BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
COMPLEJO REGIONAL CENTRO, SEDE TECAMACHALCO.
INGENIERÍA AGROINDRUSTRIAL

ESTUDIO COMPARATIVO DE EXTRACTOS CRUDOS DE PLANTAS COMO ALTERNATIVA EN EL CONTROL DEL CÁNCER BACTERIANO EN JITOMATE.

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PRESENTA
ALAN DIEGO TAPIA BARRERA.

DIRECTOR DE TESIS:
DR. J. JESÚS HINOJOSA MOYA.

CODIRECTORES:
M.C. RAYMUNDO HERNÁNDEZ LOMA
DR. VERÓNICA SANTACRUZ VÁZQUEZ

El Salado, Tecamachalco, Puebla; octubre 2022

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Agrobiotecnología Molecular del Complejo Regional Centro Sede Tecamachalco de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección del Dr. J. Jesús Hinojosa Moya

DEDICATORIAS.

A mi madre **Saeth Barrera Alcaide** por apoyarme siempre en mis decisiones, por estar en cada momento importarte de mi vida, por ayudarme para cumplir mis sueños y metas, y sobre todo tu amor incondicional.

A mi padre **José Tapia Nájera** eres mi mayor ejemplo, quien me enseñó a valorar los resultados de un gran esfuerzo, por guiarme a través del camino de la vida, por sus consejos que me orientaron a tomar las mejores decisiones y por creer en mí.

A mis hermanas **Tonanzi Belén** y **Estrella Fátima**, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

A mis abuelos **Severo Tapia Arenas, María Nájera Sosa, Mariano Barrera Quiroz, Juventina Alcaide Quiroz.** Soy la persona más afortunada por tenerlos como abuelos, gracias por ser los pilares de mi familia, por su apoyo, ayuda y amor, les agradezco desde el fondo de mi corazón por lo que han hecho por mí.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, por darme la oportunidad de venir a esta vida, de realizar un sueño el cual es ser profesionista. Por darme las fuerzas, sabiduría, paciencia, ánimo, en fin, todo, para que pudiera terminar un grado más de estudios. Muchas gracias Dios mío.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme realizar el estudio de la licenciatura en Ingeniería Agroindustrial.

A mi asesor de tesis el Dr. J. Jesús Hinojosa Moya, le agradezco su amistad, por creer en mí, por su paciencia, su dedicación, su entusiasmo, su ayuda y sobre todo el gran ser humano que es, ya que sin esas cualidades y virtudes no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A la Dr. Verónica Santacruz Vázquez y al M.C. Raymundo Hernández Loma por su conocimiento, tiempo y dedicación que le dieron a este trabajo.

A la M.C. Guadalupe Yoanna Arenas Martínez por el apoyo brindado en el análisis estadístico, por su colaboración, tiempo, espacio, muchas gracias.

A los académicos de la facultad de Ingeniería Agroindustrial por su conocimiento que me brindaron en el transcurso de mi carrera.

A toda mi familia, porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible, ustedes son mi motivo en la vida, gracias por creer en mí, los amo.

A los profesores Alberto, Ana María y su familia por brindarme su apoyo, sus consejos y su cariño.

A Don Esteban, Doña Cristina y su familia muchas gracias por su apoyo, consejos y su cariño.

A mis amigos incondicionales Brenda, Nelly, Zuleica, Iridian, Guadalupe, Ervin, Mario, José Miguel… Por siempre creer en mí, no tengo palabras para expresar lo afortunado que soy por tenerlos en mi vida, gracias por ser las maravillosas personas que son. No importa donde este, siempre contaran conmigo.

A todos mis compañeros de la generación 2015.

¡¡¡GRACIAS A TODOS!!!

ÍNDICE DE CONTENIDO.

DEDICATORIAS. 3

AGRADECIMIENTOS. 4

1. INTRODUCCIÓN. 11

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. 15

3. JUSTIFICACIÓN. 18

4. HIPÓTESIS. 18

5. OBJETIVO GENERAL. 20

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS. 20

7. MARCO TEÓRICO. 22

7.1.- GENERALIDADES DE LA PLANTA EXPERIMENTAL Y SUS ENFERMEDADES 22
7.2.- GENERALIDADES DEL MATERIAL VEGETAL PROPUESTO 26
7.2.1. Flor de Jamaica (Hibiscus sabdariffa). *26*
7.2.2. Maracuyá (Passiflora edulis). *27*
7.2.3. Naranja Agria (Citrus x aurantium). *30*
7.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS 31
7.3.1.- Infusión. *32*
7.3.2.- Decocción (Cocimiento). *33*
7.3.3.- Maceración. *33*
7.3.4.- Extracción Soxhlet. *34*
7.3.5.- Hidrodestilación. *34*

8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL. 36

9. MATERIALES Y MÉTODOS. 38

9.1.- MATERIAL VEGETAL Y EXTRACTOS. 38
9.2.- AISLAMIENTO Y PROPAGACIÓN DE LA BACTERIA. 38
9.2.- ENSAYO ANTIMICROBIANO. 39
9.2.1- ENSAYO IN-VITRO (CULTIVOS LÍQUIDOS DE CLAVIBACTER MICHIGANENSIS) 39
9.2.2- ENSAYO *IN-VIVO* (EN TEJIDOS DE PLÁNTULAS DE JITOMATE INFECTADO) 40
9.3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO. 40

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. 43

10.1 ENSAYO ANTIMICROBIANO *IN-VITRO.* 43
10.2 CINÉTICA DE CRECIMENTO. 49
10.3 ENSAYO ANTIMICROBIANO *IN-VIVO.* 54

11. CONCLUSIONES. 59

12. PERSPECTIVAS. 59

13. REFERENCIAS. 61

14. ANEXOS. 65

ANEXO 1: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT BACTERIA-KANAMICINA ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 65
ANEXO 2: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT BACTERIA-MARACUYÁ ACUOSO ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 66
ANEXO 3: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT BACTERIA-MARACUYÁ METANÓLICO ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 67
ANEXO 4: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT BACTERIA-NARANJA AGRIA ACUOSO ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 68
ANEXO 5: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT BACTERIA-NARANJA AGRIA METANÓLICO ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 69
ANEXO 6: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT BACTERIA-JAMAICA ACUOSO ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 70
ANEXO 7: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT BACTERIA-JAMAICA METANÓLICO ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 71
ANEXO 8: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIA-KANAMICINA, BACTERIA-MARACUYÁ METANÓLICO 0 HORAS ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 72
ANEXO 9: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIA-KANAMICINA 6 HORAS ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 73
ANEXO 10: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIA-MARACUYÁ METANÓLICO 6 HORAS ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 74
ANEXO 11: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIA-KANAMICINA 12 HORAS ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 75
ANEXO 12: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIA-MARACUYÁ METANÓLICO 12 HORAS ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 76
ANEXO 13: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIA-KANAMICINA 18 HORAS ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 77
ANEXO 14: RESULTADOS DE LA PRUEBA T-STUDENT CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIA-MARACUYÁ METANÓLICO 18 HORAS ABSORBANCIA (A) / UFC/MLX10^8. 78

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Valores promedio de Absorbancia (A) de los diferentes ensayos realizados en tres lotes independientes, de seis extractos naturales, control positivo (bacteria) y control negativo (Kanamicina)..... **43**

Tabla 2. Promedios en valor de unidades formadoras de colonia (UFC/mLX10^8) de los diferentes ensayos realizados en tres lotes independientes, con los seis extractos, un control positivo (bacteria) y un control negativo (Kanamicina)..... **45**

Tabla 3. Promedios en valor de Absorbancia (A) de los diferentes ensayos realizados en la cinética de crecimiento de la bacteria In-vitro en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria, control negativo Kanamicina y el extracto metanólico del maracuyá..... **49**

Tabla 4. Promedios en valor de UFC/mLX10^8 de los diferentes ensayos realizados en la cinética de crecimiento de la bacteria In-vitro en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria, control negativo Kanamicina y el extracto metanólico del maracuyá..... **51**

Tabla 5. Promedios en valor de Absorbancia (A) de los diferentes ensayos realizados en *In-vivo* en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria y el extracto metanólico del maracuyá..... **55**

Tabla 6. Promedios en valor de UFC/mLX10^8 de los diferentes ensayos realizados en *In-vivo* en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria y el extracto metanólico del maracuyá. **56**

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la planta del Jitomate. **22**

Figura 2. Síntomas de *Clavibacter michiganensis sub. spp.* en hoja, tallo y fruto del jitomate..... **24**

Figura 3. Vista de la flor de Jamaica madura sostenida por su cáliz de la misma pigmentación. . **26**

Figura 4. Variedades de Passiflora edulis y cortes transversales mostrando semillas de: a) Maracuyá púrpura; b) Maracuyá amarilla. **28**

Figura 5. Representación de la planta de maracuyá con sus frutos sin madurar (a) zarcillos (b) flor hermafrodita (c) corte transversal del fruto (c) **29**

Figura 6. Representación de la planta de la naranja agria, (a) flores, (b) fruto (c). **30**

Figura 7. Métodos de extracción metabolitos de plantas medicinales y aromáticas. **32**

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con los seis diferentes extractos vegetales en valores promedio de Absorbancia (A). **44**

Gráfica 2. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con los seis diferentes extractos vegetales en valores promedio de unidades formadoras de colonia (UFC/mL x 10^8) **46**

Gráfica 3. Valores de Estadistico T de los seis extractos. **48**

Gráfica 4. Cinética de crecimiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, con la aplicación del extracto metanólico de maracuyá y un antibiótico comercial (Kanamicina) como control negativo. **50**

