BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE BACTERIAS PATÓGENAS MEDIANTE EL USO DE EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO (A) EN BIÓLOGIA

PRESENTA:

Etssuri Chávez Hernández

DIRECTORA:

Dra. Rocío Pérez Y Terrón

Noviembre 20

Agradecimientos

Agradezco infinitamente a dios por darme otra oportunidad de poder superarme, de darme salud y fuerza para cumplir mis sueños.

Quiero agradecer principalmente a mi directora de tesis, la doctora Rocío Pérez y Terrón por brindarme todo su apoyo, sus consejos, su confianza y tiempo para realizar este trabajo bajo su dirección. Le agradezco también la facilidad de brindarme todos los materiales necesarios para la culminación y el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a mi mamá Sara, a mi papá Porfirio, a mi hermana Rebeca, mi cuñado Javier y mis sobrinos Mateo y Sebastian. por sus consejos, su apoyo, dedicación y cariño que me han brindado a lo largo de toda mi vida y en esta etapa de preparación.

A Ricardo por su amor y cariño, Además de brindarme su dedicación y su tiempo, por motivarme y animarme, siempre se que podre confiar mucho en ti. Te quiero mucho.

Agradezco a todos los profesores de la Facultad de Ciencias Biológicas por sus enseñanzas.

Estos agradecimientos son especiales a Ricardo, Azahel, Triny, Mónica, Jessi Itzel, Jessi Andrea, Amaury, Alba, Yamilet, Yuli y Agustín. Por su amistad incondicional, su apoyo a lo largo de esta tesis, por compartirme sus conocimientos y por los momentos agradables que pasamos en todo momento.

Índice

Índice de Figuras 4

Índice de abreviaturas 5

Introducción 9

Antecedentes 11

Plantas medicinales 11

Extractos vegetales 11

Farmacognosia ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Metabolitos secundarios 12

Alcaloides 12

Fenoles 13

Terpenos 13

Plantas medicinales utilizadas en México 14

Fitoquímicas 14

Resistencia bacteriana 15

Justificación 16

Objetivo General 17

Objetivos Específicos 17

Índice de Figuras

Vía de los metabolitos secundarios de plantas 11

Materia vegetal 18

Preparación de los extractos 19

Maceración de la materia vegetal 20

Equipo para la obtención de los extractos 20

Tinción de Gram 21

Esquema de la técnica de conteo en placa 22

Extractos combinados 24

Índice de abreviaturas

PM ..... Plantas medicinales

T ..... Tiempo

Hrs ..... Horas

g ..... Gramos

µL .....Microlitros

LB ..... Luria Bertani

ml ..... Mililitros

UFC .....Unidades Formadoras de Colonias

RPM ..... Revoluciones por Minuto

NM .....Nanómetros

H_20_2 .....Peróxido de hidrogeno

NaOH ..... Hidróxido de sodio

N .....Normal

$FeCl_3$. .....Cloruro Férrico

Índice de tablas

Tabla 1 Se muestran las especies y familias de las plantas que se utilizarón.

Tabla 2 Clasificación de las cepas acorde a su taxonomía.

Tabla 3 Resultados de pH de extractos vegetales.

Tabla 4 Resultados del porcentaje de la inhibición de extractos vegetales en las cepas Gram negativas.

Tabla 5 Resultados del porcentaje de la inhibición de extractos vegetales en las cepas Gram negativas.

Tabla 6 Resultados del porcentaje de la inhibición de extractos vegetales en las cepas Gram positivas

Tabla 7 Pruebas Fitoquímicas de los tres extractos que mayor inhibición tuvieron en las bacterias.

Índice de gráficas

Grafica 1. Grafica del porcentaje total en todas las especies con diferentes extractos

Gráfica 2. Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 3. Inhibición de *Klebsiella oxytoca* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 4. Inhibición de *Klebsiella pneumoniae* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 5. Inhibición de *Yersinia enterocolitica* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 6. Inhibición de *Enterobacter aerogenes* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 7. Inhibición de *Serratia marcescens* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 8. Inhibición de *Shigella sonnei* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 9: Inhibición de *Providencia stuartii* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 10. Inhibición de *Proteus vulgaris* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 11. Inhibición de *Enterococcus faecalis* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 12. Inhibición de *Staphylococcus aureus* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 13. Inhibición de *Streptococcus pneumoniae* con diferentes extractos vegetales.

Gráfica 14. Inhibición de *Listeria monocytogenes* con diferentes extractos vegetales.

Resumen

Una de las practicas mas importantes en México es la utilización de las plantas medicinales (PM) como una alternativa para curar diferentes enfermedades, esto por la gran diversidad de plantas que se pueden encontrar en nuestro país. Para este trabajo de utilizaron diferentes estructuras de la planta que comprenden; fruto, bulbos, semillas y hojas de las mismas según corresponda. Se obtuvo el extracto acuoso de las especies de *Allium sativum, Coffea arabica ,Cinnamomum verum, Capsicum chinese habanero group, Zingiber officinale roscoe, Petroselinum crispum, Ruta graveolens, Rosa sp. Aloe vera, Ocimun basilicum, Origanum vulgaris, Rosmarinus officianalis, Thymus vulgaris,* las cuales fueron previemente desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Estos extractos se elaboraron mediante la técnica de maceración, posterior a esto, se recuperó el extracto hidroalcohólico reposado durante tes días. Para la prueba de sensibilidad se realizó la técnica de turbidimetría en medio líquido, siendo una técnica muy efectiva para la demostración de la sensibilidad. Los resultados mostraron que los extractos de ajo inhibió un 100%, albahaca un 84% y café con un 76% de la especies totales siendo los que mayor acción inhibitoria presentaron entre las bacterias patógenas. Por otro lado las bacterias *Listeria monocytogenes* presentó la mayor resistencia a estos extractos con un 85%.

1. Introducción

La importancia de las plantas medicinales (PM), aromáticas y especias se hace más patente en la actualidad en países desarrollados. En Pakistán se estima que un 80% de las personas dependen de éstas para curarse y un 40% en China. En países tecnológicamente avanzados como en Estados Unidos la población utiliza también las plantas medicinales para combatir ciertas dolencias y Japón es el país con más demanda de plantas medicinales que de medicamentos exclusivos. El uso de las plantas medicinales tanto como uso interno corporal como para uso externo a menudo puede lograr una rápida solución a los diferentes problemas. (Magaña *et al.,* 2010).

1.1 Etnobotánica

Estas plantas han tenido una gran importancia etnobotánica durante varios siglos, se han utilizado en la cultura, la nutrición, como medicamentos y antioxidantes (Abdullah *et al*., 2014; Ibraheem *et al*., 2010), estas son utilizadas para el uso farmacéutico al tener un gran contenido de sustancias activas llamados metabolitos secundarios, por ejemplo: aceites esenciales, alcaloides, antraquinonas, esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas y cumarinas. Estos compuestos se pueden encontrar o extraer de hojas, semillas, corteza, resina, bayas, flores, raíces o frutas (Turgay, 2002). Se ha demostrado que tienen diferentes formas de defensa contra microorganismos. A través de la síntesis de enzimas las cuales son capaces de modificar la estructura de su pared celular vegetal presentando más resistencia a ser infectadas. (Sepúlveda *et al*., 2004).

1.2 Plantas medicinales

Las plantas medicinales son un recurso importante para el sector salud, su uso en países en desarrollo es de un 80% ya sea por tradición, uso alternativo o por economía. Se cree que no tienen efectos secundarios en sus principios activos, por lo que estos pueden poseer un potencial terapéutico. (OMS, 2004).

México tiene el segundo lugar a nivel mundial en el uso de las (PM), se han registrado aproximadamente 4,500 especies para una gran variedad de tratamientos fitoterapéuticos. Esto se debe a que desde los inicios de las épocas

prehispánicas se han utilizado y se han trasmitido de generación a generación, por la gran diversidad vegetal que se encuentra en el país (García *et al.,* 2010).

Estudios recientes han demostrado que los metabolitos secundarios poseen estructuras relativamente complejas y son capaces de brindarles protección contra bacterias, virus, parásitos y hongos, esta ventaja se puede ocupar como un método alternativo al consumo de antibióticos implementando una nueva estrategia de combatir microorganismos patógenos de forma natural consumiendo este tipo de herbolaria (Hirulkar y Agrawal, 2010; Noumedem *et al.,* 2013).

1.3 Recistencia bacteriana

Las enfermedades de origen bacteriano: respiratorias y diarreicas es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo afectando a personas de diferentes edades, siendo los más vulnerables los niños y adultos mayores. La OMS en 2015 reporto una mortalidad de 920,136 personas por enfermedades respiratorias mientras que en enfermedades intestinales se estima que cada ano mueren 1,500,000 millones personas en países en desarrollo. Ya sea por el uso indebido y excesivo de estos fármacos que se han empleado desde los últimos años, esto ha provocado un problema de salud pública, alterando las bacterias que son sensibles, otorgándoles resistencia y ventajas de supervivencia, modificando sus genes de una generación a otra incluso de diferentes especies. Las bacterias que se han reportado con mayor resistencia a los antibióticos son: *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Escherichia coli, Shigella* y *Salmonella* (Gull *et al.*, 2012; Taheri *et al.*, 2013; Beg; Ahmad 2001 y OMS 2017, 2015).

La resistencia bacteriana ha generado un gran interés en implementar el uso de medicamentos de origen natural como alternativa a los tratamientos con antibióticos. Para poder analizar más a fondo la composición química de las (PM) y sus principios activos, así como determinar alguna actividad farmacológica, es necesario realizar pruebas químicas (Coy, 2014).

Actualmente se han desarrollado diferentes metodologías para poder determinar los principios activos que pueden contener las plantas medicinales, que consisten en reacciones que producen alteraciones en las estructuras moleculares, modificando su grupo funcional. Una de las metodologías son las pruebas fitoquímicas que establecen ciertas composiciones químicas de las plantas, esto es para poder realizar una selección de vegetales que se quieren estudiar dependiendo de las sustancias activas que pueden llegar tener por sus actividades biológicas específicas, por ejemplo: antimicrobianos, antioxidantes y anticancerígenos (Erkan *et al.,* 2008).

2. Antecedentes

2.1 Plantas medicinales

Las Plantas Medicinales durante años fueron utilizadas por su alto contenido en el uso terapéutico y por sus diferentes propiedades, en ellas se encuentra una extensa gama de sustancias químicas que son útiles como medicamentos (Rates, 2001). La concentración de compuestos que se encuentran en algunas de las plantas depende de la época del año, tipo de suelo, humedad, entre otros factores, estos compuestos se pueden encontrar en toda la estructura de la planta o en algunas estructuras como en raíz, fruto, semilla. Podemos encontrar hasta 10 principios activos en una sola planta (Ocegueda *et* al*.,* 2005).

2.2 Extractos vegetales

En la actualidad los extractos vegetales son referencia de economía ya que mundialmente se manejan millones de pesos en el mundo, se reportan por lo menos 25000 especies que contienen componentes activos y 1340 que presentan componentes antimicrobianos (Raskin *et al*., 2002).

Los extractos vegetales se definen como mezclas complejas de metabolitos secundarios que se pueden aislar por diferentes métodos como la destilación por arrastre de vapor o por medio del soxtlet, estos cubriendo una gran variedad de efectos farmacológico. Los extractos vegetales tienen un gran efecto farmacológico demostrando una gama de propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes,

anticancerígenos y sirve como inhibidor a microorganismos como bacterias, hongos virus, protozoarios insectos y plantas (García *et al.,* 2010).

La farmacognosia se considera como el estudio de sustancias de origen natural que investiga los componentes de las plantas, animales, bacterias y reinos minerales con un fin terapéutico, que tiene relación con la fitoquímica, del cual se obtienen metabolitos que son principios activos y se revelan sus compuestos químicos (Barragán, 2006).

