



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“Evaluación del efecto antibacteriano de extractos vegetales de *Gnaphalium* sp., *Psidium* sp. y *Rosa gallica* contra bacterias de interés intrahospitalario”

Tesis

Para obtener el título de:

Licenciada en Biotecnología

Presenta

Victoria Gracia Escobedo Valdez

Directora de Tesis

D.C. Sandra Luz Cabrera Hilerio

Codirectora de Tesis

D.C. Mariana Miranda Arámbula

Junio, 2023



AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que me apoyaron para que esta tesis sea una realidad.

DEDICATORIA

A todos los que me acompañaron y apoyaron en mi etapa universitaria,
profesores, amigos, compañeros y familia.

ÍNDICE

	Contenido	Página
	Agradecimientos	I
	Dedicatoria	II
	Índice	III
	Índice de tablas	VI
	Índice de figuras	VII
	Abreviaturas y siglas	IX
1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Bacterias oportunistas de interés intrahospitalario	3
2.2	Resistencia bacteriana y uso de antisépticos y desinfectantes.	4
2.2.1	<i>Staphylococcus</i>	5
2.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.2.3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5
2.2.4	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6
2.3	Medicina tradicional, plantas medicinales y extractos vegetales	6
2.3.1	<i>Rosa gallica (Rosa)</i>	8
2.3.2	<i>Psidium guajava (Guayaba)</i>	9
2.3.3	<i>Gnaphalium chartaceum. (Gordolobo)</i>	10
2.4	Metabolitos secundarios de plantas	11
2.5	Extracción asistida por ultrasonido	12

3.	HIPÓTESIS	14
4.	OBJETIVOS	14
4.1	Objetivo general	14
4.2	Objetivos específicos	14
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1	Acondicionamiento de las especies vegetales	15
5.2	Activación de cepas bacterianas	15
5.3	Obtención de los extractos vegetales	16
5.4	Determinación de la concentración de los extractos por diferencia de peso	16
5.5	Rendimiento de la extracción	16
5.6	Bioensayos de actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con pozos	17
5.6.1	Obtención de la suspensión bacteriana	17
5.6.2	Bioensayo del efecto antibacteriano de los extractos etanólicos frente a bacterias nosocomiales	17
5.6.3	Análisis estadístico	18
6.	RESULTADOS	19
6.1	Determinación de concentración de los extractos.	19
6.2	Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213, <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 y <i>S. saprophyticus</i>	19
6.2.1	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Gnaphalium chartaceum</i> .(gordolobo)	19

6.2.2	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Rosa gallica</i> (rosa de castilla)	21
6.2.3	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> (guayaba)	23
7.	DISCUSIÓN	27
7.1	Concentración de extractos	27
7.2	Determinación de actividad antibacteriana	27
7.2.1	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Gnaphalium chartaceum</i> .(gordolobo)	27
7.2.2	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Rosa gallica</i> (rosa de castilla)	28
7.2.3	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Psidium guajava</i> (guayaba)	29
8.	CONCLUSIONES	30
9.	PERSPECTIVAS	31
10.	BIBLIOGRAFÍA	32

Índice de tablas

#	Título	Página
Tabla 1.	Actividad antibacteriana evaluada de las distintas plantas empleadas en este trabajo.	9
Tabla 1	Tipos de metabolitos y actividades reportadas	11
Tabla 3.	Partes vegetales utilizadas para la extracción etanólica de compuestos antimicrobianos.	15

Índice de figuras

#	Título	Página
Figura 1.	<i>Rosa de castilla</i> . A. Flor fresca B. Flor seca empleada en los experimentos.	8
Figura 2.	<i>Psidium guajava</i> A. Hoja fresca B. Hojas secas empleadas en los experimentos.	9
Figura 3.	<i>Gnaphalium chartaceum</i> A. <i>Gnaphalium chartaceum</i> B. Muestra empleada.	10
Figura 4.	Actividad antibacteriana del extracto de <i>Gnaphalium chartaceum</i> . (verde) A. <i>S. aureus</i> ATCC 29213, B. <i>S. epidermidis</i> , ATCC 12228. Control positivo en azul y control negativo en negro	20
Figura 5.	Actividad antibacteriana del extracto de <i>Gnaphalium chartaceum</i> . (verde) frente a <i>S. saprophyticus</i> . Control positivo en azul y control negativo en negro	20
Figura 6.	Gráfica de halos de inhibición de <i>Gnaphalium chartaceum</i> . sobre <i>S. aureus</i> (rosa), <i>S. saprophyticus</i> (naranja) y <i>S. epidermidis</i> (verde), halos de inhibición del control positivo (vancomicina) (azul).	21
Figura 7.	Actividad antibacteriana del extracto de <i>Rosa galica</i> (rosa), A. <i>S. aureus</i> ATCC 29213; B. <i>S. epidermidis</i> , ATCC 12228. Control positivo en azul y control negativo en negro.	22
Figura 8.	Actividad antibacteriana del extracto de <i>Rosa galica</i> (rosa) frente a <i>S. saprophyticus</i> . Control positivo en azul y control negativo en negro.	22

Figura 9.	Gráfica de halos de inhibición de <i>Rosa gallica</i> sobre <i>S. aureus</i> (rosa), <i>S. saprophyticus</i> (naranja) y <i>S. epidermidis</i> (verde), halos de inhibición del control positivo (vancomicina) (azul).	23
Figura 10.	Actividad antibacteriana del extracto de <i>Psidium guajava</i> (naranja); A. <i>S. aureus</i> ATCC 29213, B. <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228. Control positivo en azul y control negativo en negro	24
Figura 11.	Actividad antibacteriana del extracto de <i>Psidium guajava</i> (naranja); frente a <i>S. saprophyticus</i> . Control positivo en azul y control negativo en negro.	25
Figura 12.	Gráfica de halos de inhibición de <i>Psidium guajava</i> sobre <i>S. aureus</i> (rosa), <i>S. saprophyticus</i> (naranja) y <i>S. epidermidis</i> (verde), halos de inhibición del control positivo (vancomicina) (azul).	26

Abreviaturas y siglas

μg	Microgramos
μl	Microlitros
cm	Centímetros
mm	Milímetros
mL	Mililitros
ATCC	American Type Culture Collection
HUP	Hospital Universitario de Puebla
KHz	Kilohertzios = 1000 Hz
OMS	Organización Mundial de la Salud
TSA	Agar Soya Tripticaseína del inglés “Trypto-casein Soy Agar”
UNAM	Universidad Autónoma de México
<i>S. saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
mg/mL	Miligramos por mililitro
EAU	Extracción Asistida por Ultrasonido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>A. baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
IAAS	Infecciones Asociadas con la Atención de la Salud
RHVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
h	Horas
MT	Medicina tradicional
va / VANCO	vancomicina

1. RESUMEN

La búsqueda, el descubrimiento y el empleo de nuevos compuestos químicos para hacer frente a la resistencia microbiana a los antibióticos es de vital importancia ya que las Infecciones Asociadas con la Atención de la Salud (IAAS) se consideran una seria complicación de salud pública debido al alto efecto en la morbilidad, mortalidad y los costos hospitalarios que estas conllevan. Hoy en día la necesidad de hacer frente a la resistencia a los antibióticos ha llevado a investigadores de distintas áreas a buscar nuevas fuentes de actividad antimicrobiana lo que ha conducido a estudiar metabolitos secundarios de plantas que poseen propiedades bactericidas, antiinflamatorias, antivirales, terapéuticas, insecticidas y fungicidas. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Gnaphalium chartaceum* (gordolobo), *Rosa gallica* (rosa de castilla) y *Psidium guajava* (guayaba) frente a bacterias nosocomiales *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus* salvaje. Los extractos se obtuvieron mediante ultrasonido por 45 minutos a 47kHz utilizando como disolvente etanol absoluto y la evaluación antibacteriana se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en pozo midiendo halos de inhibición a las 24 h. El resultado de la actividad antibacteriana evaluada a las 24 h demostró que existe inhibición de crecimiento contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 frente al extracto etanólico de *Rosa gallica* (rosa) a una concentración de 98 mg/mL con un porcentaje de inhibición del 82.4% respecto al control. El extracto de *Gnaphalium chartaceum*. a una concentración de 15 mg/mL inhibió a *S. aureus* ATCC 29213 y a *S. saprophyticus* un 72.5 % y un 60 % a *S. epidermidis* ATCC 12228. El extracto de *Psidium guajava* a una concentración de 65 mg/mL inhibió a *S. epidermidis* ATCC 12228 (90.9% de inhibición), *S. aureus* ATCC 29213 (86.3% de inhibición) y *S. saprophyticus* (81.7%). Estos resultados muestran que los extractos evaluados tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de estas bacterias de interés intrahospitalario.

2. INTRODUCCIÓN

La resistencia microbiana a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de cambiar su respuesta al uso de estos medicamentos. El uso excesivo, la prescripción inapropiada, la poca disponibilidad de nuevos antibióticos y los obstáculos de regulación para el desarrollo de estos ha dado como resultado el pronto desarrollo de la resistencia bacteriana a los antibióticos (Belloso, 2009; Lee-Ventola, 2015; World Health Organization, 2020).

En México los microorganismos vinculados con más frecuencia a infecciones en hospitales son *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *A. baumannii* de acuerdo con el último reporte de 2015 publicado por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en 2017 (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, 2017).