Gráfica 5. Cinética de crecimiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, con la aplicación del extracto metanólico de maracuyá y la aplicación de un antibiótico (Kanamicina) como control negativo. **52**

Gráfica 6. Valores de Estadístico T de los ensayos de la cinética de crecimiento. **54**

Gráfica 7. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con el extracto metanólico de maracuyá *in vivo* en valores promedio de Absorbancia (A). **56**

Gráfica 8. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con el extracto metanólico de maracuyá *in vivo* en valores promedio de unidades formadoras de colonia (UFC/mL x 10^8) **57**

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Desde nuestros antepasados y, aún más, recientemente los extractos de las plantas han recibido la atención en las comunidades farmacéuticas y científicas; un gran número de publicaciones han documentado el valor terapéutico de los compuestos naturales en un intento por validar las afirmaciones de su actividad biológica. Diversas de sus propiedades han sido exploradas, por mencionar su potencial nutricional, aromático, antioxidante, de pigmentación y, particularmente, ha llamado la atención su actividad antimicrobiana debido al desafío de la creciente incidencia de patógenos resistentes a los medicamentos u otros agentes químicos sumamente agresivos. Algunas plantas han demostrado la capacidad de superar la resistencia en algunos organismos y esto ha llevado a los investigadores estudiar y entender sus mecanismos de acción sin dejar de lado la extracción de los compuestos bioactivos (Ncube N. 2008).

Muchas plantas han sido utilizadas debido a sus rasgos antimicrobianos y se han investigado sus propiedades para la eliminación de algunos patógenos perjudiciales en los cultivos y en la salud humana. Dicha propiedad se ha atribuido a una diversidad de compuestos naturales dentro de los que destacan los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos constituyen una clase principal de metabolitos secundarios de plantas que están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y muestran una gran diversidad estructural. Estos compuestos se presentan como agliconas o glucósidos, como monómeros que constituyen estructuras altamente polimerizadas, como compuestos libres o unidos a la matriz basal. Además, no están distribuidos uniformemente en la planta y su estabilidad varía significativamente, esto complica en gran medida sus procesos de extracción y aislamiento, lo que significa que un solo procedimiento estandarizado no se puede recomendar para todos los fenólicos y/o materiales vegetales, los procedimientos

tienen que ser optimizados dependiendo de la naturaleza de la muestra, de la edad de la planta, de los analitos de interés, y también sobre el objetivo del estudio.

La diversidad estructural de los compuestos fenólicos afecta su comportamiento fisicoquímico, como la solubilidad y las características de partición. La polaridad de los compuestos varía significativamente con su estructura, estado de conjugación y asociación con la muestra matriz; formas ligadas y fenólicos de alto peso molecular pueden ser bastante insolubles, además, los compuestos fenólicos no son distribuidos uniformemente en la planta y su estabilidad varía significativamente; algunos son relativamente estables y otros son volátiles, termolábiles y/o fácilmente propenso a la oxidación.

Por lo tanto, se debe tener mucho cuidado al elegir la metodología de extracción correcta asegurando la reducción de las posibles modificaciones químicas que invariablemente resultan en artefactos por hidrólisis, oxidación, y/o isomerización (Robards K. 2003).

Es decir, no existe un procedimiento estandarizado para la preparación de muestras y extracción de todos los fenólicos o cualquier grupo de compuestos naturales, o una clase específica de sustancias fenólicas en materiales vegetales. El procedimiento tiene que ser optimizado dependiendo de:

a) Naturaleza de la muestra y los analitos; por ejemplo, extracción del total fenólicos, clases fenólicas específicas, compuestos individuales; fenólicos unidos o libres, especies poliméricas.
b) Objeto del análisis; por ejemplo, interés en la aclaración de la estructura o cuantificación.
c) Disponibilidad de equipos y reactivos para desarrollar las técnicas.

Debido a la complejidad de la mayoría de las matrices, es decir, alimentos, bebidas, plantas y muestras biológicas, el procedimiento de preparación de muestras es un paso crítico de todo el proceso. Secado, molienda, homogeneización, y la filtración (o centrifugación) son pretratamientos comunes previos a la extracción. Además, en

algunos casos, un paso de hidrólisis es incluido para liberar compuestos de estructuras matriciales y/o simplificar la composición del extracto.

Bajo el contexto anterior, en este proyecto de investigación se propone una metodología para extraer compuestos fenólicos de tres diferentes fuentes vegetales; maracuyá, naranja agria y Jamaica, y su evaluación como posibles agentes antimicrobianos de cepas fitopatógenas letales en algunos cultivos de interés agrícola, específicamente, el cáncer bacteriano del jitomate *(Solanum lycopersicum)*

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Las enfermedades en los cultivos de interés agrícola siempre ha sido un problema que impacta negativamente al productor y consumidor con el desabasto de alimentos básicos; aunado a esto, factores externos complican el problema con la aparición o desarrollo de cepas fitopatógenas resistentes al control químico convencional.

Sin duda, la sociedad en general es, y ha sido, blanco de numerosos casos de patógenos donde se incluyen levaduras, hongos, virus y bacterias; ejemplos claros de este fenómeno devastador en los cultivos agrícolas se encuentran *Phytophthora infestans, Oidiopsis táurica, Rhizoctonia spp., Fusarium oxysporum, Oidium neolycopersici y Clavibacter michiganensis;* la última es una bacteria patogénica causante de la enfermedad más grave del jitomate responsable de grandes pérdidas económicas en México y el mundo; el llamado Cáncer bacteriano.

El jitomate es la hortaliza de mayor producción, ya que se cultiva para atender la demanda nacional y la exportación. Al primer mes de 2021 para el ciclo Primavera-verano de 2020, la producción de tomate rojo (jitomate) es de un millón 878 mil 289 toneladas; 23 mil 987 menor (1.3%) que la producción al mismo mes del año previo (un millón 902 mil 276 toneladas). Entre las hortalizas que México exporta, el jitomate es la más importante, por la derrama económica que representa para los agricultores y comercializadores su venta externa. En 2020, el volumen exportado alcanzó un millón 662 mil toneladas, que resultó menor en 2.1% respecto del año precedente. (SIAP, 2021).

Por otro lado, existen factores que limitan la producción, entre ellos resaltan los problemas fitosanitarios como el cáncer bacteriano que es ocasionado por la bacteria *Clavibacter michiganensis ssp michiganensis (Cmm*), una enfermedad cuarentenada y de impacto internacional por las pérdidas económicas que ocasiona en la producción de jitomate, principalmente en invernadero. Cuando se presenta es devastadora y con gran capacidad de diseminación, *Cmm* puede sobrevivir en

restos de plantas o en el suelo por periodos de 2 o 3 años, lo cual dificulta su control (Fatmi y Schaad, 2002; Flores, 2014). *Cmm* está distribuida en todo el mundo prevaleciendo en regiones donde se cultiva jitomate; se han reportado epidemias en Israel, Japón, España y México, en promedio puede ocasionar pérdidas de 80 a 100% (Borboa-Flores *et al*, 2009; EPPO, 2010; De León *et al,* 2011; NAPPO, 2014).

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

3. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la problemática expuesta, el desarrollo de este proyecto se justifica ampliamente, ya que buscaremos aprovechar algunos cultivos; Jamaica, Maracuyá y Naranja Agria; para la extracción de productos naturales empleados como complementemos o sustitutos de agentes químicos en el control de plagas de cultivos de interés agroindustrial. De esta manera se impactará al minimizar las pérdidas de los cultivos, así como mejorar los aspectos económicos, ambientales y de salud para el consumidor.

4. HIPÓTESIS.

Los extractos naturales, solos o combinados, serán una buena estrategia para el control del cáncer bacteriano en el cultivo de jitomate, lo cual podría ser escalado en el control de enfermedades bacterianas de otros cultivos.

OBJETIVOS

5. OBJETIVO GENERAL.

- Obtener extractos crudos de plantas como alternativa en el control del cáncer bacteriano

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Obtener y concentrar los extractos crudos totales de la flor de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*), Maracuyá (*Passiflora edulis*), y de Naranja agria (*Citrus aurantium).*
- Evaluar su potencial antimicrobiano *in vitro*
- Evaluar su potencial como antimicrobianos en plantas de jitomate
- Proponer una metodología experimental para la extracción de productos naturales en el control del fitopatógeno del cáncer bacteriano

MARCO TEÓRICO

7. MARCO TEÓRICO.

7.1.- Generalidades de la planta experimental y sus enfermedades

El jitomate *(Lycopersicon esculentum)* pertenece a la familia de las solanáceas, entre las cuales se encuentran, la berenjena, el pimentón, los ajíes, el pimiento, la papa y el tabaco. La planta de jitomate (figura 1) es de estructura herbácea como todas las hortalizas consta de:

- Sistema radicular: se desarrolla rápidamente a profundidades mayores de un metro. Sin embargo, debido al sistema de trasplante, no supera los 40 cm de profundidad, y tiende a ser fibroso con muchas raíces laterales.