2.3 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos activos y de bajo peso molecular, que se encuentran en diferentes estructuras de las plantas, estos varían dependiendo la etapa de crecimiento y de las condiciones ambientales en la que se encuentra dicho vegetal, pueden tener una gran importancia ecológica incluyendo su participación en los procesos de adaptación de las plantas a los diferentes cambios ambientales. Se sabe que en las plantas por su actividad terapéutica poseen una gran variedad de estos compuestos ocupando un papel importante en la farmacognosia (Delgoda y Murray, 2017; Yarnell, 2007).

En la actualidad los metabolitos secundarios se clasifican en tres grandes grupos: Alcaloides: compuestos heterocíclicos de nitrógenos que raramente son usados en medicina debido a su alto grado de toxicidad. Terpenoides: compuestos por unidades de isopreno, un gas muy volátil que en las plantas es producido en el cloroplasto y protege a la planta de las temperaturas altas. Por último, los compuestos Fenólicos, que consiste en un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático, es el compuesto que más características benéficas para el hombre se han encontrado (Ikan,1991).

2.3.1 Alcaloides

Son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico, la mayoría de ellos son insolubles o pocos solubles en agua y los podemos encontrarlos en las plantas superiores y se sabe que hay un 20% de plantas con flores que contienen alcaloides porque les otorga una defensa para insectos o parásitos siendo tóxico para estos (Coy, 2014).

2.3.2 Fenoles

La presencia de los fenoles se puede encontrar en los tejidos vegetales siendo una de las características que tienen las plantas. Los fenoles están compuestos de estructuras aromáticas con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos, su compuesto básico es el fenol, pero la mayoría están constituidos por polifenoles y se pueden encontrar más de 8000 de estos, como; quinonas fenólicas, cumarinas, flavonoides, taninos constituyendo uno de los grupos de micronutrientes más abundantes en los vegetales e importante en la dieta humana (Azcón y Talón, 2000).

2.3.3Terpenos

Son hidrocarburos que pertenecen a la familia de los alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas, constituyen a un grupo de más de 40,000 moléculas diferentes. Los terpenos se localizan en las plantas principalmente en las hojas, flores y frutos (Ormeño y Fernández, 2012).

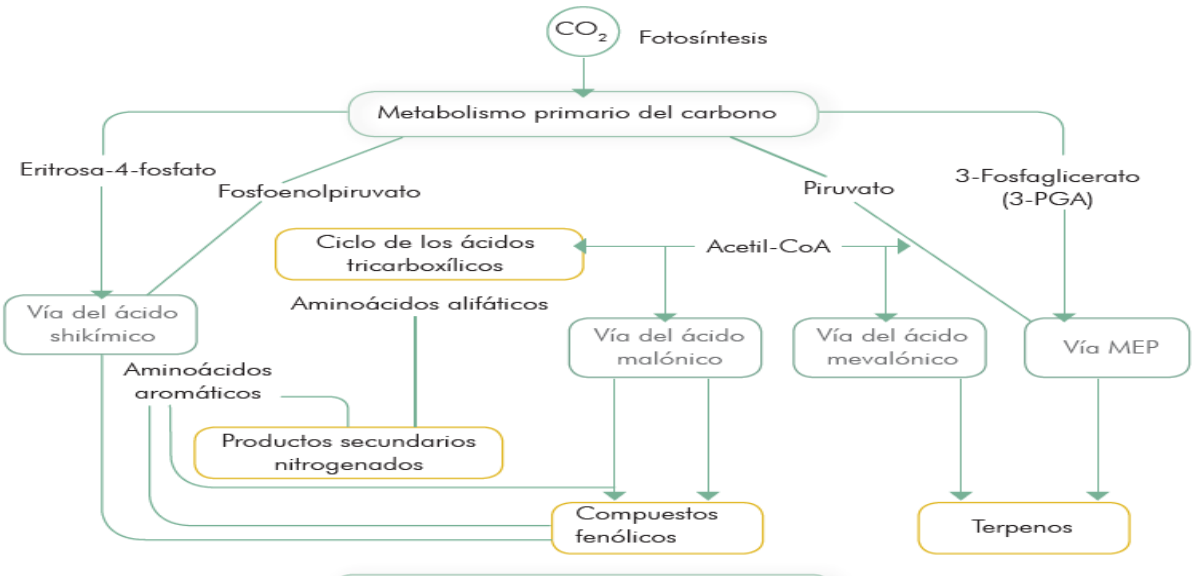


Figura (1). Vía de los metabolitos secundarios de plantas donde se muestran los tres compuestos secundarios como nitrogenados, fenólicos y terpenoides ("Secondary Metabolites and Plant Defense". En: Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. 2006. Capítulo 13.)

2.4 Plantas medicinales utilizadas en México

México posee el segundo lugar a nivel mundial en el uso de plantas medicinales, se han registrado aproximadamente 4500 especies para una gran variedad de tratamientos fitoterapéuticos. Esto se debe a que desde los inicios de las épocas prehispánicas se han utilizado y se han trasmitido de generación a generación, por su gran diversidad vegetal que se encuentra en el país (Carvajal *et al.,* 2012). Las plantas medicinales tienen una gran demanda y son uno de los principales recursos en México, ya que más de 40 millones de mexicanos que se encuentran en zonas rurales dependen de ellas al no tener acceso a los diferentes centros de salud (Osuna *et al*., 2005).

Fitoquímicas

Son sustancias biológicamente activas, estos compuestos químicos se encuentran en las plantas, cada una provee muchos beneficios para la salud humana proporcionando tanto micronutrientes como macronutrientes. Estos compuestos son benéficos también para la planta protegiéndola de alguna enfermedad o para reparar algún daño, además contribuyen a la coloración, aroma y sabor a las plantas. En general estos químicos de origen vegetal que protegen a las plantas de peligros ambientales, tales como; la sequía, el estrés, animales, la exposición a los rayos UV y los ataques de algún patógeno (bacteria, virus, hongos) se le denominan fitoquímicos (Velavan, 2015).

Actualmente se han desarrollado diferentes metodologías para poder determinar los principios activos que pueden contener las plantas medicinales, que consisten en reacciones que producen alteraciones en las estructuras moleculares, modificando su grupo funcional. Una de estas metodologías son las pruebas fitoquímicas que establecen ciertas composiciones químicas, esto es para poder realizar una selección de vegetales que se quieren estudiar dependiendo de las sustancias activas que pueden llegar tener, ya sea por sus actividades biológicas específicas, por ejemplo: antimicrobianos, antioxidantes y anticancerígenos (Erkan, 2008).

2.5 Resistencia bacteriana

La OMS en el 2017 reportó que la mortalidad a nivel mundial es de casi 50,000 personas al día, la razón es porque las bacterias han presentado resistencia a diferentes fármacos, uno de ellos son los antibióticos. Provocando que en los últimos años el uso indebido y excesivo de estos medicamentos ocasionen un problema de salud pública, alterando las bacterias que son sensibles, otorgándoles resistencia y ventajas de supervivencia, modificando sus genes de una generación a otra incluso de diferentes especies. Las bacterias que se han reportado con mayor resistencia a los antibióticos son: *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriaceas *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Escherichia coli, Shigella* y *Salmonella* (Gull *et al.*, 2012; Taheri *et al.*, 2013; Beg; Ahmad 2001 y OMS 2017).

La resistencia bacteriana ha generado un gran interés en implementar el uso de medicamentos de origen natural como alternativa a los tratamientos con antibióticos. Para poder analizar más a fondo la composición química y los factores que pueden variar su estructura, sus principios activos y determinar alguna actividad farmacológica (Coy, 2014).

Justificación

En la actualidad el uso inadecuado de los antibióticos, ha causado una problemática a nivel mundial, facilitando que muchas de las enfermedades causadas por bacterias sean difíciles de erradicar, por esta razón, el presente trabajo pretende dar una alternativa para el uso excesivo de los antibióticos mediante extractos de origen natural, teniendo en cuenta que se sabe que las plantas medicinales y aromáticas han sido utilizados para la inhibición del crecimiento bacteriano que afectan al ser humano, esto es de suma importancia debido a su origen natural y no desarrollan efectos secundarios. Con base en lo mencionado anteriormente, se sugiere el consumo de extractos vegetales como una alternativa para disminuir el uso de antibióticos y de esta manera evitar la posible resistencia bacteriana, porque se ha demostrado en los últimos años que algunos metabolitos secundarios como: saponinas, flavonoides, fenoles, taninos, por mencionar algunos y otros compuestos activos de las plantas medicinales y aromáticas no generan resistencia bacteriana.

Objetivo General

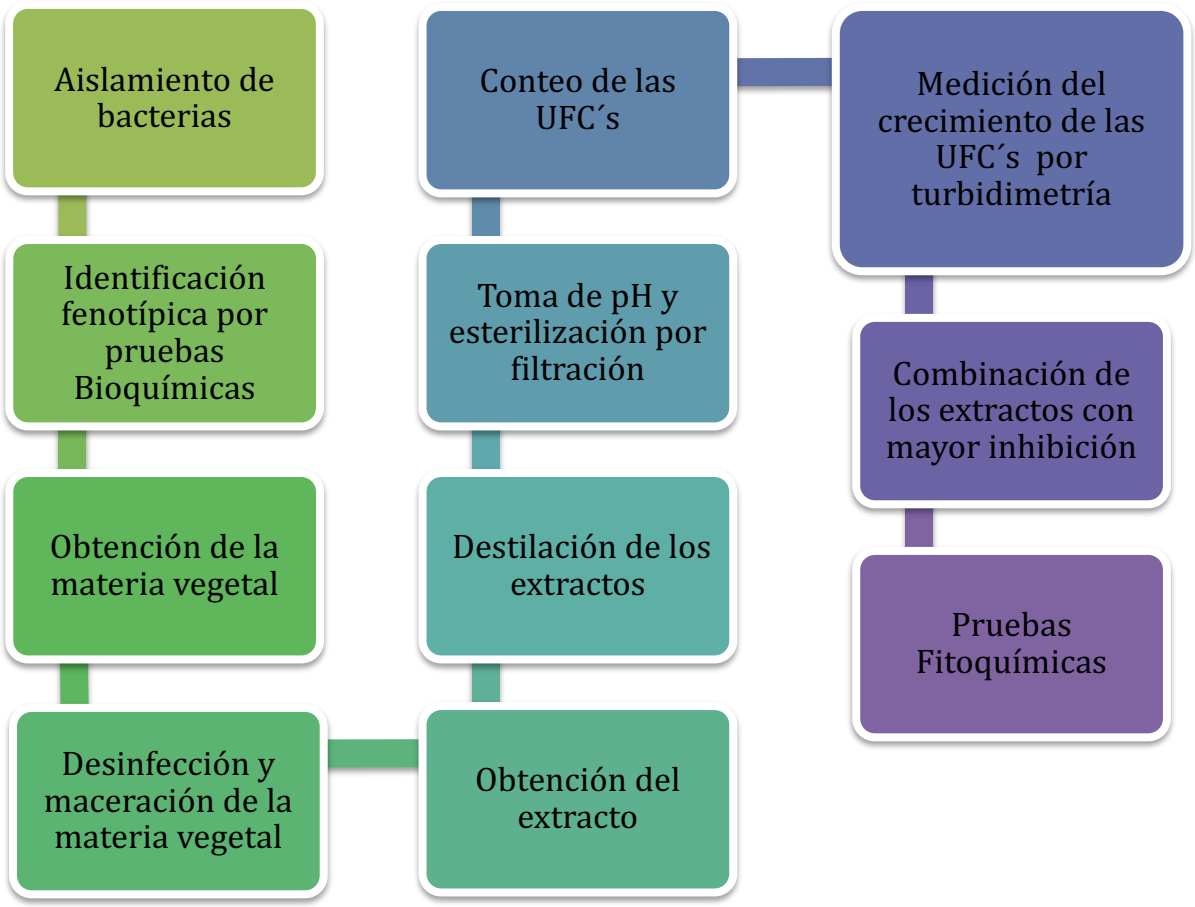
- Evaluar la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas mediante el uso de extractos acuosos de origen vegetal.

