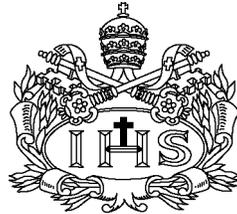


ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Allium sativum* Y *Zingiber officinale*  
SOBRE MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN PATOLOGÍAS INFECCIOSAS DE  
CAVIDAD ORAL



TATIANA PAVA ÁNGEL  
TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para optar el título de  
BACTERIOLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BACTERIOLOGÍA  
Bogotá D.C  
2016

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Allium sativum* Y *Zingiber officinale*  
SOBRE MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN PATOLOGÍAS INFECCIOSAS DE  
CAVIDAD ORAL

TATIANA PAVA ÁNGEL

---

MARIA CONCEPCIÓN PUERTA PhD.  
Decana Académica Facultad de Ciencias

---

Melva Yomary Linares Linares, MSc.  
Directora Carrera de Bacteriología  
Facultad de Ciencias

## NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de Julio de 1994

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por qué las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por brindarme la oportunidad de realizar mis sueños y gracias a ellos pude culminar mis estudios.

Agradezco al Doctor Fredy Gamboa por darme la oportunidad de trabajar con él en mi proyecto de grado, por aconsejarme y siempre motivarme para hacer las cosas bien, enseñarme con paciencia y dedicación.

A mi compañera Camila Muñoz porque aprendí mucho de ti tanto en la parte académica como personal, por tu paciencia y compromiso en enseñarme.

A Gloria Numpaque y a la Doctora Nohemi Téllez por su colaboración en el laboratorio de fitoquímica y sus enseñanzas.

## TABLA DE CONTENIDO

	No. Pág.
RESUMEN	
<b>1. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>10</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>12</b>
2.1 enfermedad periodontal	
2.1.1 Etiopatogénesis de la Enfermedad Periodontal	12
2.1.2 Periodontitis	14
2.1.3 Gingivitis	14
2.2 Bacterias de cavidad oral	15
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.2.2 <i>Streptococcus mutans</i>	19
2.2.3 <i>Enterococcus faecalis</i>	21
2.2.4 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	23
2.2.5 <i>Prevotella intermedia</i>	25
2.3 Plantas antimicrobianas	27
2.3.1 Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	27
2.3.2 Ajo ( <i>Allium sativum</i> )	29
2.4 Metabolitos con capacidad antimicrobiana	30
2.4.1 Alcaloides	30
2.4.2 Esteroides y Terpenoides	31
2.4.3 Taninos	31
2.4.4 Cumarinas	31
2.4.5 Flavonas y Flavonoides	31
2.4.6 Cardiotónicos	32

<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivo General	33
3.2 Objetivos específicos	33
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>34</b>
4.1 Obtención de los extractos	
4.1.2 Metodología 2	35
4.2 Evaluación de actividad antimicrobiana	36
4.2.1 Preparación del inóculo	36
4.2.2 Siembra	36
4.2.2.1 Bacterias Gram- positivas	36
4.2.2.2 Bacterias Gram- negativas	36
4.2.2.3 Controles	36
4.2.4 lectura de las siembras	36
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
5.1 Marcha fotoquímica	38
5.2 actividad antimicrobiana	
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>48</b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b>50</b>

## INDICE DE FIGURA

	No. Pág.
<b>Figura 1.</b> Composición del diente y encía. (Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)	13
<b>Figura 2.</b> Periodontitis (Dreamstime)	14
<b>Figura 3.</b> Gingivitis (Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)	15
<b>Figura 4.</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>S. aureus</i> (recuperado de <a href="https://compendiomicrobiologia.wordpress.com">https://compendiomicrobiologia.wordpress.com</a> )	18
<b>Figura 5.</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>S. mutans</i> (recuperado de <a href="http://www.bacteriainphotos.com/">http://www.bacteriainphotos.com/</a> )	20
<b>Figura 6.</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>E. faecalis</i> (Recuperado de <a href="http://www.denniskunkel.com">http://www.denniskunkel.com</a> )	22
<b>Figura 7.</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>P. gingivalis</i> (recuperado de <a href="https://www.flickr.com">https://www.flickr.com</a> )	23
<b>Figura 8.</b> Características macroscópicas y microscópicas de <i>P. intermedia</i> (Recuperado de <a href="http://www.microbiologyinpictures.com">http://www.microbiologyinpictures.com</a> )	25
<b>Figura 9.</b> <i>Zingiber officinale</i> (recuperado de <a href="http://encyclopedia2.thefreedictionary.com">http://encyclopedia2.thefreedictionary.com</a> )	28
<b>Figura 10.</b> <i>Allium sativum</i> (Recuperado de <a href="http://www.tuninst.net/">http://www.tuninst.net/</a> )	30
<b>Figura 11.</b> Liofilizador (recuperado <a href="http://www.tecniespectro.com">http://www.tecniespectro.com</a> )	34
<b>Figura 12.</b> Rotaevaporador (recuperado <a href="http://grupodidacta.com">http://grupodidacta.com</a> )	35

## ÍNDICE DE TABLAS

	No.Pàg.
<b>Tabla 1.</b> Taxonomia <i>S. aureus</i>	16
<b>Tabla 2.</b> Taxonomia <i>S. mutans</i>	19
<b>Tabla 3.</b> Taxonomia <i>E.faecalis</i>	21
<b>Tabla 4.</b> Taxonomia <i>P. gingivalis</i>	23
<b>Tabla 5.</b> Taxonomia <i>P.intermedia</i>	25
<b>Tabla 6.</b> Anàlisis fitoquímico preliminar de <i>Allium sativum</i> y <i>zingiber officinale</i> para alcaloides.	38
<b>Tabla 7.</b> Anàlisis fitoquímico preliminar de <i>Allium sativum</i> y <i>zingiber officinale</i> para esteroides.	38
<b>Tabla 8.</b> Anàlisis fitoquímico preliminar de <i>Allium sativum</i> y <i>zingiber officinale</i> para Taninos.	39
<b>Tabla 9.</b> Anàlisis fitoquímico preliminar de <i>Allium sativum</i> y <i>zingiber officinale</i> para flavonoides.	39
<b>Tabla 10.</b> Anàlisis fitoquímico preliminar de <i>Allium sativum</i> y <i>zingiber officinale</i> para cumarinas.	40
<b>Tabla 11.</b> Anàlisis fitoquímico preliminar de <i>Allium sativum</i> y <i>zingiber officinale</i> para cardiotónicos.	41
<b>Tabla 12.</b> Promedio de halos de inhibición en centímetros de los extractos liofilizados y rotaevaporados.	41
<b>Tabla 13.</b> Promedio de halos de inhibición en centímetros de los extractos en solución acuosa a las 3 horas.	41
<b>Tabla 14.</b> Promedio de halos de inhibición en centímetros de los controles negativos (DMSO) y de los controles positivos Amoxicilina y Vancomicina.	42

## 1. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad periodontal tiene una alta prevalencia a nivel mundial y es una de las principales causas de pérdida de dientes y enfermedades sistémicas relacionadas con patologías dentales. (Ramírez J, et al; 2007)

La gingivitis, la forma más leve de la enfermedad periodontal es causada por el biofilm (placa bacteriana) que se acumula en la superficie del diente adyacente al tejido gingival (encías). La periodontitis, el tipo más severo de enfermedad periodontal se caracteriza por la destrucción del tejido conectivo y el soporte óseo dental después de una respuesta inflamatoria del huésped, secundaria a la infección por bacterias periodontales (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, entre otros). (Ramírez J, et al; 2007)

De acuerdo con la Tercera Encuesta Nacional de Salud Oral (ENSAB III) el 50,2% de las personas que viven en Colombia tienen algún grado de enfermedad periodontal. Entre ellos, el 17,7% de los casos se clasifican de periodontitis moderada a severa. (Ramírez J, et al; 2007)

A pesar de la alta prevalencia de la periodontitis y su relación con múltiples enfermedades sistémicas, Colombia carece de una política adecuada de salud pública dirigida a la prevención y tratamiento de la enfermedad periodontal, debido a que el plan de salud básico no cuenta con la cobertura para este tipo de tratamientos, por estas razones en este estudio se quiere encontrar una forma alterna de prevención y tratamiento de esta patología a través de la utilización de extractos de diferentes plantas para la inhibición o disminución de la colonización de diferentes microorganismos que se encuentra en cavidad bucal que generan o son precursores de esta enfermedad.

En la búsqueda de información acerca de estudios previos o utilización de plantas medicinales se encontró que desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales (curativos y preventivos), alimenticios y cosméticos. Actualmente, especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica. La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrando las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas. (Ali-Shtayed, M. et al., 1998; Sanabria, A. et al., 1999)

La horticultura y los cultivos agrícolas han recibido una consideración especial ya que se han identificado especies que al ser consumidas han demostrado ser beneficiosas para la salud de las personas, en estudios previos se han identificado diferentes componentes extraídos de plantas como la Allicina proveniente de *Allium sativum*, macelignan de *Myristica fragrans*, backuchiol de *Psoralea coryfolia* e isopanduratin A de *kaempferia pandurata* que tienen actividad antimicrobiana sobre microorganismos como *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*. (Bakri IM, Douglas CW.2005); por lo tanto, se decidió hacer practica experimental con el fin de identificar si las cepas de referencia de bacterias como *prevotella intermedia*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* son susceptibles a los extractos completos (acuoso y etanólico) de *Allium sativum* y *zingiber officinale*, ya que se ha observado en revisiones previas su actividad antimicrobiana específicamente del extracto acuoso de *Allium sativum* sobre estos microorganismos. (Bakri IM, Douglas CW.2005).