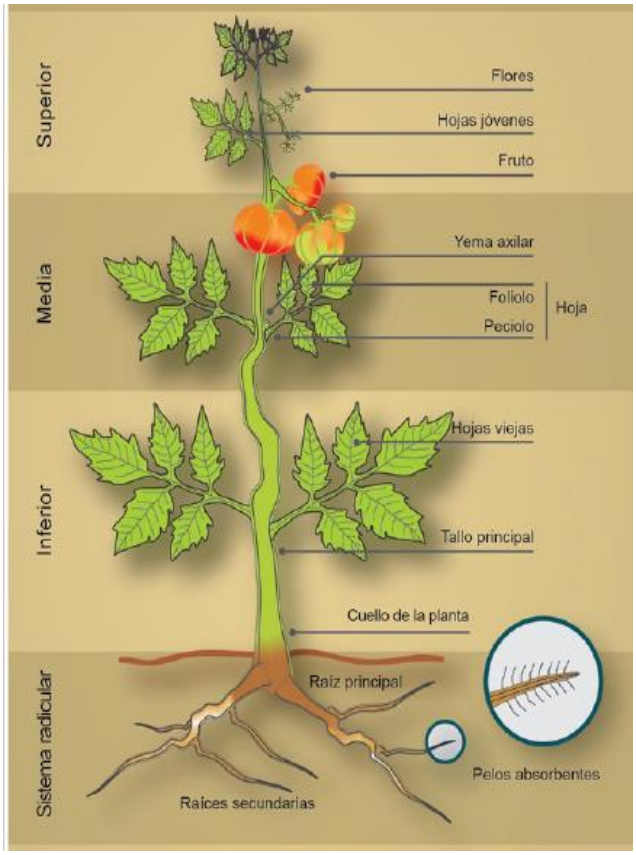


Figura 1. Estructura de la planta del Jitomate.

- Tallo: es herbáceo, pero algo lignificado en las plantas viejas. En la base tiende a formar raíces.

- Hojas: formadas por varias partes que se denominan folíolos. La superficie es pilosa (pelos pequeños) que se dañan en la poda, manchando las manos del operario y permitiendo la transmisión de enfermedades.
- Yemas axilares: se encuentran en las axilas de las hojas. Si no se las controlan generan muchos tallos laterales.
- Inflorescencias: puede contener hasta 40 flores. Las flores son bisexuales y se polinizan principalmente, por medio del viento. (Flores Ceferino, 2012)

Como se ha mencionado las hojas pilosas son unas de las principales partes de las plantas del jitomate para la captación de hospederos por lo tanto son una fuente de transmisión de enfermedades variadas.

Agentes biológicos causantes de enfermedades del jitomate

Los agentes biológicos desencadenantes de una gran diversidad de enfermedades vegetales se agrupan en poblaciones que comparten características de nutrición, reproducción, propagación, morfología entre otras. Dentro de estas poblaciones se encuentran los hongos, virus, y bacterias.

Hongos: se caracterizan por ser incapaces de realizar su propio alimento como lo hacen las plantas, por lo tanto, las parasitan para alimentarse y obtener de ellas agua y nutrientes, enfermándolas. Son de aspecto algodonoso, filamentoso, con capacidad de sobrevivir en diferentes ambientes. El Tizón temprano del tomate, la mancha gris del tomate, marchitez por fusarium, polvillo o ceniza, etc., son algunos ejemplos. Semejante a los hongos se encuentran los Oomycetes, siendo microorganismos de aspecto filamentoso, que se diseminan e infectan en presencia de agua sobre la superficie de la planta, ejemplo; el Tizón tardío del jitomate.

Virus: Agentes infecciosos transmitidos por insectos o por contacto de savia entre plantas, solo se multiplican en el interior de células vivas. Una vez invadidas, las células no tienen cura, las plantas enferman de manera permanente; ejemplos:

Begomovirus, hojas cordón de zapato, peste negra, virus del mosaico del pepino, virus rugoso del jitomate, etc.

Bacterias: Parasitan plantas para obtener agua y nutrientes, producen muerte de tejido vegetal, obstruyen el sistema de conducción generando marchitamiento, liberan toxinas, produciendo amarillamiento en la planta. Forman un grupo muy grande y variado de microorganismos entre los cuales se encuentra *Clavibacter michiganensis* causante del cáncer bacteriano. (Flores Ceferino, 2012)

El cáncer bacteriano es la enfermedad de mayor importancia para el cultivo de jitomate con amplia distribución mundial. La bacteria causante del llamado "cáncer bacteriano" se distribuye y coloniza los diferentes tejidos de la planta sistémicamente para localizarse de manera abundante en semillas, tallos, hojas y frutos (figura 2).

Figura 2. Síntomas de *Clavibacter michiganensis sub. spp.* en hoja, tallo y fruto del jitomate.

La diseminación en largas distancias se efectúa por medio de semillas infectadas e insectos, mientras que, en corta distancia, ocurre a través de suelo, agua y labores de entutorado, poda y desbrote. La bacteria es de escasa sobrevivencia en suelo, puede permanecer sobre restos de cultivos, postes, alambrados, plásticos y demás estructuras de conducción, lo cual hace complejo el tratamiento químico para evitar su propagación.

La enfermedad puede manifestarse varias veces en el mismo ciclo de cultivo (policíclica) se inicia en condiciones de temperaturas moderadas (18 a 25 °C) y niveles elevados de humedad, las labores de desbrote, entutorado en condiciones de alta humedad, incrementan rápidamente la incidencia de la misma.

En infecciones sistémicas desarrolladas en plantas jóvenes se observa el marchitamiento unilateral de las hojas de la parte baja y media. En plantas grandes, en infecciones localizadas, los primeros síntomas son tejidos muertos (necrosis) en los bordes de las hojas ubicadas en la parte baja y necrosis a lo largo del tallo. A nivel de fruto se observa necrosis del cáliz, reticulado y ocasionalmente se observa la manifestación del síntoma conocido como ojo de pájaro (figura 2). A nivel del tallo se observa la formación de cancros, emisión de raíces adventicias y en el interior, oscurecimiento del tejido de vascular. (Flores Ceferino, 2012)

Se entiende que el control del patógeno es una labor muy compleja, hasta el momento se ha recurrido a tratamientos químicos, físicos o combinados, además de que se opta por no efectuar plantaciones en campos infectados, la desinfección de materiales de trabajo en una solución de hipoclorito de sodio al 10% por 10 minutos; el empleo de semillas libres del patógeno, las semillas pueden ser tratadas con una solución de hipoclorito de sodio 0,06 molar durante cuatro horas, se recomienda no efectuar labores de desbrote en regiones con alta humedad, además de desinfectar los utensilios. En el caso de encontrar plantas con síntomas erradicar del suelo y efectuar aplicaciones de oxicloruro de cobre más Mancozeb, este producto también puede ser utilizado ante condiciones ambientales que favorecen la propagación.

7.2.- Generalidades del material vegetal propuesto

7.2.1. Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa)*.

Hibiscus Sabdariffa L, es el nombre científico de la popular flor de Jamaica, también conocida como rosa de abisinia. Es propia de climas secos, y es originaria del África Occidental, se utiliza para la producción de fibra y como infusión. Es una planta anual o perenne hierba o de base leñosa sub arbusto, y crece hasta 2.0 a 2.5 m de alto. Las hojas tienen de tres a cinco lóbulos dispuestas alternativamente en los tallos (Green, 2012).

Figura 3. Vista de la flor de Jamaica madura sostenida por su cáliz de la misma pigmentación.

Las flores con 8 a 10 cm de diámetro, son de color blanco y amarillo pálido con una mancha de color rojo oscuro en la base de cada pétalo, y tienen un cáliz carnoso en la base, son carnosas y brillantes de color rojo como la fruta madura, tardando alrededor de seis meses para madurar (figura 3). Su composición química tan extensa permite emplearla para combatir diversas enfermedades (Amarula, 2009; J.M. Nzikou, 2011; J. Zhen, 2015).

Diversos autores han preparado extractos de Jamaica con solventes orgánicos demostrando su aplicación exitosa en patógenos varios para el tratamiento y la

prevención de infecciones urinarias; para combatir patógenos resistentes a múltiples fármacos, y exitosos para combatir bacterias (I. Alshami, A.E. Alharbi, 2014; I. Borras-Linares, 2015; E.M. Abdallah, 2016; I. Jabeur, 2017). Los autores han atribuido su efecto antimicrobiano a los flavonoides, ya que tienen la capacidad de formar un complejo con las paredes celulares bacterianas y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que da como resultado la fuga de iones de las células bacterianas.

7.2.2. Maracuyá (*Passiflora edulis*).

El nombre Passiflora, proveniente del latín passio (pasión) y floris (flor), se debe a la semejanza entre los elementos de la flor y los diversos instrumentos de la Pasión de Cristo: la corona floral representaría la corona de espinas, los estambres asemejan las cinco llagas, el pistilo corresponde a la cruz, los estigmas a los tres clavos y las brácteas representan la Santísima Trinidad. (Verónica Pereira, 2015).

El género *Passiflora* comprende alrededor de 500 especies, es el más grande de la familia Passifloraceae, entre las cuales, se destacan las *Passiflora edulis* por su importancia económica y medicinal. Se cultiva ampliamente en regiones tropicales y subtropicales en varias partes del mundo, especialmente en América del Sur, el Caribe, el sur de Florida, Sudáfrica y Asia. Se presentan dos variedades diferentes la púrpura o morada (*Passiflora edulis Sims*.) y la amarilla (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa)* (figura 4). La primera se consume en fresco y prospera en lugares semicálidos y a mayor altura sobre el nivel del mar, en tanto que la segunda crece en climas cálidos, desde el nivel del mar hasta 1000 m de altitud. La última es más apreciada por la industria gracias a su mayor acidez y aromaticidad; se obtiene del tejido que rodea a la semilla, y es una excelente fuente de vitamina A, niacina, riboflavina y ácido ascórbico. Las hojas de *P. edulis* son muy utilizadas como sedantes o tranquilizantes en Estados Unidos y países europeos. Las flores son grandes y hermosas y se pueden utilizar como plantas ornamentales de jardín. Las cáscaras, caracterizadas por altos niveles de polifenoles, fibras y oligoelementos,

se han utilizado ampliamente para hacer vino o té, cocinar, extraer pectina e ingredientes medicinales y procesar alimento seco para el ganado. Las semillas son comestibles y tienen un alto contenido de proteínas y aceite (compuesto principalmente de ácido linoleico, ácido oleico y ácido palmítico) (Xirui He, 2020).

