de la banda intensa, vista en la primera corrida. Además se observa una progresiva separación de las bandas vistas en el borde inferior (Figura 4).

En la tercera corrida con hexano se observan tres bandas de diferente intensidad en el borde superior, sin embargo la separación entre ellas es mínima. Se observa una progresiva separación de los metabolitos presentes en el borde inferior, aunque no es la adecuada para la extracción de estos (Figura 4).

La corrida con el sistema Hexano-acetato de etilo 9:1 se realiza hasta tres cuartas partes de la placa, para evitar el empalme con los metabolitos presentes en el borde superior. Se observa la presencia de bandas aunque no completamente aisladas.

La purificación se realizó a ocho metabolitos con los siguientes R_f : 0,2 , 0,23 , 0,29 , 0,42 , 0,56 , 0,61 , 0,70 , 0,73 , 0,96 .

En la siguiente figura 5 se observa la placa de purificación con los metabolitos aislados.

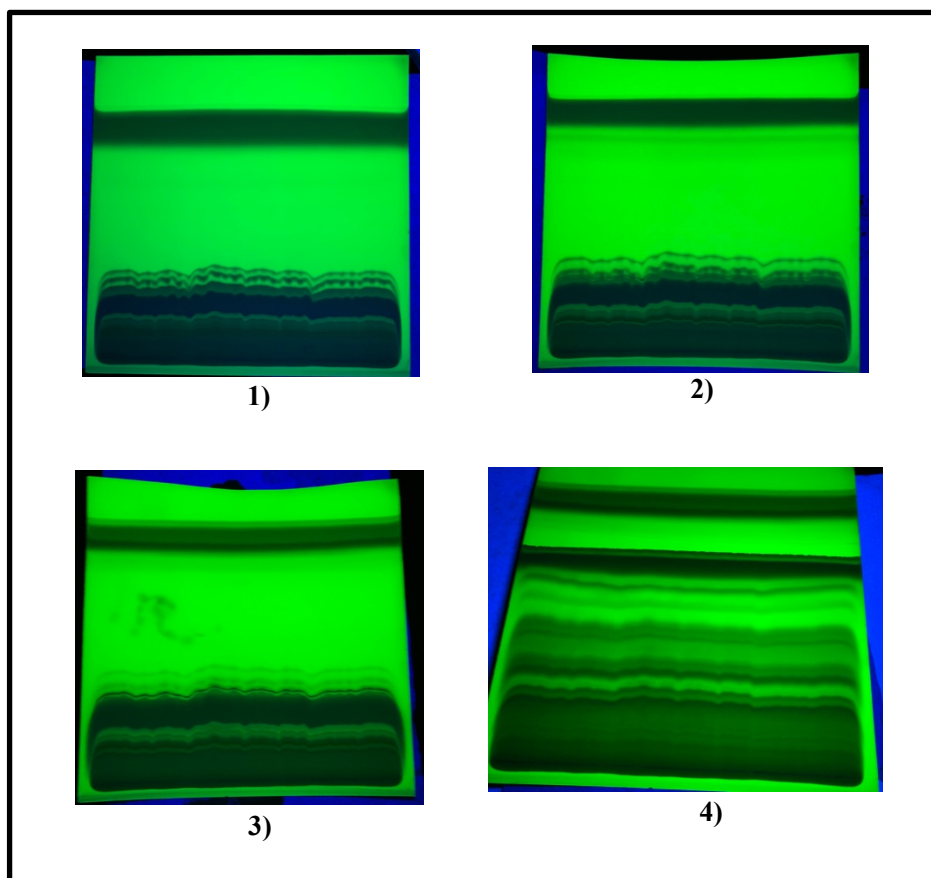


Figura 4 . Purificación de metabolitos.

Corridas realizadas :

1) Hexano 2) Hexano 3) Hexano 4)Hexano-acetato de etilo 9:1

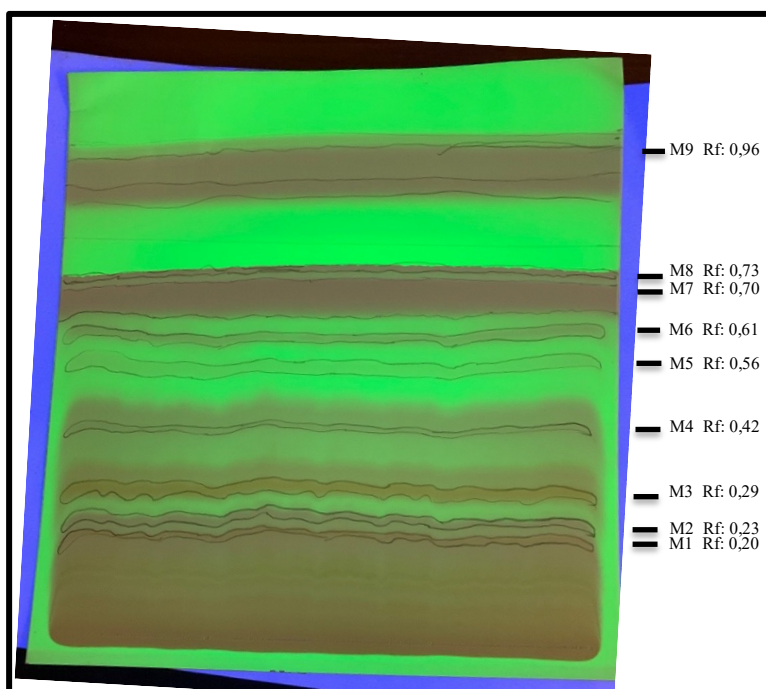


Figura 5. Metabolitos identificados para aislamiento.

4.4 Rendimiento de extracción

Se obtuvieron valores medios del rendimiento del aceite esencial de *Zingiber officinale* por el método de maceración, los cuales fueron de 4.3% para el agua, 0.49% para el etanol y 1.04% para el diclorometano (Tabla 1).

Los rendimientos obtenidos para la extracción con etanol y diclorometano concuerdan con la literatura, ya que para aceites esenciales los rendimientos varían de 0.5 al 2%.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias del rendimiento de extracción entre etanol y diclorometano ($P < 0.0001$).

Aunque el extracto acuoso presenta un rendimiento superior al reportado en la literatura, este no concuerda con las características del aceite esencial.

El valor reportado se debe a la presencia de otros componentes presentes en el rizoma que lograron ser extraídos por el agua, ya que los métodos cromatográficos utilizados no revelan la presencia de metabolitos secundarios en este extracto.

Tabla 9. Rendimiento de extracción de aceite esencial de *Zingiber officinale*.

Disolvente	Rendimiento %
Agua	4.3 ^a
Etanol	0.49 ^b
Diclorometano	1.04 ^c

Las medias que comparten letra no muestran diferencias significativas ($P < 0.05$)

4.5 Pruebas fitoquímicas

Las pruebas fitoquímicas para el extracto clorofórmico muestran la presencia de flavonoides, taninos, triterpenos y glucósidos cardiotónicos.

Las pruebas fitoquímicas y FTIR de los metabolitos aislados corresponden a triterpenos y flavonoides, los cuales se han identificado como los componentes principales. Los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas se pueden observar en la siguiente tabla 2.

Tabla 10. Pruebas fitoquímicas del extracto y metabolitos de *Zingiber officinale*.

Metabolito secundario	Técnica	Extracto clorofórmico	M1	M4	M8	M11
Alcaloides	Meyer	-	-	-	-	-
	Wagner	-	-	-	-	-
	Dragendorff	-	-	-	-	-
Flavonoides	H ₂ SO ₄	+	-	-	-	+++
	NaOH	+	+	-	-	-
	Pew's	-	-	-	-	-
	Shioda	-	-	-	-	-
Saponinas	Prueba de espuma	-	-	-	-	-
	Rosenthaler	-	-	-	+	-
Cumarinas	NaOH 10%	-	-	-	-	-
Taninos	FeCl ₃	+++	-	-	-	-
	Gelatina	++	-	-	-	-
Triterpenos o esteroides	Lieberman-Burchard	+++	-	+	+	-
Glucósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas	Baljet	+	-	-	-	-
	Legal	+	-	-	-	-
	Keller-Kiliani	+	-	-	-	-
	Grignard	+	-	-	-	-

4.6 Análisis espectroscópico de Infrarrojo

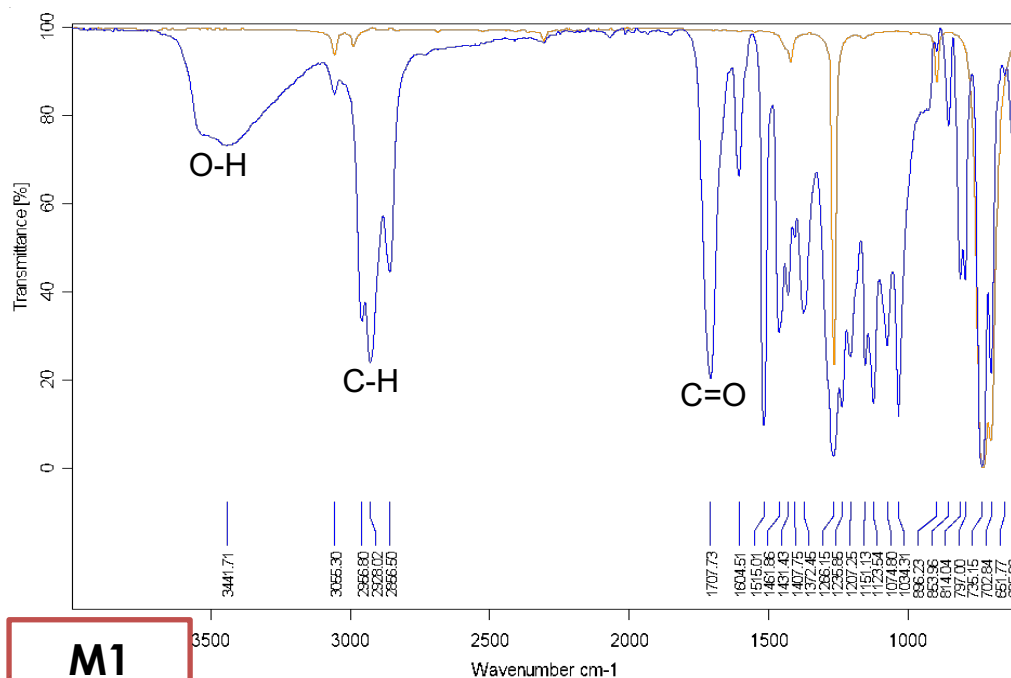
De acuerdo a los espectros FT-IR, el metabolito M1 presentó bandas de absorción a 3441,71 y por arriba de 3000cm⁻¹ que indica la presencia de un grupo -OH y enlaces C-H saturados correspondientes a grupos alcanos. Mientras que la banda de absorción en 1707,73cm⁻¹ corresponde al grupo carbonilo (C=O), el cual es característico en compuestos como el ginerol y shogaol, los componentes principales en los extractos de *Zingiber officinale*.

Las bandas observadas entre 1604,51 y 1461,86 cm⁻¹ son características del estiramiento C=C de carbonos con hibridación sp².

Los espectros FT-IR para los metabolitos M4, M8 y M11 muestran bandas de absorción entre 3500-3000cm⁻¹ correspondiente a grupos OH, los cuales están presentes en fenoles o alcoholes. Las bandas presentes en 3300-2850 representan los enlaces C-H saturados.