México es conocido como un país megadiverso, ya que presenta al menos el 10% de la diversidad terrestre del planeta (Mittermeier, *et al.*, 1992). Además, ocupa el segundo lugar a nivel mundial con 4500 plantas medicinales documentadas (Sánchez, 2017) que han sido empleadas a lo largo de los años por la población, para aliviar malestares asociadas a infecciones bacterianas, por lo que el empleo de compuestos obtenidos a partir de plantas medicinales puede ser una alternativa viable para combatir estas enfermedades.

Algunas de las plantas que se emplean en nuestro país son la rosa de castilla, la hoja de guayaba y el gordolobo, éstas se utilizan en infusiones para distintas afecciones relacionadas con el tracto respiratorio y el aparato digestivo. Y se ha reportado la actividad antimicrobiana de extractos de estas plantas contra bacterias patógenas (Ramírez-Rueda & Mojica-Ávila, 2014; Mármol *et al.*, 2017; Suruy-Echeverría, 2013).

Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Gnaphalium chartaceum*, *Rosa gallica* y *Psidium guajava* frente a bacterias de importancia clínica.

2.1 Bacterias oportunistas de interés intrahospitalario

Las Infecciones Asociadas con la Atención de la Salud (IAAS) se consideran una seria complicación de salud pública debido al alto efecto en la morbilidad, mortalidad y los costos hospitalarios que estas conllevan (Torres-Erazo *et al.*, 2020; World Health Organization, 2011). De acuerdo con el Economista, las IAAS dan por resultado un costo al sistema hospitalario de salud del país de entre 13,400 y 28,400 millones de pesos que representan entre el 5% y 11.5% de todo lo que se gasta en hospitalización en un año en México (El Economista, 2021).

De acuerdo con la OMS (2011) se estima que la prevalencia de infecciones asociada con la atención de la salud en países en vías de desarrollo es de 10.1% teniendo un 2.5% más de prevalencia y tasa de letalidad que en países industrializados donde no existen limitaciones económicas y de infraestructura (Torres-Erazo *et al.*, 2020).

La infección bacteriana es un proceso complejo donde el estado inmunológico, fisiológico y genético del hospedero influyen en el desarrollo de esta (Cabrera *et al.*, 2007). A menudo estas infecciones son ocasionadas por bacterias oportunistas como bacilos gramnegativos entre los que destaca la familia *Enterobacteriaceae* y los no fermentadores como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* spp. y gram positivos como *S. aureus* y *S. epidermidis* que son los de mayor predominio. El incremento en la frecuencia de la prevalencia de microorganismos resistentes a antibióticos se ha vinculado con infecciones adquiridas de manera intrahospitalaria (World Health Organization, 2014; Sader *et al.*, 2014; Torres-Erazo *et al.*, 2020; García-Elorriaga *et al.*, 2013).

En México los microorganismos vinculados con más frecuencia a IAAS son *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *A. baumannii* de acuerdo con el último reporte de 2015 publicado por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en 2017 (Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica, 2017).

2.2 Resistencia bacteriana y uso de antisépticos y desinfectantes

En el ambiente de manera natural existen bacterias productoras de antibióticos que tienen una serie de mecanismos sofisticados para defensa contra los antibióticos que ellas mismas producen (Peterson & Kaur, 2018). Ejemplos de este tipo de bacteria se pueden encontrar en el género *Streptomyces* (Mak, Xu & Nodwell, 2014). Se cree que la coexistencia de este tipo de bacterias con bacterias sensibles a antibióticos resultó en la evolución de mecanismos de resistencia (Peterson & Kaur, 2018)

La resistencia puede ser adquirida mediante mutaciones e intercambio de material genético ya sea de otras bacterias o fagos a través de mecanismos como la transformación, la transducción, la transposición y la conjugación (Calderón & Aguilar, 2016).

Los principales mecanismos de resistencia presentes en patógenos clínicos son: la modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas, bombas de eflujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana, bloqueo de la penetración del antimicrobiano mediante la modificación del sitio activo, alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular, biofilmes y la sobreexpresión del sitio blanco (Calderón Rojas & Aguilar Ulate, 2016; Peterson & Kaur, 2018; Cloete, 2003).

Una de las acciones que se puede llevar a cabo para controlar la resistencia a antibióticos es el prevenir la transmisión de infecciones bacterianas donde la limpieza, la desinfección y la esterilización forman parte de los mecanismos indispensables, para esto, es de principal importancia el uso de desinfectantes y antisépticos, sin embargo los mecanismos de resistencia no son indiferentes a estas sustancias ya que se han reportado bacterias con resistencia inherente y adquirida contra estas (Zhelev, 2019; de Souza *et al.*, 2020; Luque & Mareca, 2018; Vijayakumar, 2018).

De acuerdo con el boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) de 2022 entre los diez principales microorganismos aislados causantes de las IAAS de enero a agosto de 2022 se encuentran *S. aureus* y *S. epidermidis* en quinto y sexto lugar respectivamente (Secretaría de Salud, 2022).

2.2.1 *Staphylococcus*

Los cocos se asociaron por primera vez a enfermedades humanas cuando fueron observados en materiales purulentos provenientes de abscesos humanos. En 1800 el cirujano escocés Sir Alexander Ogston llamó a estos cocos “*Staphylococcus*” derivando el nombre de los términos griegos *staphile* (racimo de uvas) y *kokus* (frutilla) (Cervantes *et al.*, 2014).

2.2.2 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria comensal que se encuentra en la piel y las narinas anteriores de alrededor del 20-50% de la población mundial (Selseleh *et al.*, 2020). Se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piógenas y superficiales, aunque también puede producir, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda en personas con un sistema inmune comprometido. A nivel nosocomial es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, prótesis y otras. También causa una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, intoxicación alimentaria y el síndrome de la piel escaldada (Selseleh *et al.*, 2020, Hessen *et al.*, 2000).

2.2.3 *Staphylococcus epidermidis*

Forma parte de la microbiota de la piel humana sin embargo se ha visto incremento de casos en la población a partir de infecciones de piel y anexos bajo condiciones específicas, colonizando cuerpos extraños (catéteres endovenosos, fístulas para hemodiálisis, catéteres de diálisis peritoneal, marcapasos, articulaciones protésicas,

injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas e implantes de mama), causando infecciones como bacteriemia y endocarditis en huéspedes inmunocomprometidos (Younis *et al.* 2021, Bennett *et al.*, 2014). Tiene la capacidad de producir un biofilm que le confiere una adherencia muy eficiente, que le permite unirse a superficies formando una barrera que dificulta el paso de los antibióticos (Pinheiro *et al.*, 2014).

2.2.4 *Staphylococcus saprophyticus*

Es un importante agente causal de infecciones agudas en el tracto urinario en mujeres ambulatorias en edad sexual activa y está considerado como el segundo agente más frecuente de cistitis después de *E. coli* en esta población. El mayor reservorio humano de esta bacteria es el recto, la uretra y el cervix y se adhiere significativamente mejor a las células uroepiteliales que *S. aureus* y *S. epidermidis* y no se adhiere a otros tipos celulares como piel y células mucosas bucales (Orden-Martínez *et al.*, 2008; Fariña *et al.*, 2005).

2.3 Medicina tradicional, plantas medicinales y extractos vegetales

La medicina tradicional (MT) es el conjunto de conocimiento, habilidades y práctica para el mantenimiento de la salud, que forman parte de la tradición de una localidad, región y/o país; y no están integradas al sistema sanitario convencional (Organización Mundial de la Salud, 2013; Mirzaeian *et al.*, 2019; Villanueva-Solis, 2020).

La herbolaria que es el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos ha jugado un papel muy importante en la MT desde tiempos muy antiguos, una gran parte de la población en países desarrollados y en vías de desarrollo emplean la MT, especialmente la herbolaria para el cuidado de la salud (Orozco-Martínez *et al.*, 2020; Mirzaeian *et al.*, 2019; Fang *et al.*, 2005).

Hoy en día la necesidad de hacer frente a la resistencia a los antibióticos ha llevado a investigadores a buscar nuevas fuentes, principalmente de origen vegetal, que producen sustancias con actividad antibacteriana que ayuden a combatir cierto tipo de enfermedades y por diversos estudios se conoce que la mayoría de las especies

vegetales poseen propiedades bactericidas, antiinflamatorias, antivirales, antiterapéuticas, insecticidas y fungicidas (Velázquez-Vázquez *et al.*, 2019; Miranda-Cruz *et al.*, 2012).

La diversidad biológica y cultural en México es de importancia por la cantidad de especies de plantas de uso medicinal en distintas afecciones (Campos-Saldaña *et al.*, 2018; Velázquez-Vázquez *et al.*, 2019). Entre las distintas plantas empleadas en la cultura mexicana se encuentran la rosa de castilla, el gordolobo y la guayaba, las cuales, de acuerdo con la bibliografía, han presentado actividad antibacteriana (tabla 1) contra diversas bacterias de interés para el humano.

Tabla 2. Actividad antibacteriana evaluada de las distintas plantas empleadas en este trabajo.