Objetivos Específicos

- Obtención de los extractos vegetales por medio de maceración y destilación.
- Evaluar los extractos vegetales para determinar la inhibición de bacterias patógenas mediante cultivo líquido.
- Elaborar la combinación de los extractos vegetales que mayor efecto inhibitorio presentaron.
- Comprobar mediante pruebas fitoquímicas la presencia de metabolitos secundarios de los extractos con mayor inhibición.

Materiales y Métodos

Esquema de trabajo general



Recolección y desinfección de la materia vegetal

El material vegetal que se utilizó para este trabajo se obtuvo en mercados locales, pertenecientes a las siguientes familias que se muestran en la tabla 1. Utilizando el fruto, bulbos, semillas y hojas de las plantas según corresponda. La materia vegetal se seleccionó según sus cualidades organolépticas, es decir, dependiendo de su aspecto físico como: su olor, color, consistencia y frescura.

Tabla 1. Se muestran las especies y familias de las plantas que se utilizarón.

Nombre común	Nombre científico	Familia
Ajo	*Allium sativum*	*Amaryllidceae*
Café	*Coffea arabica*	*Rubiaceae*
Canela	*Cinnamomum verum*	*Lauraceae*
Chile habanero	*Capsicum chinese habanero group*	*Solanaceae*
Jengibre	*Zingiber officinale roscoe*	*Zingiberaceae*
Perejil	*Petroselinum crispum*	*Apiaceae*
Ruda	*Ruta graveolens*	*Rutaceae*
Rosa	*Rosa sp.*	*Rosaceae*
Sábila	*Aloe vera*	*Asphodelaceae*
Albahaca	*Ocimun basilicum*	*Laminaceae*
Orégano	*Origanum vulgaris*	
Romero	*Rosmarinus officianalis*	
Tomillo	*Thymus vulgaris*	

Figura 2. Materia vegetal utilizada en el trabajo enumeradas correspondientemente 1) ajo *Allium sativum)*, 2) Albahaca *(Ocimun basilicum L.)*, 3) Café *(Coffea arabica L.)*, 4) Canela *(Cinnamomum verum*), 5) Chile Habanero *(Capsicum chinense Habanero Group)*, 6) Jengibre *(Zingiber officinale roscoe),* 7) Orégano *(Origanum vulgaris L.)*, 8) Perejil (*Petroselinum crispum),* 9) Romero (*Rosmarinus Officianalis L.),* 10) Rosas rojas spp. 11) Ruda (*Ruta graveolens L)*, 12) Sábila (*Aloe vera*), 13) Tomillo *(Thymus vulgaris L.)*.

Desinfección de la materia vegetal

Una vez seleccionado el material que tenían mejor aspecto, se pesaron 30g y se procedió a su desinfección, todo se realizó bajo condiciones de esterilidad. Los vegetales fueron lavados con agua destilada para eliminar cualquier agente contaminante, posteriormente se preparó una solución de hipoclorito de sodio al 5% y se dejó reposar durante diez minutos, transcurrido el tiempo se retiró la solución lavando el exceso con agua destilada estéril, posteriormente se coló y se dejó escurrir.

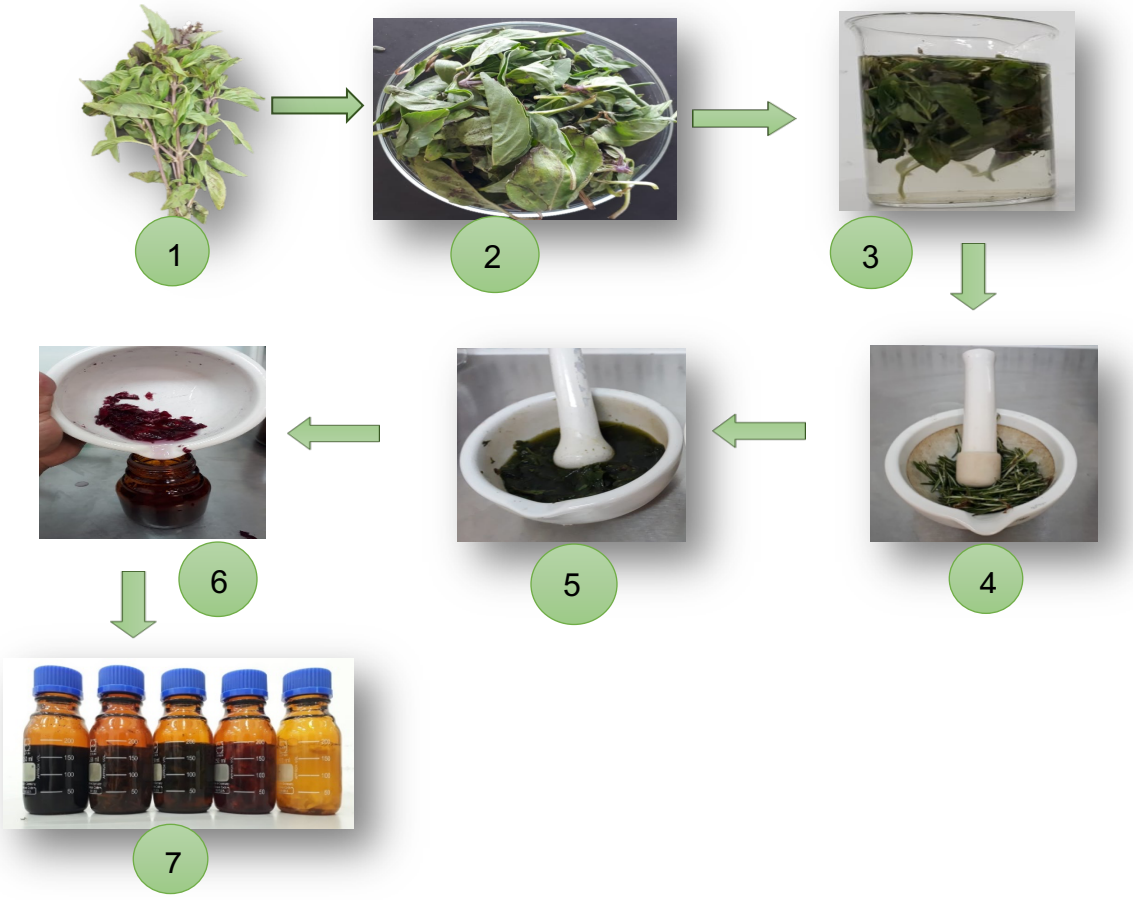


Figura (3). Esquema de preparación de extractos 1) Recolección, 2) Selección, 3)Desinfección, 4) Maceración, 5) Sol. Hidroetanólica, 6) Verter 7) Almacenaje

Maceración de la materia vegetal

Posterior a su desinfección se colocarón en un mortero previamente esterilizado para su maceración, se le agregó una solución de 1:1 de alcohol etanólico y agua destilada estéril, el extracto obtenido se colocó en un frasco de color ámbar (SHOOT) y se dejó reposar por 3 días agitando la mezcla cada día por diez minutos.

Figura (4). Vegetales macerados

Después se filtró con un embudo de cristal esterilizado y gasa estéril para obtener el extracto libre de residuos de materia vegetal, el extracto se colocó en un evaporador rotatorio Hahnvapor de marca Witeg a 70°C en baño maría a 50 rpm por 45 minutos, hasta eliminar el disolvente de los extractos.

Figura (5). Imagen del equipo utilizado Rotavapor para la obtención de los extractos

Esterilización por filtración de los extractos

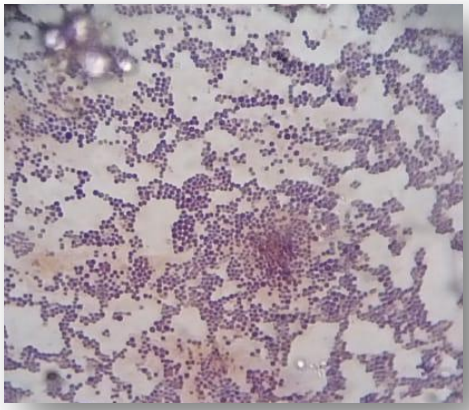
Ya que se obtuvieron los extractos, se filtraron mediante gasas, algodón, y papel filtro estéril. Finalmente, los extractos fueron esterilizados por medio de filtración por membrana (0,45 micras). El extracto final conservó en frascos color ámbar y se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Bacterias utilizadas

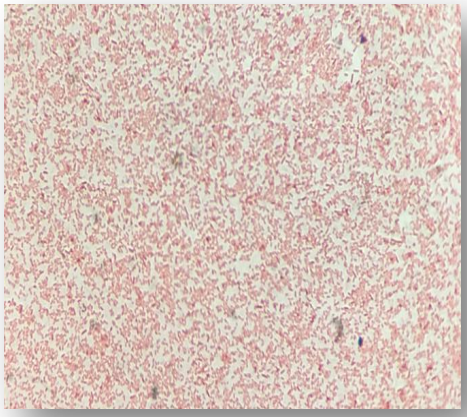
La especies utilizadas en este trabajo fueron donadas por la Facultad de Ciencias Químicas del departamento de microbiología de alimentos de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, son: *Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Kllebsiella oxytoca, Listeria monocytogenes, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae,* la restante fue previamente aislada de alimentos crudos e identificada por pruebas bioquímicas.

Identificación morfológica por Tinción de Gram

Cada una de las cepas, se sometió a un proceso de tinción de Gram con la finalidad de diferenciar entre una bacteria Gram negativa y una bacteria Gram positiva.



Staphylococcus aureus



Klebsiella oxytoca

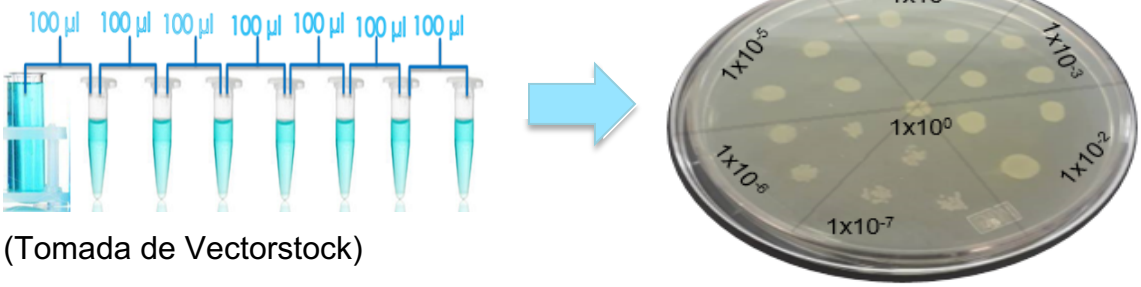
Figura (6). A la izquierda se observa una bacteria Gram (+) y a la derecha una bacteria Gram (-) observadas a 100X.

Pruebas bioquímicas

Para confirmar que las cepas concordaran con la especie se les realizaron diferentes pruebas bioquímicas convencionales como: oxidasa, catalasa, Citrato de Simmons, Movilidad Indol Ornitina (MIO), Agar Hierro Triple Azúcar (TSI), Urea, Y Agar Hierro Lisina (LIA), consultando los resultados en el libro de MacFaddin.