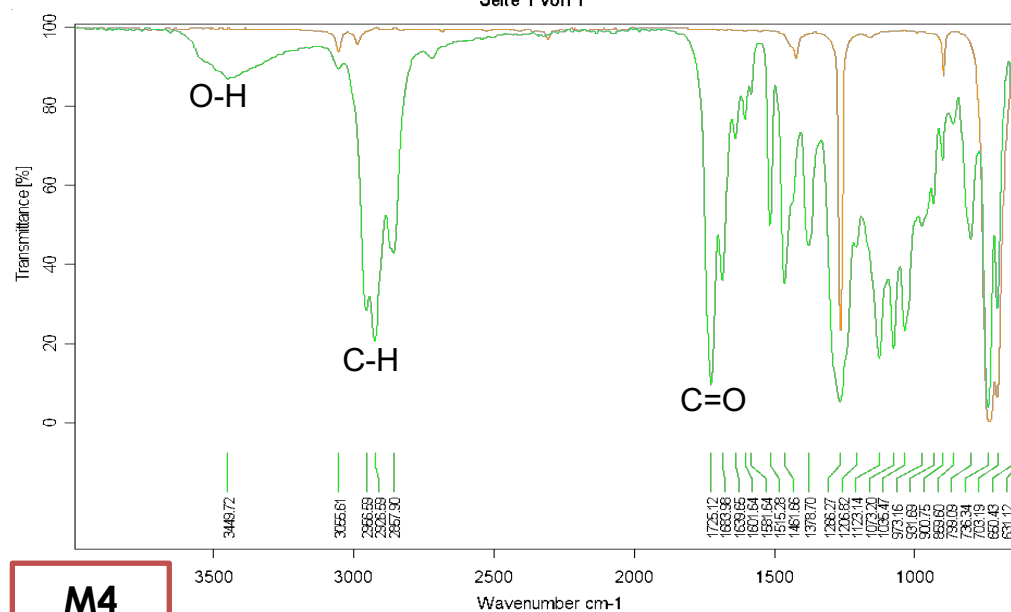
Alrededor de 1750-1680 cm⁻¹ se observan bandas de absorción del grupo carbonilo (C=O), siendo el metabolito 11 el que presenta menor intensidad. Así mismo, la presencia de bandas en 1600-1450 cm⁻¹ y 1460-1370 cm⁻¹ representan la tensión de enlaces C=C de anillos aromáticos o grupos alifáticos y la flexión de enlaces C-H de los grupos CH₃ y CH₂ respectivamente.

En las siguientes figuras 6 y 7 se muestran los espectros de FT-IR para los metabolitos M1, M4, M8 y M11.



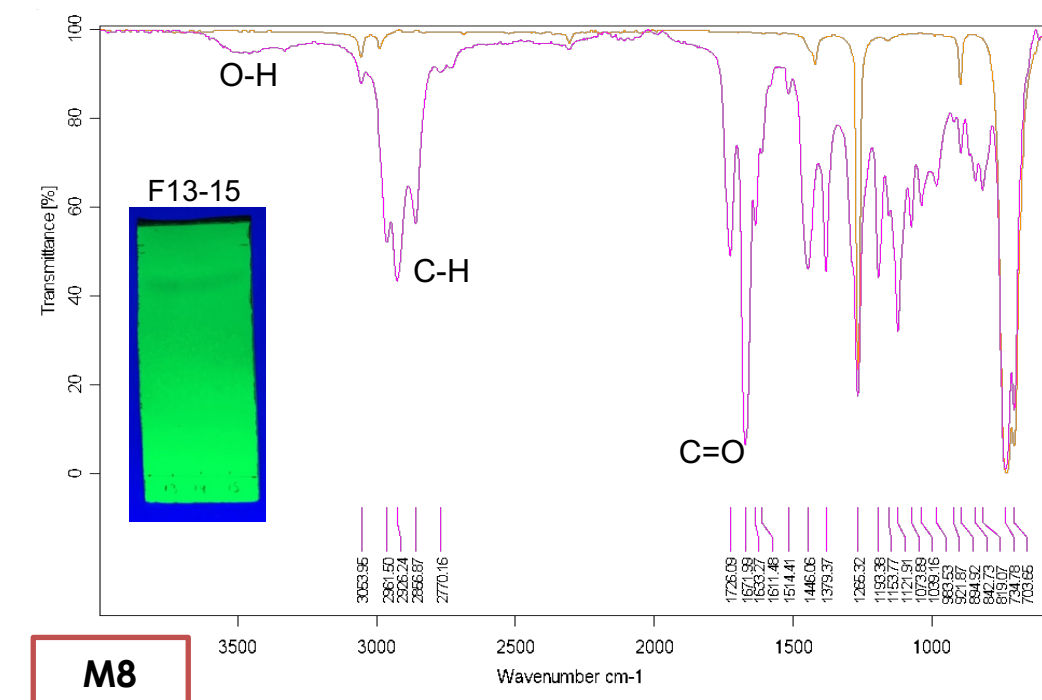
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2020\QF20-072 Jengibre 1.0	QF20-072 Jengibre 1	Lectura directa	25/11/2020
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2006-2019\2019\Diclorometano.0	Diclorometano	Lectura directa	21/11/2019

Seite 1 von 1

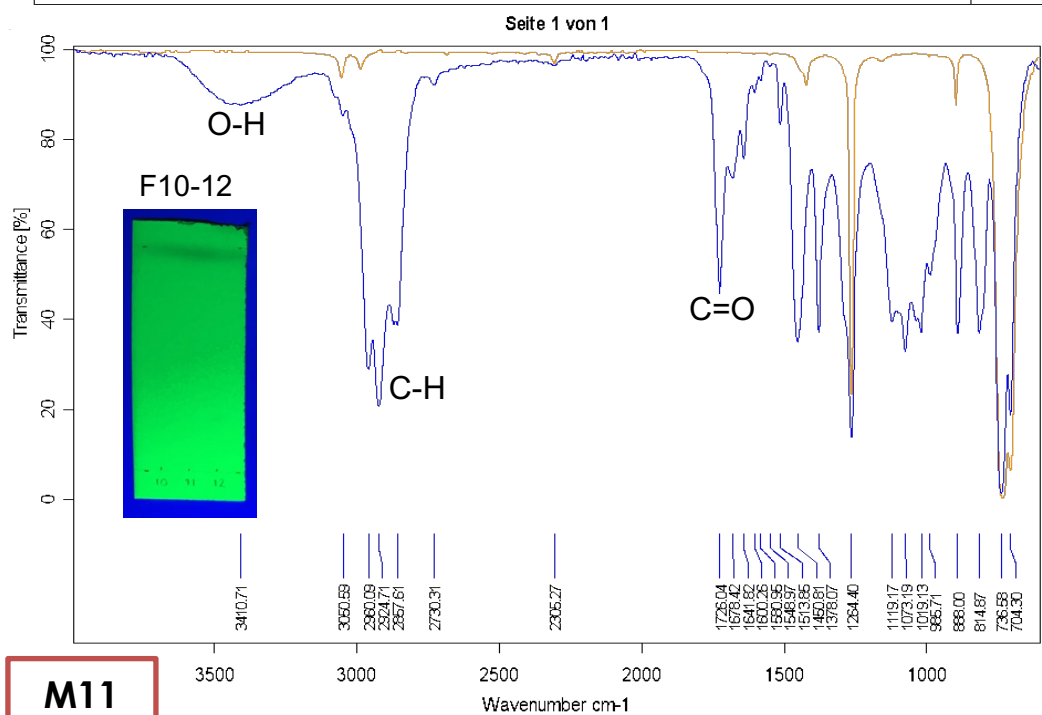


C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2020\QF20-074 Jengibre 4.0	QF20-074 Jengibre 4	Lectura directa	25/11/2020
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2006-2019\2019\Diclorometano.0	Diclorometano	Lectura directa	21/11/2019

Figura 6. Espectro FT-IR metabolito 1 y metabolito 4. Espectro obtenido en equipo Brunker, en el rango de longitud de 4000-400 cm-1. M1:Metabolito 1 (azul), M4:Metabolito 4 (verde) , solvente de extracción: diclorometano (naranja).



C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2020\QF20-066 Jengibre 8.0	QF20-066 Jengibre 8	Lectura directa	18/11/2020
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2006-2019\2019\Diclorometano.0	Diclorometano	Lectura directa	21/11/2019



C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2020\QF20-064 Jengibre 11.0	Jengibre 11	Lectura directa	18/11/2020
C:\Documents and Settings\vertex70\My Documents\espectros modificados\2006-2019\2019\Diclorometano.0	Diclorometano	Lectura directa	21/11/2019

Figura 7. Espectro FT-IR metabolito 8 y metabolito 11. Espectro obtenido en equipo Brunker, en el rango de longitud de 4000-400 cm⁻¹ . M8:Metabolito 8 (lila), M11:Metabolito 11 (azul) , solvente de extracción: diclorometano (naranja).

4.7 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear ^1H y ^{13}C

6-shogaol Pale yellow oil; ^1H NMR (400MHz) δ : 0.8-0.9 (m, H19 and H20), 2.16 (1H, s, H8), 2.21 (3H, t, H10), 2.57 (3H, t, H11), 5.87 (d, H15), 9.98 (1H, dd, H14). ^{13}C NMR (400 MHz) δ : 17.59 (C-20), 25.07 (C-19), 25.73 (C-18), 29.71 (C-17), 40.61 (C-16), 132.92 (C-15), 163.38 (C-12). 191.32 (C-14).

Una de las principales moléculas propuestas que esperamos encontrar es el 6-shogaol. La característica principal de esta molécula que la diferencia de su análogo el 6-gingerol, es la presencia del doble enlace en el C14-C15. Una de las señales características de esta molécula es la presencia del grupo carbonilo y el doble enlace en el carbono 14-15. En la figura 8 se muestra la multiplicidad de las señales para el 6-shogaol.

En el espectro de ^1H RMN se lograron asignar 7 señales correspondientes a esta molécula, en las figuras 10, 11, 12 y 13 se pueden visualizar los desdoblamientos de estas señales y la asignación a los protones de los carbonos a los que pertenecen. Los protones del carbono 14 tienen un desdoblamiento complejo porque los protones tienen dos tipos diferentes de vecinos. La cercanía con el grupo carbonilo genera un movimiento de los hidrogenos vecinos del carbono 11 y 15 propiciado la detección de una sola señal. La señal esperada sería un doblete, sistema ax_2 , pero este doblete se divide a su vez en otras dos señales generando una señal doble dobleteada o doble de dobles a un desplazamiento de 9.98 ppm en el espectro de ^1H NMR. Esta señal se puede visualizar en la figura 9.

Mientras que en el espectro de ^{13}C RMN se observan diversas señales, lo que nos indica que no se trata de una molécula con una cadena hidrocarbonada pequeña. A campos altos se realizó la asignación de los carbonos C16-C20, mientras que las señales ubicadas entre los desplazamientos 120-130 ppm encontramos los carbonos aromáticos. Las señales ubicadas a un desplazamiento a 191 y 132 ppm corresponden al carbono 14 y 15 respectivamente y la señal correspondiente al grupo carbonilo se ubica a campos bajos, a un desplazamiento de 163 ppm. Estos resultados son similares

a los publicados por Sang *et al.*, (2009). Este espectro de RMN ^{13}C se puede visualizar en la figura 14.

También se realizó un espectro de resonancia en dos dimensiones o COSY, en el que podemos ver la interacción de las señales de los protones; esta interacción surge cuando dos tipos distintos de protones están lo suficientemente cerca que sus campos magnéticos influyen entre sí. Ambas señales se relacionan entre sí mediante el paralelogramo, esto nos indica que pertenecen a 1H 's vecinales que están acoplados entre sí. Con el se relacionan las 2 señales a 10 ppm y 6 ppm, es decir los 1H 's del doble enlace C14-C15. Este paralelorograma se puede visualiar en la figura 15.