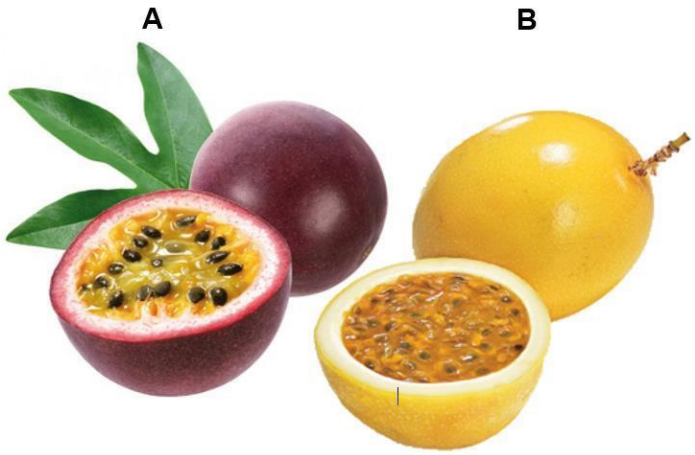


Figura 4. Variedades de Passiflora edulis y cortes transversales mostrando semillas de: a) Maracuyá púrpura; b) Maracuyá amarilla.

El maracuyá es una planta trepadora, vigorosa, leñosa, perenne, con ramas hasta de 20 metros de largo, presenta tallos verdes, acanalados y glabros, presentan zarcillos axilares que se enrollan en forma de espiral y son más largos que las hojas. Las hojas son solitarias y axilares, vistosas. Están provistas de cinco pétalos y una corona de filamentos radiante de color púrpura en la base y blanca en el ápice, posee cinco estambres y tres estigmas. Los zarcillos son redondos y en forma de espiral, alcanzan una longitud de 30-40 cm, se originan en las axilas de las hojas junto a las flores; se fijan al tacto con cualquier superficie y son las responsables de que la planta tenga el hábito de crecimiento trepador. Las flores son hermafroditas, nacen solitarias en las axilas, sostenidas por tres grandes brácteas verdes que se asemejan a hojas. Las flores consisten de tres sépalos de color blanco verdoso, cinco pétalos blancos y una corona formada por un abanico de filamentos que irradian hacia fuera, cuya base es de color púrpura (figura 5), estos tienen la función de atraer a los insectos polinizadores (Manza, 2005).

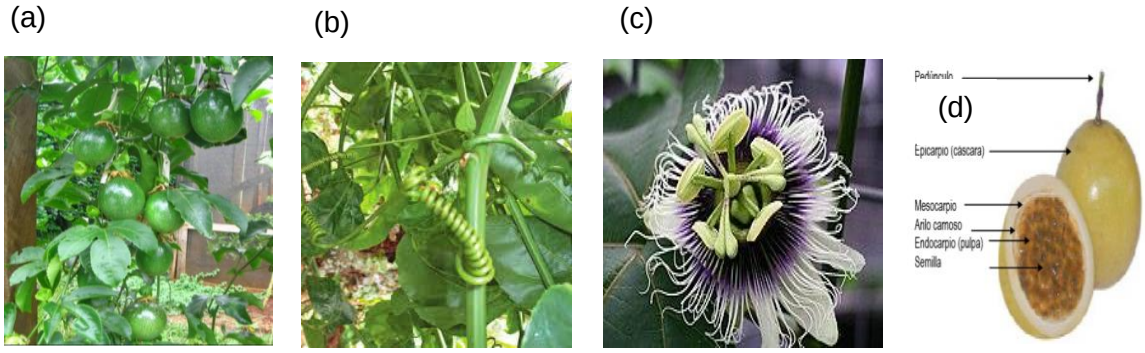


Figura 5. Representación de la planta de maracuyá con sus frutos sin madurar (a) zarcillos (b) flor hermafrodita (c) corte transversal del fruto (c)

El fruto es una baya globosa u ovoide de color entre rojo intenso a amarillo cuando está maduro, las semillas con arilo carnoso muy aromáticas, miden de 6 a 7 cm de diámetro y entre 6 y 12 cm de longitud. El fruto consta de 3 partes. Exocarpio: Es la cáscara o corteza del fruto, es liso y está recubierto de cera natural que le da brillo. El color varía desde el verde, al amarillo cuando está maduro. Mesocarpio: Es la parte blanda porosa y blanca, formada principalmente por pectina, tiene grosor aproximadamente de 6 mm que, al contacto con el agua, se reblandece con facilidad. Endocarpio: Es la envoltura que cubre las semillas de color pardo oscuro. Contiene el jugo de color amarillo opaco, bastante ácido, muy aromático y de sabor agradable (figura 5).

Se ha reportado que la pulpa de maracuyá es una famosa fuente alimenticia de flavonoides con diversas propiedades biológicas y farmacológicas (Xirui He, 2020). Es fuente de antioxidantes naturales que pueden eliminar los radicales libres o inhibir su actividad ayudando así al cuerpo a mantener un estado antioxidante adecuado (Zas and John, 2017; Rotta *et al.,* 2019), efecto superior al del plátano, papaya, colombo, nectarina, la naranja, el mango americano, la piña y el lichi (Thomas *et al.,* 2019). La administración de hojas, cáscaras y semillas a ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina mostró capacidad antioxidante al mejorar la enzima antioxidante en los órganos viscerales (Xirui He, 2020).

La fruta de la pasión posee actividad antifúngica y antibacteriana de enfermedades infecciosas en humanos y plantas. El péptido con gran similitud con las albúminas 2S de las semillas de maracuyá tiene propiedades antifúngicas Los extractos metanólicos del pericarpio de *P. edulis* inhiben el crecimiento de diferentes cepas bacterianas como *Escherichia coli,* esto podría deberse a la presencia de compuestos bioactivos como polifenoles, triterpenos y esteroles contenidos en los extractos de metanol (Ramaiya *et al.* 2014, Dzotam *et al.,* 2016, Pereira *et al.,* 2019).

7.2.3. Naranja Agria (*Citrus x aurantium*).

Árbol perenne de la familia de las rutáceas de hasta 10 metros de altura, con la copa muy redondeada, tallos espinosos, hojas coriáceas, elípticas con el pecíolo alado, flores de color blanco muy perfumadas y con cinco pétalos y numerosos estambres, más grandes que en el *Citrus sinensis*.

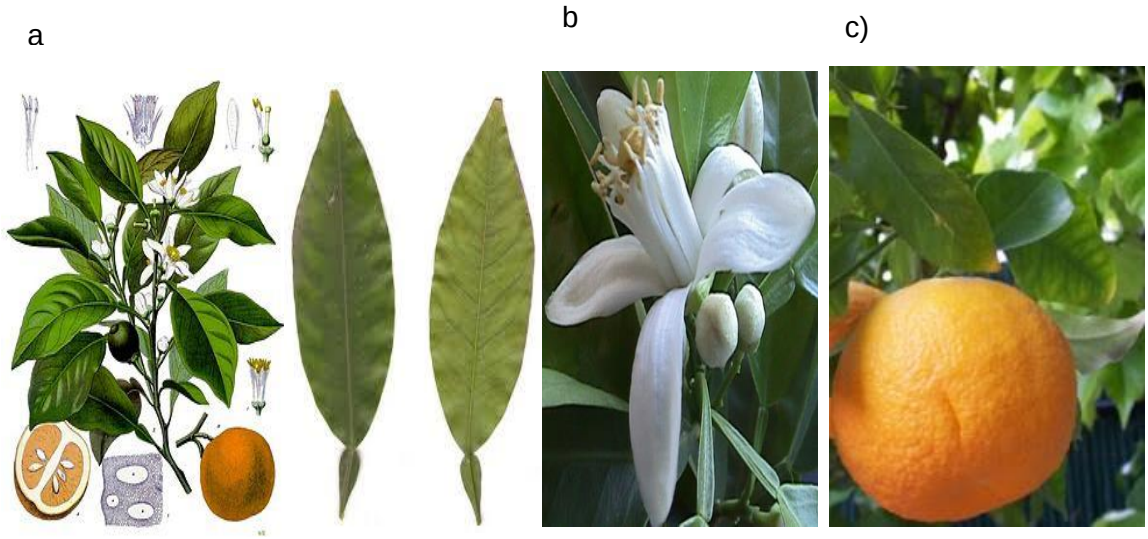


Figura 6. Representación de la planta de la naranja agria, (a) flores, (b) fruto (c).

Su composición química diversa, donde resaltan los flavonoides y que se dividen en cuatro grupos, ha sido reconocida debido a su función fisiológica, farmacológica y

por sus beneficios para la salud (Ipek Suntar, 2018). Se ha reportado como diurético, antiespasmódico, antifúngico y antibacteriano.