Cuantificación de UFC´s

Se realizó la técnica de conteo por goteo en placa, para poder calcular el número de UFC´s de las especies, se sembraron 5 µL de cada especie (*Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Kllebsiella oxytoca, Listeria monocytogenes, Proteus vulgaris, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens, Shigella sonnei, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae*), en tubos de caldo Luria Bertani (LB) con 3 ml cada uno previamente esterilizados y a prueba de esterilidad, se deja incubar por 24hrs, en 7 tubos eppendorff con 900µL de caldo LB estéril, se le agrego 100µL del inoculo previamente agitado y así sucesivamente se le agrega a cada eppendorff hasta obtener una dilución de $1x10^{-7}$. Sembradas en placas de medio LB divididas en 6 secciones sembrando 2µL de cada concentración y se incubaron a 37°C por 24 horas.



(Tomada de Vectorstock)

Pseudomonas aeruginosa

$$UFC/ml = \left[\text{Promedio de UFC}\right]\left[\frac{1}{\text{Volumen sembrado}}\right]\left[\frac{1}{\text{Dilución}}\right]$$

Figura (7). Esquema (Tomada de Vectorstock) de conteo en placa de *Pseudomonas aeroginosa* fórmula (tomada de Pérez y Terrón *et al*., 2010).

Actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana se prepararon tubos con 4ml de caldo LB, a cada tubo se le agregaron 4ml de extracto y se inocularón 4µl de la cepa correspondiente a una concentración de $1x10^9$ UFC/ml por duplicado, se llevó acabo la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro (Thermo Scientific GENESYS 20) a 625 nanómetros (nm), para el blanco se utilizó agua destilada estéril y como control el crecimiento normal de la cepa en caldo LB, se obtuvieron los resultados de las mediciones en tres tiempos diferentes: tiempo1 T1= 0 horas, tiempo2 T2= 24 horas, tiempo3 T3= 48 horas. La incubación se realizó en una incubadora de agitación orbital a 37°C a 100 (rpm).

Actividad antimicrobiana con extractos combinados

Para la combinación de los extractos se tomaron en cuenta los que presentaron mayor inhibición, que fueron café, ajo y albaca, se hizo una mezcla de ajo-café, ajo-albahaca, y café-albaca se colocó en el tubo 2ml de cada extracto y se agito en un vortex, hasta obtener una homogenización del extracto combinado, para cada cepa con un volumen de 2ml de cada uno usando la metodología antes mencionada.

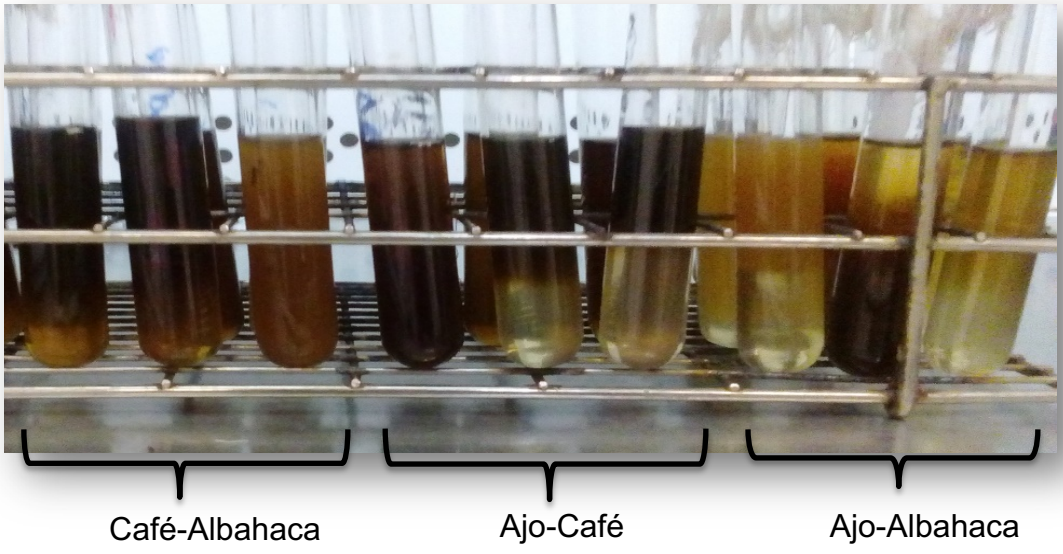


Imagen (8). Extractos combinados de café-albahaca, albahaca-café y café-ajo sin agitar.

Pruebas Fitoquímicas

Para determinar los metabolitos secundarios de cada uno de los extractos que presentaron mayor actividad inhibitoria se ocuparon diferentes pruebas colorimétricas por duplicado.

- **Prueba para Saponinas**

Para la materia vegetal se utilizó un horno de secado a 45°C durante tres días en oscuridad. Se pesaron 0.2 gr de esta materia previamente seca y se agregó a un tubo de ensayo colocando 10 ml de agua destilada a una temperatura de 70 °C, se agitó vigorosamente durante 1 min. Preferentemente a mano, se dejó reposar durante 15 min. Para observar la presencia de saponinas se considera positiva si esta produce espuma.

- **Pruebas de esteroides**

Agregar en un tubo de ensayo 0.2gr de materia vegetal seca agregando 4ml de cloroformo a cada tubo, agitar levemente por unos minutos, filtrar a otro tubo de ensayo con la ayuda de un embudo con papel filtro, agregar 0.5ml de anhídrido acético en el tubo de ensayo por último agregar 2 gotas de ácido sulfúrico. Si la prueba resulta positiva su color cambia a oscuro (morado) y se determina la reacción exotérmica.

- **Prueba para Fenoles**

Se colocó en un tubo de ensayo 1ml del extracto seleccionado (café, albahaca y ajo) se le agregó 1ml de metanol y 2 gotas de cloruro férrico ($FeCl_3$). Para identificar presencia de fenoles o taninos pirogálicos debemos identificar un color azul oscuro y verde para la presencia de fenoles o taninos de tipo catecol.

- **Prueba de flavonoides**

En tubo de ensayo se agregó 1ml de extracto acuoso, 1ml de etanol, 1ml de anhídrido acético y por último se le agregó una viruta de magnesio para oxidar. Si la muestra vira de color rojo es un resultado positivo.

- **Pruebas de quinonas**

Se pesaron 0.2gr. De material seco de los vegetales y se colocó en tubos de ensaye. Se agregaron peróxido de hidrogeno (H_20_2) AL 6% posteriormente se filtró con la ayuda de un embudo y papel filtro. Se le agregó 4 ml de benceno y se agitó vigorosamente, finalmente se le agregó 4ml de NaOH al 5N. La prueba se considera positiva si la fase alcalina cambia de color.

- **Pruebas de cumarinas**

Agregar en un tubo de ensayo 0.2 gr de materia vegetal seca agregando 4 ml de cloroformo a cada tubo, agitar levemente por unos minutos, filtrar a otro tubo de ensayo con la ayuda de un embudo con papel filtro, por último agregar 2ml de ácido clorhídrico. Si la muestra empieza a tener una decoloración es un resultado positivo.

- **Pruebas de terpenos**

Revelador de terpenos :Se agregó en un frasco 10 ml de anhídrido acético, 25 ml de cloroformo y 1ml de ácido sulfúrico, para realizar esta prueba se colocó 3ml de extracto acuoso en tubos de ensayo y se le agregaron 3 ml de solvente revelador de terpenos se agita la muestra es positiva cuando tienen un color fosforescente o fluorescente.

Resultados

Se utilizaron un total de 13 cepas, de las cuales fueron 9 Gram negativas y 4 Gram positivas enlistadas en la siguiente Tabla 2 anexando la cepa que se aisló de manera independiente (*Proteus vulgaris*).

Tabla 2. Clasificación de las cepas acorde a su taxonomía.

Orden	***Género***	***Especie***	***Gram***
Enterobacteriales	Enterobacter	*E. aerogenes*	-
	Klebsiella	*K.oxytoca*	-
		K. pneumoniae	-
	Proteus	*P. vulgaris*	-
	Providencia	*P. stuartii*	-
	Serratia	*S. marcescens*	-
	Shigella	*S. soneii*	-
	Yersinia	*Y. enterocolitica*	-
Pseudomonales	Pseudomonas	*P. aeroginosa*	-
Bacillales	Listeria	*L. monocytogenes*	+
	Staphylococcus	*S. aureus*	+
Lactobacillales	Enterococcus	*E. faecalis*	+
	Streptococcus	*S. pneumoniae*	+

Resultados de pH

Como se puede observar en la Tabla 3 muestra la comparación de los diferentes pH tomados de los extractos vegetales, la mayoría de estos tienden a ser ácidos con un pH de 4 como: café, canela, perejil, rosas rojas, y tomillo mientras que albahaca, habanero, orégano y romero presentaron un pH de 5, los extractos con

un pH de 6 fueron ajo, jengibre, y el único extracto que presentó un pH de 7 fue sábila siendo neutro.

Tabla 3. Resultados de pH de extractos vegetales.

Extracto	pH
Ajo	6
Albahaca	5
Café	4
Canela	4
Habanero	5
Jengibre	6
Orégano	5
Perejil	4
Romero	5
Rosas rojas	4
Ruda	6
Sábila	7
Tomillo	4

Resultados de los extractos vegetales

Para los resultados del porcentaje de la inhibición (sensibilidad) de las cepas Gram negativas y Gram positivas en los dos tiempos se muestran que

Tabla 4. Resultados del porcentaje de la inhibición de extractos vegetales en las cepas Gram negativas.

Familia	*Nombre común*	Cepas Gram negativas									
		E. aerogenes		*K. oxytoca*		*K. pneumoniae*		*P. vulgaris*		*P. stuartii*	
		T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)
Amaryllidaceae	Ajo	0	0	0	0	0	0	3%	3%	0	0
Rubiaceae	Café	12%	14%	0	0	81%	82%	4%	5%	0	0
Lauraceae	Canela	16%	18%	22%	37%	18%	23%	13%	14%	6%	10%
Solanaceae	Chile habanero	35%	68%	10%	13%	0	0	2%	2%	2%	3%
Zingiberaceae	Jengibre	48%	66%	4%	4%	47%	59%	57%	71%	63%	80%
Apiaceae	Perejil	25%	27%	65%	75%	0	0	46%	61%	66%	72%
Rutaceae	Ruda	82%	93%	35%	36%	63%	78%	72%	73%	34%	48%
Rosaceae	Rosa rojas	13%	15%	66%	75%	43%	59%	31%	40%	25%	27%
Asphodelaceae	Sábila	75%	88%	0	0	79%	86%	11%	11%	14%	17%
Laminaceae	Albahaca	74%	88%	3%	3%	83%	97%	2%	2%	0	0
	Orégano	9%	18%	22%	25%	21%	27%	23%	33%	4%	6%
	Romero	3%	4%	24%	25%	76%	81%	17%	24%	5%	12%
	Tomillo	36%	58%	0	0	70%	88%	15%	17%	12%	22%

Resultados del T2=24H

Resultados del T3=48H

Tabla 5. Resultados del porcentaje de la inhibición de extractos vegetales en las cepas Gram negativas.