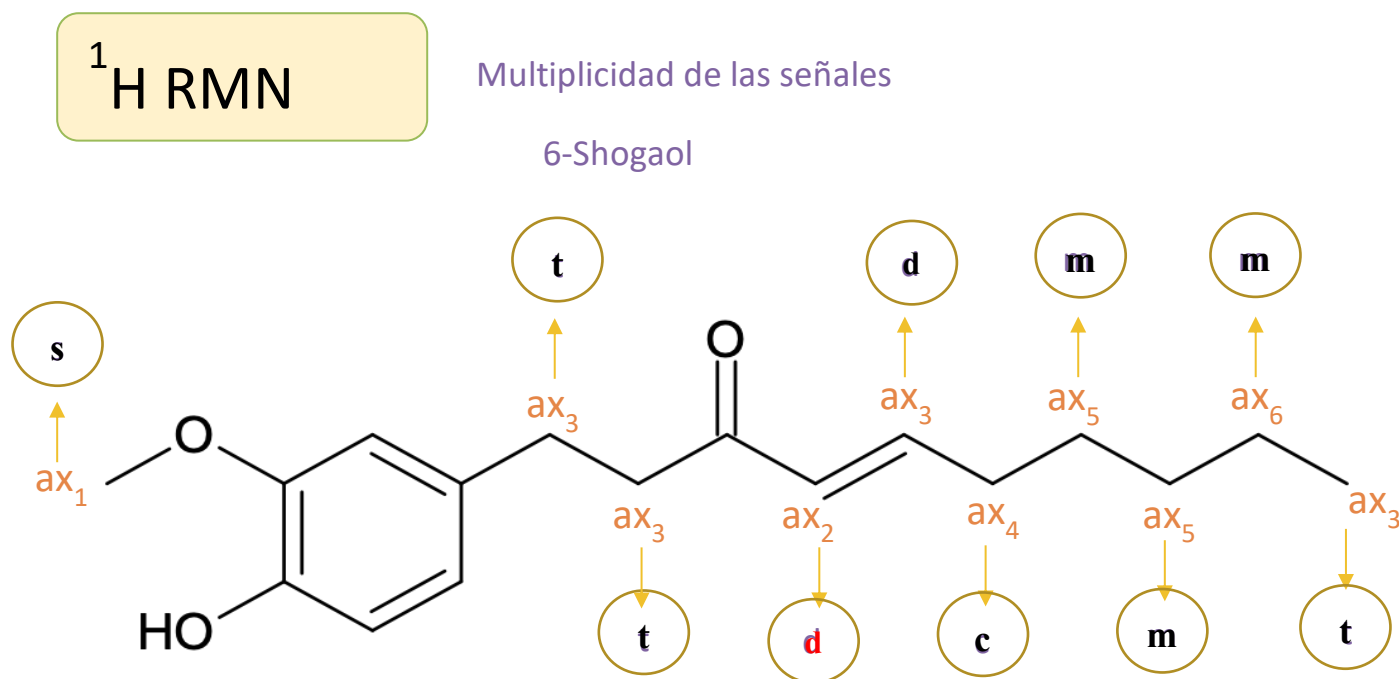


Figura 8. Multiplicidad de las señales 6-shogaol en Resonancia Magnética Nuclear ^1H .

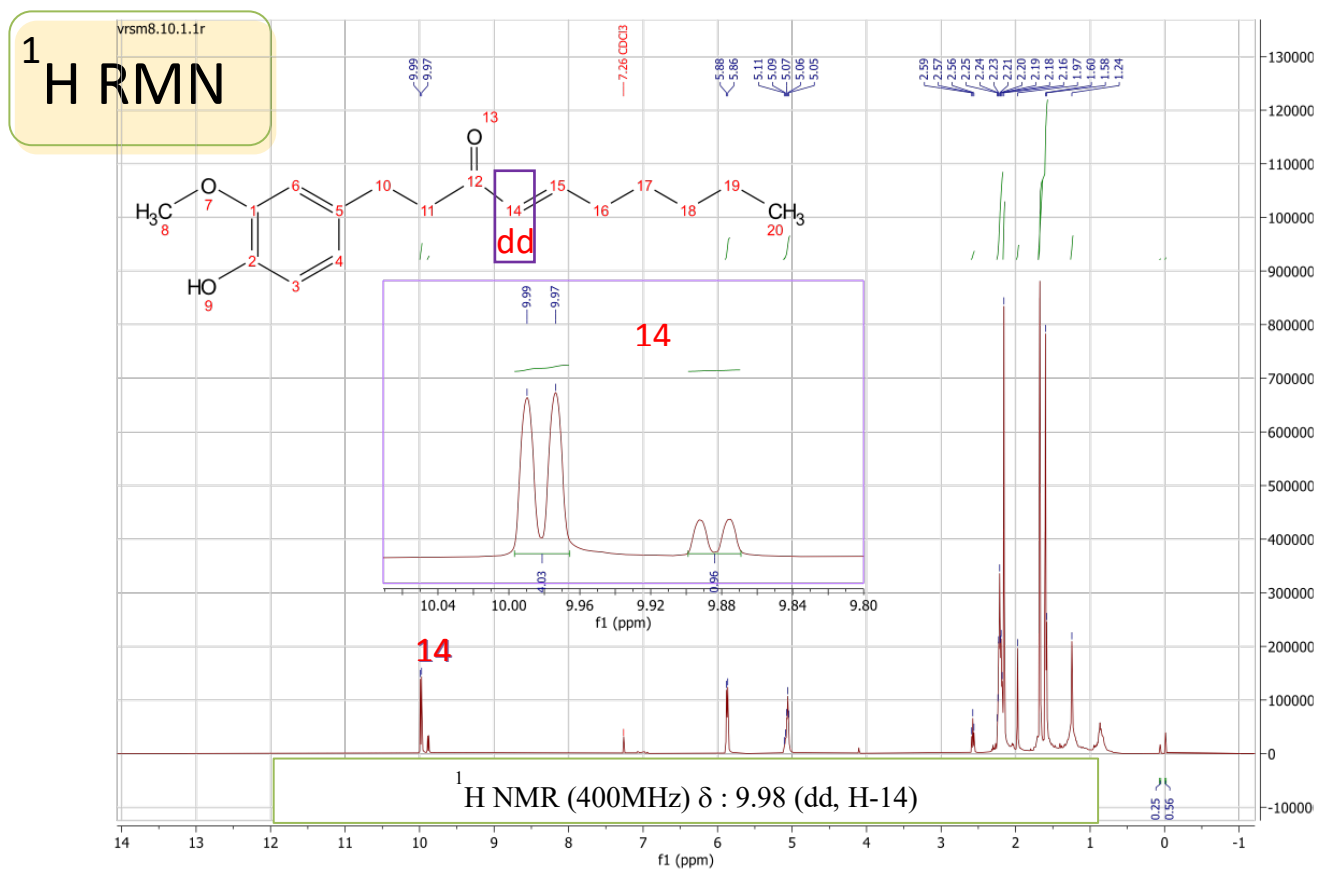


Figura 9. Ampliación de la señal del C14 del 6-shogaol en Resonancia Magnética Nuclear ¹H.

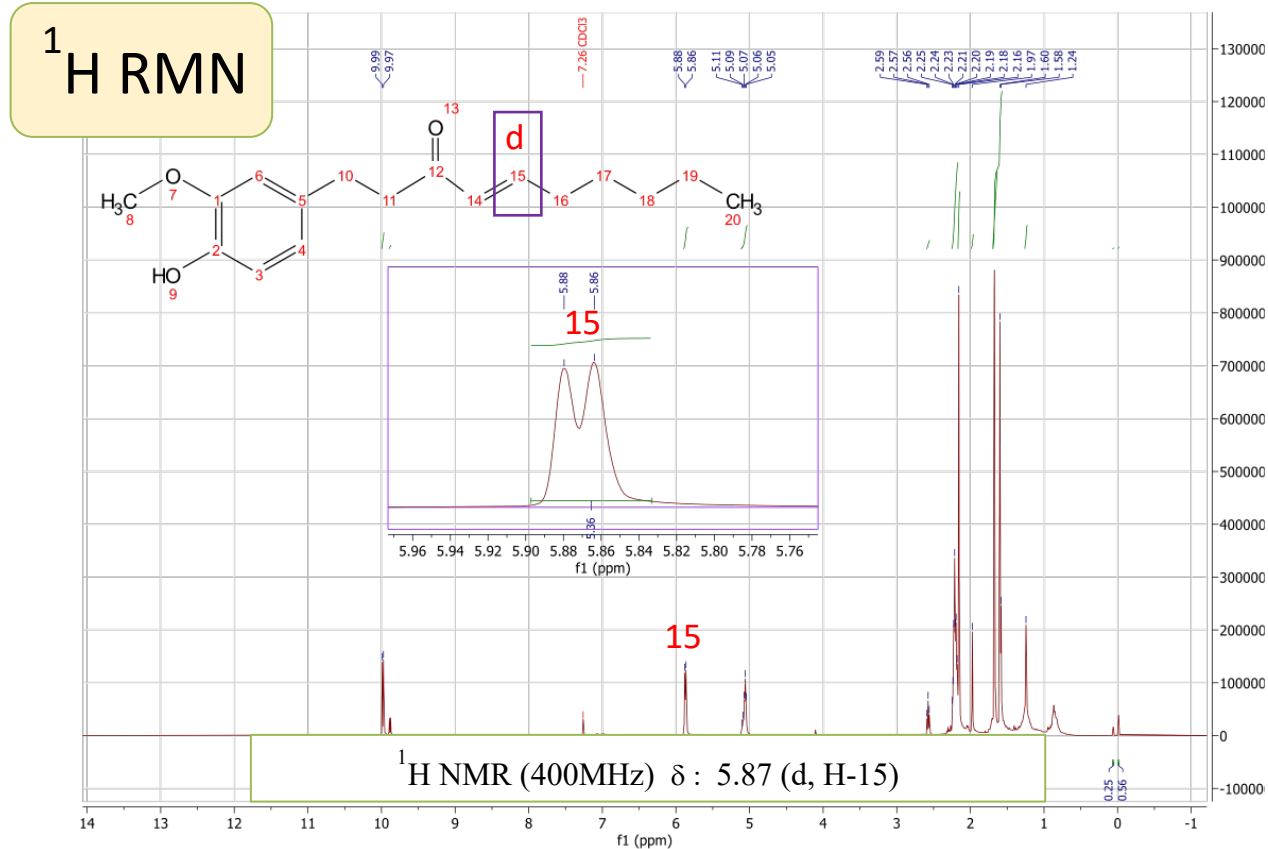


Figura 10. Ampliación de la señal del C15 del 6-shogaol en Resonancia Magnética Nuclear ¹H.

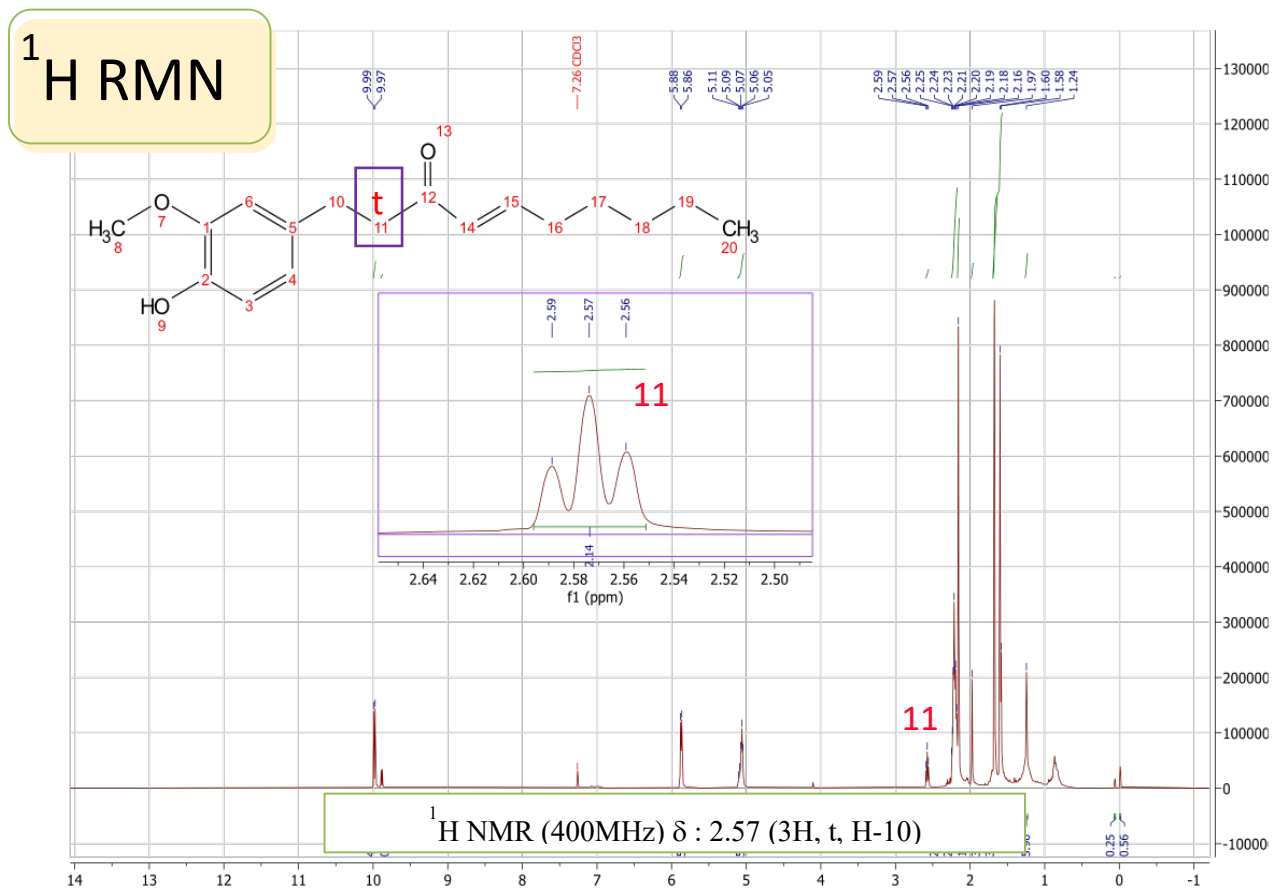


Figura 11. Ampliación de la señal del C11 del 6-shogaol en Resonancia Magnética Nuclear ^1H .