La actividad antimicrobiana de *C. aurantium* se investigó mediante el uso de varios ensayos in vitro empleando jugos neutralizados y no neutralizados a 4 y 37 °C, durante un período de siete días sobre *Salmonella enterica Typhimurium y Listeria monocytogenes, l*os resultados mostraron que ambos microorganismos crecieron durante dos días en jugo neutralizado a 37 ° C. Por otro lado, el día 7, ninguno sobrevivió. Los resultados también revelaron que *L. monocytogenes* era menos resistente que *S. enterica Typhimurium*. Se sugirió que el pH bajo del jugo de naranja agria es responsable de su potencial antimicrobiano junto con la duración del período de incubación y la temperatura. En otra investigación, se registró una alta actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis y Staphylococcus aureus* (Ipek Suntar, 2018).

7.3. Métodos de extracción de compuestos bioactivos

Los componentes naturales a base de plantas pueden derivarse de cualquier parte como tallo, corteza, hojas, flores, raíces, rizomas, frutos, semillas, etc. Las actividades biológicas de los extractos de plantas han mostrado diferencias significativas según su origen y los métodos de extracción aplicados, enfatizando así la importancia de seleccionar un método de extracción adecuado (Thangaraj, 2016). Las eficiencias de los métodos de extracción tanto convencionales como no convencionales (figura 7) dependen principalmente de los parámetros críticos de entrada (Azmir y col., 2013). Se pueden considerar ejemplos de tales parámetros: duración del período de extracción, solvente utilizado, pH del solvente, temperatura, tamaño de partícula de los tejidos, la proporción de solvente-muestra, etc.

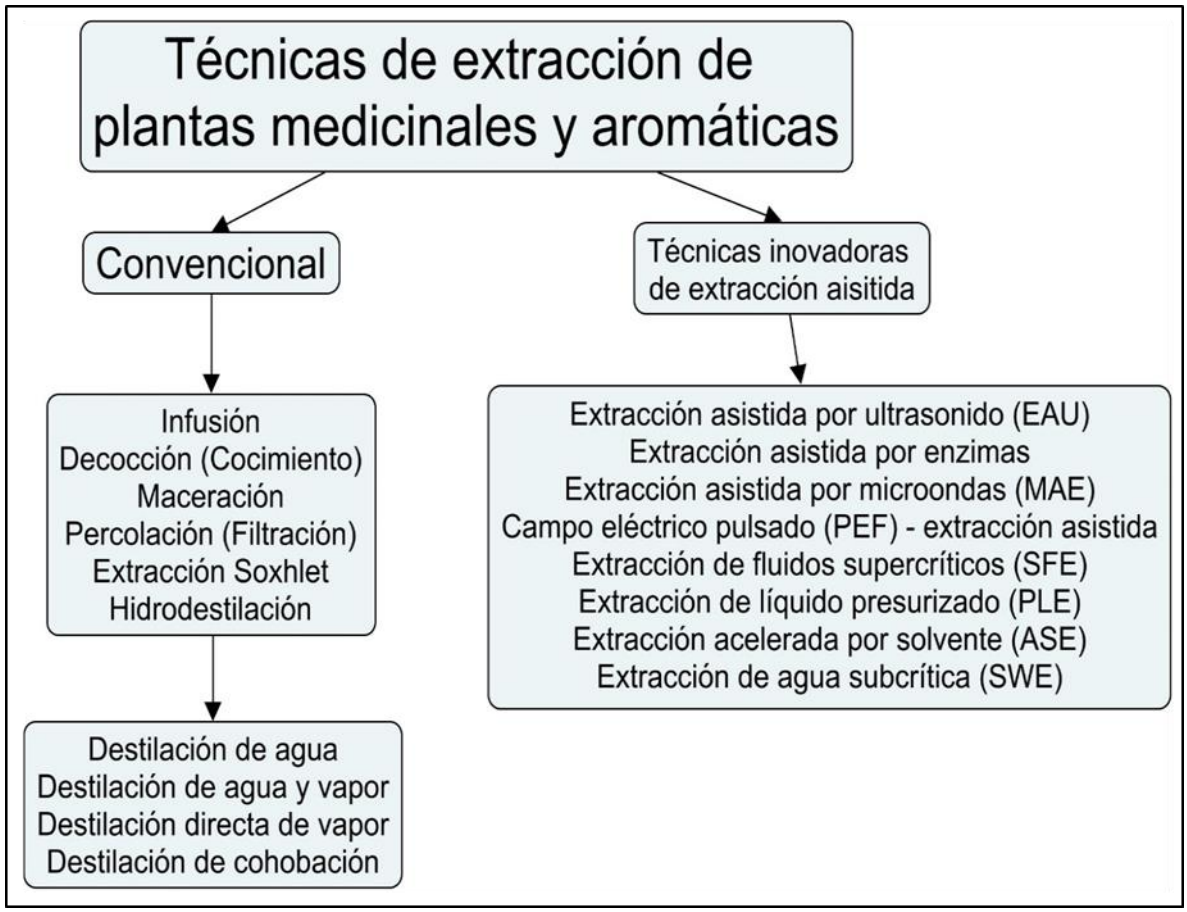


Figura 7. Métodos de extracción metabolitos de plantas medicinales y aromáticas.

Complementario a los métodos de extracción, también se debe considerar la trituración, filtración y concentración. Algunos de los métodos convencionales basados en disolventes incluyen: Infusión, decocción (cocimiento), maceración, percolación, extracción Soxhlet, e hidrodestilación. A continuación, se presenta la generalidad de algunos de ellos.

7.3.1.- Infusión.

La infusión es un método de extracción que se utiliza para obtener principios biológicamente activos de partes de plantas que tienen paredes celulares más delgadas, como flores, hojas y partes aéreas delgadas de las plantas, incluso

algunas frutas después de haber sido trituradas previamente, que contienen activos termoestables y compuestos solubles en frío. Para ello, se agrega agua hirviendo o fría al material vegetal, luego se hierve esta mezcla. A continuación, se cubre el recipiente y se deja a temperatura ambiente durante 10 a 15 minutos con agitación ocasional. El producto obtenido se filtra y el resultado serán soluciones diluidas de los componentes fácilmente solubles de los medicamentos crudos.

7.3.2.- Decocción (Cocimiento).

La decocción consiste en tratar el material vegetal picado en un volumen determinado de agua y hervirlo. Generalmente se recomienda para raíces, rizomas, cortezas, tallos, frutos duros y semillas, es decir, aquellos órganos de la planta que tienen una membrana más gruesa y donde la difusión de los principios activos se vuelven más difícil. Sin embargo, este procedimiento también se recomienda para flores, hojas, ramas y frutos, especialmente cuando se extraen aceites volátiles en el extracto acuoso. Este procedimiento es adecuado para la extracción de componentes termoestables solubles en agua.

7.3.3.- Maceración.

Es el método de extracción más sencillo y común, se realiza a temperatura ambiente. El producto vegetal se mantiene en contacto con el disolvente (agua o agua/alcohol) durante un tiempo variable, agitando ocasionalmente, tras lo cual se separa el extracto. La maceración en frío se puede preparar a partir de raíces, tallos, hojas, flores o semillas. Este método es el más adecuado para su uso en el caso de compuestos termolábiles. Por tanto, la maceración consiste en tratar el producto vegetal picado con la cantidad de solvente (agua o alcohol etílico 50% o 70%) en relación 1:10 y mantenerlo a la temperatura habitual durante un tiempo determinado.

7.3.4.- Extracción Soxhlet.

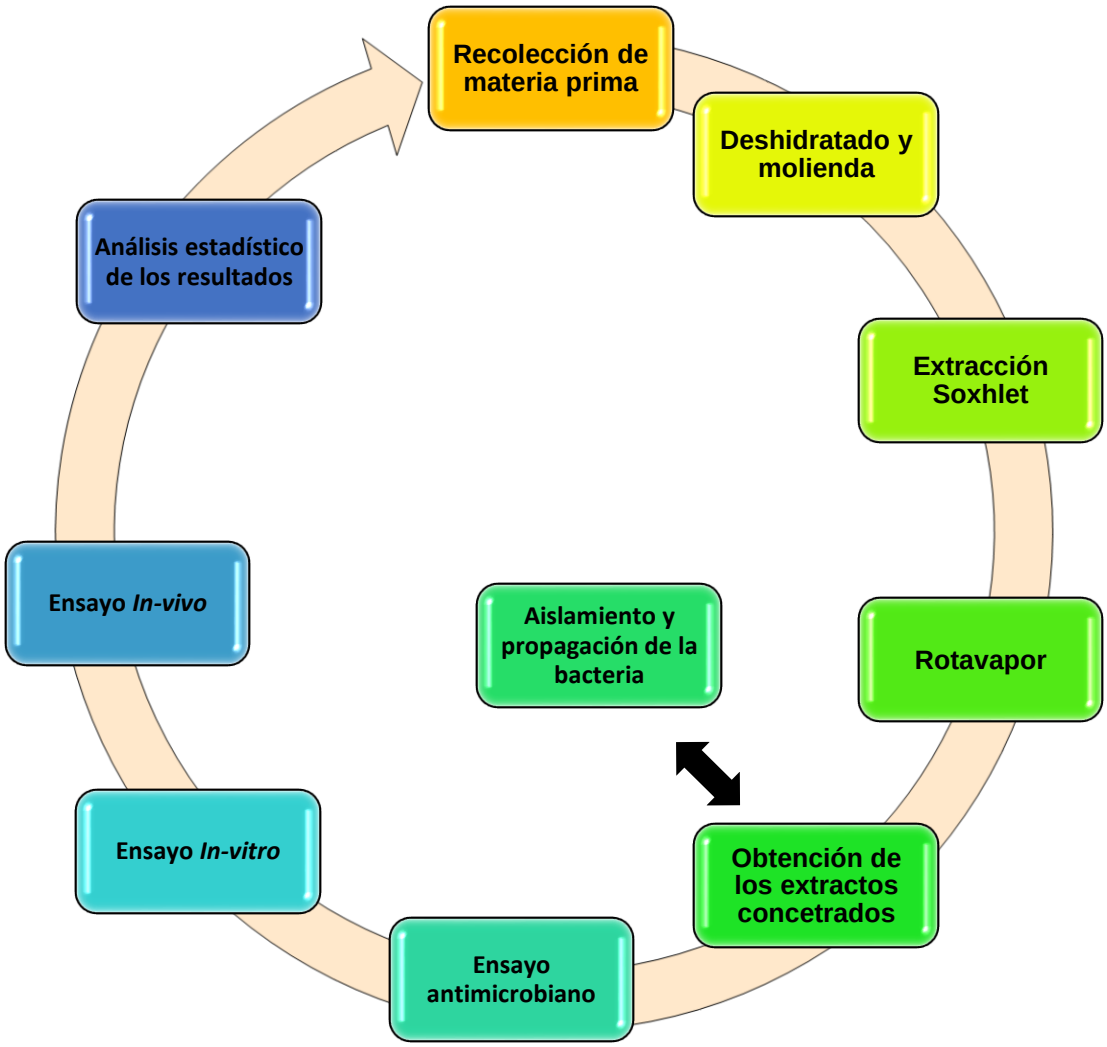
La extracción continua en caliente (Soxhlet) es adecuada para grandes cantidades de material vegetal. La materia prima se muele y se introduce en el extractor junto con el solvente, tras ciclos repetidos de extracción, el disolvente se enriquece con el componente extraído. Se detiene el calentamiento y se deja enfriar, se retira el cartucho, se seca y pesa. La principal ventaja de este método de extracción es que se logra mediante un proceso continuo.