Familia	*Nombre común*	Cepas Gram negativas							
		S. marcescens		*S. sonnei*		*Y. enterocolitica*		*P. aeruginosa*	
		T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)
Amaryllidaceae	Ajo	0	0	0	0	0	0	0	0
Rubiaceae	Café	0	0	24%	28%	10%	16%	0	0
Lauraceae	Canela	49%	66%	27%	29%	14%	22%	38%	43%
Solanaceae	Chile habanero	0	0	1%	8%	0	0	0	0
Zingiberaceae	Jengibre	0	0	87%	100%	39%	69%	2%	4%
Apiaceae	Perejil	1%	3%	61%	100%	16%	23%	30%	37%
Rutaceae	Ruda	53%	82%	88%	88%	93%	98%	3%	3%
Rosaceae	Rosa	72%	87%	78%	81%	15%	15%	28%	30%
Asphodelaceae	Sábila	66%	70%	2%	8%	46%	66%	2%	2%
Laminaceae	Albahaca	0	0	0	0	0	0	0	0
	Orégano	18%	26%	14%	29%	50%	60%	2%	6%
	Romero	36%	67%	10%	13%	5%	8%	2%	2%
	Tomillo	42%	78%	2%	8%	56%	58%	1%	2%

▲ Resultados del T2=24H

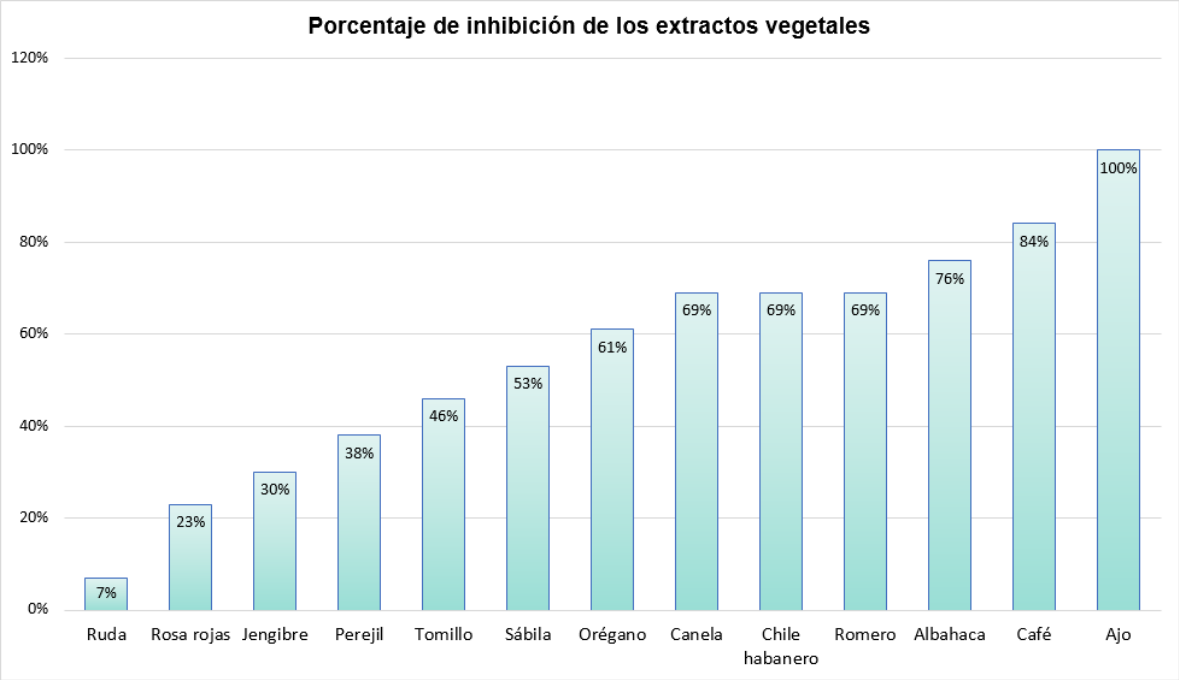
▲ Resultados del T3=48H

Tabla 6. Resultados del porcentaje de la inhibición de extractos vegetales en las cepas Gram positivas

Familia	*Nombre común*	Cepas Gram positiva							
		L. monocytogenes		*S. aureus*		*E. faecalis*		*S. pneumoniae*	
		T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)	T2(24H)	T3(48H)
Amaryllidaceae	Ajo	0	0	0	0	2%	3%	2%	3%
Rubiaceae	Café	24%	33%	0	0	10%	18%	2%	3%
Lauraceae	Canela	87%	100%	14%	18%	14%	22%	12%	17%
Solanaceae	Chile habanero	23%	45%	17%	42%	11%	16%	7%	7%
Zingiberaceae	Jengibre	87%	100%	24%	42%	91%	99%	10%	27%
Apiaceae	Perejil	94%	100%	35%	47%	48%	71%	2%	3%
Rutaceae	Ruda	28%	36%	90%	99%	100%	100%	76%	91%
Rosaceae	Rosa	86%	100%	31%	34%	39%	46%	59%	67%
Asphodelaceae	Sábila	9%	16%	0%	0%	60%	71%	35%	39%
Laminaceae	Albahaca	33%	60%	7%	13%	0	0	37%	58%
	Orégano	68%	100%	43%	44%	50%	60%	23%	37%
	Romero	85%	100%	5%	6%	5%	8%	59%	80%
	Tomillo	40%	83%	0%	0%	33%	50%	100%	100%

En la grafica 1. Podemos observar que los extractos vegetales que mayor efectividad presentaron fue el extracto de ajo con un 100% inhibiendo el crecimiento en todas las especies, mientras que albahaca con un 84% y café con un 76%,

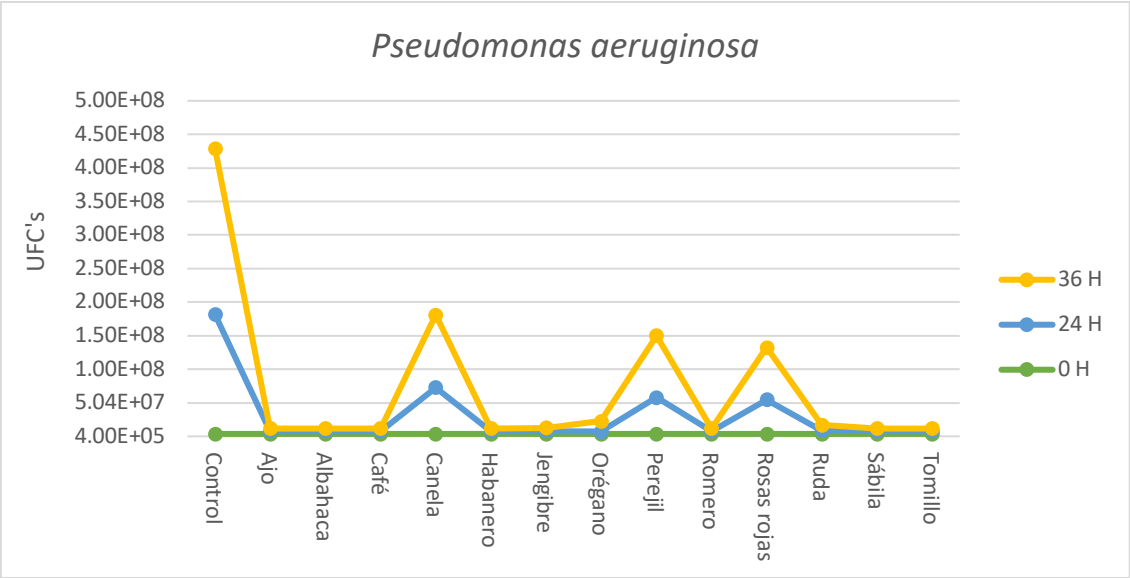
mientras que los extractos que no presentaron inhibición fueron ruda y rosas rojas con el menor porcentaje.



Grafica 1. Grafica del porcentaje total en todas las especies con diferentes extractos vegetales.

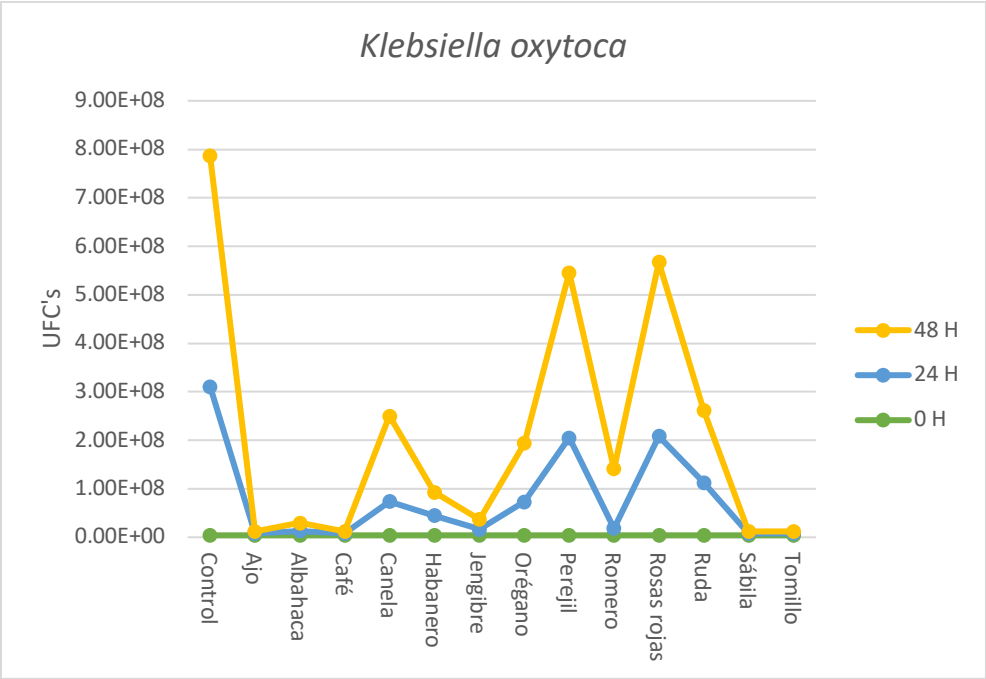
Graficas de inhibicion de cepas gram negativas

En la gráfica 2 se muestra el porcentaje de inhibición (sensibilidad) de *Pseudomonas aeruginosa* con los diferentes extractos vegetales. La cepa fue sensible en ajo, café, habanero y albahaca no presentando crecimiento en los dos tiempos, mientras que en los extractos de canela y perejil, presentaron un crecimiento mayor de un 30% a un 43% en los dos tiempos a comparación del control, mientras que en los extractos restantes hubo una sensibilidad menor de un 1% al 30%.



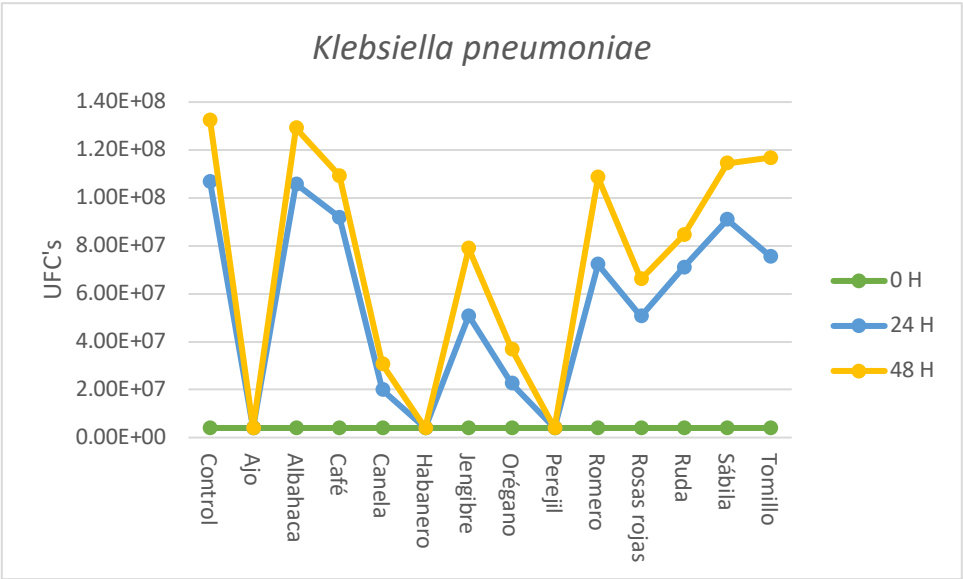
Gráfica 2. Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 3. Se muestra los diferentes extractos para la inhibición de *Klebsiella oxytoca* donde se observa que la cepa fue sensible a los extractos de ajo, café, sábila y tomillo los cuales no presentaron crecimiento a comparación de perejil, rosas y ruda que su crecimiento fue mayor al 35% mientras que los demás extractos tuvieron una inhibición de menos de un 20% en los dos tiempos.