Planta	Uso medicinal	Microorganismo blanco	Disolvente	Referencia
Rosa	Contra diarrea y baños oculares (Ríos & Martínez, 2015).	<i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Agua Etanol	Vargas-Segura <i>et al.</i> , 2019, Mármol, <i>et al.</i> , 2017
Guayaba	Enfermedades de garganta y pecho, tos y aliviar úlceras orales (Irshad <i>et al.</i> , 2020).	<i>S. aureus</i> , <i>S. enteriditis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Shigella</i> spp.	Etanol Metanol	Biswas <i>et al.</i> , 2013, Suruy-Echeverría, 2013; CONABIO; Sanches <i>et al.</i> , 2005
Gordolobo	Tos, infecciones de garganta, bronquitis, asma, descongestión, úlceras, dolor de estómago y parásitos intestinales (Fonseca-Chávez <i>et al.</i> , 2020)	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>B. cerus</i> , <i>S. typhimurium</i>	Diclorometano, metanol, cloroformo y hexano	Ramírez-Rueda & Mojica-Ávila, 2014, Rojaset <i>et al.</i> , 2001, Villagómez-Ibarra, y otros, 2001, Sharma <i>et al.</i> , 2017.

2.3.1 *Rosa gallica* (Rosa)

Esta planta, en especial hojas y flores, en la medicina tradicional se emplea como diurético y se emplea para aliviar bronquios, congestión de pecho y dolor de garganta y debido a la propiedad antiséptica que tiene se utiliza para lavado de ojos y para hidratar la piel (Mármol *et al.*, 2017).

Diversos estudios científicos han evaluado la actividad antifúngica, antibacterial y antioxidante de este género, estas propiedades se le han atribuido a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos (Mármol *et al.*, 2017). Olech *et al.* (2016) proponen el mecanismo de acción de extractos de rosa en el que la privación de energía causada por la hiperacidificación de la interfaz de la membrana plasmática interrumpe a la H⁺-ATPasa debido a la actividad antioxidante de los extractos de rosa. Algunas de las bacterias contra las que se han evaluado extractos etanólicos de este género son *S. aureus*, *Streptococcus mutans* y *E. coli* (Mármol *et al.*, 2017).



Figura 2. *Rosa gallica*. A. Flor fresca B. Flor seca empleada en los experimentos

2.3.2 *Psidium guajava* (Guayaba)

En la medicina tradicional esta planta se emplea para aliviar enfermedades de garganta, pecho, tos y aliviar úlceras orales (Irshad *et al.*, 2020), en México se emplea con mayor frecuencia para enfermedades gastrointestinales, diarrea, dolor de estómago, vómito, disentería padecimientos en la piel y también como desparasitante, generalmente se emplean las hojas de guayaba en infusiones que pueden ser tomadas o aplicadas como en el caso de padecimientos de piel (Fonseca, *et al.*, 2020).

Debido a los usos medicinales de esta planta se han llevado a cabo diversos estudios donde se ha demostrado que los extractos fenólicos de hojas y flores como la guaverina, el ácido psidiolico y quercetina tienen actividad antibiótica contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri* (CONABIO; Suruy-Echeverría, 2013). Igualmente se ha evaluado la actividad antibacteriana de extractos acuosos y etanólicos contra *S. aureus* donde el extracto etanólico mostró mayor actividad antibacteriana (Sanches *et al.*, 2005; Biswas *et al.*, 2013).

Se ha reportado que el mecanismo de acción de estos extractos vegetales consiste en la penetración de la bicapa lipídica de la membrana celular volviéndola más permeable permitiendo que el contenido vital para las células salga produciendo la muerte bacteriana (Biswas *et al.*, 2013; Burt, 2004).



Figura 3. *Psidium guajava* A. Hoja fresca B. Hojas secas empleadas en los experimentos.

2.3.3 *Gnaphalium chartaceum* (Gordolobo)

Esta planta es empleada a manera de infusión en la medicina tradicional mexicana para tos, infecciones de garganta, bronquitis, asma, descongestión, úlceras, dolor de estómago y parásitos intestinales (Fonseca *et al.*, 2020).

Dentro del género *Gnaphalium* existen diferentes especies que han mostrado actividad antibacteriana y se han reportado grupos químicos como flavonas y lactonas sesquiterpénicas en los extractos de esta especie (Ramírez-Rueda & Mojica-Ávila, 2014).

Se han llevado a cabo diversos estudios sobre la actividad antibacteriana de esta especie con extractos diclorometánicos, metanólicos, clorofórmicos y hexánicos contra diferentes especies de *Staphylococcus*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Bacillus cerus* y *Salmonella typhimurium* (Ramírez-Rueda & Mojica-Ávila, 2014; Rojas *et al.*, 2001; Villagómez-Ibarra *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2017)



Figura 4. *Gnaphalium chartaceum* A. *Gnaphalium chartaceum* B. Muestra empleada.

2.4 Metabolitos secundarios de plantas

Los metabolitos secundarios de plantas son derivados biosintéticos de metabolitos primarios que producen las plantas que se encuentran sometidas a estrés medio ambiental (Veobides-Amador *et al.*, 2018; Ashraf *et al.*, 2018). Muchos de estos metabolitos se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes por lo que también reciben el nombre de productos naturales (Ávalos-García & Pérez-Urria, 2009).

Los metabolitos secundarios o productos naturales se agrupan en cuatro clases principales: Terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos-García & Pérez-Urria Carril, 2009). Entre estas clases de metabolitos secundarios existen compuestos con funciones defensivas contra insectos, bacterias y hongos entre los que se encuentran aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos, terpenoides y alcaloides (Martínez *et al.*, 2012).

Tabla 3. Tipos de metabolitos y actividades reportadas

Clase	Compuestos	Actividad reportada
Terpenos	Hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos (carotenos, xantofilas, ergosterol, sitosterol, colesterol) o aceites esenciales.	Anticancerígena, antiulcerosa, antimalariales, antimicrobianas.
Compuestos fenólicos	Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.	Antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena, antimicrobiana, cardioprotectora.
Glicósidos	Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.	Cardiotónica, anticancerígena, antimicrobiana,

		antioxidante, antiinflamatoria
Alcaloides	Isoquinolina, quinolina, indol, tropano, quinolizidina, piperidina, purina, pirrolizideno.	Analgésica, antineoplásica, antimicrobiana, estimulante del sistema nervioso central y antiarrítmica.

2.5 Extracción asistida por ultrasonido

El ultrasonido es una onda sonora que se propaga a través de una serie de olas de compresión y expansión que viajan a través de un medio, al introducir ultrasonido en un medio líquido, las ondas de sonido se transmiten en el fluido y crean ciclos alternos de alta presión y baja presión, durante el ciclo de baja presión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío o huecos en el líquido, cuando las burbujas alcanzan un volumen en el que ya no pueden absorber energía, colapsan violentamente durante un ciclo de alta presión, este fenómeno se le denomina cavitación, donde se alcanzan temperaturas y presiones muy altas así como también se producen chorros de líquido de hasta 280 m/s de velocidad (Grupo de Innovación Docente en Operativa de Laboratorios Químicos, 2014).

Las reacciones sonoquímicas se han desarrollado principalmente para reacciones en fase heterogénea, cuando las burbujas de cavitación se forman encima o cerca de la superficie sólida el colapso de la burbuja no es simétrico por lo que se forma un chorro líquido dirigido hacia la superficie sólida con una velocidad de unos 400 km/h, estos chorros y las ondas de choque asociadas pueden producir una erosión importante en las superficies y exponer nuevas superficies (Grupo de Innovación Docente en Operativa de Laboratorios Químicos, 2014).

La fuente de ultrasonido más ampliamente empleado por su disponibilidad y asequibilidad es el baño de ultrasonido, estos trabajan con frecuencias entre 30 y

50 kHz., el uso normal de los equipos se lleva a cabo mediante la inmersión de un matraz de vidrio que contiene la mezcla de reacción en el baño, lo que permite una distribución uniforme de energía en el medio de reacción (Grupo de Innovación Docente en Operativa de Laboratorios Químicos, 2014).

Esta técnica no tradicional para la extracción de compuestos vegetales disminuye considerablemente el tiempo de extracción, lo que evita la degradación térmica de constituyentes termolábiles y además reduce el consumo de disolvente disminuyendo la contaminación al medio ambiente, con rendimientos más elevados y menor costo de operación (Acosta-Esquivarosa *et al.*, 2016, Bagheri& Esmaili, 2017).

3. HIPÓTESIS

- Los extractos etanólicos de *Rosa gallica*, *Gnaphalium chartaceum*. y *Psidium guajava*, inhiben el crecimiento de las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y cepa silvestre de *Staphylococcus saprophyticus* donadas por el Hospital Universitario de Puebla.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antibacteriano de extracto etanólico asistido por ultrasonido de *Gnaphalium chartaceum*., *Rosa gállica* y *Psidium guajava* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. saprophyticus*.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos etanólicos de las plantas medicinales *Gnaphalium chartaceum*. (gordolobo), *Rosa gállica* (rosa de castilla) y *Psidium guajava*(guayaba) mediante extracción asistida por ultrasonido.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Gnaphalium chartaceum*. por el método modificado de difusión en agar con pozos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, a *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus*.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Rosa gallica* por el método modificado de difusión en agar con pozos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, a *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus*.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Psidium guajava*(guayaba) por el método modificado de difusión en agar con pozos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, a *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Acondicionamiento de las especies vegetales.

A partir de las diferentes partes de las diversas especies (tabla 2), obtenidas en un mercado local de Zacatlán Pue. Las plantas que se consiguieron frescas se deshidrataron a temperatura ambiente durante dos semanas enrolladas en papel destaza. Una vez teniendo las plantas deshidratadas se llevó a cabo la pulverización de estas empleando un extractor de alimentos, lavando y secando perfectamente entre cada uso para evitar la contaminación cruzada entre las diferentes muestras. El polvo fino obtenido fue almacenado en bolsas selladas herméticamente a temperatura ambiente hasta el momento de uso.