## **2. MARCO TEÓRICO:**

### **2.1 Enfermedad periodontal**

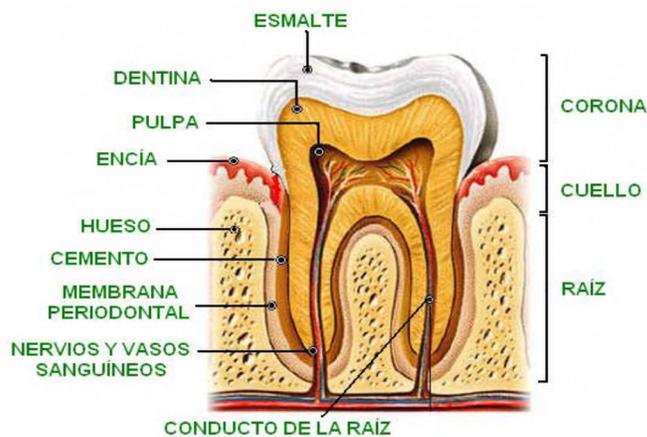
La enfermedad periodontal es considerada una enfermedad infecciosa-inflamatoria, que de acuerdo al grado de compromiso puede llevar a la pérdida total de los tejidos de soporte del diente. Considerando que la etiología de la enfermedad es principalmente infecciosa (placa bacteriana), el tratamiento se enfoca fundamentalmente en el control de la infección y reducción de la inflamación, por lo tanto, para ejecutar un tratamiento periodontal exitoso es necesario determinar de forma adecuada el diagnóstico y pronóstico periodontal.

(Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)

#### **2.1.1 Etiopatogénesis de la Enfermedad Periodontal**

Todo comienza cuando las bacterias producen factores de virulencia (Ej.: lipopolisacárido-LPS, ácido lipoteicoico) y estos entran en contacto con las células del epitelio del surco, pero es en especial atención, las células del epitelio de unión (EU) las que producen defensinas y citoquinas pro-inflamatorias. Las defensinas son péptidos antimicrobianos que dañan la superficie de las bacterias, permitiendo su eliminación. Pero son de gran importancia la producción de IL-1 y TNF, generando cambios a nivel vascular. Incrementan el calibre de los vasos sanguíneos e inducen la expresión de proteínas de adhesión celular. Adicionalmente, producen IL8, una citoquina con actividad quimiotáctica para PMNs. De esta forma, los PMNs son atraídos al sitio donde se acumulan las bacterias, salen de los vasos sanguíneos y se acumulan en el tejido conectivo adyacente al surco alterando el tejido conectivo adyacente al EU. Muchos PMNs se abren paso por los espacios intercelulares del EU y salen al surco donde se degranulan, liberando consigo reactivos del oxígeno (ROIs) y enzimas como catepsina G, lactoferrina, defensinas, mieloperoxidasa, metaloproteinasas (MMP-8) y serin proteasas. Si bien todos estos reactivos biológicos son nocivos para las bacterias, también lo pueden ser para los tejidos periodontales y algún daño tisular microscópico puede esperarse. No obstante, el agente infeccioso es controlado en la mayoría de casos, el estímulo disminuye y se establece un balance de la respuesta inmune. Después de estimulada la respuesta inmune innata, desencadena la respuesta inmune adaptativa y aparecen en el tejido conectivo linfocitos T CD4 y linfocitos B, ayudando a resolver el proceso inflamatorio. La

estimulación de linfocitos toma entre 5 y 7 días en alcanzar su mayor activación. Por lo tanto, una buena respuesta innata es fundamental para mantener la salud periodontal. Los linfocitos T CD4 producen citoquinas (IFN , IL-2) que promueven una mejor actividad de macrófagos y co-estimulan a los linfocitos B a producir anticuerpos tipo IgG e IgA neutralizantes(6). El resultado es una respuesta inmune que controla los microorganismos que se están acumulando en el surco periodontal, de forma silenciosa y sin expresar signos clínicos inflamatorios evidentes a simple vista. A medida que progresa el proceso inflamatorio éste se vuelve crónico y comienza la degradación de los tejidos de soporte, dando como resultado la formación de la bolsa periodontal, pérdida de inserción clínica y pérdida ósea. (Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)



**Figura 1.** Composición del diente y encía. (Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)

### 2.1.2 Periodontitis

La periodontitis es la inflamación de la encía y el periodonto de soporte, afectando de forma significativa el tejido conectivo gingival (TC), ligamento periodontal, cemento y hueso. Como resultado patognomónico observamos inflamación, sangrado al sondaje (SS), formación de la bolsa periodontal, pérdida de inserción y pérdida ósea radiográfica, estos signos son mandatorios para realizar el diagnóstico de periodontitis y es una diferencia clara con la gingivitis. Adicionalmente podemos observar recesiones, supuración, movilidad incrementada, migración dental patológica y dolor. (Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)



**Figura.2.** Periodontitis (Dreamstime)

### 2.1.3 Gingivitis

Es la inflamación en diferentes grados de intensidad de la encía sin afectar los tejidos de soporte (ligamento, cemento, hueso). Los signos de la gingivitis incluyen inflamación y sangrado al sondaje. Aunque puede ocurrir agrandamiento gingival por el edema, dando como resultado el desplazamiento coronal del margen gingival en relación a la CEJ, no existe formación de la bolsa periodontal con pérdida de inserción y hueso. La profundidad al sondaje (hasta 3.9 mm) debe ser analizada cuidadosamente para descartar "pseudobolsas periodontales", al igual que la pérdida ósea radiográfica. (Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)



**Figura 3.** Gingivitis (Botero JE, Bedoya E, et al., 2010)

## 2.2 Bacterias de cavidad oral

Las bacterias que forman la placa dental son muy variadas, se pueden encontrar entre 200 y 300 especies. El proceso de formación de la placa dental sigue una pauta de colonización denominada sucesión autogénica; Es decir, los propios microorganismos generan o inducen cambios físico-químicos locales que a su vez modifican la composición microbiana de la placa.

Los primeros colonizadores del diente son: *Streptococcus sanguis*, *S. mitis* y *S. oralis*. Inmediatamente después se une *Actinomyces naeslundii*. Estos microorganismos son los pioneros en la formación de la placa dental.

Posteriormente van apareciendo otras bacterias como: *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. parasanguis*, *Neisseria* spp y otros.

A los siete días de la colonización los *Streptococcus* son la especie predominante en la placa, y a las dos semanas comienzan a abundar los bacilos Gram negativos.

Después de la multiplicación activa de los microorganismos colonizadores primarios, se incorporan otras especies microbianas dando lugar a las llamadas "colonización secundaria" y "colonización terciaria".

A medida que la placa aumenta de grosor, las zonas más profundas de la misma evidencian un déficit de oxígeno, por lo que las bacterias aerobias van desapareciendo de esta zona y se añaden otras con un potencial de oxidorreducción más bajo. De modo que los anaerobios estrictos o menos aerotolerante se sitúan en la zona más profunda de la placa, los aerobios en las más superficiales y los estreptococos en cualquier lugar de la misma.

Hay una serie de microorganismos secundarios que se adhieren a las bacterias de la placa. Son los siguientes: *Prevotella loescheii*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* sp., *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*.

(Microbiología de la placa bacteriana (2012)

### 2.2.1 *Staphylococcus aureus* :

**Tabla 1.** Taxonomía *S. aureus*

Reino	Bacteria
Clase	Bacilli
Familia	Staphylococcaceae
Genero	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>

Es una bacteria anaerobia facultativa grampositiva productora de coagulasa y catalasa que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. (Cervantes E. et al.,2014; Garcia R. et al.,2014; Salazar P. et al.,2014.)

#### **Morfología:**

Es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetros de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. (Cervantes E. et al.,2014; Garcia R. et al.,2014; Salazar P. et al.,2014.)

#### **Cápsula:**

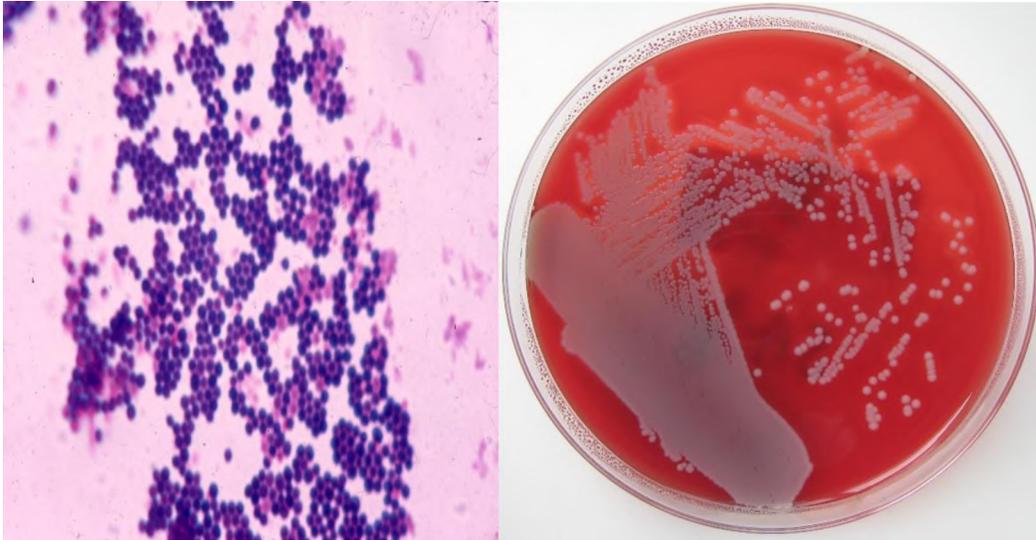
Se han reportado casos de cepas de *S. aureus* que se encuentran recubiertas por una capa de polisacáridos externos, la cual recibe el nombre de slime o cápsula mucoide, que incrementa su capacidad de adherencia, así como refuerza el efecto antifagocítico. (Cervantes E. et al.,2014; Garcia R. et al.,2014; Salazar P. et al.,2014.)

**Metabolismo:**

El *Staphylococcus aureus* tiene un metabolismo de tipo fermentativo y anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativa. Son capaces de fermentar la glucosa sin producción de gases y producen acetil metil carbinol, fermentan también el manitol con formación de ácidos y puede hacerlo en anaerobiosis. No hidrolizan el almidón y son capaces de crecer en presencia de un 40% de bilis. Su temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40 °C y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pH mucho más extremos. Soportan tasas elevadas de cloruro sódico, hasta un 15%. Poseen una enzima, la coagulasa, que la diferencia del resto de las especies del género; ésta tiene la facultad de reaccionar con el fibrinógeno dando lugar a un coágulo de fibrina. Poseen igualmente una desoxirribonucleasa o DNasa, una nucleasa exocelular que despolimeriza el ADN. También presentan la proteína A, una proteína de unión inespecífica a anticuerpos que está relacionada con su virulencia. Un medio diferencial para *S. aureus* es el medio manitol-salino o Chapman. (Cervantes E. et al.,2014; Garcia R. et al.,2014; Salazar P. et al.,2014.)