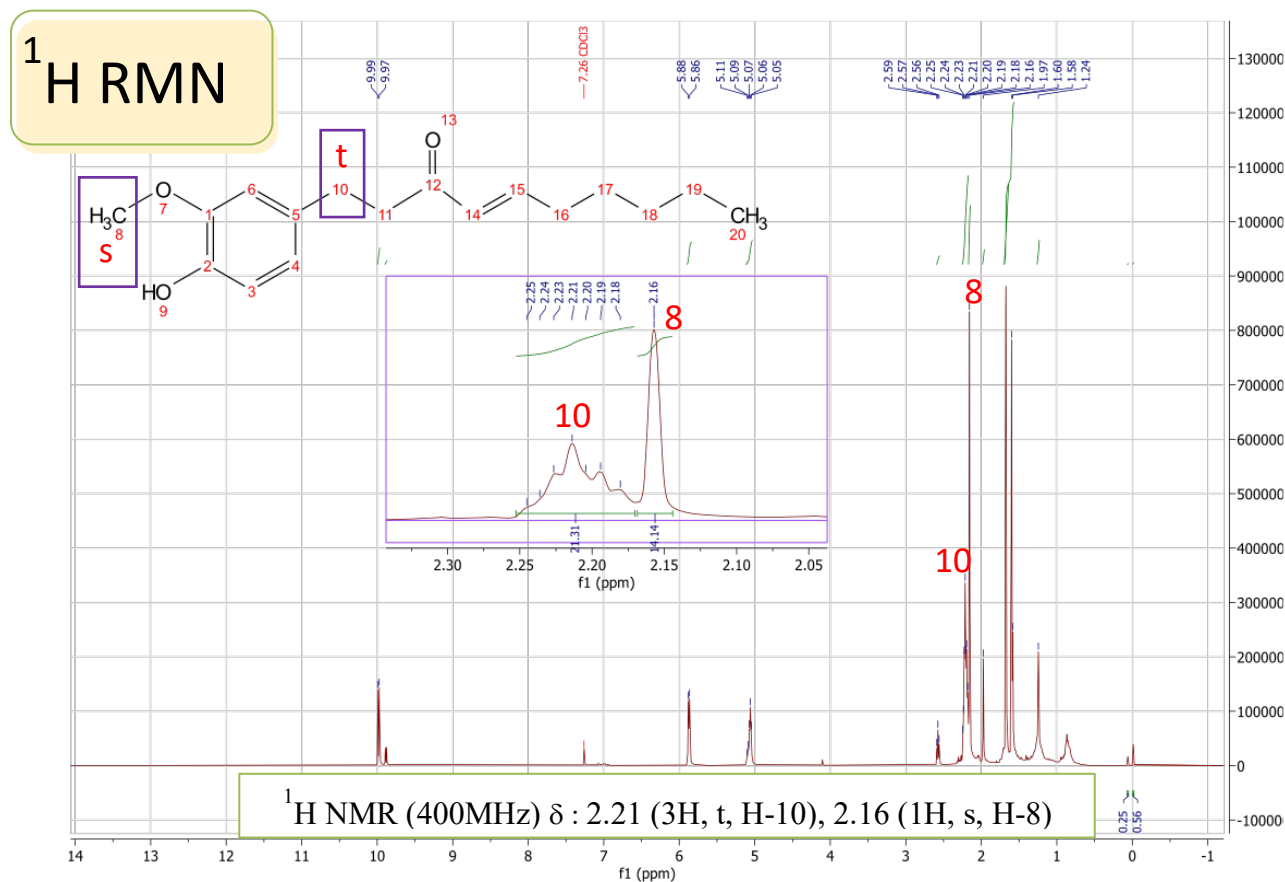


Figura 12. Ampliación de la señal del C10 y C8 del 6-shogaol en Resonancia Magnética Nuclear ^1H .

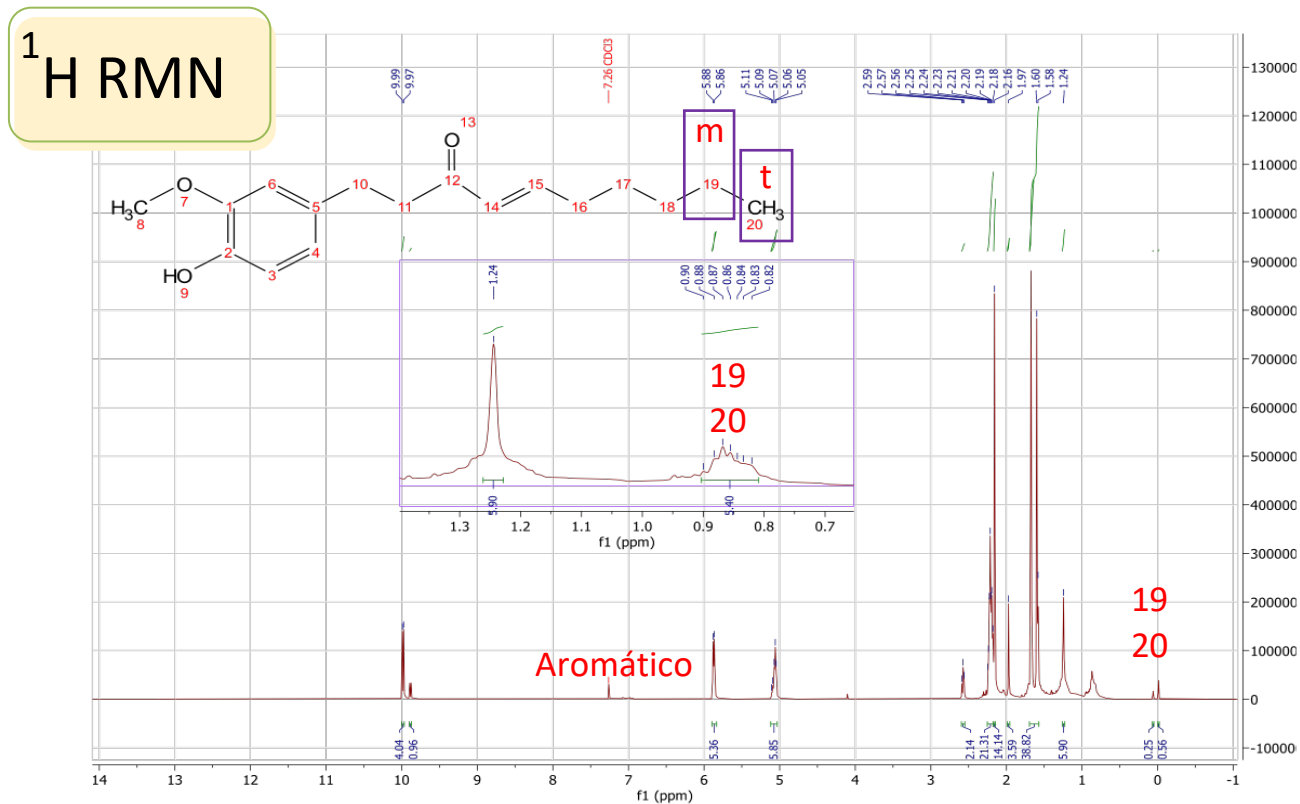


Figura 13. Ampliación de la señal del C10 y 20 del 6-shogaol en Resonancia Magnética Nuclear ^1H .

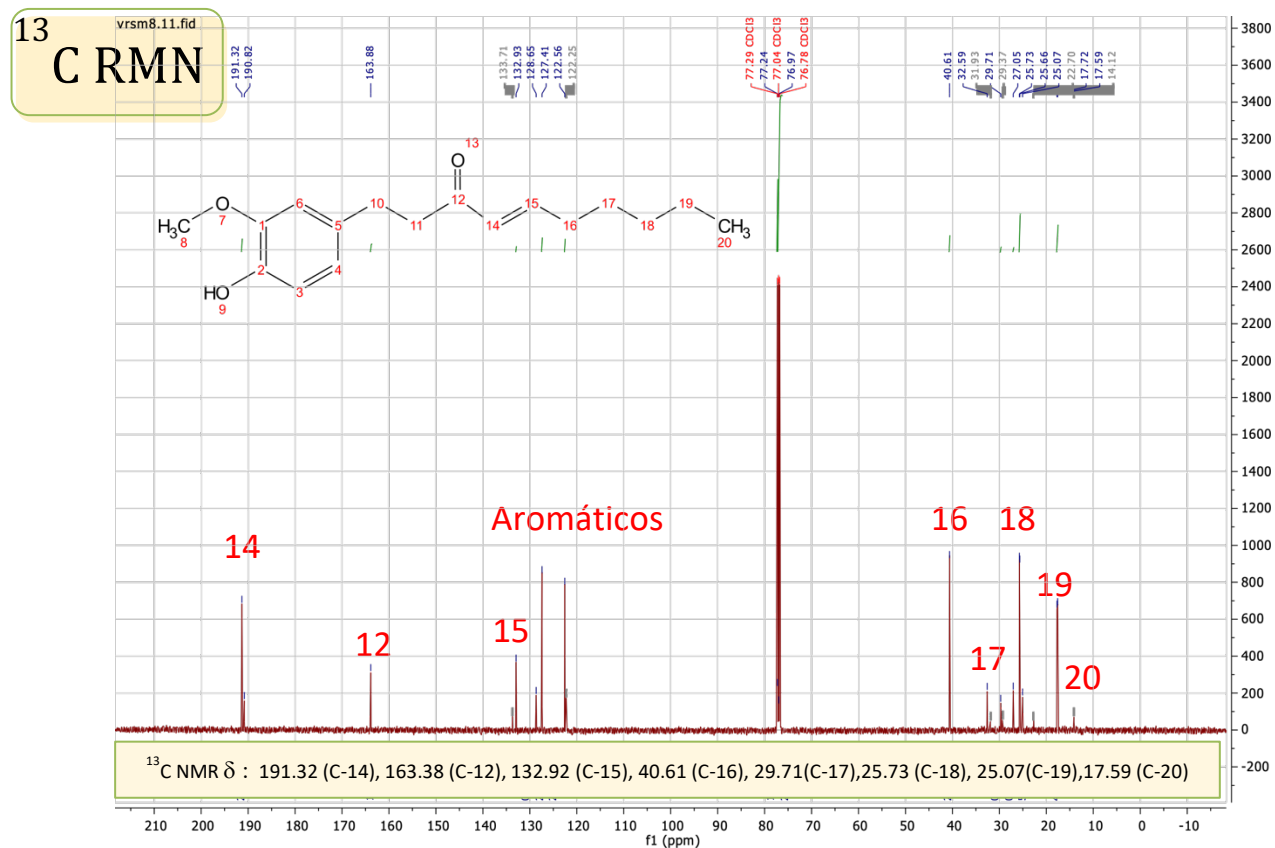


Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C del 6-shogaol.