Tabla 4. Partes vegetales utilizadas para la extracción etanólica de compuestos antimicrobianos.

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta empleada
<i>Gnaphalium chartaceum.</i>	Gordolobo	Flor y tallo
<i>Rosa gálica</i>	Rosa de castilla	Flor
<i>Psidium guajava</i>	Guayaba	Hoja

5.2 Activación de cepas bacterianas

Las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus* silvestre las cuales fueron donadas por el Laboratorio de análisis clínicos de la torre medica de especialidades del Hospital Universitario de Puebla (HUP) y fueron resembradas en agar TSA con el fin de obtener resiembras de 24 h para el montaje de los bioensayos.

Se preparó solución salina isotónica al 0.9% y se vertieron 5 mL en tubos de cristal con tapa. Se esterilizaron y posteriormente se utilizaron para la obtención de la suspensión bacteriana por cepa a partir de las resiembras.

5.3 Obtención de los extractos vegetales

Se emplearon 25 g de muestra pulverizada de cada especie (tabla 2). Posteriormente se colocaron en 100 mL de etanol absoluto en matraz Erlenmeyer para realizar la extracción asistida por ultrasonido (EAU) en un equipo marca Branson modelo 3510 durante 45 min a 47 kHz. Posteriormente se llevó a cabo un filtrado con papel Whatman No.5 y se realizó la concentración de los extractos en rotavapor a no más 70 °C hasta obtener 5 mL de extracto. Los extractos obtenidos fueron almacenados en frasco ámbar a 4° C hasta el momento de su uso.

5.4 Determinación de la concentración de los extractos por diferencia de peso

Se realizó la determinación de la concentración de los tres de los extractos obtenidos por diferencia de peso en mg/mL realizándolo por triplicado y empleando papel aluminio y parrilla de eléctrica, adicionando una muestra de extracto y dejando evaporar hasta obtener la muestra en estado sólido, pesando antes y después de llevar a cabo la evaporación para posteriormente obtener la diferencia de peso, esto se llevó a cabo por triplicado para cada muestra para posteriormente hacer un promedio siguiendo la metodología de Rojas Laveaga, 2020 (Rojas Laveaga, 2020).

5.5 Rendimiento de la extracción

Se calculó el rendimiento de la extracción empleando la siguiente fórmula donde M_2 es la masa del extracto, M_1 la masa inicial de materia vegetal.

$$P = \frac{M_2}{M_1} * 100$$

Fórmula 1 Rendimiento de extracción

5.6 Bioensayos de actividad antibacteriana por el método de difusión en agar con pozos

5.6.1 Obtención de la suspensión bacteriana

Para la obtención de la suspensión bacteriana, se utilizaron cultivos de 24 h de cada una de las cepas de bacterias seleccionadas y se obtuvieron a una densidad celular equivalente al tubo 0.5 en la escala de McFarland (10^8 UFC/L).

5.6.2 Bioensayo del efecto antibacteriano de los extractos etanólicos frente a bacterias nosocomiales

La evaluación de la actividad antibacteriana de cada extracto se determinó mediante la técnica de difusión en pozo con modificaciones (Ramírez *et al.*, 2009), se inocularon placas de agar Mueller Hinton con pozos con las soluciones bacterianas a una concentración de 10^8 células/mL correspondiente al tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland para posteriormente colocar 10 µl del extracto a evaluar.

Se midió el tamaño del halo de inhibición después de 24 h de ser incubadas las placas a 37°C. Cada ensayo se realizó por triplicado. Se empleó vancomicina (Va 30 µg) como control positivo y etanol como control negativo.

Finalmente se calculó el porcentaje de efecto de inhibición de cada uno de los extractos empleando la fórmula por Martínez (2016) y Rojas-Laveaga (2020).

% del efecto de inhibición

$$= \frac{\text{diámetro de halo de inhibición}}{\text{diámetro de halo de inhibición de control positivo}} \times 100$$

Fórmula 2. Porcentaje del efecto inhibitorio

5.6.3. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante la aplicación Excel, calculando la desviación estándar e intervalo de confianza. La comparación de medias de los resultados de cada extracto se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey con un nivel de probabilidad de 0.05, utilizando el software Graphpad Prism versión 5.

6. RESULTADOS

6.1 Determinación de concentración de los extractos

Las concentraciones determinadas para cada uno de los tres extractos etanólicos obtenidos fueron *Gnaphalium chartaceum*. (gordolobo) 15 ± 0.2 mg/mL; *Rosa gallica* (rosa de castilla) 98 ± 0.2 mg/mL y *Psidium guajava* (guayaba) tuvo una concentración de 65 ± 0.2 mg/mL. Todos los extractos obtenidos presentaron una concentración diferente debido a que las extracciones se realizaron de diversas partes de las plantas. Para el caso de *Gnaphalium chartaceum*. se obtuvo un rendimiento de 0.3%, para *Rosa gallica* 1.96% y para *Psidium guajava* 1.3%. El análisis estadístico mostró que hay una diferencia significativa donde el extracto de mayor concentración fue el extracto de rosa.

6.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus*

6.2.1 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Gnaphalium chartaceum*. (gordolobo)

Los resultados muestran que el extracto de *Gnaphalium chartaceum*. evaluado a la concentración de 15 mg/mL inhiben el crecimiento de todas las cepas evaluadas presentando una mayor inhibición con *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en un halo de inhibición de 12.3 ± 0.6 (72.5% de inhibición) (figura 4A). Con respecto a la cepa de *S. epidermidis* ATCC 12228 el extracto mostró un halo de inhibición del 11.0 ± 0.6 (60 % de inhibición) (figura 4B). Con la cepa de *S. saprophyticus* fue de un halo de inhibición de 11.3 ± 0.6 (72.5% de inhibición) (figura 5). Sin embargo, a la concentración evaluado no superó al control con vancomicina a 30 μ g.

Los analisis estadísticos mostraron que cuando se comparó la actividad de este extracto se mostró que no existe una diferencia significativa del efecto de este extracto sobre las tres cepas, con respecto al control (vancomicina) mostró que existe diferencia significativa entre la actividad de este extracto y el control (figura 6).

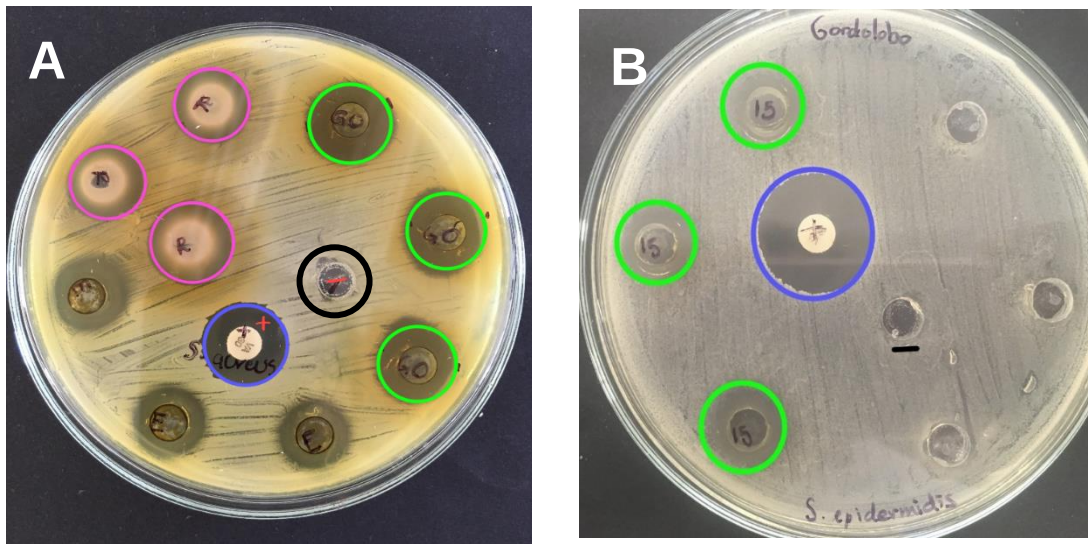


Figura 4. Actividad antibacteriana del extracto de *Gnaphalium* sp. (verde). A. *S. aureus* ATCC 29213, B. *S. epidermidis*, ATCC 12228. Control positivo en azul y control negativo en negro.



Figura 5. Actividad antibacteriana del extracto de *Gnaphalium* sp. (verde) frente a *S. saprophyticus*. Control positivo en azul y control negativo en negro.