**Epidemiología:**

El *Staphylococcus aureus* es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprófito, se encuentra en la piel del individuo sano, pero en ocasiones en que las defensas de la piel caen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo. Entre las principales patologías causadas por este microorganismo están la neumonía, sialadenitis, sepsis con o sin metástasis (osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados), enfermedades por toxinas (síndrome de piel escaldada por estafilococo, síndrome del shock tóxico y gastroenteritis). (Cervantes E. et al.,2014; Garcia R. et al.,2014; Salazar P. et al.,2014.)



**Figura 4.** Características macroscópicas y microscópicas de *S. aureus* (recuperado de <https://compendiomicrobiologia.wordpress.com>)

#### **Resistencia:**

*S. aureus* posee resistencia a través de una beta-lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta-lactamasa está codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas. La resistencia al óxido nítrico es una cualidad peculiar del *S. aureus*, capacidad que lo distingue de otros patógenos. Esa resistencia se debe a que el microorganismo produce una enzima llamada lactato-deshidrogenasa, que la faculta para tolerar el estrés causado por el radical del óxido nítrico. Esta observación se ha hecho tanto en especies resistentes a la meticilina como en las que son susceptibles al antibiótico, así como en cepas hospitalarias como adquiridas en la comunidad. . (Cervantes E. et al.,2014; Garcia R. et al.,2014; Salazar P. et al.,2014.)

#### **Tratamiento:**

Esta bacteria produce la enzima  $\beta$ -lactamasa, pero hay que tomar en cuenta que está logrando un alto grado de tolerancia contra penicilinas resistentes a  $\beta$ -lactamasa como la oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina o metecilina (SARM *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina). Estos *Staphylococcus* resistentes a Meticilina son muy peligrosos ya que provocan multitud de infecciones nosocomiales (contraídas en el hospital) y son multiresistentes a gran cantidad de antibióticos; el siguiente tratamiento usado fue vancomicina pero incluso a éste han desarrollado resistencia. Ahora se usan otros antibioticos si existe resistencia, como levofloxacino o daptomicina. (Cervantes E. et al.,2014; Garcia R. et al.,2014; Salazar P. et al.,2014.)

### 2.2.2 *Streptococcus mutans*:

**Tabla 2.** Taxonomía *S. mutans*

Reino	Bacteria
Clase	Bacilli
Familia	Streptococcaceae
Genero	<i>Streptococcus</i>
Especie	<i>Streptococcus mutans</i>

#### **Biología del microorganismo:**

Es una bacteria esférica, Gram-positiva, perteneciente al grupo de bacterias acidolácticas, estas bacterias crecen en cadenas o pares, donde cada división celular ocurre a lo largo de un eje, es un anaerobio obligado que recibe energía a través de la fermentación del ácido láctico, es un alfa hemolítico. (Acosta A, Agudelo S, Barrientos S, Chávez M, Cuellar A, Duran C, Gamboa F, Gamboa L, Gómez O, et al.,2006).

#### **Epidemiología:**

Hace parte de la flora oral bacteriana, tienen mayor susceptibilidad los niños.

#### **Factores de virulencia:**

Metaboliza la sacarosa para producir polisacáridos extracelulares (sustancia laxa que facilita su adhesión a las caras libres de las piezas dentales) e intracelulares (metabolismo energético).

Acidogenicidad- fermentan azúcar para producir ácido láctico

Aciduricidad- sintetiza ácido en pH bajo

Acidofilicidad- vive en pH bajo

Síntesis de fructanos y glucanos- a partir de sacarosa para adherirse al diente

Síntesis de polisacáridos intracelulares, como el glucógeno- produce ácidos sin consumir azúcares. (Acosta A, Agudelo S, Barrientos S, Chávez M, Cuellar A, Duran C, Gamboa F, Gamboa L, Gómez O, et al.,2006).

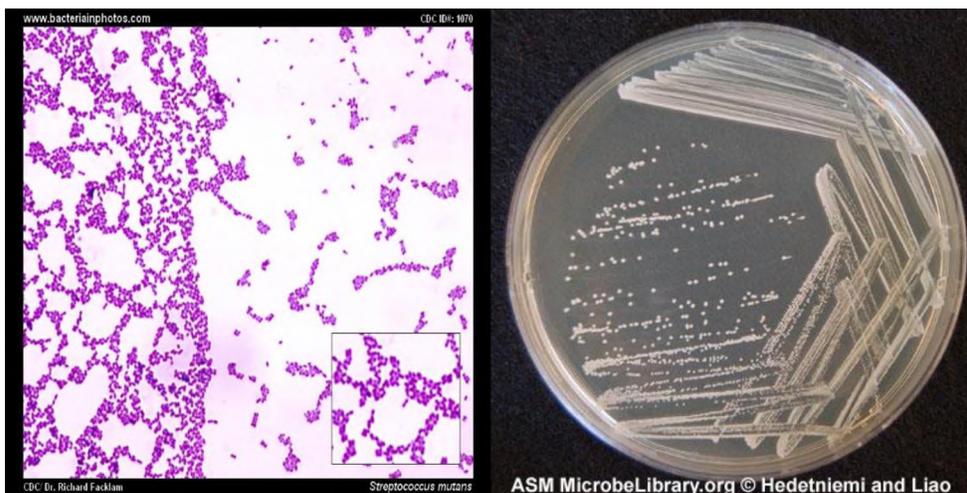
### Estructura del genoma:

No cuenta con un núcleo definido por una membrana nuclear, el material genético se encuentra en forma de cadenas simples. (Acosta A, Agudelo S, Barrientos S, Chávez M, Cuellar A, Duran C, Gamboa F, Gamboa L, Gómez O, et al.,2006).

### Patogénesis:

Interactúa con partículas de alimentos, produce ácido láctico, se adhiere al diente y permite la invasión de otros microorganismos, es una de las causas de las caries dentales, puede generar Endocarditis si alcanza el torrente circulatorio de individuos con valvulopatías (p. ej., durante una extracción dental).

Estas bacterias forman capas de naturaleza polisacárida (glucocaliz) que les permite adherirse a los dientes. Producen ácido a partir de los azúcares de la saliva y dan lugar a la erosión del esmalte y la dentina. El glucocaliz también facilita la adherencia a las válvulas cardiacas lesionadas si la bacteria llega a torrente sanguíneo. (Acosta A, Agudelo S, Barrientos S, Chávez M, Cuellar A, Duran C, Gamboa F, Gamboa L, Gómez O, et al.,2006).



**Figura 5.** Características macroscópicas y microscópicas de *S. mutans* (recuperado de <http://www.bacteriainphotos.com/>)

### 2.2.3 *Enterococcus faecalis*

**Tabla 3.** Taxonomía *E.faecalis*

Reino	Bacteria
Clase	Bacilli
Familia	Enterococcaceae
Genero	<i>Enterococcus</i>
Especie	<i>Enterococcus faecalis</i>

Es una bacteria anaerobia, Gram- positiva.

Su reservorio natural es el tracto gastrointestinal de mamíferos, aunque puede detectarse en el suelo, agua o alimentos. Los enterococos causan diferentes tipos de infección, tales como las del tracto urinario, bacteriemias, endocarditis, meningitis, infecciones intraabdominales (bilíares o peritoneales) y de úlceras de decúbito o isquémicas. Actualmente es una de las principales causas de infección nosocomial. (J A. Girón-González<sup>a</sup>, R. Pérez-Cano et al.,2013)

#### **Infecciones nosocomiales:**

De acuerdo con la Agencia de Salud Pública de Canadá, el *Enterococcus faecalis* es el tercer organismo más común responsable de las infecciones nosocomiales y ocasiona el 10 por ciento de las infecciones nosocomiales en todo el mundo. El primer signo de una infección nosocomial es a menudo la fiebre. Otros síntomas pueden incluir presión arterial baja, micción reducida, un alto recuento de células blancas en la sangre, respiración rápida, y confusión. Una infección de una herida específica o la entrada de un catéter pueden inflamarse, ponerse de color rojo y ser sensible al tacto. (J A. Girón-González<sup>a</sup>, R. Pérez-Cano et al.,2013)

### **Infecciones del tracto urinario:**

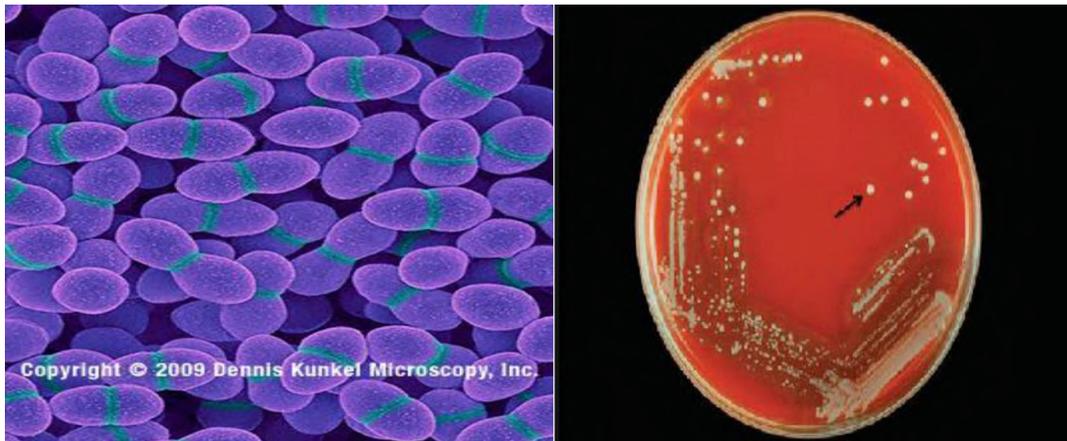
Las infecciones del tracto urinario, o UTI (por sus siglas en inglés), son las infecciones nosocomiales más comúnmente adquiridas. De acuerdo con la Agencia de Salud Pública de Canadá, el 16 por ciento de las infecciones urinarias son causadas por el *Enterococcus faecalis*. Los síntomas incluyen fiebre, orina turbia, fuerte olor de la orina, dolor o sensibilidad sobre el hueso púbico, sensación de ardor que acompaña a la micción, sangre en la orina, irritabilidad, falta de apetito, pérdida del control urinario, una mayor frecuencia de micción, náuseas y vómitos. (J A. Girón-González<sup>a</sup>, R. Pérez-Cano<sup>a</sup> et al.,2013)