7.3.5.- Hidrodestilación.

Es un método tradicional ampliamente utilizado para la extracción de los componentes activos y los aceites esenciales. Este procedimiento es bueno para la extracción de compuestos activos volátiles, pero como se requiere una alta temperatura, no se puede utilizar para compuestos termolábiles. Las cuatro categorías básicas de hidrodestilación son: (a) destilación con agua, (b) destilación con agua y vapor, (c) destilación directa con vapor y (d) destilación con cohobación. La elección entre las cuatro modificaciones depende del punto de ebullición del aceite esencial y de la naturaleza de la planta (Natalia Manousi, 2019).

METODOLOGÍA

8. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.



MATERIALES Y MÉTODOS

9. MATERIALES Y MÉTODOS.

9.1.- Material vegetal y extractos.

El material vegetal fresco seleccionado y empleado para los ensayos fueron de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L*.), hoja de Maracuyá (*Passiflora edulis*), hoja de Naranja agria (*Citrus x aurantium*), todos fueron adquiridos directamente con los agricultores en la localidad de Chiautla de Tapia en el estado de Puebla, México; una región donde son cultivados y comercializados, todos se obtuvieron en los periodos de diciembre del 2020- febrero del 2021. Todo el material vegetal en fresco fue pesado en diferentes gramajes, se secó en condiciones de sombra a temperatura ambiente y luego fueron triturados hasta obtener un polvo fino con apoyo de un mortero y un pistilo de porcelana. A 5 gr de polvo seco de cada cultivo fueron colocados en frascos ámbar y se les adicionó 50 ml de metanol al 80% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), o la misma de cantidad de agua destilada estéril, procediendo con agitaciones frecuentes durante tres días a temperatura ambiente (37 °C + 2 °C) evitando el contacto directo de la luz en un cuarto obscuro. Todas las suspensiones fueron filtradas con papel filtro Whatman No. 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Los extractos metanólicos y acuosos fueron concentrados en baño maría (idealmente se deberá hacer a presión reducida en un evaporador rotatorio a 68 °C y tiempos variables hasta sequedad total y resuspender en DMSO) hasta obtener los extractos crudos concentrados para ser almacenados en refrigeración en frascos ámbar a una temperatura de 0 a 4 °C hasta sus ensayos posteriores.

9.2.- Aislamiento y Propagación de la bacteria.

La bacteria *Clavibacter michiganensis* fue aislada de una planta enferma de jitomate propagada en condiciones controladas en una cámara de crecimiento a 16/8 horas luz-oscuridad, 40% de humedad relativa y 20 °C. El tejido de la planta que presentó o no síntomas típicos del patógeno fue macerado en buffer de extracción (AFT 4 ml

por gramo de tejido), se dejó reposar de 15 a 30 minutos a 4 °C y de la parte acuosa se tomó 1 ml para ser Re suspendido en 9 ml del buffer AFT (8 g de NaCl, 0.4 gr de $NaH_2PO_4.2H_2O$, $Na_2HPO_4.12H_2O$, 1 l de agua) si el tejido mostraba síntomas, fue necesario preparar diluciones de hasta $1X10^{-3}$. Con 20 µl del extracto concentrado o diluciones se inocularon por duplicado plagas en agar o caldo nutritivo KB (20 g de peptona, 1.5 g de K_2HPO_4, 1.5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 20 gr de agar-agar, 10 ml de glicerol, aforar a litro de agua, pH 7.2) a 37 °C durante 12-24 horas. Con el crecimiento sospechoso se prepararon placas de cultivos puros para su mantenimiento y preservación. Al mismo tiempo, la bacteria fue propagada en medio líquido para ajustar el aporte microbiano a $1x10^3$ UFC/ml de los cuales se emplearon 20 µl para la inoculación uniforme inicial de los tubos experimentales mismos que fueron incubados a 37 °C de 12 a 24 horas.

9.2.- Ensayo antimicrobiano.

Los extractos vegetales crudos y concentrados fueron deshidratados en su totalidad obteniendo un polvo que fue Re suspendido en metanol a 80% y/o en agua para una concentración de 500 mg/ml (1 g / 2 ml de solvente). Con el cual se procedió a realizar las pruebas biológicas *in-vitro e in-vivo.*

9.2.1- Ensayo in-vitro (cultivos líquidos de Clavibacter michiganensis).

A partir de un cultivo de activación bacteriano (aislamiento y propagación de la bacteria) se inocularon con 20 µl $1x10^{-3}$ UFC/ml tubos conteniendo 3 ml de medio líquido KB y 20 µl de cada extracto vegetal preparado a 500 mg/ml. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 horas y 150 rpm. Transcurrido el tiempo, se obtuvo 1 ml para leer la absorbancia de cada muestra a 550 nm en el espectrofotómetro de luz UV- visible. El equipo fue calibrado A/T cero/uno con 1 ml del medio de cultivo líquido. El comportamiento microbiano fue comparado respecto a un control positivo

y negativo, adicionando 100 µl de (Kanamicina) a 100 mg/ml, o 100 µl de agua, respectivamente.

9.2.2- Ensayo *In-vivo* (en tejidos de plántulas de jitomate infectado).

Semillas de plantas infectadas fueron sumergidas en los extractos acuosos o metanólicos durante una noche a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las semillas fueron lavadas con agua destilada y cultivadas en un suelo estéril en condiciones controladas en una cámara de crecimiento a 16/8 horas luz-oscuridad, 40% de humedad relativa y 20 °C, desde el inicio y durante cuatro semanas las semillas o su desarrollo fue regado de manera alternada con los tres diferentes extractos vegetales y agua pura. A cada maceta experimental se aplicaron 2 ml (a 1000 mg/ml) del extracto vegetal concentrado en metanol al 80% y agua pura. Con plántulas de cuatro semanas postgerminación, se recolectaron las hojas con mayor desarrollo y se procedió al aislamiento del patógeno como ya se ha descrito. Con 20 µl se inocularon 3 ml de medio, se midió el desarrollo bacteriano en los puntos iniciales de su crecimiento cuantificando mediante densidad óptica a 550 nm en el espectrofotómetro de luz UV- visible. El equipo fue calibrado A/T cero/uno con 1 ml del buffer AFT. Las lecturas fueron comparadas un control positivo y negativo, adicionando 100 µl de Kanamicina a 100 mg/ml, o 100 µl de agua, respectivamente.

9.3- Análisis estadístico.

El diseño experimental empleando tres cultivos y dos solventes diferentes, generó una batería de ensayos consistente de dos extractos por cada cultivo, es decir, se prepararon y aplicaron seis extractos naturales (Maracuyá-Acuoso, Maracuyá-Metanólico, Naranja agria-Acuoso, Naranja agria-Metanólico, Jamaica-Acuso y Jamaica-Metanólico), cada uno de los extractos se probaron por triplicado en tres experimentos independientes valorando el compararon sobre el crecimiento de

Clavibacter michiganensis. Los datos obtenidos fueron analizados a través de prueba de hipótesis utilizando el estadístico de prueba t-Student con una confiabilidad del 95%, complementado con el análisis de valores empleando el programa de Microsoft Excel 2016.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

10.1 Ensayo antimicrobiano *In-vitro.*

Como ya se mencionó, las pruebas de inhibición antimicrobiana para los diferentes extractos fueron realizadas con 10% (masa seca/volumen) de cada uno de los tejidos; los cuales fueron obtenidos posterior a su deshidratación macerándolos en metanol o agua destilada; de la misma manera se concentraron con el rotavapor obteniendo un polvo fino que fue Re suspendido en agua destilada esterilizada; con dichos extractos se realizaron los diferentes ensayos.