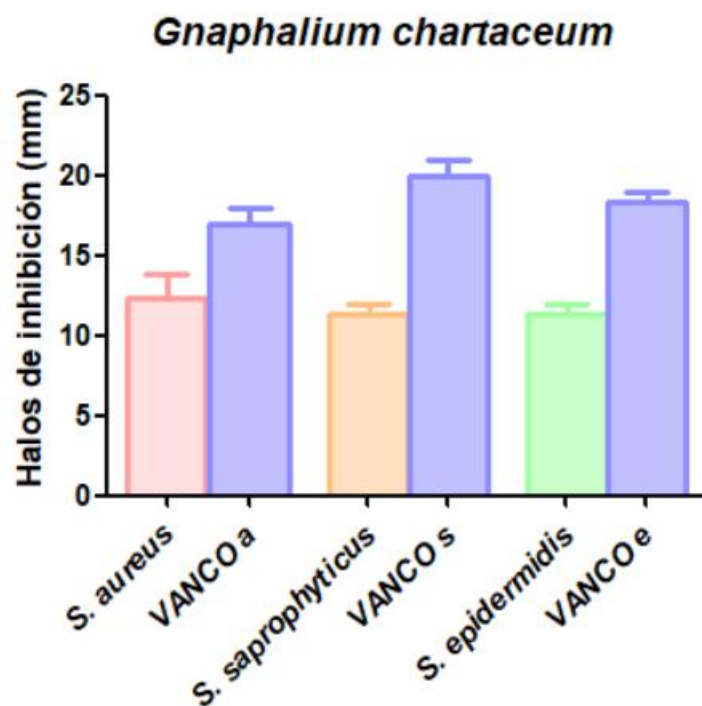


Figura 6. Gráfica de halos de inhibición de *Gnaphalium* sp. sobre *S. aureus* (rosa), *S. saprophyticus* (naranja) y *S. epidermidis* (verde), halos de inhibición del control positivo (vancomicina) (azul).

6.2.2 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosa gallica* (rosa de castilla)

Los resultados muestran que el extracto de *Rosa gallica* (rosa de castilla) evaluado a la concentración de 98 mg/mL inhiben el crecimiento de únicamente de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con un halo de inhibición de 14 ± 0.1 (82.4% de inhibición) (figura 7A). Los resultados con las cepas de *S. epidermidis* y *S. saprophyticus* no mostraron ninguna inhibición (figura 7B y 8 respectivamente). El extracto evaluado no supera el halo de inhibición que presenta el antibiótico comercial (Va 30 µg).

Los análisis estadísticos mostraron que cuando se comparó la actividad de este extracto se mostró que el efecto de este extracto sobre *S. aureus* tiene una diferencia significativa con respecto a la actividad que tuvo sobre *S. saprophyticus* y *S. epidermidis*, al igual que con el control (vancomicina) como se puede observar en la figura 9 teniendo mayor actividad este último.

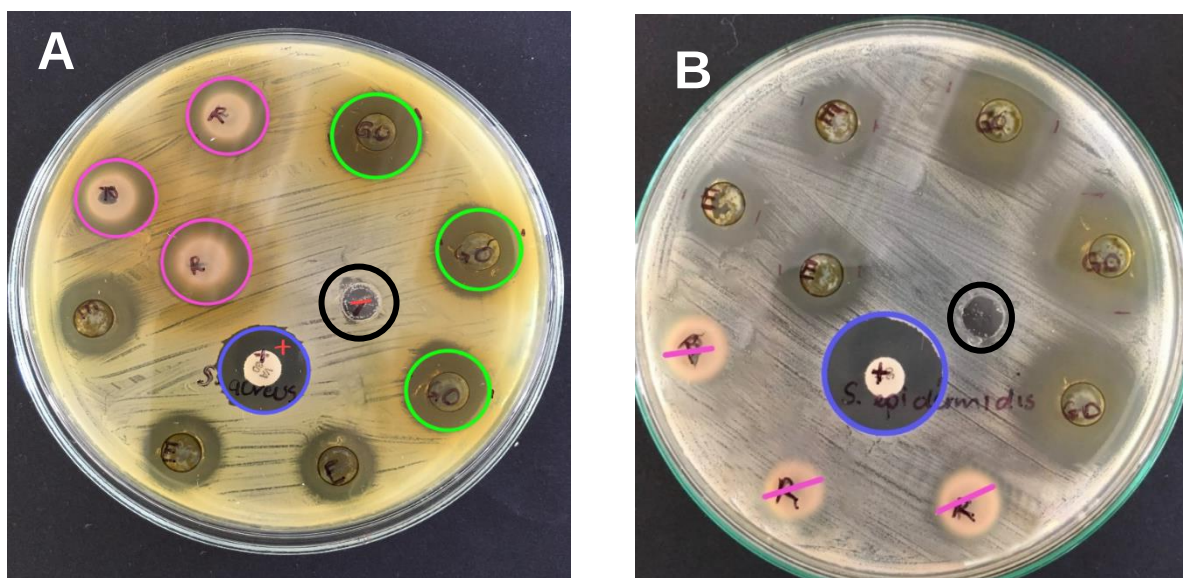


Figura 7. Actividad antibacteriana del extracto de *Rosa gallica* (rosa). A. *S. aureus* ATCC 29213; B. *S. epidermidis*, ATCC 12228. Control positivo en azul y control negativo en negro.

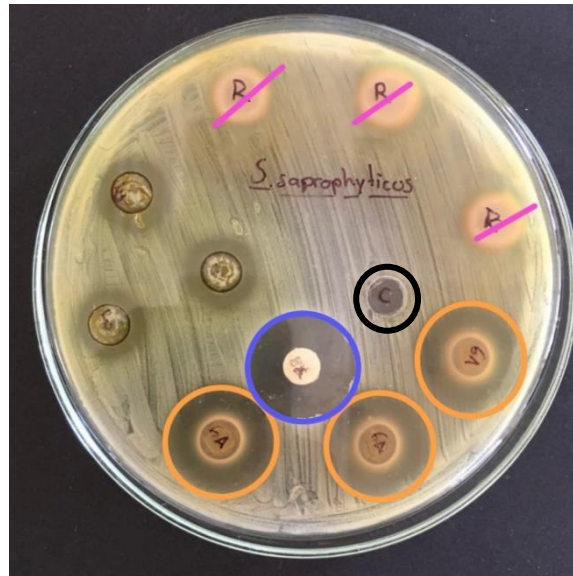


Figura 8. Actividad antibacteriana del extracto de *Rosa gallica* (rosa) frente a *S. saprophyticus*. Control positivo en azul y control negativo en negro.

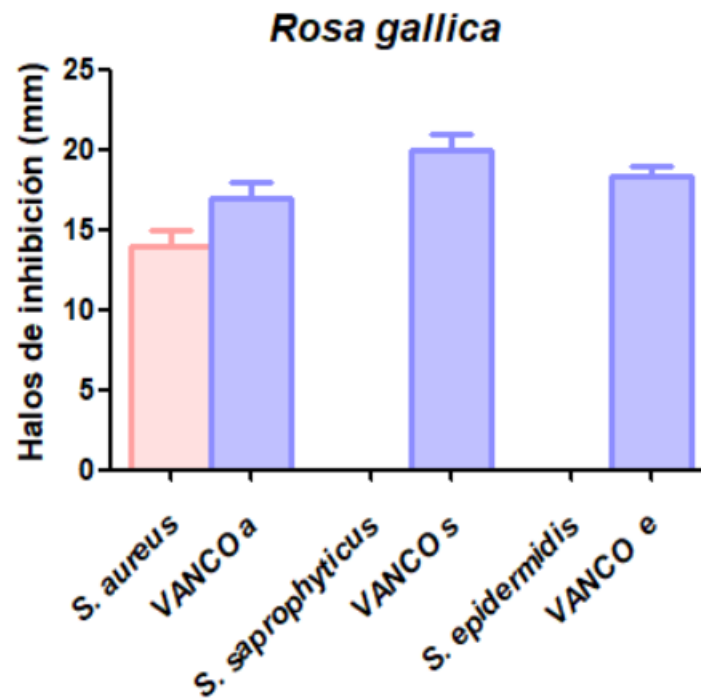


Figura 9. Gráfica de halos de inhibición de *Rosa gallica* sobre *S. aureus* (rosa), *S. saprophyticus* (naranja) y *S. epidermidis* (verde), halos de inhibición del control positivo (vancomicina) (azul).

6.2.3 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Psidium guajava* (guayaba)

Los resultados indican que el extracto de *Psidium guajava* (guayaba) evaluado a la concentración de 65 mg/mL inhiben el crecimiento de todas las cepas evaluadas resaltando que el mayor porcentaje de inhibición fue para *Staphylococcus epidermidis* con un halo de inhibición de 16.7 ± 0.6 (90.9% de inhibición) (figura 10A). Comparando con los datos presentados en *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fue menor con un halo de inhibición de 14.7 ± 0.6 (86.3% de inhibición) (figura 10B) y para *S. saprophyticus* se obtuvo 16.3 ± 0.6 (81.7% de inhibición) (figura 11). Estos valores, aunque fueron cercanos al control positivo utilizado ninguno supero a la inhibición de la vancomicina (figura 10 y 11).

Los analisis estadísticos mostraron que cuando se comparó la actividad de este extracto se mostró que el efecto sobre las tres cepas no tiene una diferencia significativa. Con respecto al control positivo (Vancomicina) no hubo una diferencia significativa entre la actividad contra *S. epidermidis* contrario a la actividad contra *S. aureus* y *S. saprophyticus* (Figura 12).