### **Resistencia:**

Además de ser adaptable, el *Enterococcus faecalis* es extremadamente resistente. La bacteria es capaz de resistir la mayoría de los antibióticos debido a la fluidez de su composición genética. Tiene la capacidad única para el intercambio de ADN con el fin de mejorar tanto su potencia infecciosa como su resistencia a los antibióticos. (J A. Girón-González<sup>a</sup>, R. Pérez-Cano<sup>a</sup> et al.,2013)

### **Tratamiento:**

Las infecciones causadas por el *Enterococcus faecalis* pueden ser tratadas con ampicilina o penicilina, pero sólo si se combinan con aminoglucósido. (J A. Girón-González<sup>a</sup>, R. Pérez-Cano<sup>a</sup> et al.,2013)



**Figura 6.** Características macroscópicas y microscópicas de *E. faecalis*

( recuperado de <http://www.denniskunkel.com>)

## 2.2.4 *Porphyromonas gingivalis*:

**Tabla 4.** Taxonomía *P. gingivalis*

Reino	Eubacteria
Clase	bacteroides
Genero	<i>Porphiromonas</i>
Especie	<i>Porphiromonas gingivalis</i>

Pertenece al género bacteroides y es un cocobacilo Gram- negativo, no tiene movilidad, anaerobios estrictos, forma colonias negras en agar sangre, no forma parte de la flora normal de la cavidad oral, es un patógeno exógeno ausente en individuos sanos, destruye colágeno y los tejidos de sostén, también secretan diversas enzimas como desoxirribonucleasas, fosfolipasas y pueden degradar fibrinógeno, utilizan principalmente aminoácidos y no fermentan hidratos de carbono, liberan metabolitos tóxicos para las células del hospedador, algunos son volátiles(halitosis).( Donald Ramos Perfecto<sup>1</sup>, Hilda Moromi Nakata<sup>1</sup>, Elba Martínez Cadillo, et al., 2011)

### **Factores de virulencia**

**Membrana externa:** forma vesículas superficiales que se liberan con facilidad del resto del soma celular, atraviesan membranas impermeables y transportan factores de virulencia; posee proteínas que se comportan como adhesinas que participan en fenómenos de adhesión y congregación bacteriana, por tanto, la colonización de células epiteliales y fibroblastos.

**Fimbrias:** se comportan como adhesinas, participan en procesos de coagregación y adhesión a superficies epiteliales y dentales.

**Proteasas:** produce enzimas proteolíticas gracias a ellas obtiene nutrientes del hospedador favoreciendo la multiplicación y capacidad de penetración y diseminación provocando daños tisulares importantes.

Estas proteasas al comportarse como agresinas e impedinas desempeñan un papel fundamental en el surco gingival para producir periodontitis. (Donald Ramos Perfecto<sup>1</sup>, Hilda Moromi Nakata<sup>1</sup>, Elba Martínez Cadillo, et al., 2011)

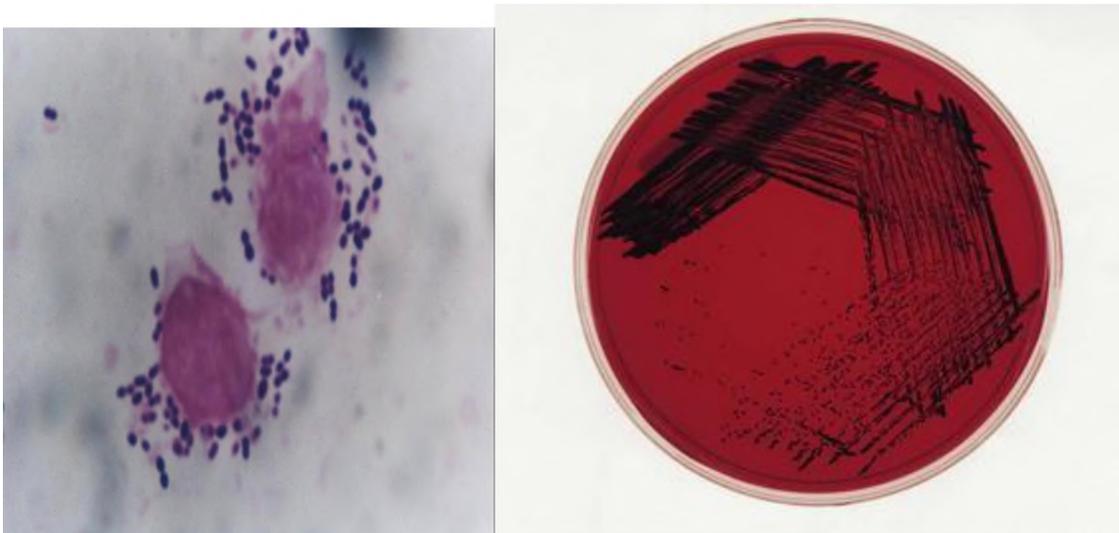
**Clínica:**

Asociada a la periodontitis crónica.

GUNA: destrucción acelerada de los tejidos afectados y diseminación local o sistémica de la infección.

Síndrome de NOMA invade tejidos locales de la boca y la cara.

Abscesos periapicales. (Donald Ramos Perfecto<sup>1</sup>, Hilda Moromi Nakata<sup>1</sup>, Elba Martínez Cadillo, et al., 2011)



**Figura 7.** Características macroscópicas y microscópicas de *P. gingivalis* (recuperado de <https://www.flickr.com>)

### 2.2.5 *Prevotella intermedia*

**Tabla 5.** Taxonomía *P.intermedia*

Reino	Bacteria
Clase	Bacteroidia
Familia	Prevotellaceae
Genero	<i>Prevotella</i>
Especie	<i>Prevotella intermedia</i>

Bacilos Gram- negativos inmóviles, anaerobios estrictos, no esporulados, capaces de producir pigmentos, moderadamente fermentativos. (Donald Ramos Perfecto<sup>1</sup>, Hilda Moromi Nakata<sup>1</sup>, Elba Martínez Cadillo, et al., 2011)

#### **Clínica:**

Periodontitis, gingivitis, abscesos periodontales y periapicales.

Gingivitis en embarazo: estas bacterias degradan hormonas que se sintetizan en el embarazo.

#### **Hábitat:**

Surco gingival, forma parte de la placa subgingival, coloniza ese hábitat debido a que existe anaerobiosis. (Donald Ramos Perfecto<sup>1</sup>, Hilda Moromi Nakata<sup>1</sup>, Elba Martínez Cadillo, et al., 2011)

#### **Medios de cultivo:**

Muestra de suco gingival, donde no hay oxígeno.

Agar sangre: se utilizan en los medios de cultivo Vit K y hemina como suplemento.

La mayoría de sus colonias aisladas son pigmentadas.

Si se exponen las placas con colonias crecidas (aproximadamente 10 días) a luz UV se observan las colonias de color rojizo. (Donald Ramos Perfecto<sup>1</sup>, Hilda Moromi Nakata<sup>1</sup>, Elba Martínez Cadillo, et al., 2011)

**Factores de virulencia:**

Proteasas que degradan inmunoglobulinas, fimbrias que participan en la agregación y conragación bacteriana, metabolitos tóxicos que producen una mayor muerte de células del hospedador por contacto. (Donald Ramos Perfecto<sup>1</sup>, Hilda Moromi Nakata<sup>1</sup>, Elba Martínez Cadillo, et al., 2011)



**Figura 8.** Características macroscópicas y microscópicas de *P. intermedia*  
(Recuperado de <http://www.microbiologyinpictures.com>)

## **2.3 Plantas antimicrobianas**

Desde la antigüedad han sido empleadas las plantas para diferentes fines ya sean en el área de alimentos (condimentos), en la cosmetología y en la medicina principalmente enfocados a curar o prevenir diversas enfermedades (Negróni,2000). Los productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. Para el desarrollo de estos farmacéuticos se comienza con la identificación de los principios activos, para después utilizando diversos ensayos biológicos obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés, ya sea obteniendo la concentración mínima inhibitoria o la concentración mínima bactericida. (Ncube, Afolayan & Okoh, 2008). Para determinar su correcta evaluación existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de valorar su actividad, en especial la antimicrobiana, a través de diferentes métodos *in vitro* principalmente desarrollados en el laboratorio y así determinar a qué microorganismos son sensibles o muestran resistencia. (Ramírez & Marín, 2009).

Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado una amplia gama de productos y extractos obtenidos de plantas con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas (Cáceres et al; 1990; Dimayuga y García, 1991; Rojas et al., 1992; Sanabria et al., 1998).

### **2.3.1 Jengibre (*Zingiber officinale*)**

Es una planta de aproximadamente 90 cm. de altura. Tiene hojas alargadas de hasta 20 cm y un rizoma horizontal. Los rizomas son tallos subterráneos con varias yemas que crecen horizontalmente donde se emiten raíces y brotes herbáceos El rizoma del jengibre es usado mundialmente como especia y planta medicinal, siendo México uno de los más importantes productores. Se han atribuido sus propiedades medicinales a una molécula orgánica llamada gingerol que le derivan una familia de moléculas llamadas gingeroles. Aproximadamente del 2-3% del rizoma son aceites volátiles compuestos por una mezcla de monoterpenos y sesquiterpenos [Ghosh AK et al. 2011].