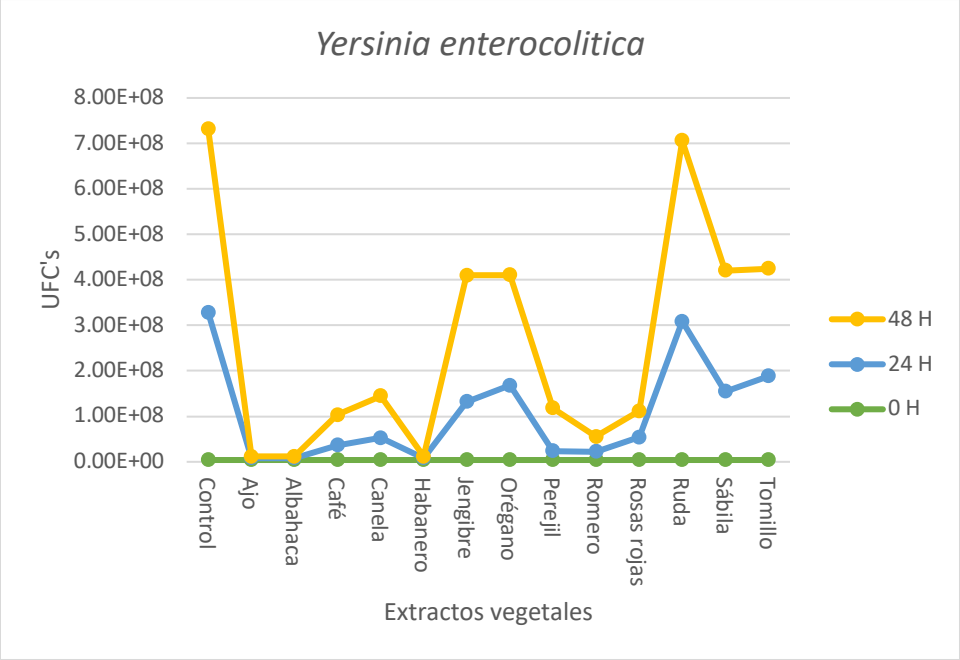
Gráfica 3. Inhibición de *Klebsiella oxytoca* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 4 se muestra los diferentes extractos para la inhibición de *Klebsiella pneumoniae* donde se observa que al cepa fue sensible a los extractos de ajo, habanero y perejil, no presento un crecimiento mientras que en los extractos de café, albahaca y tomillo tuvieron un crecimiento de más de un 70% siendo una de las cepas que presento más resistencia a los extractos en los dos tiempos.



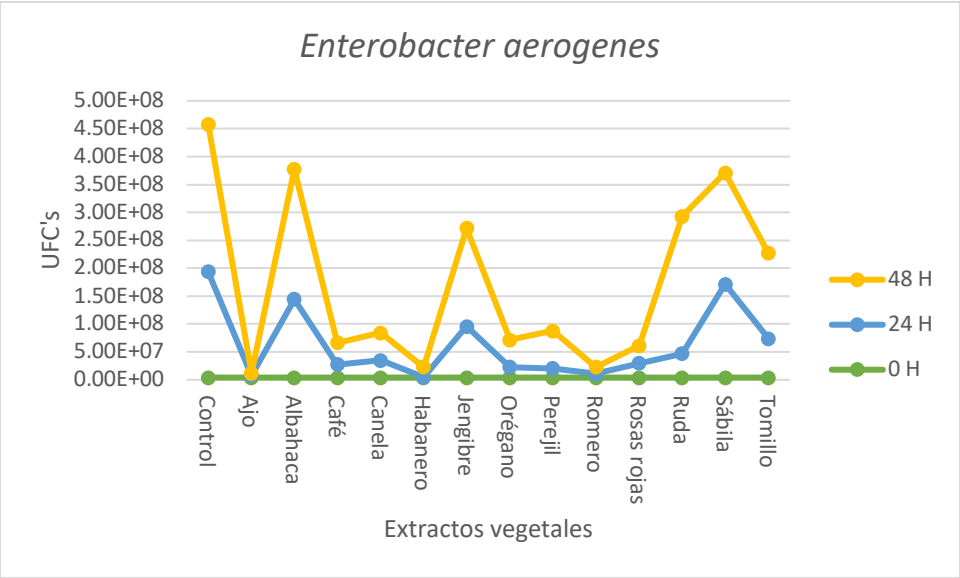
Gráfica 4. Inhibición de *Klebsiella pneumoniae* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 5 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Yersinia enterocolitica* donde se observa que los extractos de ajo, habanero y albahaca no presentaron crecimiento mientras que la cepa presento una resistencia mayor al 50 % a los extractos de ruda, orégano y tomillo en los dos tiempos.



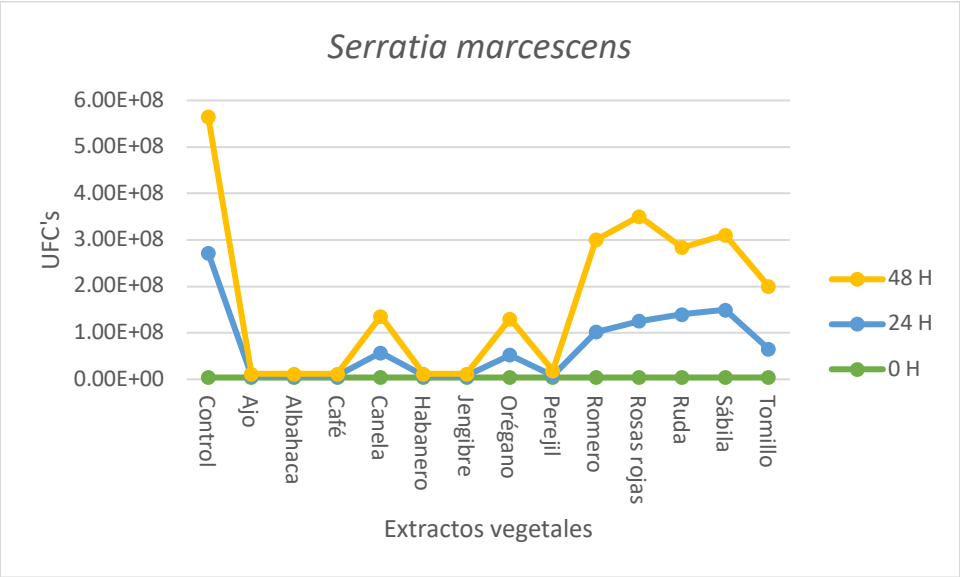
Gráfica 5. Inhibición de *Yersinia enterocolitica* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 6 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Enterobacter aerogenes* donde se observa que los extractos de ajo, no tuvo un crecimiento mientras que habanero, jengibre, ruda, sabila, albahaca, y tomillo tuvieron un crecimiento mayor de un 30 % en los dos tiempos.



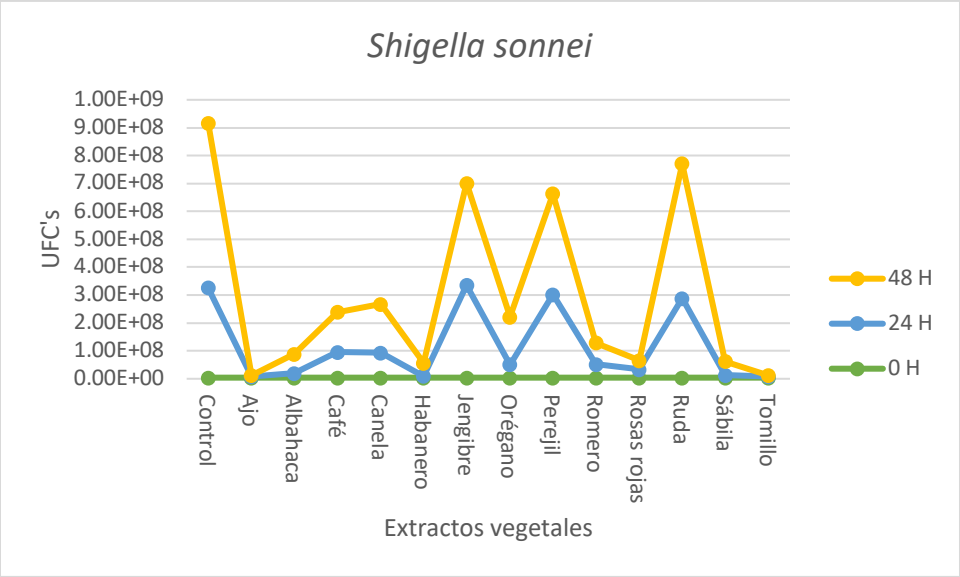
Gráfica 6. Inhibición de *Enterobacter aerogenes* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 7 se muestra que los extractos de ajo, café, habanero, jengibre y albahaca no presentaron crecimiento en *Serratia marcescens* a diferencia de los extractos de canela, ruda, sábila, romero, tomillo y rosas siendo esta última la que mayor crecimiento presento con un 72 y 87% a comparación del control.



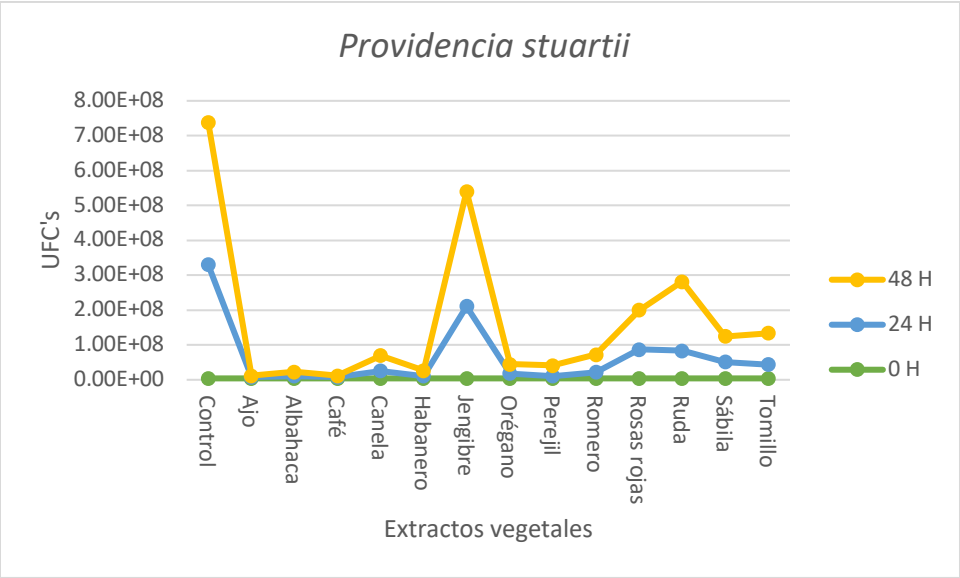
Gráfica 7. Inhibición de *Serratia marcescens* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 8 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Shigella sonnei* donde se observa que los extractos de ajo y albahaca no presentaron crecimiento mientras que los extractos de jengibre y perejil llegaron a crecer al 100% a comparación del control.