COSY RMN-2D

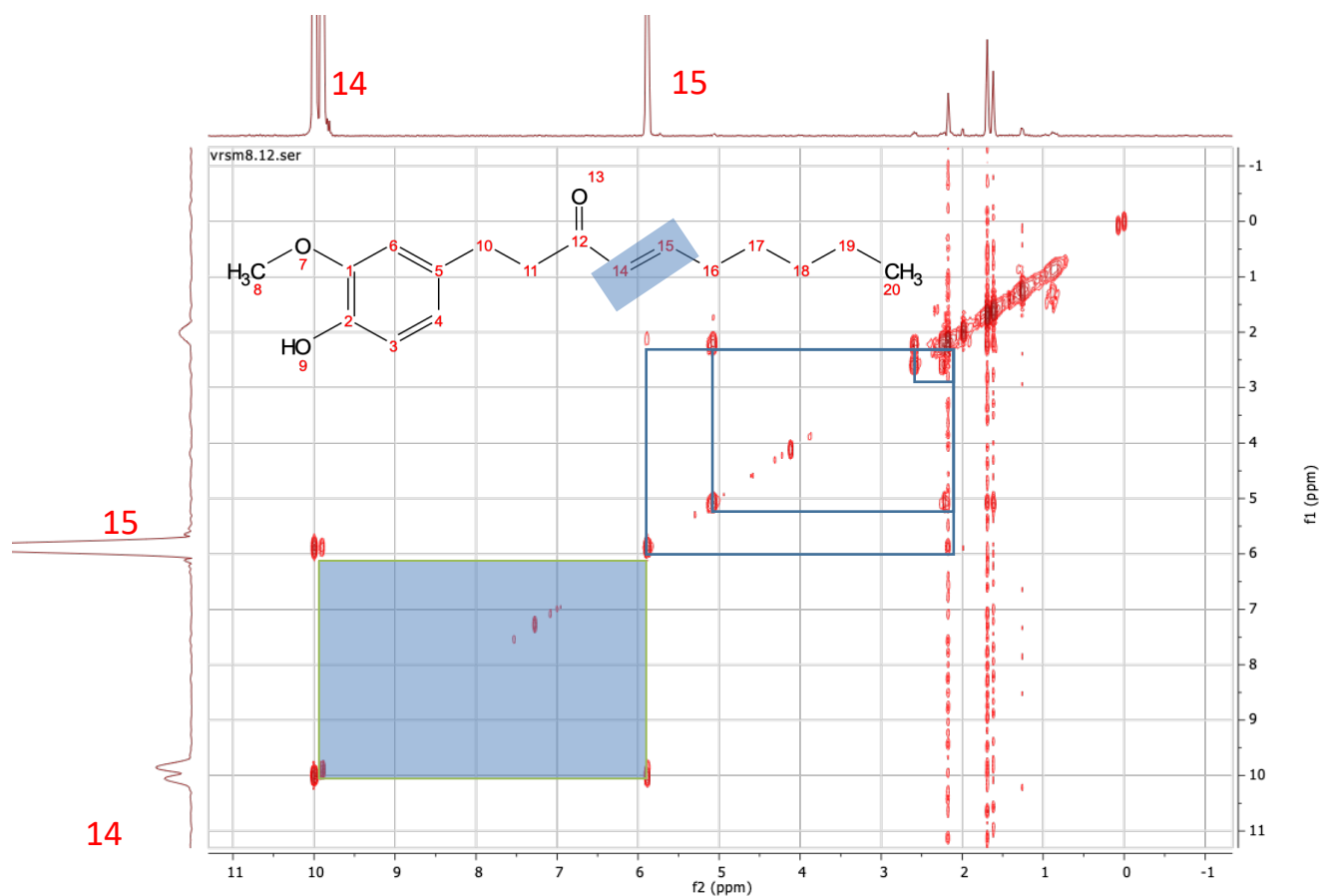


Figura 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear COSY del 6-shogaol.

4.8 Pruebas de susceptibilidad

El extracto clorofórmico de *Zingiber officinale* presenta actividad antimicrobiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto para *P. aeruginosa* y *S. haemolyticus*. La susceptibilidad antimicrobiana que presenta va de resistente a intermedio, estos resultados se pueden visualizar en la siguiente tabla 8.

El metabolito M11 presenta actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos con halos de inhibición mayores a 8 mm, excepto contra *P. aeruginosa*. La susceptibilidad es intermedio a sensible.

Los metabolitos M1, M4 y M8 presentan actividad frente a cinco microorganismos, los halos de inhibición son mayores a 10 mm para el metabolito 1 y 8 frente a *C. orthopsilosis* y *C. tropicalis* respectivamente.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos contra los diferentes géneros de *Candida* y para *S. haemolyticus*. Dichas diferencias estadísticamente significativas están representadas en los gráficos de la figura 16.

El metabolito M4 presenta una susceptibilidad frente *S. epidermidis* de tipo sensible, mientras que el metabolito M8 presenta potencial antimicrobiano frente a tres tipos de *Candidas*, siendo *C. tropicalis* la que es sensible frente a este tratamiento.

A pesar de no observar potencial antimicrobiano del extracto y metabolitos frente a la cepa nosocomial de *P. aeruginosa*, se observó la generación de una pigmentación azul conocida como piocianina en la cepa ATCC. La piocianina es una toxina secretada como mecanismo de virulencia y su producción en las placas pudo verse influenciada por la presencia de estos metabolitos.

El análisis estadístico refleja diferencias estadísticamente significativas en las medias de los halos de inhibición de *S. haemolyticus* entre los tratamientos con los metabolitos M8 y M11 ($P = 0.0143$).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias de los halos de inhibición de *C. orthopsilosis* entre el tratamiento con el metabolito M1 y los

tratamientos con el extracto ($P = 0.0047$), metabolito M4 ($P = 0.0047$), metabolito M8 ($P = 0.0125$) y el metabolito M11 ($P = 0.0404$).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias de los halos de inhibición de *C. tropicalis* entre el tratamiento con los metabolitos 1 y 8 ($P = 0.0270$) y el tratamiento con el metabolito 8 y 11 ($P = 0.0495$).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las medias de los halos de inhibición de *C. albicans* entre los tratamientos con el metabolito 1 y 8 ($P = 0.0252$).

Tabla 11. Actividad antimicrobiana del extracto y metabolitos aislados de los rizomas de *Zingiber officinale*.

Microorganismo	Sensibilidad					P
	Extracto	M1	M4	M8	M11	
Bacterias						
<i>S. aureus</i> CE12/04	R	R	I	R	S	0.0227
<i>S. aureus</i> ATCC	R	R	R	-	I	0.0128
<i>S. haemolyticus</i> 619630	-	-	R	R	I	< 0.0001
<i>S. hominis</i> 62284LCR	R	-	R	-	R	0.3536
<i>S. epidermidis</i> 62347D	I	-	I	-	I	0.1925
<i>S. capitis</i> 72107H	I	-	-	I	S	0.3852
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	S	S	S	S	S	0.0013
<i>P. aeruginosa</i> 62366F	-	-	-	-	-	-
Levaduras						
<i>C. orthopsilosis</i> 619/9H	R	S	R	I	I	0.0040
<i>C. tropicalis</i> 619310	I	R	-	S	I	0.0286
<i>C. albicans</i> 619150	R	R	-	I	I	0.0280
<i>C. albicans</i> ATCC	R	R	-	I	I	0.0635
<i>C. parapsilosis</i> 62231H	R	-	-	-	I	< 0.0001
<i>C. lusitaniae</i> 71855F-3	R	R	-	-	I	0.0515
<i>C. krusei</i> 72309F	I	-	-	S	S	0.0010
<i>C. catenulate</i> 722240	I	-	-	I	I	0.0003
Hongos filamentosos						
<i>P. chrysogenum</i> 62275F	R	I	-	-	R	0.1643
Abreviaciones: ® Resistant ≥8 mm (I) Intermediaire 9-10mm (S) Sensible ≤11mm						

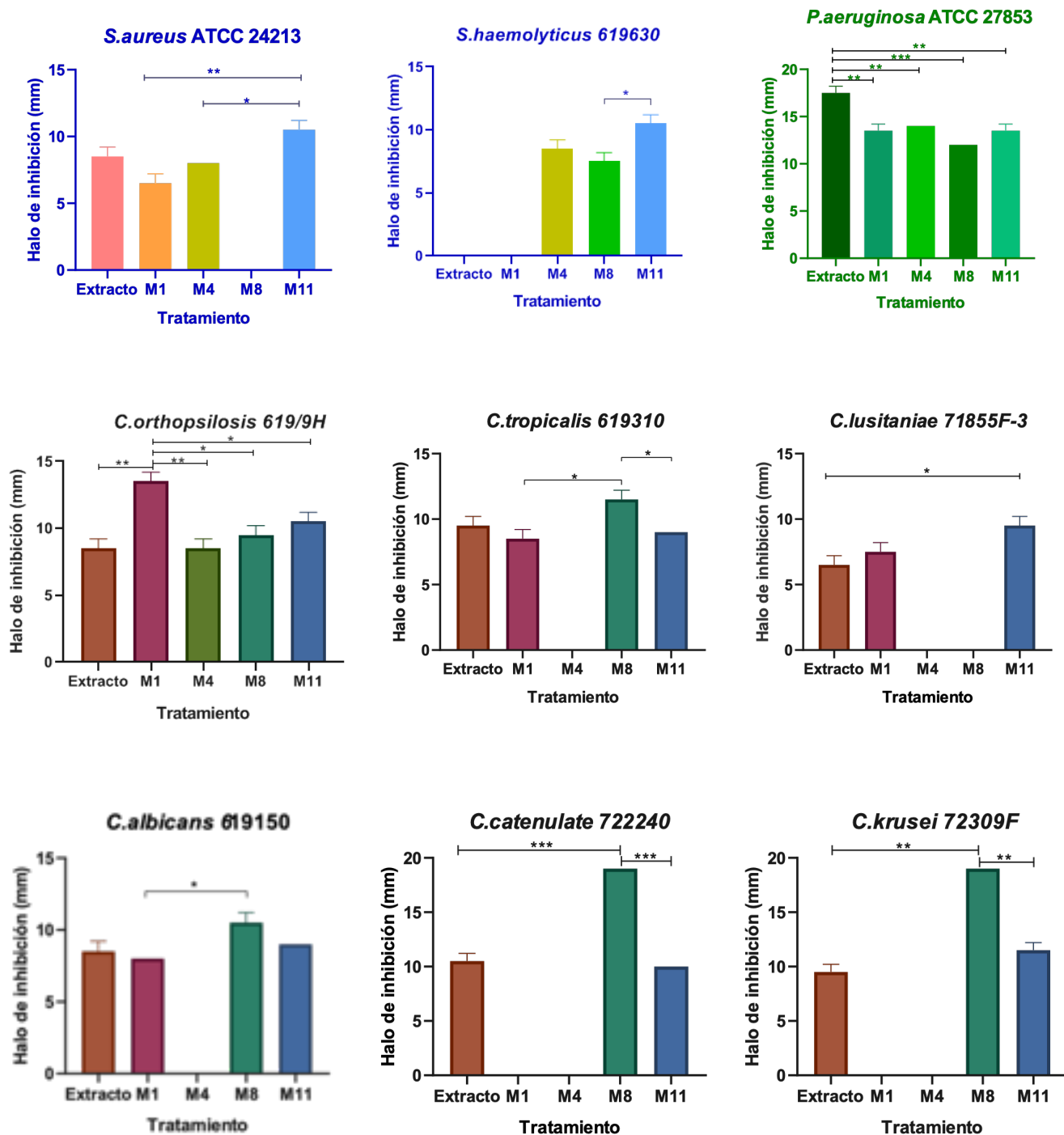


Figura 16. Gráficos con las diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con el extracto y metabolitos aislados contra bacterias y levaduras.

4.9 Concentración mínima Inhibitoria (CMI 90)

Los valores obtenidos de las concentraciones mínimas inhibitorias 90 se pueden visualizar en la tabla 12.

La concentración mínima inhibitoria del metabolito M11 fue de 1.349 ± 0.32 y 1.425 ± 0.15 para la cepa *S. aureus ATCC* y la cepa resistente *S. aureus CE12/04*. No obstante para el caso de los metabolitos M4 y M8 las concentraciones para la cepa *S. aureus ATCC* fueron de 0.7208 ± 0.04 y 0.7985 ± 0.15 respectivamente, para la cepa resistente *S. aureus CE12/04* fueron de 1.518 ± 0.26 y 1.647 ± 0.21 respectivamente.

Para la cepa *C. albicans* el metabolito M1 se obtuvo una concentración de 1.474 ± 0.21 para la cepa *ATCC*, mientras que para la cepa resistente *C. albicans 619150* el valor obtenido fue de 1.508 ± 0.58 . Para el metabolito M8 los valores obtenidos para la concentración mínima inhibitoria fueron similares, para la cepa *C. albicans ATCC* el valor obtenido fue de 2.112 ± 0.37 , mientras que para la cepa *C. albicans 619150* fue de 2.463 ± 0.87 . Sin embargo las concentraciones para el metabolito M11 fueron de 0.8709 ± 0.05 y 3.417 ± 0.59 para la cepa *ATCC* y resistente *619150* respectivamente.