**Figura 9.** *Zingiber officinale* (recuperado de <http://encyclopedia2.thefreedictionary.com>)

*Zingiber officinale* es una planta nativa de la India y China, que ha sido ampliamente utilizada como saborizante, en bebidas alcohólicas y en la medicina popular. Ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional china para tratar dolores de cabeza, náuseas, fiebre, artritis, reumatismos y dolores musculares. Los constituyentes activos del jengibre comprenden gingeroles y shogaoles, y el primero es el componente activo biológico principal que explica las propiedades antiinflamatorias y analgésicas del jengibre. Analizando los constituyentes activos del jengibre (Lantz R, Chen G, 2007) verificaron que tanto el gingerol como el shogaol eran capaces de inhibir significativamente la producción de prostaglandinas E2 inducidas por LPS de *Escherichia coli*. Los extractos que contenían principalmente gingerol tuvieron la capacidad de inhibir la producción de COX-2, mientras que los que contenían shogaol no mostraron efecto sobre la COX-2. (Eiko L, Olivera J, Dennis R, et al.,2015).

En estudios previos se analizó la acción antimicrobiana del extracto glicólico del *z. officinale* en el biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* y se observó la disminución de la biopelícula en un 57%. (Maekawa L, Valera M, 2013), también se observó la actividad antimicrobiana del extracto glicólico de *z. officinale* por medicación intracanal durante 14 días a pacientes con infecciones de *Candida albicans*, *E. faecalis* y *E. coli*.

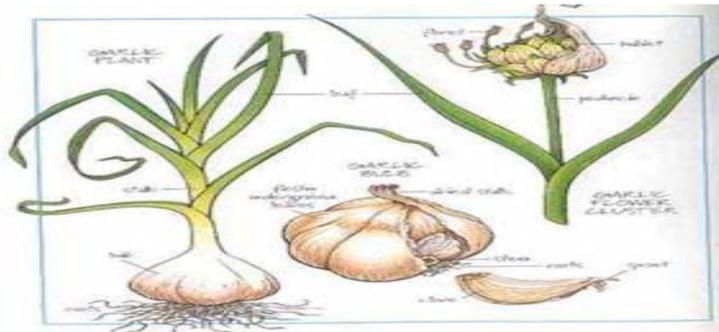
### 2.3.2 Ajo (*Allium sativum*)

Es una planta de aproximadamente 30 cm de alto conformada por un bulbo subterráneo, que a su vez está conformada por 20 bulbos o más, y por una raíz que puede llegar a medir 50 cm. La riqueza de compuestos azufrados le otorga al ajo propiedades farmacológicas. Se ha comprobado su actividad antioxidante, anticarcinogénica, inmunoreguladora y antimicrobiana, entre otros.

Los primeros pasos para identificar los constituyentes activos del ajo datan de la mitad del siglo pasado cuando Cavallito y Cols, descubrieron la alicina (dialil sulfato), una sustancia que se formaba por la acción de la enzima aliinasa, presente en la cubierta, cuando actúa sobre la aliina que forma parte de los dientes de ajo, al macerarlos. Estudios más modernos han aportado nuevos datos acerca de los compuestos causantes de la capacidad antimicrobiana del ajo. Actualmente existen muchos preparados comerciales de ajo. El primero es una preparación de dientes de ajo pulverizados que en contacto con agua produce alicina; el aceite de ajo se produce comercialmente mediante el calentamiento de sus dientes a 100°C y la recolección de los vapores destilados, proceso en el cual la alicina se convierte en dialil sulfuro y otros compuestos, y posteriormente esta sustancia se diluye con aceite vegetal en una proporción 200:1 (Domingo D, Lopez-Brea M, 2003).

La vulva de *Allium sativum* ha sido utilizada en muchas partes del mundo como antiséptico, antihelmíntico y antihistamínico; El ajo (*Allium sativum*), del cual se realiza la extracción del disulfuro de alilo (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>S<sub>2</sub>), trisulfuro de alilo y tetrasulfuro de alilo, tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los componentes sulfurosos y fenólicos. Un patrón con el que se compara el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales o cualquier otro agente bactericida es el fenol. [Ghosh AK et al. 2011].

El ajo (*Allium sativum*) se conoce desde hace mucho tiempo por tener propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, hay estudios previos que muestran la eficiente actividad bactericida mostrando como concentraciones mínimas inhibitorias en bacterias gram- negativas 35.7-1mg/ml y en bacterias gram-positivas 142.7-35.7 mg/ml, en ensayos con *Streptococcus mutans* and *P. gingivalis* se identificó la muerte casi inmediata de la segunda y la primera se demoró un poco más. El extracto de ajo también inhibió la actividad de la tripsina y la proteasa total de *P. gingivalis* en 92,7% y 94,88%, respectivamente. Estos datos indican que el extracto de ajo inhibe el crecimiento de patógenos orales y ciertas proteasas y por lo tanto puede tener valor terapéutico, particularmente para la periodontitis. (Bakri I, Douglas C,2004)



**Figura 10.** *Allium sativum* (Recuperado de <http://www.tuninst.net/>)

## 2.4 Metabolitos con capacidad antimicrobiana

Como parte de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. Durante la respuesta hipersensible, algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. (Sepulveda G, 2004)

### 2.4.1 Alcaloides

Son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con terpenoides. Por su similitud química a moléculas que participan en la transmisión de las señales del sistema nervioso, el efecto tóxico de los alcaloides radica en la capacidad de bloquear neuroreceptores, intermediarios de la transducción de la señal neuronal y canales iónicos de vertebrados e insectos. Mientras que sus efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos. (Wink y Schimmer, 1999).

#### **2.4.2 Esteroides y Terpenoides**

Se derivan de la fusión de unidades de 5 carbonos llamados isoprenos (C<sub>5</sub>) y se clasifican de acuerdo al número unidades de isopreno que los forman. En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina como la ruta DXP y se realiza en los plastidos. (Sepulveda G, 2004).

#### **2.4.3 Taninos**

El término tanino se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden y se pueden dividir en hidrolizables y condensados, en función de que puedan o no ser hidrolizados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. (Domingo D, Lopez-Brea M, 2003).

#### **2.4.4 Cumarinas**

Son compuestos derivados de la benzo-alfa-pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Están presentes en las margaritas y tienen propiedades antiinflamatorias, antitromboticas y vasodilatadoras. La Warfarina, un anticoagulante clásico, pertenece a este grupo. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante la interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral. (Domingo D, Lopez-Brea M, 2003).

#### **2.4.5 Flavonas y Flavonoides**

Las Flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas. Mención especial merecen las catequinas, presentes en el té verde (*camellia sinensis*), las cuales ejercen actividad contra *Vibrio cholerae* O1, *streptococcus mutans*, *shiguella* y otros microorganismos. (Domingo D, Lopez-Brea M, 2003).

### **2.4.6 Cardiotónicos**

Son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada o  $\delta$ -lactona- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco. De las raíces de Azuceno de la habana fue aislado un cardenólido que además de ser cardiotónico es antibacterial. (Martínez A; 2002)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana de extractos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale*, sobre microorganismos de importancia en cavidad oral.

#### 3.2 Objetivos específicos

Obtener extractos acuosos y etanolicos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale*.

Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale*, sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*.

Determinar la CMI de los extractos de las dos plantas sobre los 5 microorganismos mencionados anteriormente.

Identificar cualitativamente los tipos de metabolitos secundarios presentes en los extratos etanolicos rotaevaporados y acuosos liofilizados de *Allium sativum* y *Zingiber officinale*.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Obtención de los extractos

#### 4.1.1 Metodología 1

El material vegetal se obtuvo en un mercado local, posteriormente este material seco y molido de ambas especies vegetales se sometieron a extracción por separado con etanol y agua desionizada mediante la técnica de maceración en frío. Se utilizaron inicialmente 1000g de cada planta, se pelaron y lavaron, posteriormente se volvió a pesar cada una, el material de ajo que se maceró fue de 480 g y de jengibre 400 g, se colocaron cada uno en 2 frascos ámbar uno con 1000ml de alcohol rectificado y otro con 1000ml agua desionizada se agitaron los frascos 3 veces al día durante 8 días.

Después de transcurridos los 8 días, se filtraron al vacío los 4 extractos a través de un papel filtro para eliminar cualquier material sólido de las dos plantas.

Para obtener los extractos acuosos se utilizó un liofilizador que permite la eliminación del agua de productos o disoluciones en condiciones de baja presión y temperatura lo que favorece que estos productos deshidratados mantengan todas sus propiedades estables. El agua se elimina por congelación del producto y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío y temperatura. Al suministrar calor el hielo pasa de su fase sólida a la gaseosa (sublimación), sin alcanzar el punto de ebullición del agua, y se evita el paso por la fase líquida. (Universidad autónoma de Madrid, <https://www.uam.es>)



**Figura 11.** Liofilizador (recuperado <http://www.tecniespectro.com>)

Luego se utilizó un rotaevaporador para eliminar el etanol de las muestras de las dos plantas; El rotavapor permite mediante una destilación a vacío, la evaporación rápida de disolvente de una disolución, recuperando el soluto.



**Figura 12.** Rotaevaporador (recuperado <http://grupodidacta.com>)

Finalmente se concentraron a presión reducida a una temperatura no mayor de 40°C en una cámara de vacío. A partir de los extractos concentrados se prepararon diferentes concentraciones para su evaluación. (Gracia et al, 1995)

#### **4.1.2 Metodología 2**

Se tomaron 90 gramos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale*, se picaron en una procesadora de alimentos, previamente desinfectada con hipoclorito y agua, el material obtenido del procesamiento, se envasó en frascos ámbar y se les adiciono 600 ml de agua desionizada, se dejó reposar el material vegetal, a las 3 horas se tomaron alícuotas del sobrenadante para envasar el contenido en tubos eppendorf y a las 24 horas se repite la toma de alícuotas.

## **4.2 Evaluación de actividad antimicrobiana**

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las dos plantas se realizó sobre cepas de referencia ATCC: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* (microorganismos Gram-positivos) y *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* (microorganismos Gram-negativos). Estas cepas de referencia están preservadas en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana.

### **4.2.1 Preparación del inóculo**

Se tomaron de 3 a 5 colonias morfológicamente idénticas del agar donde se encontraban sembrados cada microorganismo, se tomó un tubo de ensayo de 100 ml a este se le adicionaron 4 ml de solución salina en el caso de bacterias Gram-positivas y caldo BHI para bacterias gram- negativas, se mezcló la bacteria por agitación con ayuda del aza y se acopló la turbidez a la escala de McFarland.