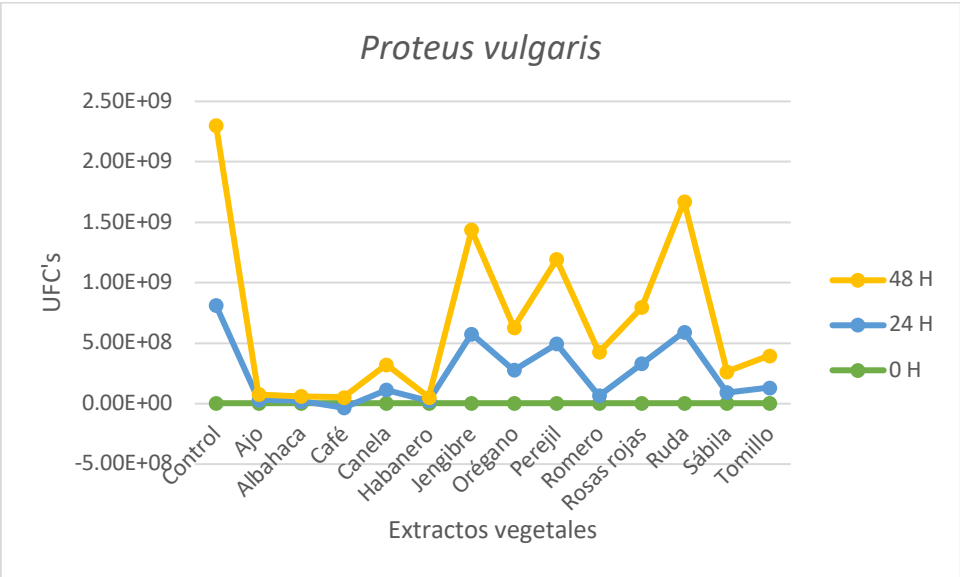
Gráfica 8. Inhibición de *Shigella sonnei* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 9 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Providencia stuartii* donde se observa que los extractos de ajo, albahaca y café no presentan crecimiento mientras que jengibre, perejil y ruda presentaron un crecimiento mayor del 50%.



Gráfica 9: Inhibición de *Providencia stuartii* con diferentes extractos vegetales

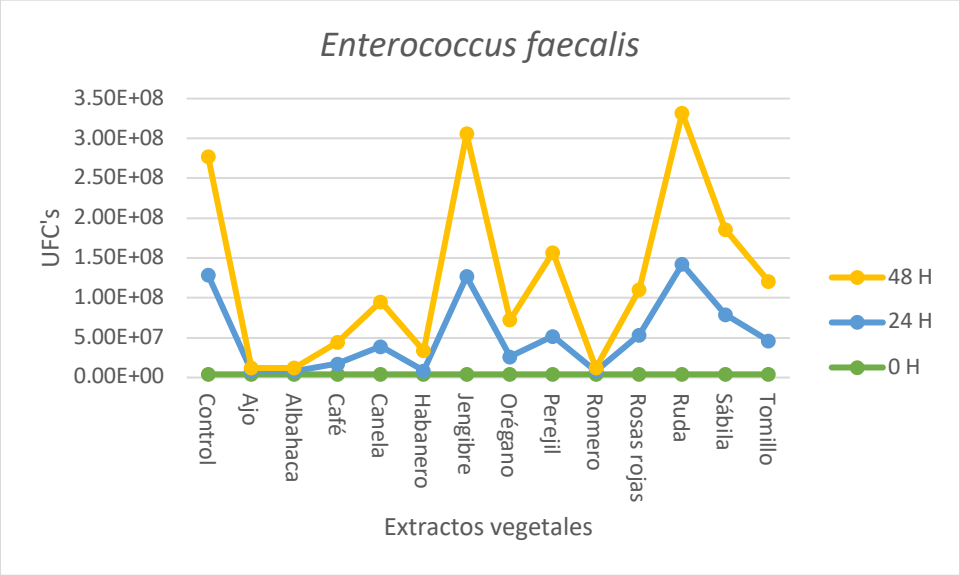
En la gráfica 10 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Proteus vulgaris* se observa que los extractos de ajo, albahaca, café y chile habanero presentaron un crecimiento menor del 5 % mientras que los extractos de jengibre, perejil, ruda,y rosas presentaron un crecimiento mayor al 30 y 71%.



Gráfica 10. Inhibición de *Proteus vulgaris* con diferentes extractos vegetales.

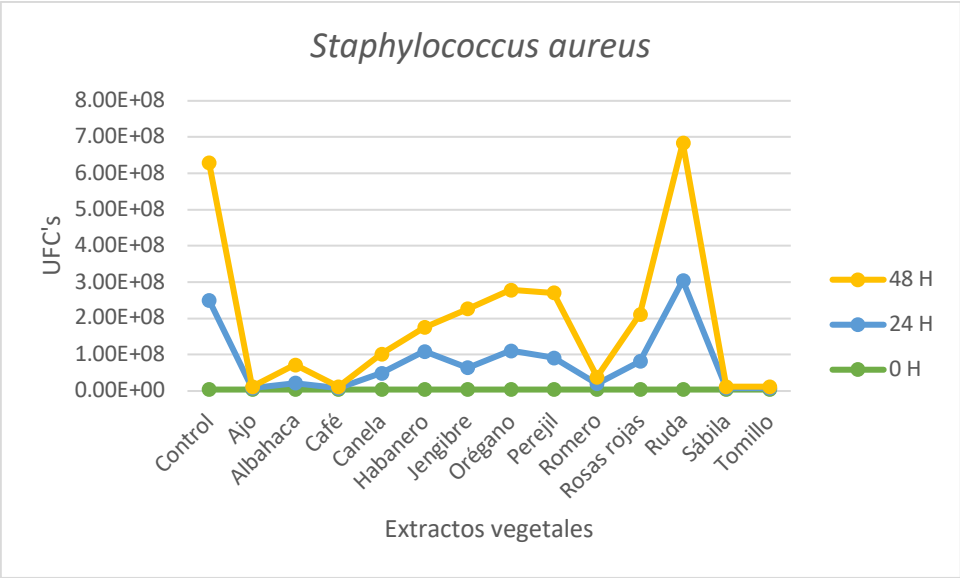
Graficas de inhibicion de cepas gram positivas

En la gráfica 11 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Enterococcus faecalis* donde se observa que el extracto de albahaca fue el único que tuvo inhibición mayor a comparación de los demás extractos ya no hubo crecimiento mientras que los extractos de jengibre, perejil, sábila y ruda siendo esta ultima la que presento mayor crecimiento con un 100% a comparación del control.



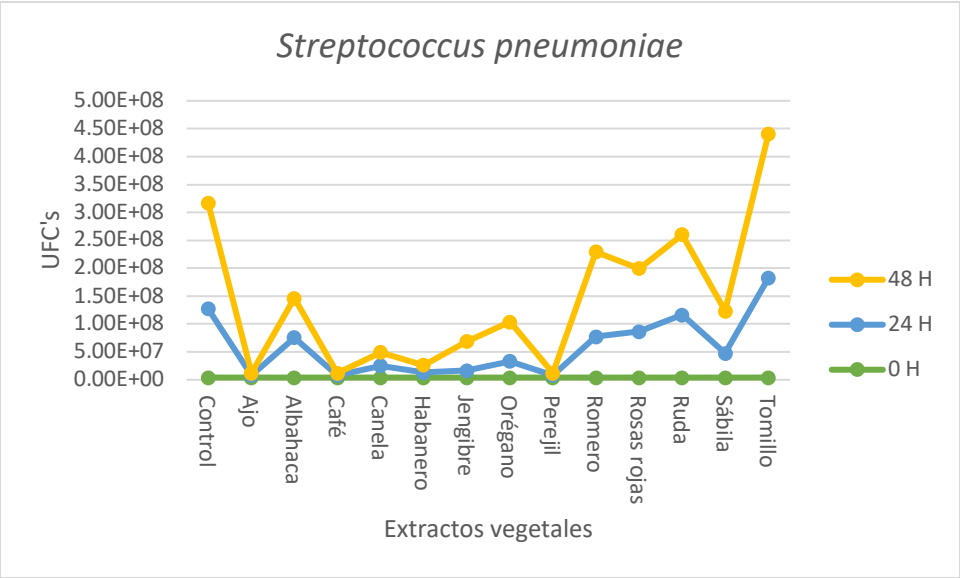
Gráfica 11. Inhibición de *Enterococcus faecalis* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 12 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Staphylococcus aureus* donde se observa que los extractos de ajo café sabila y tomillo no presentaron crecimiento mientras que en el extractos de ruda presento un crecimiento de 90 y 99 %



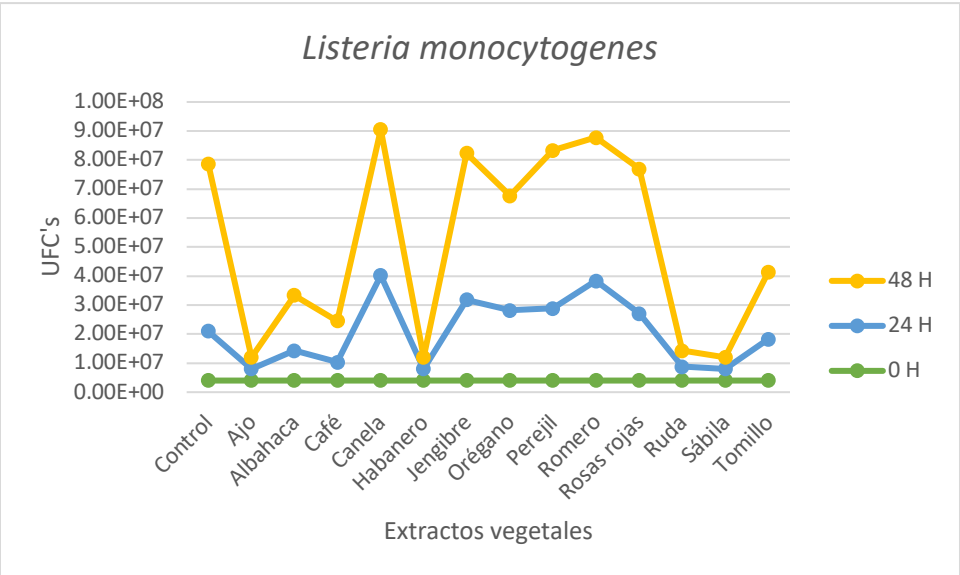
Gráfica 12. Inhibición de *Staphylococcus aureus* con diferentes extractos vegetales

En la gráfica 13 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Streptococcus pneumoniae* se observa que los extractos de ajo, café, perejil presentaron un crecimiento menor del 5 % mientras que los extractos de ruda, rosas, sabila, albahaca, oregano romero teniendo un crecimiento mayor a un 30 % del crecimiento a comparacion del control mientras que tomillo presento un crecimoento de un 100%.



Gráfica 13. Inhibición de *Streptococcus pneumoniae* con diferentes extractos vegetales.

En la gráfica 14 se muestra los diferentes extractos para la inhibición *Listeria monocytogenes donde* se observa que el extracto de ajo fue el unico que no presento crecimiento y sabila con un crecimiento menor al 16 %, esta cepa fue la que mayor resistencia tuvo con la mayoría de los extractos, siendo los extarctos de jengibre , perejil, rosas, oregano y tomillo los que presentaron un crecimiento mayor al 80 y 100%.



Gráfica 14. Inhibición de *Listeria monocytogenes* con diferentes extractos vegetales

Resultados de Fitoquímicas

Tabla 7. Pruebas Fitoquímicas de los tres extractos que mayor inhibición tuvieron en las bacterias.

Grupos funcionales	AJO	CAFÉ	ALBAHACA
Saponinas	++	_	+
Cumarinas	+	+++	++
Flavonoides	+++	++	+
Quinonas	-	+	+
Terpenos	+	+	++
Esteroides	++	-	_
Alcaloides	-	+++	_
Fenoles	+++	+++	+++

- Sin presencia, +presencia baja, ++ presencia media y +++ presencia

Discusión

El uso de la PM con propiedades medicinales, representa una forma alternativa y esencial para el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas, esto puede incluir el uso de estos productos de origen natural.

De acuerdo con Ankri y Mirelman en 1999, atribuyen la actividad antimicrobiana a los componentes de origen natural que posee el ajo (Allium sativum) y una de ellas es la Alicina que en su forma pura actúa inhibiendo una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, nuestro trabajo concuerda con el del autor antes mencionado ya que 13 cepas siendo el (100%) total fueron inhibidas por el extracto de ajo, por lo que se concluye que el ajo tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano de manera eficaz ya que sus algunos principios activos que contienen son: flavonoides, antocianinas. Fenoles, esteroides y saponinas, Memarian 2020.