En primer lugar, en las tablas 1 y 2, y graficas 1, 2, y 3 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana de los seis extractos naturales, un control positivo (bacteria) y un control negativo (Kanamicina), se aprecian los promedios de tres lotes independientes con tres repeticiones cada uno.

Tabla 1. Valores promedio de Absorbancia (A) de los diferentes ensayos realizados en tres lotes independientes, de seis extractos naturales, control positivo (bacteria) y control negativo (Kanamicina).

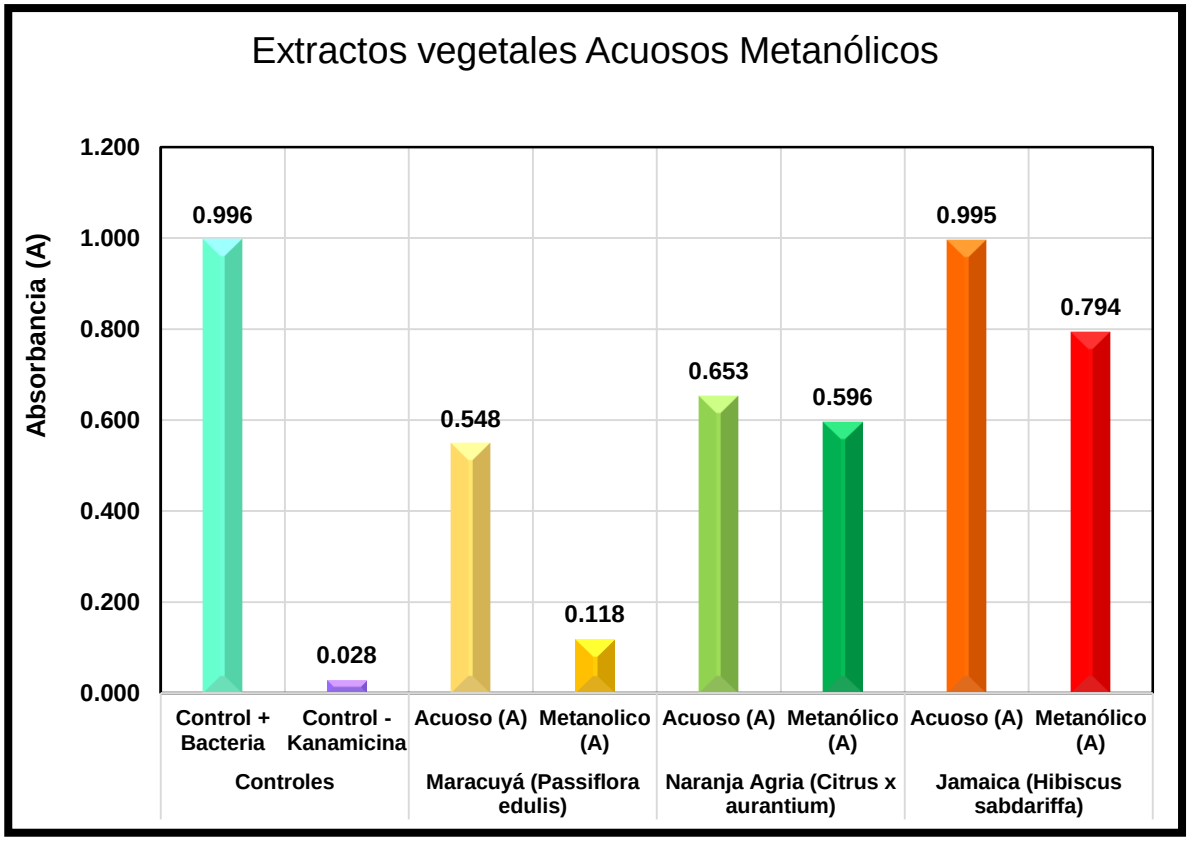
Absorbancia (A)								
Tratamiento	**Controles**		**Maracuyá (*Passiflora edulis*)**		**Naranja Agria (*Citrus x aurantium*)**		**Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)**	
	Control + Bacteria	**Control - Kanamicina**	**Acuoso**	**Metanólico**	**Acuoso**	**Metanólico**	**Acuoso**	**Metanólico**
Lote 1	0.9976	0.0283	0.5493	0.1176	0.6523	0.5973	0.9950	0.7950
Lote 2	0.9950	0.0283	0.5453	0.1180	0.6516	0.5956	0.9953	0.7950
Lote 3	0.9956	0.0283	0.5493	0.1180	0.6540	0.5960	0.9956	0.7916
Promedio	0.9961	0.0283	0.5480	0.1179	0.6527	0.5963	0.9953	0.7940

En la tabla 1 se presentan los valores del crecimiento antimicrobiano registrado indirectamente mediante espectroscopia de UV-VIS a una longitud de onda de 550 nm. En cada lote y ensayo se presenta el promedio de tres repeticiones con los que se obtuvo un gran promedio de crecimiento a las 12 horas de la inoculación del cultivo. Podemos apreciar que el control positivo alcanzó un desarrollo en absorbancia de 0.996 como valor máximo; su tratamiento con el antibiótico comercial inhibió el desarrollo hasta 0.0283. Las pruebas de inhibición bacteriana

empleando los tres diferentes cultivos con los dos diferentes solventes, agua y metanol, muestran que los de menor efecto fueron los extractos de Jamaica con valores de 0.9953 y 0.7940, acuoso y metanólico, respectivamente. Caso contario para los extractos de maracuyá cuyos valores fueron del 0.5480 y 0.1179, respectivamente. Es decir, en los tres casos se apreció inhibición del crecimiento bacteriano siendo más notorio para los extractos de maracuyá con metanol.

A continuación, se muestran los resultados de la tabla 1 que fueron representados gráficamente; de manera general se puede observar el crecimiento de la cepa *Clavibacter michiganensis* (Control +), el antibiótico comercial Kanamicina (control) y los seis extractos naturales.

Gráfica 1. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con los seis diferentes extractos vegetales en valores promedio de Absorbancia (A).



De los tres tejidos probados, el de maracuyá arrojó los mejores valores de inhibición, al comparar el extracto acuoso y metanólico de esta planta, el que tuvo mayor

incidencia contra la bacteria fue el extracto metanólico de maracuyá, al comparar dicho extracto con el control negativo, Kanamicina como antibiótico comercial, podemos observar que el extracto metanólico de maracuyá podría ser propuesto como un posible antibacteriano natural eficaz contra la bacteria y las enfermedades que genera. En este caso debemos experimentar y optimizar las condiciones de extracción, incluso aumentar el gramaje seco del tejido procesado; alternativamente podríamos sugerir dichos extractos con otras partes de la planta, combinaciones con otros solventes, por mencionar.

Tabla 2. Promedios en valor de unidades formadoras de colonia (UFC/mLX10^8) de los diferentes ensayos realizados en tres lotes independientes, con los seis extractos, un control positivo (bacteria) y un control negativo (Kanamicina).

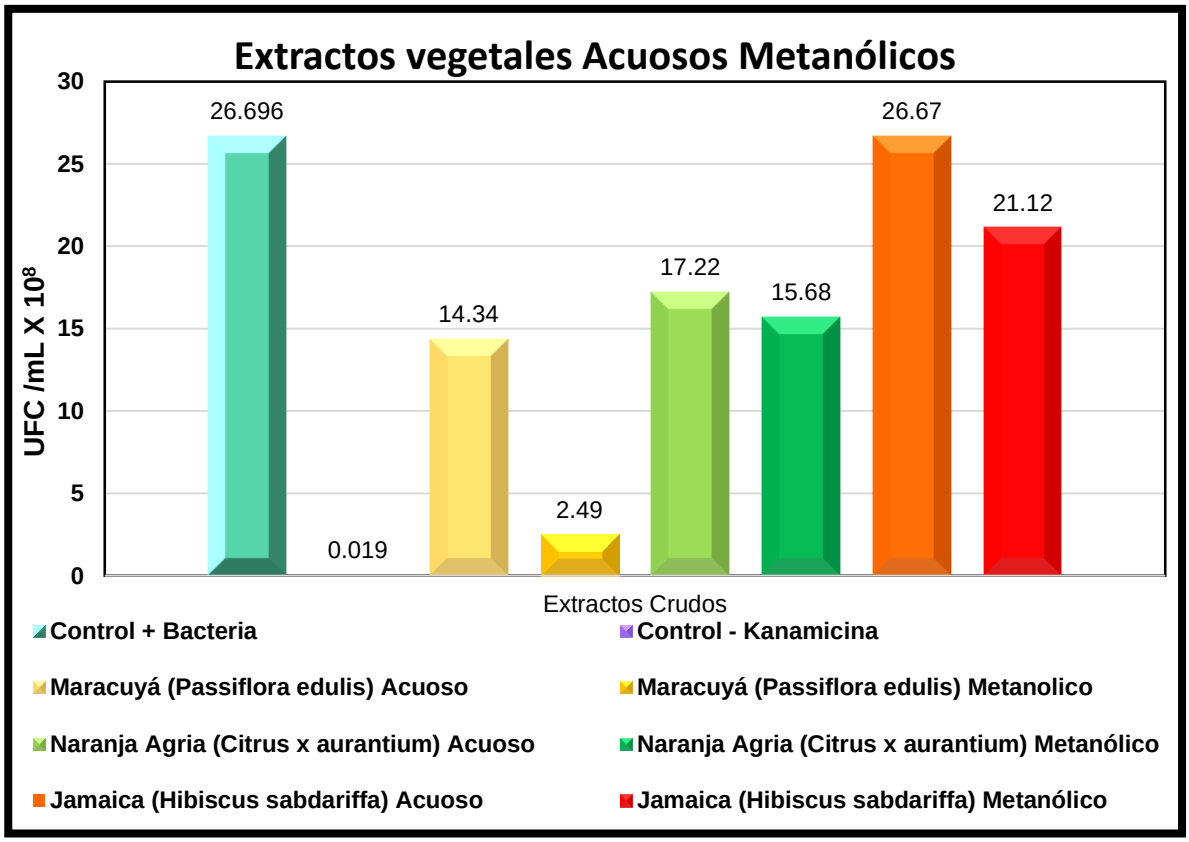
UFC/mLX10^8								
Tratamiento	**Controles**		**Maracuyá (*Passiflora edulis*)**		**Naranja Agria (*Citrus x aurantium*)**		**Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*)**	
	Control + Bacteria	**Control - Kanamicina**	**Acuoso**	**Metanólico**	**Acuoso**	**Metanólico**	**Acuoso**	**Metanólico**
Lote 1	26.74	-0.4586	14.38	2.48	17.22	15.70	26.67	21.16
Lote 2	26.67	0.1477	14.27	2.49	17.20	15.66	26.67	21.15
Lote 3	26.68	0.3682	14.38	2.49	17.24	15.67	26.68	21.06
Promedio	26.70	0.0191	14.34	2.49	17.20	15.68	26.67	21.12