### **4.2.2 Siembra**

#### **4.2.2.1 Bacterias Gram- positivas**

Se tomó el medio Mueller Hinton ya esteril en tubos de ensayo de 100 ml, se vertió en cajas de Petri, posterior a su solidificación se realizó la siembra con un isopo impregnado con la suspensión en solución salina de la bacteria en superficie y de forma masiva, después se hicieron seis perforaciones con la punta invertida esterilizada de una pipeta pasteur. Finalmente, se adicionaron 30 µL de los cuatro extractos y en los dos pozos restantes se inocularon dos antibióticos vancomicina y amoxicilina. Se incubó a 37°C, por 24 horas. Cada prueba se realizó por triplicado. (Martínez, 1996)

#### **4.2.2.2 Bacterias Gram- negativas**

Se tomó agar Wilkins-Chalgren enriquecido con 5 µg/ml de Hemina y 1 µg/ml de menadiona, se esterilizó en tubos de ensayo de 100 ml, posteriormente se inocularon 100 µL de la suspensión en BHI de las bacterias gram – negativas y se vertió en cajas de Petri, después de su solidificación en un ambiente anaerobio se realizaron seis perforaciones con la punta invertida de una pipeta pasteur.

Finalmente se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de los cuatro extractos y en los dos pozos restantes se inocularon dos antibióticos vancomicina y amoxicilina. Estas cajas se incubaron por 8 días a 35°C en anaerobiosis. Cada prueba se realizó por triplicado. (Martínez, 1996)

#### **4.2.3 Controles**

Se utilizó como controles positivos Amoxicilina y Vancomicina, cada uno se preparó en un tubo eppendorf con 500  $\mu\text{l}$  y cinco discos de cada antibiótico; y como control negativo se utilizó dimetilsulfoxido (DMS) que fue el diluyente de cada extracto.

#### **4.2.4 lectura de las siembras**

Los medios de cultivo inoculados se pre incubaron durante 18 horas a 4°C y luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas, realizándose la lectura de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas, todos los ensayos se realizaron por triplicado.

En bacterias gram – negativas la lectura se realizó a los 8 días en anaerobiosis.

## 5. Resultados

### 5.1 Marcha fitoquímica

Los resultados de la marcha fitoquímica demuestran que tanto *Allium sativum* y *zingiber officinale* evidencian la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, quinonas, cumarinas, terpenos y esteroides.

(---) Negativo

(+) Positivo

(++) Francamente positivo

(+/-) Dudoso

**Tabla 6.** Análisis fitoquímico preliminar de *Allium sativum* y *zingiber officinale* para alcaloides

ALCALOIDES	<i>Allium sativum</i> Acuoso	<i>Allium sativum</i> Etanolico	<i>Zingiber officinale</i> Acuoso	<i>Zingiber officinale</i> Etanolico
Dragendorf	-----	-----	-----	-----
Mayer	-----	-----	-----	-----

**Tabla 7.** Análisis fitoquímico preliminar de *Allium sativum* y *zingiber officinale* para esteroides

ESTEROIDES	<i>Allium sativum</i> Acuoso	<i>Allium sativum</i> Etanolico	<i>Zingiber officinale</i> Acuoso	<i>Zingiber officinale</i> Etanolico
Vainillina	+	+	----	----
Lieberman	----	----	----	----

**Tabla 8.** Análisis fitoquímico preliminar de *Allium sativum* y *zingiber officinale* para Taninos

TANINO	<i>Allium sativum</i> Acuoso	<i>Allium sativum</i> Etanolico	<i>Zingiber officinale</i> Acuoso	<i>Zingiber officinale</i> Etanolico
Cloruro férrico	+	+/-	+	++

**Tabla 9.** Análisis fitoquímico preliminar de *Allium sativum* y *zingiber officinale* para flavonoides

FLAVONOIDES	<i>Allium sativum</i> Acuoso	<i>Allium sativum</i> Etanolico	<i>Zingiber officinale</i> Acuoso	<i>Zingiber officinale</i> Etanolico
Shinoda	---	---	---	---
Rosenhein	+	++	---	---
Leucoantocianidinas	---	---	---	---

**Tabla 10.** Análisis fitoquímico preliminar de *Allium sativum* y *zingiber officinale* para cumarinas

CUMARINAS	<i>Allium sativum</i> Acuoso	<i>Allium sativum</i> Etanolico	<i>Zingiber officinale</i> Acuoso	<i>Zingiber officinale</i> Etanolico
Erlinch	---	++	---	++
Fuorescencia	++	++	++	++

**Tabla 11.** Análisis fitoquímico preliminar de *Allium sativum* y *zingiber officinale* para cardiotonicos

CARDIOTONICOS	<i>Allium sativum</i> Acuoso	<i>Allium sativum</i> Etanolico	<i>Zingiber officinale</i> Acuoso	<i>Zingiber officinale</i> Etanolico
Baljet	---	---	---	---
Molish	++	+	++	++

## 5.2 Actividad antimicrobiana

**Tabla 11.** Promedio de halos de inhibición en milímetros de los extractos obtenidos por metodología 1.

Microorganismos	Extractos 280 mg/mL			
	Allium sativum etanólico rotaevaporado	Allium sativum acuoso liofilizado	Zingiber officinale etanólico rotaevaporado	Zingiber officinale acuoso liofilizado
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	.	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	.	-	-	-
<i>P. gingivalis</i>	17.7	-	14.7	-
<i>P. intermedia</i>	-	-	-	-

**Tabla 12.** Promedio de halos de inhibición en milímetros de los extractos en solución acuosa obtenidos por metodología 2 (3 horas)

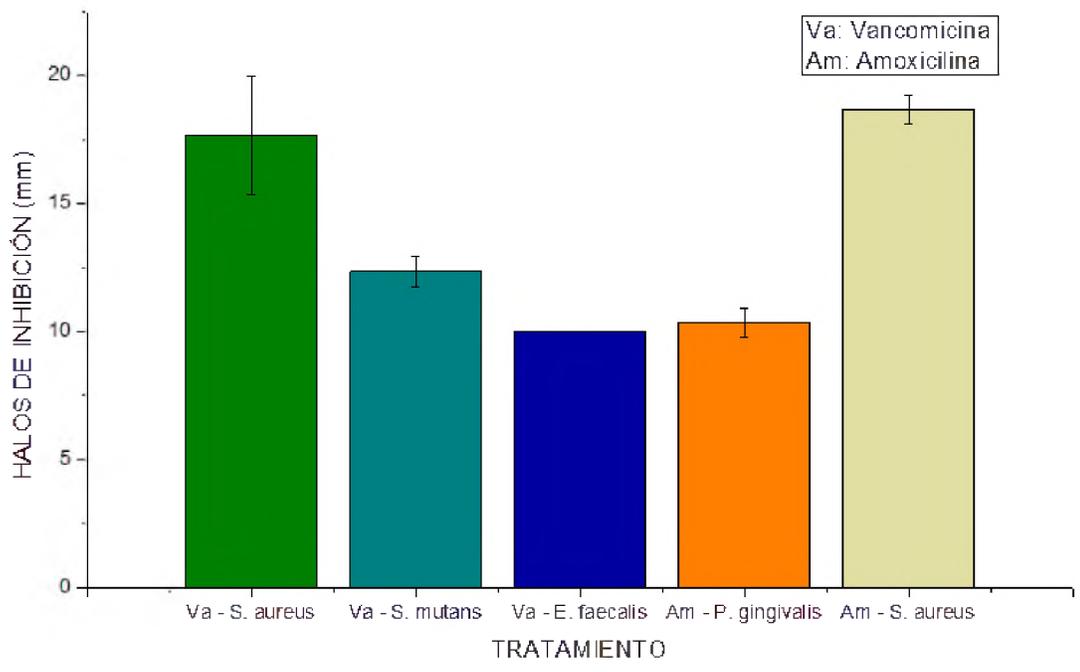
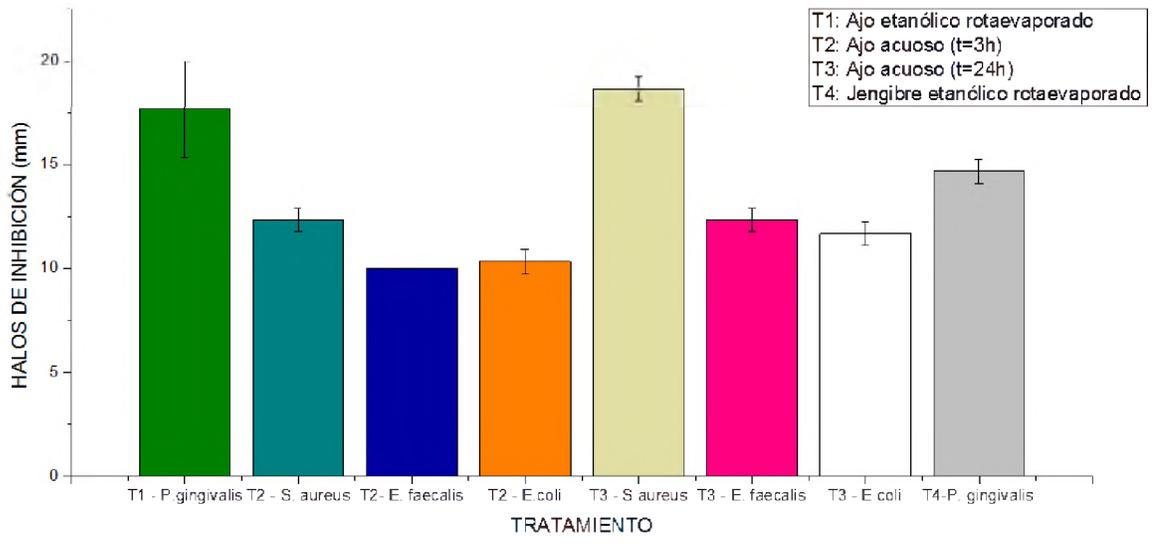
Microorganismos	Extractos 150 mg/ml	
	Allium sativum acuoso	Zingiber officinale acuoso
<i>S. aureus</i>	12.3	-
<i>S. mutans</i>	-	-
<i>E. faecalis</i>	10	-
<i>P. gingivalis</i>	-	-
<i>P. intermedia</i>	-	-
<i>E. coli</i>	10.3	-