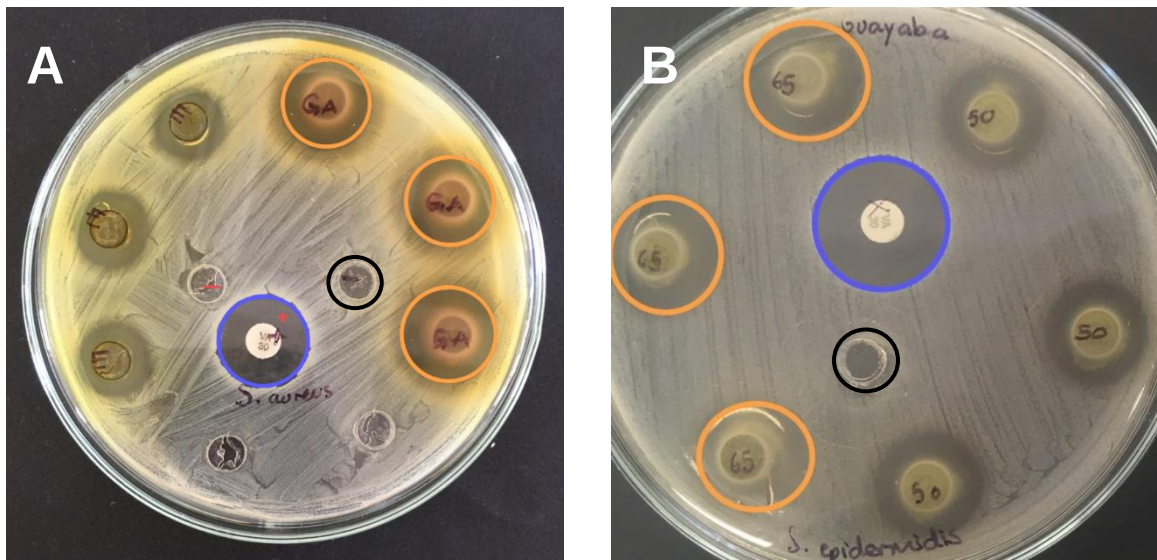


Figura 10. Actividad antibacteriana del extracto de *Psidium guajava* (naranja). A. *S. aureus* ATCC 29213. B. *S. epidermidis*, ATCC 12228. Control positivo en azul y control negativo en negro.



Figura 11. Actividad antibacteriana del extracto de *Psidium guajava* (naranja); frente a *S. saprophyticus*. Control positivo en azul y control negativo en negro.

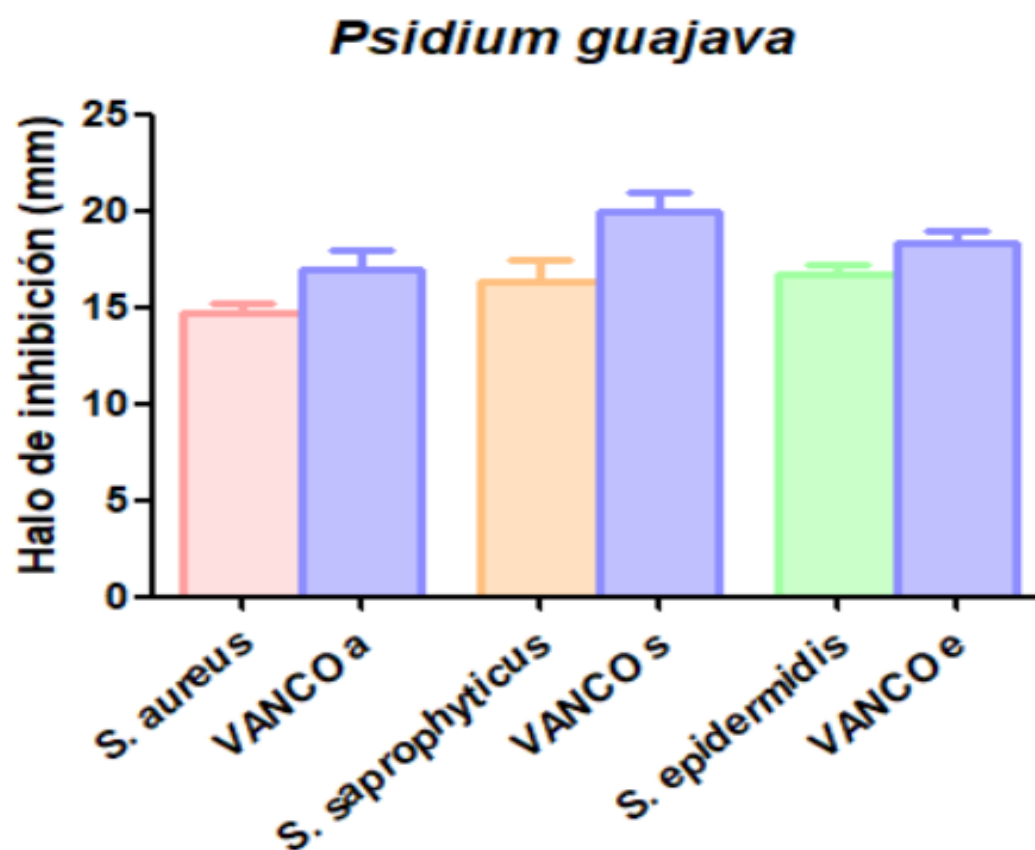


Figura 12. Gráfica de halos de inhibición de *Psidium guajava* sobre *S. aureus* (rosa), *S. saprophyticus* (naranja) y *S. epidermidis* (verde), halos de inhibición del control positivo (vancomicina) (azul).

7. DISCUSIÓN

7.1 Concentración de extractos

El rendimiento en la extracción asistida por ultrasonido se basa en dos principios de acuerdo con Bagheri y Esmaili (2017), el primero es la sonicación, donde las células se hincharán debido al proceso de cavitación y como consecuencia la tasa de difusión a través de la pared o membrana aumentará; el segundo principio es el proceso de cavitación que hace que la pared celular se rompa y el contenido celular sea expulsado. Ahora bien, existen diversos parámetros que influyen en los rendimientos de extracción de compuestos bioactivos como: el solvente, la temperatura, el tiempo y el tamaño de la partícula (Abreu-Naranjo *et al.*, 2018) por lo que la diferencias en las concentraciones y el rendimiento de cada uno de los extractos puede deberse al tamaño de las partículas de cada una de las muestras de plantas donde la muestra de gordolobo al ser voluminoso, algodonoso y menos denso que la rosa y las hojas de guayaba la cantidad de la muestra en contacto con el solvente fue menor comparado con las otras muestras.

7.2 Determinación de actividad antibacteriana

7.2.1 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Gnaphalium chartaceum*. (gordolobo)

Con respecto al extracto de diferentes especies de *Gnaphalium* sp. (gordolobo) se ha evaluado la actividad antibacteriana de extractos obtenidos con hexano, metanol, cloroformo y etil acetato, frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cerus* y *Staphylococcus aureus* que resultaron ser sensibles a estos extractos. La literatura reporta que los extractos de diversas especies del género *Gnaphalium* contienen flavonas y lactonas sesquiterpénicas que poseen actividad antimicrobiana (Ramírez-Rueda & Mojica-Ávila, 2014). En un estudio realizado por Villagómez y colaboradores (2001) con *G. oxyphyllum* se encontró que los extractos metanólicos contienen luteolina y 3-metoxiquercitina un derivado de la quercitina, ambos compuestos tienen actividad antibacteriana y en el caso de la luteolina se ha encontrado que contra *Staphylococcus aureus* el mecanismo de

acción es la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, deteriorando la membrana celular, induciendo la alteración morfológica celular e inhibiendo la formación de biopelículas (Nguyen & Bhattacharya, 2022; Guo *et al.*, 2020), actividad parecida a la actividad que antibióticos como la vancomicina, rifampicina, fluoroquinolonas y tetraciclinas, por lo que la actividad observada en los ensayos realizados en este trabajo coinciden con lo reportado en la literatura.

7.2.2 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosa gallica* (rosa de castilla)

En el caso del extracto de *Rosa gallica* se ha reportado la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *Rosa damascena* (un híbrido de *Rosa gallica* y *Rosa phoenicia*) frente a *S. aureus* resistente a meticilina y esta actividad está relacionada con compuestos químicos como el geraniol, citronelol, nerol o efectos sinérgicos entre estos compuestos (Mahboudi, 2016; Spasova, 2016; Talib, 2010), además en 2021 estudios fitoquímicos de *Rosa gallica* reportaron que el contenido de flavonoides en esta especie es mayor que en otras especies del género *Rosa*, estos compuestos tienen actividad antimicrobiana por formar uniones entre proteínas solubles y extracelulares de la membrana bacteriana (Vázquez-Olvera, *et al.*, 2021). En 2019, se reportó evidencia fuerte por primera vez de la actividad antibacteriana de extractos acuosos y etanólicos de *Rosa gallica* contra *Streptococcus mutans* (Vargas-Segura *et al.*, 2019) por lo que la presencia de halos de inhibición en los ensayos llevados a cabo en este trabajo se esperaban, sin embargo la ausencia de halos de inhibición frente a las sepas *S. saprophyticus* y *S. epidermidis* se puede deber a que las cepas son insensibles a estos extractos debido a los diferentes mecanismos de defensa entre los que se puede mencionar la formación de biofilms que puede verse influenciada por la presencia de etanol que en este caso fue el solvente empleado en estos extractos (Knobloch *et al.*, 2001).

7.2.3 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Psidium guajava* (guayaba)

El ensayo microbiológico para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Psidium guajava* (Guayaba) a la concentración de 65 mg/mL frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, evidenció que el extracto generó un halo de inhibición medio de 16.7 ± 0.6 mm, lo cual coincide con el estudio de realizado por Llamaza y Mamani (2022) donde se probaron los extractos etanólicos de hojas de *Psidium guajava guajava* contra la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que obtuvo halos de inhibición de van de los 9.67 mm a 13.20 mm a concentraciones de 5%, 15% y 25%.