Al realizar la comparación entre los valores obtenidos de las concentraciones entre *S. aureus ATCC* y *P. aeruginosa ATCC*, se requiere mayor concentración de los metabolitos para *P. aeruginosa ATCC* M1 (CMI= 2.118 ± 0.03), M4 (CMI= 1.624 ± 0.21) y M8 (CMI= 1.698 ± 0.03). Sin embargo para el metabolito M11 se obtuvieron valores similares de 1.349 ± 0.32 y 1.423 ± 0.12 para la cepa *S. aureus ATCC* y *P. aeruginosa ATCC* respectivamente. Esto sugiere que *S. aureus ATCC* muestra mayor sensibilidad a los metabolitos M1, M4 y M8 respecto a *P. aeruginosa ATCC*.

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria 90 de los metabolitos aislados de *Zingiber officinale* contra microorganismos causantes de infecciones en la piel.

Microorganismo	M1	M4	M8	M11	P
<i>S. aureus</i> ATCC	1.345 ± 0.43	0.7208 ± 0.04	0.7985 ± 0.15	1.349 ± 0.32	0.0424
<i>S. aureus</i> CE12/04	1.710 ± 0.27	1.518 ± 0.26	1.647 ± 0.21	1.425 ± 0.15	0.4802
<i>S. haemolyticus</i> 619630	2.452 ± 0.40	1.925 ± 0.17	3.482 ± 0.99	2.454 ± 0.31	0.0529
<i>C. albicans</i> ATCC	1.474 ± 0.21	2.071 ± 0.02	2.112 ± 0.37	0.8709 ± 0.05	0.0004
<i>C. albicans</i> 619150	1.508 ± 0.58	1.422 ± 0.18	2.463 ± 0.87	3.417 ± 0.59	0.0123
<i>C. parapsilosis</i> 62231H	1.218 ± 0.05	1.400 ± 0.01	1.323 ± 0.29	1.200 ± 0.06	0.4024
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	2.118 ± 0.03	1.624 ± 0.21	1.698 ± 0.03	1.423 ± 0.12	0.0226

4.10 Genotoxicidad y citotoxicidad

El efecto toxico del extracto y metabolitos aislados de *Zingiber officinale* fue evaluado con parámetros macroscópicos como el número y tamaño de las raíces. Los resultados de la tabla 13 muestran que las concentraciones del extracto causaron inhibición al no mostrar un crecimiento de la raíz. La inhibición en el tamaño de la raíz generalmente se relaciona con la actividad meristemática apical, la inhibición de la síntesis de proteínas y la elongación celular durante la diferenciación (Adeyemo *et al.*, 2013).

La exposición de la región meristemática de *A.sativum* a los metabolitos aislados M8 y M11 incrementó el número de células en interfase y redujo el número de células en división pero no se observó una reducción significativa del índice mitótico en ninguna de las concentraciones probadas (2.5 , 5, 10 y 30 ppm). Estos resultados se pueden observar en la tabla 14.

No se observó incremento de aberraciones cromosómicas en los tratamientos con el metabolito M8, sin embargo los resultados muestran que en concentraciones superiores a 30 ppm del Metabolito M11 son capaces de inducir efectos genotóxicos.

La actividad inhibitoria de este fitoquímico sobre el ADN puede causar daño nuclear (Akaneme *et al.*, 2012). Torres de Lima *et al.*,2019 observaron la genotoxicidad del 6-gingerol en *A. cepa* especialmente a 40 µg/ mL por la formación de micronúcleos, puentes y cromosomas sueltos.

Tabla 13. Estudio de genotoxicidad y citotoxicidad del extracto de *Zingiber officinale* en bulbos de *A.sativum*

Tratamiento	Concentración ppm	Efecto tóxico		Efecto citotóxico	Efecto genotóxico
		Tamaño de raíz DS (mm)	Coefficiente de inhibición	% índice mitótico	X ²
Testigo	0	35.3 ± 2,3 ac	0.0	19	0
Tween	0	24.7 ± 7,2 cd	30.0	9	0.62
Extracto	1000	Inhibición	0.0	/	/
	1500	Inhibición	0.0	/	/
	2000	Inhibición	0.0	/	/

Tabla 14. Estudio de genotoxicidad y citotoxicidad de los metabolitos M8 y M11 de *Zingiber officinale*.

Tratamiento	Concentración ppm	Efecto tóxico		Efecto citotóxico	Efecto genotóxico
		Tamaño de raíz DS (mm)	Coefficiente de inhibición	% índice mitótico	X ²
Testigo	0	35.3 ± 2,3 ac	0.0	19	0
Tween	0	24.7 ± 7,2 cd	30.0	9	0.62
Metabolito M8	34.5	37.2 ± 5.3 ac	2.8	20	0.54
	11.5	32.3 ± 5.9ac	- 47.7	21	0.2
	5.75	52.2 ± 9.9ab	8.5	36	0.54
	2.875	34.3 ± 15.4ac	-5.3	19	0.54
Metabolito M11	30	62.8 ± 34.7a	-77.7	/	/
	10	35.5 ± 9.4 ac	- 0.4	/	/
	5	32.2 ± 4.8 ac	8.8	/	/
	2.5	22.7 ± 8.8 dc	35.7	/	/

CONCLUSIONES

El extracto clorofórmico de *Zingiber officinale* presenta actividad antimicrobiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto para *P.aeruginosa* y *S.haemolyticus*. La suceptibilidad antimicrobiana que presenta va de resistente a intermedio, estos resultados se pueden visualizar en la siguiente tabla 8.

El diclorometano es un disolvente polar aprótico, logró extraer 11 metabolitos de los rizomas de *Zingiber officinale*. Mostró un rendimiento de extracción de 1.03 %, estadísticamente significativo respecto a los rendimientos con los disolventes polares.

Mediante el método de Kirby-bauer se observó que los metabolitos secundarios aislados y purificados M8 y M11 muestran actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas y levaduras causantes de infecciones en la piel. La concentración mínima inhibitoria 90 obtenida mediante ensayo de microplaca es de 3.482 ± 0.99 mg/mL y 3.417 ± 0.59 mg/ mL para el metabolito M8 y M11 respectivamente. Los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad muestran que los metabolitos puros presentan estos efectos dependiendo de la concentración.

Mediante las pruebas espectrofotométricas de IR y RMN se determinó que el metabolito M8 corresponde al 6-shogaol. Estos metabolitos pueden ser aprovechados para desarrollar productos biotecnológicos coadyuvantes en el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por bacterias gram positivas y levaduras.

RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación del metabolito 11 mediante resonancia magnética nuclear ^1H , ^{13}C y COSY.
- Complementar la identificación de los metabolitos M8 y M11 mediante cromatografía de absorción atómica.
- Desarrollar una formulación tópica con el principio activo que muestra actividad antimicrobiana contra cepas resistentes causantes de infecciones en la piel.
- Realizar pruebas de estabilidad acelerada de las formulaciones propuestas.
- Someter al comité de bioética la utilización de modelos animales para evaluación de las formulaciones.
- Realizar pruebas en modelos murinos para evaluar la efectividad de dichas formulaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosptupa– Quispe, Y., Zamalloa– Acurio, V., Claveli– Jarandilla, A., Monterola– Jururo, I., & Zapata–Callañaupa, J. (2019). *Determinación de la concentración letal media de recubrimientos biodegradables de quitosano y compuestos bioactivos en nauplios de Artemia salina Leach. Cantua*, 18(1), 36-40.
- Alvarado Luis, L. J. (2018). *Influencia del método de extracción soxhlet y reflujo en la acción reductora del extracto etanólico de hojas de Piper aduncum*.
- Aranda-Ventura, J., Villacrés-Vallejo, J., Núñez-Tuesta, L., Marín-Sisley, P., Nonato-Ramírez, L., & González-Aspajo, G. (2018). *Evaluación de la bioactividad de plantas medicinales cultivadas en el Perú usando la prueba de letalidad de Artemia salina. Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 3(3), 132-137.
- Aşkin Çelik, T., & Aslantürk, Ö. S. (2010). *Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of Inula viscosa leaf extracts with Allium test. Journal of biomedicine and biotechnology*, 2010.
- Bajpai, V. K.; AL-Reza, S. M.; Choi, U. K.; Lee, J. H.; Kang, S. C. *Chemical Composition, Antibacterial and Antioxidant Activities of Leaf Essential Oil and Extracts of Metasequoia Glyptostroboides Miki Ex HU. Food Chem. Toxicol.* 2009, 47, 1876–1883. DOI: 10.1016/j.fct.2009.04.043.
- Barrera, J. A., Espinosa, A. J., & Álvarez, J. P. (2019). *Contaminación en el lago de Tota, Colombia: toxicidad aguda en Daphnia magna (Cladocera: Daphniidae) e Hydra attenuata (Hydroidea: Hydridae). Revista de Biología Tropical*, 67(1), 11-23.
- Bellik, Y. *Total Antioxidant Activity and Antimicrobial Potency of the Essential Oil and Oleoresin of Zingiber Officinale Roscoe. Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2014, 4, 40. DOI: [10.1016/ S2222-1808\(14\)60311-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60311-X).
- Bendaha, H.; Yu, L.; Touzani, R.; Souane, R.; Giaever, G.; Nislow, C.; Boone, C.; Kadiri, S. E.; Brown, G. W.; Bellaoui, M. *New Azole Antifungal Agents with Novel Modes of Action:*

Synthesis and Biological Studies of New Tridentate Ligands Based on Pyrazole and Triazole.
Eur. J. Med. Chem. 2011, 9, 4117–4124. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.06.012.

Bhattarai, K., Pokharel, B., Maharjan, S., & Adhikari, S. (2018). *Chemical Constituents and Biological Activities of Ginger Rhizomes from Three Different Regions of Nepal.* *J. Nutri. Diet Probiotics*, 1, 180005.

Caballero Ospino, Y. F., & Rodríguez Domínguez, M. D. L. Á. (2019). *Obtención de aceites esenciales a partir de cáscara de mango (Mangifera indica L.) mediante técnica de destilación por arrastre de vapor.*

Carbonero Rosales, L. A., & Meza Martínez, I. E. (2020). *Evaluación de la toxicidad aguda de 12 especies de plantas vegetales recolectadas en la zona norcentral de Nicaragua, mediante el Bioensayo Alluim cepa L y el método de la marcha analítica de cationes del grupo I.* Mayo-noviembre. León-Nicaragua 2019 (Doctoral dissertation).

Castelán, T.J., Ponce, Q.K (2020) *Selección del Método óptimo para la extracción de Aceite Esencial de Jengibre para Maximizar el aprovechamiento de sus propiedades.*

Cayot, N., Lafarge, C., Bou-Maroun, E., & Cayot, P. (2016). *Substitution of carcinogenic solvent dichloromethane for the extraction of volatile compounds in a fat-free model food system.* *Journal of Chromatography A*, 1456, 77–88. doi:10.1016/j.chroma.2016.06.015

Ccuno Mamani, S. Y. (2021). *Evaluación de la calidad del agua del río azángaro y su efecto en la germinación y crecimiento de plántulas indicadoras De toxicidad vegetal-tomate (Solanum lycopersicum) y lechuga (Lactuca sativa).*

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016) *Performance Standards for antimicrobial Suceptibility Testing.* 26th Edition, Wayne.

Conejo-Fernández, A. J., & Moraga-Llop, F. A. (2016). *Enfermedades bacterianas de la piel.* *PediatríaIntegral*, 179.

- Contreras Villavicencio, A. E. (2019). *Capacidad inhibitoria de los aceites esenciales del Jengibre (Zingiber officinale) y Pino (Pinus sp.) frente a la bacteria Xanthomona sp en condiciones in vitro* (Bachelor's thesis).
- Coronell-Rodríguez W, Arteta-Acosta C, Dueñas-Castell C. (2017) *Interpretive reading of the antibiogram: A tool for clinical practice.Sepsis*. 95-115
- del Tanago, G. G., Hernández, R. V., González, M. R., Polar, E. O., & Carlavilla, F. J. P. (2017). *Infecciones bacterianas de la piel. Panorama actual del medicamento*, 41(406), 723-728.
- Dréno B. (2019). *The microbiome, a new target for ecobiology in dermatology. European journal of dermatology : EJD*, 29(S1), 15–18. <https://doi.org/10.1684/ejd.2019.3535>
- Elizalde Vivanco, R. A. (2020). *Determinación de costos de manufactura de extractos antioxidantes mediante extracción de fluidos supercríticos* (Bachelor's thesis).
- Escobar Salazar, G. (2021). *Efecto de las variables temperatura y tiempo en los procesos de extracción por maceración y ultrasonido sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de corteza de Quercus crassifolia utilizando la metodología de superficie de respuesta*.
- Esperbent, C. E., & Migliorati, M. A. (2017). *Bacterias multirresistentes: una amenaza oculta que crece*.
- Espinosa Ramírez, A., & Hernández Avendaño, P. (2018, March). *Comparación de la toxicidad aguda del NaCl en Hydra attenuata, e Hydra viridis cf. In XII Encuentro Facultad De Ciencias-UPTC IV Encuentro Nacional*.
- Estrada Julón, E. K., & Romero Mendoza, J. N. (2017). *Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico y aceite esencial del rizoma de Zingiber officinale jengibre en cepas de Helicobacter pylori in vitro*.