De acuerdo con El Aztal 2004 sus resultados coinciden con los de nuestro trabajo usando la misma técnica de extracto acuoso de ajo teniendo la inhibición del 100%en las cepas *P. aeruginosa S. aureus S. pneumonia.*

Johnson *et al*., 2016, reportan actividad antimicrobiana del extracto de ajo (Allium sativum) contra S. aureus y P. aeroginosa, patógenos importantes de enfermedades infecciosas. Estos resultados coincidieron con los obtenidos del presente trabajo donde el extracto de ajo obtuvo la mayor acción inhibitoria en las cepas de S. aureus, P. aeroginosa entre otras. Además, el autor afirma en sus pruebas fitoquímicas la presencia de metabolismos secundarios como taninos, terpenoides, esteroides, saponinas, fenoles, proteínas y azúcar reductor. Por lo tanto, se coincide la presencia de estos metabólitos con excepción de proteínas y de azúcar reductor.

De acuerdo con Celikel y Navas, 2008, probaron el aceite esencial de tomillo para la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes* y de *Staphylococcus aureus*, en el presente trabajo se obtuvieron los mismos resultados, pero difieren en la técnica ya que ellos utilizaron aceites esenciales y en este caso se ocupó extractos acuosos.

De acuerdo con el trabajo realizado de Hirulkar y Agrawal, 2010, probaron que el extracto alcohólico de rosas presentaba una mejor inhibición en el crecimiento de algunas bacterias como: *Streptococcus pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus y Pseudomonas Aeruginos*a, en nuestro trabajo no se obtuvieron los mismos resultados del autor antes mencionado teniendo solo la inhibición de dos de las cepas utilizadas por el autor *Enterobacter aerogenes, y Pseudomonas Aeruginos*a podemos concluir que varía ya que el utilizo una técnica diferente a la de nosotros.

Acorde a las tablas mostradas en los resultados, el trabajo de Castaño et al 2010, probaron el extracto etanólico y aceites escenciales de romero (*Rosmarinus officinalis L.)* contra 8 microorganismos patógenos principales como: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, Shigella sonnei, Listeria monocytogenes, Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus y Lactobacillus plantarum.* Mostró que el extracto etanólico tiene un efecto antimicrobiano para las cepas de *Salmonella typhimurium, Shigella sonnei y Listeria monocytogenes* de las 8 cepas y con el aceite escencial tuvo un efecto inhibitorio en todas, se afirma que nuestro extracto acuoso de romero presentó una inhibición bacteriana en la mayoria de nuestras cepas con un 69%. Entre l*as cepas utilizadas por el autor Pseudomonas aeruginosa, Shigella* sonnei furon inhibidas mientras que Listeria monocytogenes no mostro los mismos resultados . Por lo tanto, la similitud de los resultados puede variar ya que la metodología no es diferente.

Estudios recientes sobre las diferentes propiedades antimicrobianas de las especies de café son innumerables en la bibliografía, a pesar de que es una de las bebidas mas apreciadas, conocidas y preferidas del mundo.

Los ácidos clorogénicos como menciona Chaves y Esquivel en 2019 son componentes de mucha relevancia presentes en el café, uno de los compuestos fenólicos mas importantes son los conjugados de ácido quínico, mejor conocidos como ácidos clorogénicos, sugieren que este efecto antimicrobiano reside en los componentes presentes en el café, principalmente el ácido clorogénico, el hecho de que las bacterias Gram negativas presentan una mayor resistencia se debe a la naturaleza hidrofóbica de los compuestos fenólicos, lo cual se convierte en un

obstáculo para que los compuestos atraviesen la membrana externa de las Gram negativas como en el caso de nuestro trabajo con la bacteria *Klebsiella pneumonie*.

Conclusiones

- El uso de los extractos vegetales es una buena alternativa para disminuir la presencia de bacterias resistentes a los antibióticos, por lo que no presentan efectos secundarios por ser de origen natural.
- La mayoría de las bacterias resultaron ser sensibles a los extractos ocupados.
- De acuerdo con los resultados antes mostrados se puede diferir que los extractos que mejor función inhibitoria presentaron fueron ajo, albahaca y café mostrando una sensibilidad en la mayoría de las bacterias de un 76% a un 100%.
- Las bacterias Gram negativas presentaron mayor sensibilidad a los extractos que las bacterias Gram positivas que no presentaron mayor sensibilidad a los extractos.

Referencias Bibliográfica

1. Ankri., S y Mirelman., D. (1999). Antimicrobial properties of Allicin from garlic. ELSEVIER. Vol 1. P.p. 125-129.
2. Beyra Á., León M., Iglesias E., Ferrándiz D., Herrera R., Volpato G., Godínez D, Guimarais M y Álvarez R., (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente., Anales del Jardín Botánico de Madrid. P.p. 185-204.
3. Castano P. Hader I y Ciro G. (2010). Actividad bacteriana del extracto etanólico y aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis L*. sobre algunas bacterias de interés alimentario. Vitae 17(2)., ISSN:0121-4004.
4. Celikel, N., Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. Czech J. Food Sci., 26(3), 174–181.
5. Coy Carlos A., Parra J y Cuca Luis E. (2014), Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie raputia heptaphylla (rutaceae), Revista Elementos.
6. Delgoda R. Murray J.E., (2017). Evolutionary Perspectives on the Role of Plant Secondary Metabolites. Pharmacognosy. ELSEVIER. P.p93-100. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00007-X.
7. El Astal, Z. (2004). The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria. European Food Research and Technology. 218 (5) 460-464. Doi:10. 1007/s00217-003-0864-3.
8. Fardiaz S. Actividad antimicrobiana del extracto de café (*Coffea robusta*). ASEA Food J. 1995; 10 : 103–6.
9. García C, Martínez A, Ortega JL y Castro F. (2010). Componentes químicos y microbiology & biotechnology, 16. 814-844.
10. Gull I., Saeed M., Shaukat H., Aslam SM., Qadir Samra y Atar A,M. (2012). Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.

11. Ibraheem M., Kassim K., Abdalrasool S. y Ahmad D. (2009). Antibacterial activity of ginger extracts and its essential oil on some of pathogenic bacteria, Baghdad Science Journal, Vol.7, Pp. 1159-116.
12. Ikan, R. (1991). Natural products: a laboratory guide. Academic Press. San Diego. Pp 360.
13. Johnson, M., Olaleye, Nurudeen, O y Kolawole Simeon, O. (2016). Antimicrobial and antioxidant properties of aqueous garlic (*Allium sativum*) Extract against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, British Microbiology Research Journal, vol 11. Pp.1-11.
14. Lidia Osuna Torres, María Esther Tapia Pérez y Abigail Aguilar Contreras. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: estudio Etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Barcelona: Edicions Universitat Barcelona.
15. MacFaddin, J. F. (2003). Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España.
16. Magaña Alejandro Miguel A. Gama Campillo Lilia Ma y Mariaca Méndez Ramón. (2010). El uso de las plantas medicinales en las comunidades mayachontales de Nacajuca, Tabasco, México. Polibotanica. Núm. 29, pp. 213-262, ISSN 1405-2768.
17. Mariana Palma Tenango, R. S. (2017). Aromatic and Medicinal Plants in México. IntechOpen, 134-147. DOI:http://dx.doi.org/10.5772/66507
18. Mariana Palma-Tenango, Rubén San Miguel-Chávez y Ramón Marcos Soto-Hernández. (15 de marzo2017). Aromatic and Medicinal Plants in Mexico. En Aromatic and Medicinal Plants (17). Cairo University: Hany El-Shemy.
19. Memariani, Z., Gorji, N., Moeini, R., y Farzaei, M. H. (2020). Traditional uses. Phytonutrients in Food, 23–66. Doi:10.1016/b978-0-12-815354-3.00004-6
20. N. B. Hirulkar, M. A. (2010). Antimicrobial Activity of Rose petals Extract Against Some Pathogenic Bacteria. International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives, 478-484.

21. Naciye Erkan, G. A. (2008). Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid,rosmarinic acid and sesamol. Elsevier, 76–82.
22. Noumedem J., Mihasan M., Lacmata S., Stefan M., Kuiate J y Kuete V. (2013). Actividades antibacterianas de los extractos de metanol de diez vegetales de Camerún contra bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos., BMC Medicina complementaria y alternativa, P.p 13, https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-26.
23. Ocegueda, s., E. Moreno y P. Koleff. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identifica. CONABIO. Biodiversidad P.p.12-15.
24. OMS, (2017). Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.
25. OMS. (2004). New WHO guidelines to promote proper use of alternative medicines.
26. Ormeño E. y Fernandez C. (2002). los Terpenos de las plantas., investigación y ciencia.P.p 62-69.
27. Pérez y Terrón, R., Anaya, A., de Gante, A., Espinosa, S. Molina, D., López D. Rosete y M., Rueda, G. (2010). Procesos Celulares Fundamentales. Manual de Prácticas de Laboratorio. Primera edición. Ediciones Color 2000. P.p 1-313.
28. Rana Mujahid Abdullah Alshwaikh, D., (2014). Antibacterial activity of parsley and celery aqueous extract on the isolated bacteria from children UTI in Erbil city. International Journal of Advanced Research, 9.
29. Raskin, I., Ribnicky, D. M., Komarnytsky, S., Ilic, N., Poulev, A., Borisjuk, N y Fridlender, B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. Trends in Biotechnology, 20(12), 522–531. doi:10.1016/s0167-7799(02)02080-2.
30. Rates, S. M. (2001). Plants as source of drugs. Toxicon, 39(5), 603–613.doi:10.1016/s0041-0101(00)00154-9
31. Roig y Mesa Juan Toma. (2012). Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de cuba. cuba: científico-técnica.

32. Salar Bakhtiyari, S. S. (2014). Investigating antimicrobial activity of hydroalcoholic extract and essential oil of Tymbra spicata against some pathogenic bacteria. Medical Sciences, Bangananjab Avenue, 1-7.
33. Sepúlveda Jiménez, G. Porta Ducoing, H y Rocha Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas . *Revista Mexicana de Fitopatología, 21* (3), 355-363.
34. So HS, Park R, Oh HM, Chai KY, Lee JH y Chung HT. (1999). Enhancement of nitric oxide synthesis by the aqueous extract of Siraea prunifo ha car simplictflora's root in RAW 264.7 cells. Immunopharmacol Immunotoxicol 2:343-355.
35. Surbled, M. y Mompon, B. (2008). Extraction and concentration techniques for bioactives from fruit and vegetables. Improving the Health-Promoting Properties of Fruit and Vegetable Products. Elsevier. Pp.533-547. doi:10.1533/9781845694289.5.533
36. Taheri A, Seyfan A, Jalalinezhad S y Nasery F. (2012). Antibacterial Effect of Myrtus Communis Hydro-Alcoholic Extract on Pathogenic Bacteria. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, Pp. 19-24.
37. Turgay Erdog Özlem. (2002). Antibacterial Activistas of Some Plant ExtractsUsed in Folk Medicine, Pharmaceutical Biology, 40:4, 269-273, DOI: 10.1076/phbi.40.4.269.8474.
38. Vega G, Antonio, Ampuero C, Nevenka, Díaz N, Luis, y Lemus M, Roberto. (2005). EL ALOE VERA (*aloe barbadensis miller*) como componente de alimentos funcionales. Revista chilena de nutrición, *32*(3), 208-214.
39. Velavan S. (2015). Phytochemical Techniques - A Review. World Journal of Science and Research. 1(2): P.p 80-91.
40. Yarnell, E. (2007), Plant Chemistry in Veterinary Medicine: Medicinal Constituents and Their Mechanisms of Action. Veterinary Herbal Medicine. ELSEVIER. P.p. 159-182.