La actividad antibacteriana de extractos etanólicos de guayaba han sido evaluados en distintos estudios y se ha reportado que a partir de estos extractos se han aislado flavonoides que han reportado actividad antibacteriana contra bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *S. aureus* (Dhiman *et al.*, 2011), sin embargo se considera que la actividad antibacteriana es más perceptible y más común en bacterias gram positivas (García & Angeles, 2020) por lo que la actividad encontrada en *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Staphylococcus saprophyticus* en este trabajo se esperaba. Además de que se han encontrado en los extractos de esta planta metabolitos alcaloides, lactonas α , β -insaturadas, así como también compuestos fenólicos, taninos, saponinas y flavonoides a los que se atribuyen la actividad antibacteriana que poseen las hojas de guayaba (Llamaza & Mammani De La Cruz, 2022). Sin embargo, la acción antibacteriana se le atribuye principalmente a la guayaverina, un derivado de la quercitina, cuya acción antibacteriana es la interrupción de la membrana celular y la inactivación de proteínas intracelulares (Carrero Montenegro, 2019).

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un mejor rendimiento en el extracto de *Rosa gallica* con un 1.96 % de rendimiento y una concentración mayor con 98 mg/mL seguido del extracto de *Psidium guajava* y *Gnaphalium chartaceum*.
- El extracto etanólico de *Gnaphalium chartaceum*. (gordolobo) tiene actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus* en la misma media sin ser mejor que el control (vancomicina).
- El extracto etanólico de *Rosa gallica* (rosa) tiene actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sin embargo no presentó actividad frente a *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus* y no presentó actividad mayor al control (vancomicina).
- El extracto etanólico de *Psidium guajava* (guayaba) tiene actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228 y *S. saprophyticus* en la misma medida sin llegar a ser mejor que el control (vancomicina).

9. PERSPECTIVAS

- Realizar cromatografía líquida HPLC (High Performance Liquid Chromatography) para identificación del o los compuestos de interés.
- Realizar cromatografía en capa fina y en columna para la obtención de diferentes fracciones y analizar el o los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.
- Se propone realizar evaluaciones de toxicidad de estos compuestos con el fin de desarrollar un antibiótico o algún producto de limpieza para ser empleado en hospitales.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Naranjo, R., Arteaga-Crespo, Y., Bravo-Sanchez, L., Pérez-Quintana, M., & García-Quintana, Y. (2018). Response surface methodology for optimisation of total polyphenol content and antioxidant activity of extracts from *Maytenus macrocarpa* bark by means of ultrasound-assisted extraction. *Wood Science and Technology*, 1359-1376. doi:<https://doi.org/10.1007/s00226-018-1034-x>
- Acosta-Esquivarosa, J., Salomón-Izquierdo, S., Sevilla-Fernández, I., & Nuevas-Pazz, L. (2016). Empleo de ultrasonido par ala extracción de fracción apolar en hojas de *Mangifera indica* L. (árbol del mango). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(3), 261-271.
- Ashraf, M., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. (2018). Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 153-167. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X>
- Ávalos-García, A., & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.*, 2(3), 119-145. doi:https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf
- Bagheri, H., & Esmaili, M. (2017). Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Unripe Grape (Qora). *Springer Link*, 221-226. doi:10.1007/s10341-016-0315-5
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *W. H. Rev Hosp Ital B Aires*, 102-11.
- Bennett, J., Dolin, R., & Blaser, M. (2014). *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases: 2-Volume Set (Vol. 1)*. Elsevier Health Sciences.

- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., & Yadav, A. (2013). Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava guajava* L.) on Two Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *International Journal of Microbiology*, 1-7. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2013/746165>
- Burt, S. (Agosto de 2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.*, 94(3), 223-53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022. PMID: 15246235.
- Cabrera, C., Gómez, R., & Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med Corporación Editora Médica del Valle*, 38(2), 149-158. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342007000200008#:~:text=La%20resistencia%20que%20ejercen%20las, capaces%20de%20evadir%20su%20acci%C3%B3n.
- Calderón Rojas, G., & Aguilar Ulate, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 73(621), 757-763. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69870>
- Campos-Saldaña, R., Solís-Vázquez, O., Velázquez-Nucamendi, A., Cruz-Magdaleno, L., Cruz-Oliva, D., Vázquez-Gómez, M., & Rodríguez-Larramendi, L. (2018). Saber etnobotánico, riqueza y valor de uso de plantas medicinales en Monterrey, Villa Corzo, Chiapas (México). *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*. 17(4), 350-362. ISSN 0717 7917
- Carrero Montenegro, C. (2019). Efecto antimicrobiano in vitro del extracto. Perú: Universidad César Vallejo.
- Cervantes-García, E. García-González, R. & Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio*, 61(1), 28-40.

- Chávez Hernández, E. (Noviembre de 2020). *Repositorio Institucional BUAP*.
Obtenido de Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas mediante el
uso de extractos de origen vegetal.:
<https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/9819>
- Cloete, T. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds.
International biodegradation and biodegradation., 51, 277-282.
doi:10.1016/S0964-8305(03)00042-8
- CONABIO. (s.f.). *Psidium guajava guajava*. Obtenido de CONABIO:
[http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-
myrta3m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/52-myrta3m.pdf)
- de Souza, C., Franceschi, M., Viera Faria, Y., de Oliveira Cabral, F., Rodrigues de
Oliveira, D., de Oliveira Sant'Anna, L., . . . Mattos-Guaraldi, A. (2020).
Resistance to Antiseptics and Disinfectants of Planktonic. *Microbial Drug
Resistance*, 26(12), 1546-1558. doi:10.1089/mdr.2019.0124
- Dhiman, A., Nanda, A., Ahmad, S., & Narasimhan, B. (2011). In vitro antimicrobial
activity of methanolic leaf . *J Pharm Bioall Sci*, 226-9.
- El economista. (30 de abril de 2021). Primer foro: Abordando el Desafío de las
Infecciones Intrahospitalarias-Tercera Sesión.[Archivo de Video].Youtube.
<https://www.youtube.com/watch?v=KNU8EKDzxqc&t=6980s>
- Fang, X., Shao, L., Zhang , H., & Wang, S. (2005). CHMIS-C: A comprehensive
herbal medicine information system for cancer . *J Med Chem*, 48(5), 1481-
1488.
- Fariña, N., Snabria, R., Figueredo, L., Ramos, L., & Samudio, M. (2005).
Staphylococcus saprophyticus como patógeno urinario. *Memorias del
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 3(1), 31-33.

- Fonseca Chávez, R., Rivera Lecario, L., & Vázquez Gracia, L. (2020). Guía ilustrada de plantas medicinales. *Instituto Nacional de los Pueblos Indígenas*, 204-205.
- García Huamán, F., & Angeles Trauco, M. (2020). Efecto del extracto de plantas medicinales sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y. *Revista de Investigacion Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*. doi:<http://dx.doi.org/10.25127/ucni.v3i3.633>
- García-Elorriaga, G., Corona-de los Santos, J., Méndez-Tovar, S., del Rey-Pineda, G., & Pérez-Casillas, R. (2013). Bacterias oportunistas y microbiota en niños con leucemia y enterocolitis neutropénica. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.*, 51(4), 424-427.
- Grupo de Innovación Docente en Operativa de Laboratorios Químicos. (Marzo de 2014). *TÉCNICAS Y OPERACIONES AVANZADAS EN EL LABORATORIO QUÍMICO (TALQ)*. Obtenido de <http://www.ub.edu/talq/es/node/251>
- Guo, Y., Liu, Y., Zhang, Z., Chen, M., Zhang, D., Tian, C., . . . Jiang, G. (2020). The Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Luteolin Against *Trueperella pyogenes*. *Infection and Drug Resistance*, 1697-1711. doi:<https://doi.org/10.2147/IDR.S253363>
- Hessen, M., Kaye, D., & Zuckerman, J. (2000). Infections associated with foreign bodies in the urinary tract. In *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*, Third Edition. *American Society of Microbiology.*, 325-344. doi:<https://doi.org/10.1128/9781555818067.ch16>
- Irshad, Z., Asif Hanif, M., Adnan Ayub, M., Idrees Jilani, M., & Tavallali, V. (2020). *Medicinal plants of south Asia*. (M. Asif Hanif, H. Nawaz, M. Mumtaz Khan, & H. Byrne, Edits.) doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102659-5.00026-4>.
- Knobloch, J., Bartscht, K., Sabottke, A., Rohde, H., Feucht, H., & Mack, D. (2001). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* depends on functional RsbU, an activator of the sigB operon: differential activation mechanisms due

- to ethanol and sat stress. *J bacterial*, 183(8), 2624-2633. Doi:10.1128/JB.18382624-2633.2001
- Lee Ventola, C. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. Part 1: Causes and threats. *zzP&T*, 40(4), 277-283.
- Llamoza Maldonado, J., & Mammani De La Cruz, G. (03 de 06 de 2022). Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de Psidium guajava guajava L. "Guayaba" frente a bacterias gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922). Universidad María Auxiliadora.
- Luque Gómez, P., & Mareca Doñate, R. (2018). Conceptos básicos sobre antisepsia y antisépticos. *Medicina Intensiva*, 43(1), 2-6. doi:<https://doi.org/10.1016/j.medin.2018.11.003>
- Mahboudi, M. (2016). Rosa damascena as holy ancient herb with novel applications. *J Tradit Complement Med.*, 6(1), 10-16.
- Mak, S., Xu, Y. & Nodwell, J. R. (2014). The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Mol. Microbiol.* 93, 391-402. doi: 10.1111/mmi.12689
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Jiménez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C., & Rodríguez-Yoldi, M. (2017). Therapeutic Applications of Rose Hips from Different Rosa Species. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1137. doi:10.3390/ijms18061137
- Martín, G., & Carmona, O. (2003). Prevección de la resistencia bacteriana a antimicrobianos. Aspectos farmacológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1), 55-59. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100013&lng=es&tlng=es.
- Martínez, M. (1996). Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Aloe vera* (sábila). *Rev. Cubana Plant Med*, 1(3), 18-20.