- Estrada, E., & Romero, J. (2017). *Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico y aceite esencial del rizoma de Zingiber officinale “Jengibre” en cepas de Helicobacter pylori, in vitro*. Cajamarca: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.
- F.I. Akaneme, C.C. Amaefule. *Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous leaf extracts of Azadirachta indica A. Juss using the Allium test*. *J. Med. Plants Res.*, 6 (2012), pp. 3898-3907
- Fariña, Norma. (2016). *Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución*. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1),04-05. [https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)04-005](https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)04-005)
- Flores Cruzado, O. (2020). *Efecto del tiempo de maceración y la concentración de etanol en la extracción de Saponina del bulbo fresco de palma (Gladiolus communis)*.
- Forbes. (2018, 23 febrero). *La industria de la belleza en México vale 154,000 mdp*. Recuperado abril,2020 ,de:<https://www.forbes.com.mx/la-industria-de-la-belleza-en-mexico-vale-154000- mdp/>
- Foster TJ. *Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects*. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41:430–49.
- Gaikwad, D. D., Shinde, S. K., Kawade, A. V., Jadhav, S. J., & Gadhave, M. V. (2017). *Isolation and standardization of gingerol from ginger rhizome by using TLC, HPLC, and identification tests*. *The Pharma Innovation*, 6(2, Part C), 179.
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z., & Rahmat, A. (2015). *Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from Zingiber officinale var. rubrum Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology*. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 258.

- González-Lastres, T., Gárces-García, A. E., Casado-Méndez, P. R., Santos-Fonseca, R. S., del Castillo-Remón, I. L., & Jiménez-Almaguer, D. (2019). *Prevalencia de enfermedades dermatológicas en escolares del Consejo Popular Pesquera. Revista Archivo Médico de Camagüey*, 23(1), 19-27.
- González-Lastres, Tania, Gárces-García, Alian Ernesto, Casado-Méndez, Pedro Rafael, Santos-Fonseca, Rafael Salvador, Castillo-Remón, Irene Luisa del, & Jiménez-Almaguer, Danis. (2019). *Prevalencia de enfermedades dermatológicas en escolares del Consejo Popular Pesquera. Revista Archivo Médico de Camagüey*, 23(1), 19-27. Recuperado en 17 de junio de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552019000100019&lng=es&tlng=es.
- González Guevara, J. C., Madrigal Redondo, G., Vargas Zúñiga, R., & Rodríguez Sibaja, S. (2017). *Physicochemical characterization of medicinal essential oil from the rizome of Zingiber officinale (ginger), grown in San Carlos, Costa Rica*.
- Granja Aguirre, E. A., & Mejía Ron, R. G. (2022). *Control de calidad en la lectura interpretativa del antibiograma basada en los criterios de organismos internacionales para la determinación de mecanismos de resistencia antimicrobiana*(Bachelor's thesis, PUCE-Quito).
- Gutierrez Meneses, M., & Neyra Alva, M. T. (2017). *Obtención y caracterización del aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale)*.
- Ha, S. K., Moon, E., Ju, M. S., Kim, D. H., Ryu, J. H., Oh, M. S., & Kim, S. Y. (2012). *6-Shogaol, a ginger product, modulates neuroinflammation: A new approach to neuroprotection. Neuropharmacology*, 63(2), 211–223. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.03.016
- Haag NL, Velk KK, Wu C. *Potential antibacterial targets in bacterial central metabolism. Int J Adv Life Sci*. 2012;4:21–32.

- Haridas, M., Sasidhar, V., Nath, P., Abhithaj, J., Sabu, A., and Rammanohar, P. (2021). *Compounds of Citrus Medica and Zingiber Officinale for COVID-19 Inhibition: In Silico Evidence for Cues from Ayurveda. Futur. J. Pharm. Sci.* 7. doi:10.1186/s43094-020-00171-6
- Hasan, H. A.; Rashhed Raauf, A. M.; Abd Razik, B. M.; Rasool Hassan, B. A. *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Crude Extracts Isolated from Zingiber Officinale by Different Solvents. Pharmaceut. Ana. Acta.* 2012, 3, 1–5. DOI: [10.4172/2153-2435.1000184](https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000184).
- Hernández, O.C., García, J.A.L., del Socorro Fernández, M., Rodríguez, M.L., Hernández M.D.J.M & Analco, J.A.G. (2018). *Efecto nematocida y fungicida de extractos hidroalcohólicos de Piper lapathifolium y P.melastomoides. Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 6 (2. Especial), 26-33.
- Herráiz, E. M. (2016). 14. *Jengibre. Quaderns de la Fundació Dr. Antoni Esteve*, (18), 56-59.
- Jácome Jurado, J. A. (2019). *Evaluación del efecto bactericida de aceites esenciales de canela (Cinnamomum verum), jengibre (Zingiber officinale) y clavo de olor (Syzygium aromaticum) para aplicaciones agroindustriales* (Bachelor's thesis, Quito: Universidad de las Américas, 2019).
- Kanadea, R., & Bhatkhandeb, D. S. (2016). *Extraction of ginger oil using different methods and effect of solvents, time, temperature to maximize yield. Inter. J. Adv. Sci. Eng. Technol*, 4(2), 241-244.
- Kaushik, P.; Goyal, P. *Evaluation of Various Crude Extracts of Zingiber Officinale Rhizome for Potential Antibacterial Activity: A Study in Vitro. Adv. Appl. Microbiol.* 2011, 1, 7–12. DOI: 10.4236/aim.2011.11002.
- Khaki, A., Fathiazad, F., 2012. *Diabetic nephropathy – using herbals in diabetic nephropathy prevention and treatment – the role of ginger (Zingiber officinale) and onion (Allium cepa) in diabetics' nephropathy. In: Bhattacharya, A. (Ed.), A Compendium of Essays on Alternative Therapy. InTech Publisher, Rijeka, Croatia*, pp. 207–232.

- Kubra, I. R., and Rao, L. J. (2012). *An Impression on Current Developments in the Technology, Chemistry, and Biological Activities of Ginger (Zingiber officinale Roscoe)*. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 52, 651–688. doi:10.1080/10408398.2010.505689
- Kumar Gupta, S., and Sharma, A. (2014). *Medicinal properties of Zingiber officinale Roscoe-A Review*. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 9, 124–129. doi:10.9790/3008-095512412.
- Larrosa, M. N., Canut-Blasco, A., Benito, N., Cantón, R., Cercenado, E., Docobo-Pérez, F., ... & Oliver, A. (2022). *Recomendaciones del Comité Español del Antibiógrama (COESANT) para la realización de los Informes de Sensibilidad Antibiótica Acumulada. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Lemma, T. S., & Egza, T. F. (2019) *Extraction and Characterization of Essential Oil from Ginger Rhizome Collected From Arba Minch Market*. *International Journal of engineering and Technology*, 62(2), 41-45.
- Li, C., Li, J., Jiang, F., Tzvetkov, N. T., Horbanczuk, J. O., Li, Y., ... Wang, D. (2021). *Vasculoprotective effects of ginger (Zingiber officinale Roscoe) and underlying molecular mechanisms*. *Food & Function*, 12(5), 1897–1913. doi:10.1039/d0fo02210a
- Limache Calisaya, E. (2017). *Influencia de la temperatura y tiempo de secado en la extracción del aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale) variedad amarillo jamaiquino ecotipo de Junín*.
- Liu Y, Liu J, Zhang Y. *Research Progress on Chemical Constituents of Zingiber officinale Roscoe*. *Biomed Res Int*. 2019 Dec 20;2019:5370823. doi: 10.1155/2019/5370823. PMID: 31930125; PMCID: PMC6942719.
- López, T. G. T., Magaña, J. E. M., Trillo, L. P. L., & Gómez, M. A. A. (2022). *Comparación de diferentes extractos, su dosis letal 50 en Artemia salina y la composición química del Granjel (Celtis pallida Torr.)*. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 10(1), 17-27.

- Machet L, Martin L, Vaillant L. (2018) *Infecciones bacterianas cutáneas superficiales foliculares y no foliculares. Dermatología*, 52(4), 1-9.
- Manrique, A. M. B., Preciado, M. P., Riaño, D., & Sierra, J. V. (2017). *Microbiota de la piel identidad de cada individuo. Biociencias*, 1(2).
- Mao, Q. Q., Xu, X. Y., Cao, S. Y., Gan, R. Y., Corke, H., Beta, T., et al. (2019). *Bioactive compounds and bioactivities of ginger (Zingiber officinale roscoe). Foods* 8, 1–21. doi:10.3390/foods8060185
- Martínez Martínez, A. (2020). *Química de productos naturales*.
- Mederos Hernández, J., Presedo Llanes, C., & Larrea Fabra, R. R. (2018). *Fundamentos de la lectura interpretada del antibiograma para médicos de asistencia clínica. Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 17(4), 603-619.
- Mehrotra, N. (2020). *Medicinal plants, aromatic herbs and spices as potent immunity defenders: Antiviral (COVID-19) perspectives*. Ap 9, 30–49. doi:10.21276/ap.2020.9.2.4
- Mele, M. A. (2019). *Bioactive compounds and biological activity of ginger. J. Multidiscip. Sci.* 1, 1–7. doi:10.33888/jms.2019.111
- Melo-Guerrero, M. C., Ortiz-Jurado, D. E., & Hurtado-Benavides, A. M. (2020). *Comparación de la composición y de la actividad antioxidante del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla L.) obtenido mediante extracción con fluidos supercríticos y otras técnicas verdes. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44(172), 845-856.
- Méndez, E., & Amaya, J. (2015). *Fenología y producción de masa fresca y oleorresina de jengibre (zingiber officinale r.) con diferente materia orgánica. Revista Ciencia y Tecnología*, 9(2), 181-196.

- Morales A. (2017) *El cultivo de Jengibre Zingiber Officinale*. Ministerio de Agricultura y ganadería, República de costa Rica. 1-13.
- Mostacero-León, J., De La Cruz-Castillo, A., Taramona-Ruíz, L., Calderón, R. A., Seijas-Bernabé, P., & Rodríguez, R. M. (2020). *Efecto citotóxico del colorante alimentario rojo 40 en nauplios de Artemia salina Leach*. *Revista de Investigaciones de la Universidad Le Cordon Bleu*, 7(2), 60-66.
- Myint, M. M., & Khine, M. M. (2017). *Determination of Bioactivities and Identification of Isolated Compounds from the Rhizome of Zingiber officinale Roscoe (Ginger)*. *Dagon University Research Journal*, 10, 85-93.
- Nishidono, Y., Saifudin, A., Nishizawa, M., Fujita, T., Nakamoto, M., & Tanaka, K. (2018). *Identification of the Chemical Constituents in Ginger (Zingiber officinale) Responsible for Thermogenesis*. *Natural Product Communications*, 13(7), 1934578X1801300722.
- Noori, S.; Zeynali, F.; Almasi, H. *Antimicrobial and Antioxidant Efficiency of Nanoemulsion-Based Edible Coating Containing Ginger (Zingiber Officinale) Essential Oil and Its Effect on Safety and Quality Attributes of Chicken Breast Fillets*. *Food Control*. 2018, 84, 312–320. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.08.015.
- O.A. Adeyemo, A.E. Farinmade. *Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using Allium cepa assay Afr. J. Biotechnol.*, 12 (2013), pp. 1459-1466
- Organización Mundial de la Salud (Febrero 5 de 2018). *Resistencia a los antibióticos*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibióticos>
- Orisakwe, O. E., Orish, C. N., and Nwanaforo, E. O. (2020). *Coronavirus disease (COVID-19) and Africa: Acclaimed home remedies*. *Sci. Afr.* 10, e00620. doi:10.1016/j.sciaf.2020.e00620