**Tabla 13.** Promedio de halos de inhibición en milímetros de los extractos obtenidos por metodología 2 (24horas)

Microorganismos	Extractos 150 mg/ml	
	<i>Allium sativum</i> acuoso	<i>Zingiber officinale</i> acuoso
<i>S. aureus</i>	19	-
<i>S. mutans</i>	-	-
<i>E. faecalis</i>	12.6	-
<i>P. gingivalis</i>	-	-
<i>P. intermedia</i>	-	-
<i>E. coli</i>	11.6	-

**Tabla 14.** Promedio de halos de inhibición de controles negativos (DMSO) y controles positivos Vancomicina y Amoxicilina

Microorganismos	Controles		
	Vancomicina	Amoxicilina	DMSO
<i>S. aureus</i>	19.3	26	-
<i>S. mutans</i>	2	-	-
<i>E. faecalis</i>	18.7	-	-
<i>P. gingivalis</i>	-	30	-
<i>P. intermedia</i>	-	-	-
<i>E. Coli</i>	-	-	-



## 6. DISCUSION

Analizando los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica que se le hizo a los extractos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale*, se evidencio pruebas positivas de Rosenhein para los extractos acuosos y etanolicos del ajo, lo que indica la presencia de Flavonoides, según la literatura este tipo de extracto tiene actividad antimicrobiana frente a los microorganismos por formar complejos con las proteínas solubles y extracelulares de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas, degradando la membrana citoplasmática. (Domingo D, Lopez-Brea M, 2003). Se determinó por medio de la prueba de Erlinch y de fluorescencia que los extractos de ajo y jengibre acuoso y etanólico contienen cumarinas las cuales tienen como mecanismo de acción antimicrobiano la interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral. (Domingo D, López-Brea M, 2003). Las pruebas de terpenos y esteroides dieron positivas para los dos extractos obtenidos de *Allium sativum*, estos metabolitos tienen actividad antimicrobiana y antiinflamatoria (Domingo D, Lopez-Brea M, 2003). En la realización de las extracciones por separado de *Allium sativum* y *zingiber officinale* mediante la utilización de agua desionizada y etanol rectificado, se evidencio que la preservación del material vegetal con el agua fue menor que con el alcohol rectificado, las cuatro preparaciones se pusieron en frascos ámbar y se guardaron los recipientes con el contenido vegetal en un lugar fresco, sin exposición a rayos solares, posterior a esto se llevaron a cabo los procedimientos de liofilización y rotaevaporación, los extractos concentrados se guardaron en una cámara de vacío y luego en una nevera a 4 °C, sellados con papel aluminio para evitar su descomposición o contaminación cruzada con otros microorganismos del laboratorio donde se trabajó. Para hacer los concentrados se utilizó como solvente dimetilsulfoxido y agua desionizada, sin embargo, los concentrados se disolvieron con mayor facilidad con DMS

Al realizar la siembra y la inoculación de los concentrados preparados a partir de los extratos secos acuosos rotaevaporados y etanolicos liofilizados de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* a una concentración de 280 mg/ml se observó que los cuatro extractos de las dos plantas no tuvieron efecto sobre las bacterias Grampositivas utilizadas en la fase experimental, al inicio se pensó que era porque los extractos etanolicos liofilizados no estaban lo suficientemente secos y las concentraciones a las que se inoculaban no eran las calculadas, se procedió a dejar los extractos en la cámara de vacío durante un día más para eliminar cualquier tipo de contenido acuoso o etanólico, sin embargo al realizar de nuevo las pruebas en bacterias

Grampositivas no se evidencio ninguna clase de inhibición del extracto sobre los microorganismos sembrados en el medio de cultivo, se procedió a aumentar las concentración de los extractos hasta 500 mg/ml, pero no se encontró ningún resultado positivo.

En las bacterias gram negativas utilizadas *Porphyromonas gingivalis* mostro halos de inhibición con los extractos etanolicos de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* de la metodología 1, a una concentración de 280 mg/ml, por otra parte, *Prevotella intermedia* no mostro ningún tipo de inhibición.

Analizando los resultados previos tanto de los metabolitos que indican que el material vegetal evidencia la posible presencia de componentes y de reportes bibliográficos en los cuales se muestran actividad antimicrobiana en bajas concentraciones de extracto acuoso de *Allium sativum* con efecto inhibitorio sobre (*S. mutans* 71µg/ml, *S.aureus* 71.4 µg/ml, *E. faecalis* 71.4 µg/ml, *P.intermedia* 4.4 µg/ml y *P gingivalis* 4.4 µg/ml)( Bakri I, Douglas C. 2004) se tomó como posibilidad que los extractos de ambas plantas podrían ser termolábiles.

A partir de esta situación se decidió realizar otra metodología de extracción (metodología 2) utilizando agua desionizada y material vegetal de ambas plantas, no se utilizó etanol rectificado porque este puede generar un falso positivo en los halos de inhibición por ser un antiséptico.

El extracto acuoso de *Allium sativum* obtenido en la metodología 2 evidencio formación de halos de inhibición en *E. coli*, *E faecalis* y *s. mutans*, sin embargo a mayor tiempo de exposición del extracto a los microorganismos mayor es la medida de los halos de inhibición.

## 7. CONCLUSIONES

El extracto etanolico de *Allium sativum* y *Zingiber officinale* tuvo acción antimicrobiana sobre *Porphyromona gingivalis* a una concentración de 280 mg/ml

El extracto acuoso de *Allium sativum* mostro actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* a una concentración de 150 mg/ml.

Se observó que la mayor inhibición sobre *Porphyromona gingivalis* se dio por parte del extracto acuoso de *Allium sativum* obtenido en la metodología 1 a una concentración de 280 mg/ y sobre *Staphylococcus aureus* el extracto acuoso de *allium sativum* a una concentración de 150 mg/ml obtenido de la metodología 2.

Presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, quinonas, cumarinas, terpenos y esteroides en *Allium sativum* y *Zingiber officinale*

## 9. BIBLIOGRAFIA

Adeshina GO et al. 2011. Antibacterial activity of fresh juices of *Allium cepa* and *Zingiber officinale* against multidrug resistant bacteria. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2: 289-295.

Bakri I, Douglas C. 2004. Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria, Department of oral pathology, School of clinical Dentistry, University of Sheffield. UK.

Barker J, Jones MV. 2005. The potential spread of infection caused by aerosol contamination of surfaces after flushing a domestic toilet. *Journal of Applied Microbiology* 99: 339–347.

Cáceres A, Cano O, Alvarez A, Ovando and Samayoa B.1991. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. screening of 68 plants against gram positive bacteria. *J. Ethnopharmacol* 31: 193-208.

Domingo D, Lopez- Brea M.2003. Plantas con accion antimicrobiana, Servicio de Microbiologia, Hospital universitario de la princesa. Madrid.

Departamento de microbiología y parasitología. Escuela de bioanálisis. Facultad de farmacia. Universidad de los andes. Merida, Venezuela.

Eiko L, Olivera J, Dennis R. 2015. Different extracts of *Zingiber officinale* decrease *Enterococcus faecalis* infection in *Galleria mellonella*.

Fратиanni F, Ombra M, Cozzolino A, Riccardi R, Spigno P, Tremonte P, Coppola R, Nazzaro F, 2016, Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.) Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.), Department of Agriculture, Environment and Food, DiAAA, University of Molise, Via de Sanctis snc, 86100 Campobasso, Italy.

Grigore A et al.2010.Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus Vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters*. 15:5436-5443.

Lantz RC, Chen GJ, Sarihan M, Sólyom AM, Jolad SD, Timmermann BN. The effect of extracts from ginger rhizome on inflammatory mediator production. *Phytomedicine* 2007; 14:123-128.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Camargo CH, Jorge AO. 2013 Effect of *Zingiber officinale* and propolis on microorganisms and endotoxins in root canals. *J Appl Oral Sci*; pag 21:25-31.

Martínez A (2002). Esteroides Cardiotonicos. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Medellín.

Meriga B, Mopuri R, MuraliKrishna T, 2012, Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*, Department of Entomology, Regional Agricultural Research Station, Tirupati, India.

Microbiología de la placa bacteriana. (2012). Recuperado de <https://microral.wikispaces.com>.

Rangel D, García I, Velasco J, Velazco E y Buitrago D. 2001. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetonico y acuoso de *Baccharis nítida*.

Ramirez J, Contreras A. 2007. Is periodontal disease a public health issue in Colombia, *Colombia Medica*. 38(3):183-184.

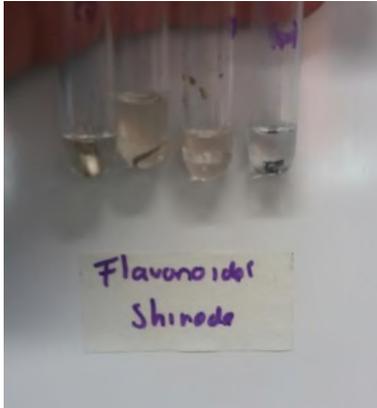
Ramirez L. Marin D. 2009. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. Universidad Tecnológica de Pereira.

Sepulveda G. 2004. La participacion de los metabolites secundarios en la defense de las plantas. Departamento de biotecnologia, Centro de desarrollo de productos bioticos del Intituto Politecnico Nacional. Mexico.