- Martínez Aguilar, Y., Soto Rodríguez, F., Almeida Saavedra, M., Hermosilla Espinosa, R., & Martínez Yero, O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 320-329.
- Miranda-Cruz, E., Espinosa-Moreno, J., Centurión-Hidalgo, D., Velázquez-Martínez, J., & Alor-Chávez, M. (2012). Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium guajava friedrichthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(4), 354-361. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/856/85623048007.pdf>
- Mirzaeian, R., Sadoughi, F., Tahmasebian, S., & Mojahedi, M. (2019). Progresses and challenges in the traditional medicine information. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 7(4), 246-259. Obtenido de <https://jppres.com/jppres/progresses-and-challenges-in-the-traditional-medicine-information-system/>
- Mittermeier, R. y C. Goettsch. (1992). La importancia de la diversidad biológica de México. México ante los retos de la biodiversidad. Conabio. México
- Nguyen, T., & Bhattacharya, D. (2022). Antimicrobial Activity of Quercetin: An Approach to Its Mechanistic Principle. *Molecules*, 27(8). doi:<https://doi.org/10.3390/molecules27082494>
- Olech, M., Nowak, R., Pecio, L., Los, R., Malm, A., Rzymowska, J., & Oleszek, W. (2016). Multidirectional characterisation of chemical composition and health-promoting potential of *Rosa rugosa* hips. *Natural Product Research*, 31(6), 667-671. doi:<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2016.1180601>
- Orden-Martínez, B., Martínez-Ruiz, R., & Millán-Pérez, R. (2008). ¿Qué estamos aprendiendo de *Staphylococcus saprophyticus*? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 495-499.

- Organización Mundial de la Salud*. (27 de febrero de 2017). Recuperado el octubre de 2020, de <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=8E7C6CA924BA208C0C12A3F5202D98E9?sequence=1
- Orozco-Martínez, J., Lira-Saade, R., Jiménez-Estraada, M., Ávila-Acevedo, J., Serrano-Parrales, R., & Hernández-Delgado, T. (2020). Medicinal plants of Oaxaca, Mexico: Ethnobotany and antibacterial activity. *BOLETIN LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE DE PLANTAS MEDICINALES Y AROMÁTICAS*, 19(2), 221-235. doi: <https://doi.org/10.37360/blacpma.20.19.2.14>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-21. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Pinheiro, L., Brito, C., Pereira, V., Oliveira, A., Camargo, C., & de Souza da Cunha, M. (2014). Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. 109(7). doi:10.1590/0074-0276140120
- Ramírez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
- Ramírez-Rueda, R., & Mojica-Ávila, D. (2014). Actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Investig. Salud Univ. Bocayá*, 63-71.

- Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. (2017). *Informe Anual 2015 de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica*. Obtenido de Secretaría de Salud: <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015>
- Ríos Ruiz, S., & Martínez Francés, V. (2015). Rosa gallica L. var. officinalis (hort. ex Andrews) Ser. en el norte de Alicante (Comunidad Valenciana). *Bouteloua*, 236-240.
- Rojas, G., Lévaro, J., Tororiello, J., & Navarro, V. (2001). Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(1), 97-101. doi:10.1016/S0378-8741(00)00349-4
- Rojas-Laveaga, J. (Octubre de 2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* frente a bacterias de importancia clínica. *Tesis*. Puebla, México: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Sader, H., Farrel, D., & Jones, R. (2014). Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 78(4), 443–448.
- Sanches, N. R., Garcia Cortez, D., Schiavini, M., Vataru Nakamura, C., & Prado Dias Filho, B. (2005). An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* guajava (L.). *Brazilian Archives of Biology and Technology: An International Journal*, 429-436.
- Sánchez, V. (28 de Agosto de 2017). *Herbolaria* . Obtenido de Dirección General de Comunicación Social: <https://www.dint.unam.mx/blog/index.php/item/3330-herbolaria#:~:text=Sobre%20el%20registro%20taxon%C3%B3mico%2C%20M%C3%A9xico,indica%20la%20Secretar%C3%ADa%20de%20Salud>.
- Secretaría de Salud. (Agosto, 2022). Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). Obtenido de:

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/770528/BOLET_NRHOVE
AGOSTO2022_Final_21102022_1.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/770528/BOLET_NRHOVE_AGOSTO2022_Final_21102022_1.pdf)

- Selseleh, M., Nejad Ebrahimi, S., Aliahmadi, A., Sonboli, A., & Mirjalili, M. H. (2020). Metabolic profiling, antioxidant, and antibacterial activity of some Iranian *Verbascum* L. species. *Industrial Crops and Products*, 153. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112609
- Sharma, A., Flores-Vallejo, R., Cardoso-Taketa, A., & Villareal, M. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 208, 264-329. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
- Spasova Nunes, H. (2016). *Rosa x damascena* mill: propiedades biológicas. Faro, Portugal: Universidade do Algarve.
- Suruy-Echeverría, A. G. (Octubre de 2013). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana In Vitro de la infusión de hoja de guajayaba (*Psidium guajava guajava*, L.) sobre las principales bacterias que causan enteritis en lechones. Universidad de San Carlos de Guatemala :
- Talib, H. W. (2010). Antimicrobial, Cytotoxicity and Phytochemical Screening of Jordanian Plants Used in Traditional Medicine. *Molecules*, 15(3), 1811-
- Torres-Erazo, D., Núñez-Caamal, N., Villalobos-Díaz, R., & Durán-Falcón, M. (2020). Características de las infecciones asociadas con la atención de la salud en un hospital de tercer nivel de Yucatán, México. *Med IntMéx.*, 36(4), 451-459. doi:<https://doi.org/10.24245/mim.v36i4.3188>
- Vargas-Segura, A., Silva-Belmares, S., Segura-Ceniceros, E., Ascacio-Valdéz, J., Méndez-González, L., & Ilyina, A. (2019). Screening and characterization of medicinal plants extracts with bactericidal activity against *Streptococcus mutans*. *Natural Product REsearch*. Obtenido de <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1550757>

- Vázquez-Olvera, L.A., Vargas-Segura, A.I., Ramos-González, R., Iliná, A. & Segura-Ceniceros, E. P. (2021). Caracterización fisicoquímica de metabolitos secundarios obtenidos a partir de la extracción acuosa de *Rosa gallica*. *Ciencia Acierta*. ISSN: 2683-1848
- Velázquez-Vázquez, G., Pérez-Armendáriz, B., Ortega-Martinez, L., & Nelly-Juarez, Z. (2019). Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la. *BOLETÍN LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE*, 18(3), 365-276. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/333248116_Conocimiento_etnobotanico_sobre_el_uso_de_plantas_medicinales_en_la_Sierra_Negra_de_Puebla_Mexico
- Veobides-Amador, H., Guridi-Izquierdo, F., & Vázquez-Padrón, V. (2018). Las sustancias húmicas como bioestimulantes de plantas bajo condiciones de estrés ambiental. *Cultivos Tropicales*, 39(4), 102-109.
- Vijayakumar, R. S. (2018). A review on biocide reduced susceptibility due to plasmid-borne antiseptic-resistant genes-|special notes on pharmaceutical environmental isolates. *Applied Microbiology*, 126, 011--1022. doi:10.1111/jam.14118
- Villagómez-Ibarra, J., Sánchez, M., Espejo , O., Zúñiga-Estrada, A., Torres-Valencia, J., & Joseph-Nathan, P. (2001). Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* chartaceum species. *Fitoterapia*, 72(6), 692-694. doi:10.1016/s0367-326x(01)00303-3
- Villanueva-Solis, I. Arreguín-Sánchez, M.L. & Quiroz-García, D.L. (2020). Plantas medicinales que se comercializan en el mercado 8 de julio y uno tradicional, ambos localizados en el Centro de Actopan, Hidalgo, México. *Polibotánica*(50), 209-243. doi:10.18387/polibotanica.50.14
- World Health Organization. (2011). *Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide*. Obtenido de World Health Organization:

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf;jsessionid=2C324B715E503FC4876A24985FA373A2?sequence=1

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance*. WHO Library Cataloguing-in Publication Data.

World Health Organization. (31 de Julio de 2020). *World Health Organization*.
Obtenido de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

Younis, I., El-Hawary, S., Eldahshan, O., Abdel-Aziz, M., & Ali, Z. (2021). Green synthesis of magnesium nanoparticles mediated from *Rosa floribunda* charisma extract and its antioxidant, antiaging and antibiofilm activities. *Scientific Reports*, 11. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-96377-6>

Zhelev, G. (2019). Bacterial resistance to antiseptics and. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 1311-1477. doi:10.15547/bjvm.2019-0085