- Panpatil, V.; Tattari, S.; Kota, N.; Nimgulkar, C.; Polasa, K. *In Vitro Evaluation on Antioxidant and Antimicrobial Activity of Spice Extracts of Ginger, Turmeric and Garlic. J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, *2*, 143–148.
- Park, G., Kim, H. G., Ju, M. S., Ha, S. K., Park, Y., Kim, S. Y., & Oh, M. S. (2013). 6- Shogaol, an active compound of ginger, protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models via anti-neuroinflammation. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(9), 1131–1139. doi:10.1038/aps.2013.57
- Patiño, L. Andrés, C. (2015). *Microbiota de la piel: el ecosistema cutáneo. Revista Asoc. Colomb. Dermatol.* Volumen 21 (Número 2), 147-158.
- Pereda, M. C. O., & Orbegoso, R. A. B. (2018). *Efecto antimicrobiano in vitro de los extractos de Allium sativum y Zingiber officinale frente a Staphylococcus aureus. UCV-SCIENTIA*, *10*(2), 152-159.
- Perez, J. C. B., Valverde, I. R. T., & Castro, J. A. V. (2022). *Bioensayos de toxicidad aguda de extractos vegetales con Daphnia magna: un camino eficaz hacia el desarrollo sostenible. Revista Científica: BIOTECH AND ENGINEERING*, *2*(02), 38-49
- Pintado, V. (2016). *Fármacos antiguos y nuevos en el tratamiento de la infección por bacterias multirresistentes. Rev Esp Quimioter*, *29*(1), 39-42.
- Pratap, S. R. (2017). *Ginger: A Potential Nutraceutical, An Updated Review. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, *9*(9), 1227-1238.
- Prieto, J. R., Areosa, L. A., & Rey, J. S. C. (2018). *Mapa microbiano de la piel humana: conociendo a nuestros huéspedes. Enfermería Dermatológica*, *12*(34), 18-22.
- Quintero Duque, C. S. (2022). *Ecotoxicología del acetaminofén. Efectos citotóxicos producidos en el Allium cepa (cebolla roja).*

- Quispe Diaz, K. F., Huamani, T., & John, R. (2018). *Evaluación del tiempo de extracción, factor de empaquetamiento, humedad del rizoma, en el rendimiento de la extracción del aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale roscoe) por arrastre de vapor, caracterización fisicoquímica del aceite esencial y aplicación antioxidante en el Aceite de Oliva.*
- Quizhpe Andrade, A. L. (2019). *Evaluación del efecto nematocida de extractos de tres especies del género Tagetes sobre Panagrellus redivivus (Goodey) en laboratorio* (Bachelor's thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo)
- Rajagopal, K., Byran, G., Jupudi, S., and Vadivalan, R. (2020). *Activity of phytochemical constituents of black pepper, ginger, and garlic against coronavirus (COVID-19): An In Silico approach. Int. J. Heal. Allied Sci.* doi:10.4103/ijhas.IJHAS
- Rampogu S, Baek A, Gajula RG, Zeb A, Bavi RS, Kumar R, Kim Y, Kwon YJ, Lee KW. *Ginger (Zingiber officinale) phytochemicals-gingerenone-A and shogaol inhibit SaHPPK: molecular docking, molecular dynamics simulations and in vitro approaches. Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2018 Apr 2;17(1):16. doi: 10.1186/s12941-018-0266-9. PMID: 29609660; PMCID: PMC5879566.
- Rengifo Paima, R. F. (2018). *Efecto bactericida del aceite esencial de la raíz del Zingiber officinale roscoe sobre Escherichia coli ATCC 25922 comparada con ciprofloxacino, estudio in vitro.*
- Robles-García, M. A., Aguilar, A. J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J. A., Guerrero-Medina, P. J., ... & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2016). *Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (Sideroxylum capiri PITTIER) (Sid. Biotecnia, 18(3), 3-8.*
- Saetama, V., Vera, L., Vanegas, M. E., Cruzat, C., & Brazales, D. (2018). *Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con Artemia salina, Allium schoenoprasum L y Lactuca sativa. Revista de Toxicología, 35(2), 112-118.*

- Sang, S., Hong, J., Wu, H., Liu, J., Yang, C. S., Pan, M. H., ... & Ho, C. T. (2009). *Increased growth inhibitory effects on human cancer cells and anti-inflammatory potency of shogaols from Zingiber officinale relative to gingerols*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(22), 10645-10650.
- Sapkota, A., Park, S. J., and Choi, J. W. (2019). *Neuroprotective effects of 6-shogaol and its metabolite, 6-paradol, in a mouse model of multiple sclerosis*. *Biomol. Ther. (Seoul)* 27, 152–159. doi:10.4062/biomolther.2018.089
- Sasidharan, I.; Menon, A. N. *Comparative Chemical Composition and Antimicrobial Activity Fresh & Dry Ginger Oils (Zingiber Officinale Roscoe)*. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 2010, 2, 40–43.
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S., & Viljoen, A. M. (2015). *Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger*. *Phytochemistry*, 117, 554–568. doi:10.1016/j.phytochem.2015.07.012
- Serra Valdés, M. Á. (2017). *La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana*. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419.
- Sharif, M. F., & Bennett, M. T. (2016). *The effect of different methods and solvents on the extraction of polyphenols in ginger (Zingiber officinale)*. *Jurnal Teknologi*, 78(11-2).
- Sharma, P. K.; Singh, V.; Ali, M. *Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Fresh Rhizome Essential Oil of Zingiber Officinale Roscoe*. *Pharmacogn. J.* 2016, 8, 185–190. DOI: 10.5530/pj.2016.3.3.
- Shi G, Shaw G, Liang YH, Subburaman P, Li Y, Wu Y, et al. *Bisubstrate analogue inhibitors of 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin pyrophosphokinase: new design with improved properties*. *Bioorg Med Chem.* 2012;20:47–57.

- Silveira, D., Prieto-Garcia, J. M., Boylan, F., Estrada, O., Fonseca-Bazzo, Y. M., Jamal, C. M., et al. (2020). *COVID-19: Is There Evidence for the Use of Herbal Medicines as Adjuvant Symptomatic Therapy?* *Front. Pharmacol.* 11, 581840–581844. doi:10.3389/fphar.2020.581840
- Silvia Del Carmen Beristain-Bauza, Paola Hernández-Carranza, Teresa Soledad Cid-Pérez, Raúl Ávila-Sosa, Irving Israel Ruiz-López & Carlos Enrique Ochoa-Velasco (2019) *Antimicrobial Activity of Ginger (Zingiber Officinale) and Its Application in Food Products*, *Food Reviews International*, 35:5, 407-426, DOI: [10.1080/87559129.2019.1573829](https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1573829)
- Stoner, G. D. (2013). *Ginger: is it ready for prime time?* *Cancer Prev. Res.* 6, 257–262. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-13-0055
- Suk, S., Seo, S. G., Yu, J. G., Yang, H., Jeong, E., Jang, Y. J., et al. (2016). *A Bioactive Constituent of Ginger, 6-Shogaol, Prevents Adipogenesis and Stimulates Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes.* *J. Food Biochem.* 40, 84–90. doi:10.1111/jfbc.12191
- Suquillo Lugmaña, V. E. (2017). *Elaboración de una forma farmacéutica con el aceite esencial que presente la mejor actividad antifúngica de entre las especies Pimpinella anisum, Syzygium aromaticum, y Zingiber officinale para el tratamiento de los libros del Área Histórica de la Universidad Central del Ecuador* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).
- Švarc-Gajić, J.; Cvetanović, A.; Segura-Carretero, A.; Linares, I. B.; Maškovic, P. *Characterization of Ginger Extracts Obtained by Subcritical Water.* *J. Supercrit. Fluids.* 2017, 123, 92–100. DOI: [10.1016/j.supflu.2016.12.019](https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.019).
- Tanaka, K.; Arita, M.; Sakurai, H.; Ono, N.; Tezuka, Y. *Analysis of Chemical Properties of Edible and Medicinal Ginger by Metabolomics Approach.* *BioMed Res. Int.* 2015, 2015, 1–7. DOI: [10.1155/2015/671058](https://doi.org/10.1155/2015/671058).

- Unuofin JO, Masuku NP, Paimo OK and Lebelo SL (2021) *Ginger from Farmyard to Town: Nutritional and Pharmacological Applications*. *Front. Pharmacol.* 12:779352. doi: 10.3389/fphar.2021.779352
- Vawazola, V. H.; Dani, A.; Malumba, A.; Ngombre, N.; Kizungu, R.; Zumbu, P. E.; Masimango, J. T. *Antibacterial and Antiplasmodial Potentials of Essential Oils from Two Plants of Tangawisi Products: Zingiber Officinale Roscoe and Monodora Myristica (Gaertn) Dunal*. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 2018, 7, 643–648.
- Velandia-Pérez, L. Z., Acevedo, J. T., & Espinosa, A. J. Registro del proceso regenerativo en hydra viridissima tras realizar corte longitudinal. *Memorias del v encuentro ciencia, mujer y tecnología 2019*, 241.
- Vera Castro, J. M. (2018). *Evaluación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de jengibre (Zingiber officinale) y cúrcuma (Curcuma longa) frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC: 12600* (Bachelor's thesis).
- Viera Ribot, O. M., & Morales Fernández, S. (2020). Comparación de los métodos de extracción para hidrocarburos aromáticos policíclicos en sedimentos marinos empleando soxhlet y baño ultrasónico. *Centro Azúcar*, 47(3), 14-23.
- Wang, J., Ke, W., Bao, R., Hu, X., & Chen, F. (2017). Beneficial effects of ginger *Zingiber officinale* Roscoe on obesity and metabolic syndrome: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1398(1), 83–98. doi:10.1111/nyas.13375
- Wang, S., Zhang, C., Yang, G., & Yang, Y. (2015). Biological properties of 6-gingerol: a brief review. *Natural product communications*, 9(7), 1934578X1400900736.
- Yamamoto-Ribeiro, M. M. G.; Grespan, R.; Kohiyama, C. Y.; Dias, F.; Galerani, S. A.; Leite, E.; Alves de Abreu, B.; Graton, J. M.; Machinski, M. *Effect of Zingiber Officinale Essential Oil on Fusarium Verticillioides and Fumonisin Production*. *Food Chem.* 2013, 141, 3147–3152. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.05.144.

- Yousfi, F., Abridach, F., Petrovic, J. D., Sokovic, M., & Ramdani, M. (2021). *Phytochemical screening and evaluation of the antioxidant and antibacterial potential of Zingiber officinale extracts. South African Journal of Botany, 142, 433–440.* doi:10.1016/j.sajb.2021.07.010
- ZAMBRANO-BLANCO, Eleonora. (2015) Diversidad genética del jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe.) A nivel molecular: Avances de la última década. En: *Entramado*. Julio - Diciembre, 2015 vol. 11, no. 2, p. 190-199, <http://dx.doi.org/10.18041/entramado.2015v11n2.22239>
- Zamora Mendoza, A. G. (2022). *Efecto de la nanoencapsulación de los aceites esenciales de Schinus molle L. y Thymus vulgaris L. sobre la concentración letal 50 utilizando los modelos de hemólisis eritrocitaria inducida y Artemia salina* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Zhang, Y.X., Li, J.S., Chen, L.H., Peng, W.W., Cai, B.C., 2012. *Simultaneous determination of five gingerols in raw and processed ginger by HPLC. Chin. Pharm. J.* 47, 471–474.
- Zhu, J., Chen, H., Song, Z., Wang, X., and Sun, Z. (2018). *Effects of Ginger (Zingiber officinale Roscoe) on Type 2 Diabetes Mellitus and Components of the Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2018, 1–11. doi:10.1155/2018/5692962

ANEXOS

ANEXO A



BUAP

Dra. Lydia Ma. Pérez Díaz
Profesor Investigador
Facultad de Ingeniería Química
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Por este medio reciba un cordial saludo y así mismo aprovecho la presente para entregarle la identificación taxonómica del material proporcionado, cuya identificación fue realizada por el curador MPhil Allen J. Coombes, siendo la siguiente:

Nombre Científico	Familia
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe, Trans. Linn. Soc. London	Zingiberaceae

Cabe señalar que la identificación se realizó a través de la observación de las características físicas y morfológicas de la muestra proporcionada.

Sin más por el momento me despido de usted.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"
H. Puebla de Z., a 4 de marzo de 2022