Wink M, Schimmer O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. pp17-134. UK

## 9. ANEXOS

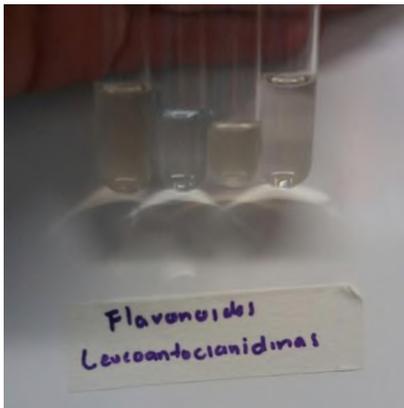
**Anexo 1.** Marcha fitoquímica extractos etanolicos y acuosos de *Allium sativum* y *zingiber officinale*



FLAVONOIDES

Shinoda

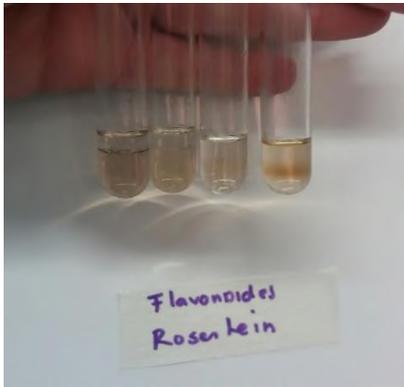
Observar la aparición de una coloración roja



FLAVONOIDES

Leucoantocianidinas

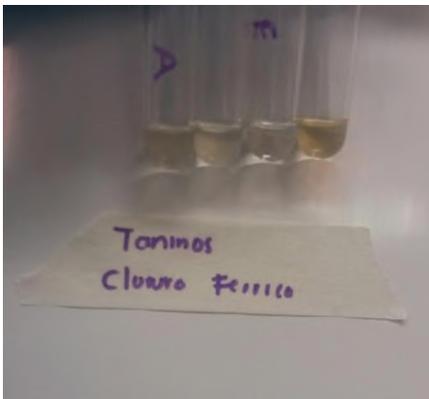
Observar la coloración roja



## FLAVONOIDES

Rosenhein

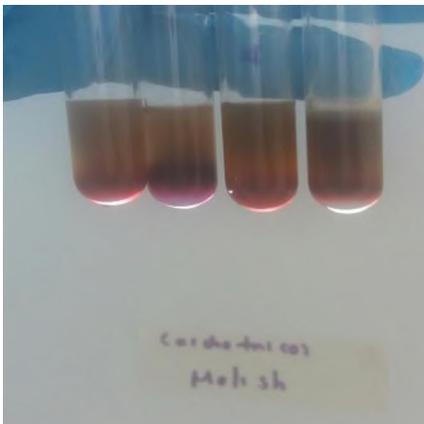
Observar la coloración de la fase amílica



## TANINOS

Cloruro ferrico

Observar la coloración azul o verde



## CARDIOTONICOS

Molish

Observar la coloración violeta en interfase



## CARDIOTONICOS

Baljet

Observar la formación de una coloración naranja rojiza



## CUMARINAS

Erllich

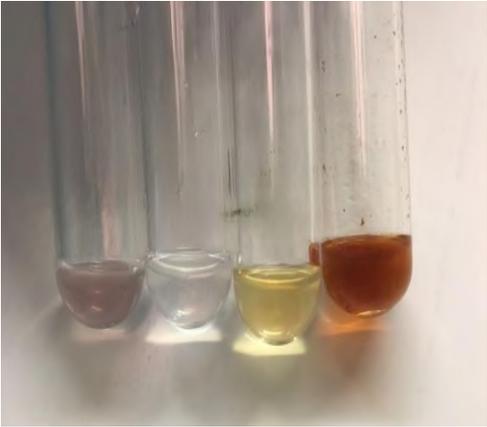
Observar coloración naranja



## ALCALOIDES

Dragendorff

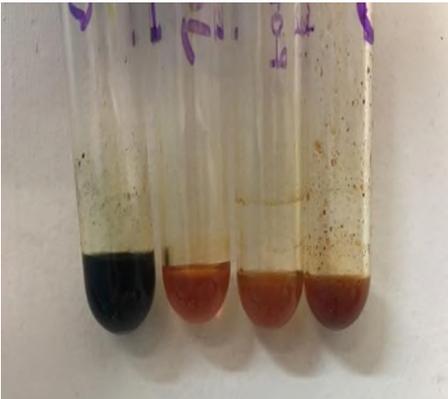
Observar la formación de un precipitado naranja



ALCALOIDES

Mayer

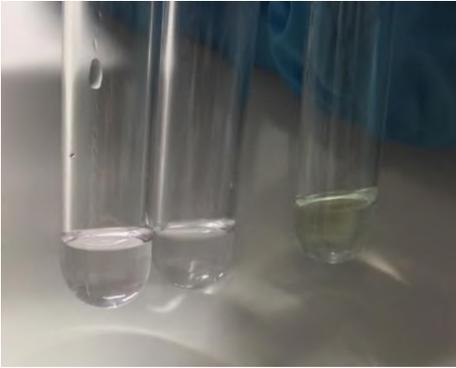
Observar la formación de un precipitado blanco



ALCALOIDES

Wagner

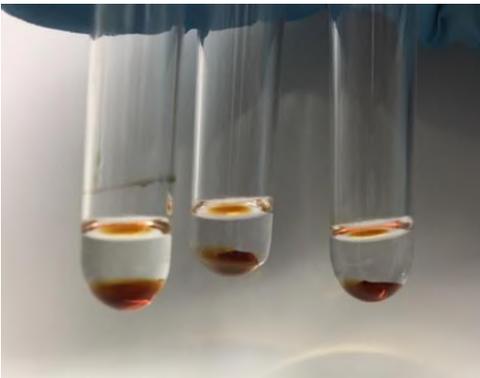
Observar formación de un precipitado blanco



**ESTEROIDES**

Vainillina-Ácido orto-fosfórico

Observar la coloración azul  
violeta en la interfase



**ESTEROIDES**

Libermann- Burchard

Observar los cambios de  
coloración

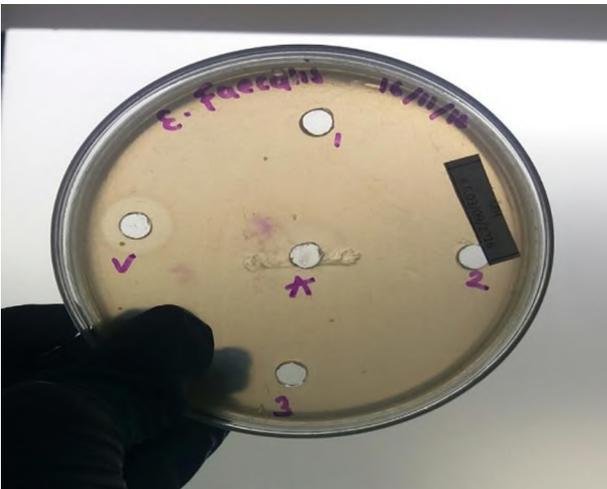
**Anexo 2. Actividad antimicrobiana**



Inhibición con Vancomicina  
Extractos etanolicos y acuosos  
(liofilizados y rotaevaporados)



Inhibición vancomicina  
Extractos etanolicos y  
acuosis (liofilizados y  
rotaevaporados)



Inhibición vancomicina  
Extracto de ajo acuoso (2)

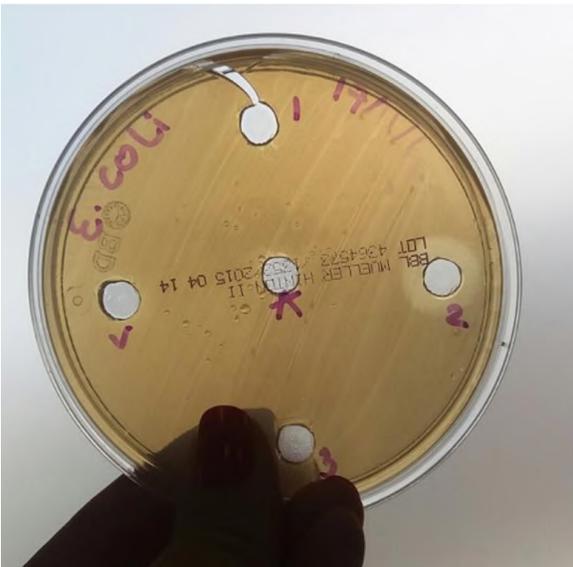
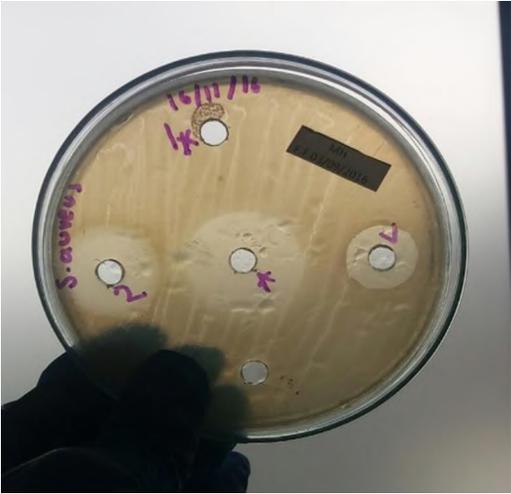


Inhibición con Vancomicina y Amoxicilina

Extractos etanolicos y acuosos (liofilizados y rotaevaporados)

Inhibición con Vancomicina y Amoxicilina

Extracto de ajo acuoso (2)



Inhibición con extracto de ajo acuoso



*P. gingivalis*

Control positivo Amoxicilina

Halos de inhibición- extracto etanòlico  
ajo (1)

Halos de inhibición – extracto etanòlico  
jengibre (6)

### **Anexo 3. Medios de cultivo**

#### **MUELLER HINTON**

Formula

Infusión de carne	300.0g
Peptona ácida de caseína	175 g
Almidòn	1.5 g
Agar	15.0 g
Agua purificada	1000 ml
Ph final	7.3+/-0.1

#### **CALDO BHI**

Composición:

Solidos de infusión de cerebro	12,5 g/L
Solidos de infusión de cerebro de vaca	5,0 g/L
Peptona	10,0 g/L
Glucosa	2,0 g/L
Cloruro de sodio	5,0 g/L
Fosfato disódico	2,5 g/L
pH:	7,4 ± 0,2 a

## WILKINS-CHALGREN ANAEROBE AGAR

### Composición:

Triptona	10,0 g/L
Peptona de gelatina	10,0 g/L
Extracto de levadura	5,0 g/L
Glucosa	1,0 g/L
Cloruro de sodio	5,0 g/L
L-Arginina 1,0	
Piruvato de sodio	1,0 g/L
Menadiona	0,0005 g/L
Hemina	0,005 g/L
Agar 10,0	
pH:	7,1 ± 0,2 a 25 °C