Los resultados anteriores fueron convertidos unidades formadoras de colonia (tabla 2) tomando como base un gráfico experimental que previamente se había construido en el grupo de trabajo (Ortiz Méndez JM, 2019). Estandarizando el inoculo inicial a 1x10^{-11} UFC/ml en todos los tratamientos. Es decir, después de 12 horas de cultivo a 37°C la bacteria alcanzó alrededor de $26.70X108\ UFC/ml$, valor que fue restringido a 0.0191 X10^8 UFC/ml con el antibiótico comercial. El crecimiento de *Clavibacter michiganensis* con el tratamiento acuoso y metanólico de la Jamaica fue de 26.67 y 21.12 X10^8 UFC/ml; con los extractos acuosos y metanólicos de Naranja agria fue de 17.20 y 15.68X10^8 UFC/ml; finalmente para maracuyá se logró una reducción importante del crecimiento hasta 14.34 y 2.49X10^8 UFC/ml, respectivamente.

A continuación, se presentan los resultados de la tabla 2 que fueron representados gráficamente; de manera general se puede observar el crecimiento de la cepa

Clavibacter michiganensis (Control +), el antibiótico comercial Kanamicina (control -) y los seis extractos naturales.

Gráfica 2. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con los seis diferentes extractos vegetales en valores promedio de unidades formadoras de colonia (UFC/mL x 10^8)



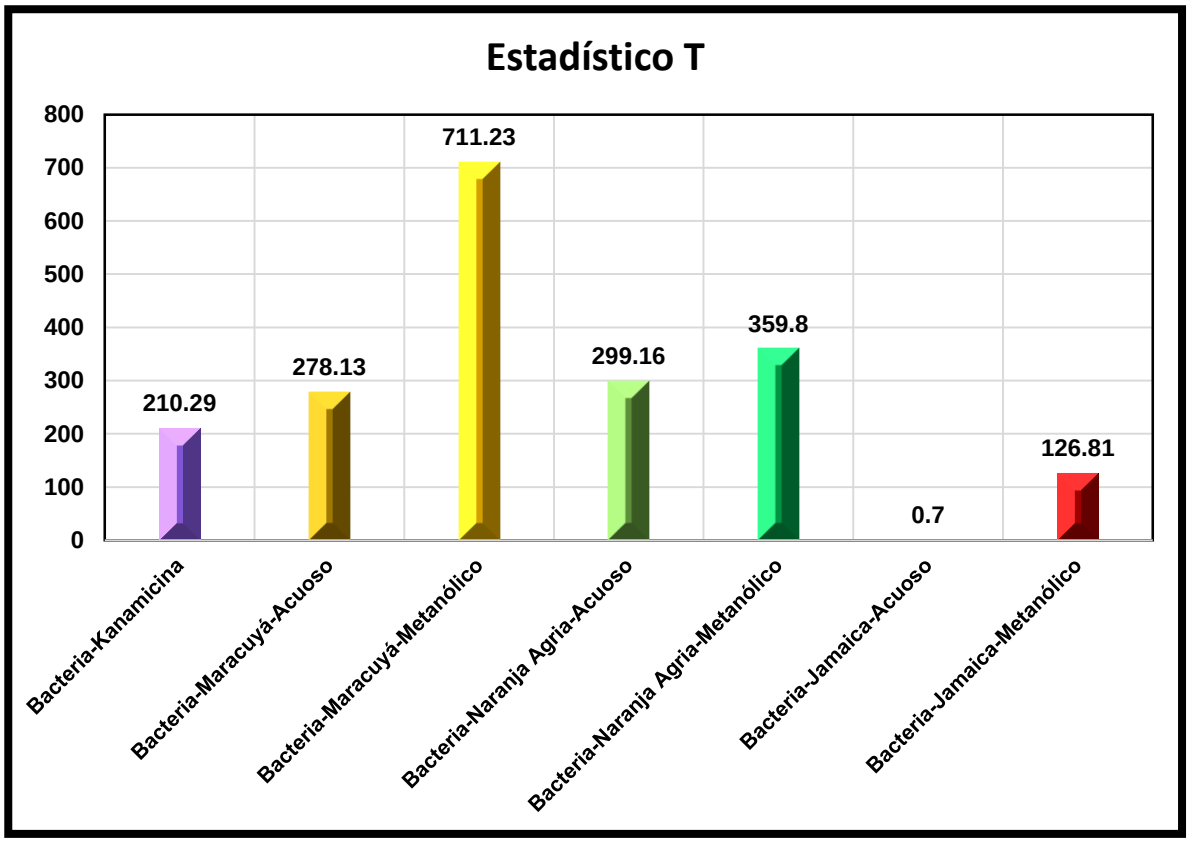
Como podemos observar en la gráfica 2 tenemos los resultados de los tres tejidos probados (Maracuyá, Naranja agria y Jamaica), los tres en extracto acuoso y metanólico. Al realizar la valoración de inhibición bacteriana, el que arrojó los mejores resultados, fue el extracto metanólico de maracuyá, al compararlo con el control negativo Kanamicina (antibiótico comercial). Ante esto, y con base en los resultados, podemos decir que el extracto metanólico de maracuyá, se puede usar como un antibacteriano natural eficaz en jitomate.

Bajo el contexto de nuestros resultados experimentales y al compararlos con algunos antecedentes o trabajos semejantes, podemos mencionar que otros autores han encontraron resultados similares sobre a actividad antibacteriana del

extracto metanólico de la Maracuyá (*Passiflora edulis*) en bacterias Gram positivas. En el 2011 B. O. Akanbi reportó que el extracto mencionado inhibió el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* por medio de un antibiograma donde su resultado mediante halos de inhibición fue de 12.0 mm (B. O. Akanbi, 2011). De manera semejante, Kannan reportó 10±1,03 mm de inhibición para extractos de metanol (S. Kannan. 2010). Los valores obtenidos en esta investigación también nos muestran inhibición en el crecimiento de una bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis,* pero con otro tipo de métodos. Idealmente, debimos realizar ensayos de antibiogramas y halos de inhibición como se ha reportado por estos autores y tener una comparación más precisa.

La validación y confiabilidad de nuestros resultados experimentales fueron analizados mediante un tratamiento estadístico $t - Student$ (grafico 3). De esta manera, y retomando que experimentalmente el extracto metanólico de maracuyá fue el mejor tratamiento para inhibir el crecimiento de *Clavibacter michiganensis*; al realizar el análisis estadístico con un nivel de confiabilidad del 95 % se validó dicho resultado, ya que el estadístico T de maracuyá con metanol tuvo un valor de 711, lo cual rechaza la hipótesis nula $(t = 711.2355 \geq t0 = 1.745883)$. Los datos generados en la estadística se presentan en anexos (anexo 1-7).

Gráfica 3. Valores de Estadistico T de los seis extractos.



Mediante el análisis del estadístico de prueba t-Student se corroboró que la tendencia observada en la gráfica 3, es significativa a las gráficas X_1 y X_2; lo que permite afirmar que de los seis extractos aplicados, el extracto metanólico de maracuyá tiene mayor efecto inhibitorio contra la bacteria *Clavibacter michiganensis.*

Este efecto puede asociarse a la presencia de compuestos bioactivos con capacidad antimicrobiana en el extracto elaborado, tales como los fenoles. El mecanismo mediante el cual los compuestos fenólicos ocasionan su acción antimicrobiana aún no se ha definido completamente, al parecer puede estar asociado a diversas vías (Noguera Nirza, 2019). Algunos autores atribuyen el efecto inhibidor a daños ocasionados a nivel de la membrana celular, debido a la interacción de los compuestos fenólicos con las proteínas de la membrana de las bacterias por medio de enlaces de hidrógeno, los cuales pueden provocar cambios

en la permeabilidad de la membrana. Causando la destrucción celular o la coagulación del contenido celular (Tsuchiya e Linuma 2000, Sengul et al. 2009).

10.2 Cinética de crecimiento.

Después de haber puesto a prueba los seis extractos contra la bacteria y haber elegido el extracto metanólico de maracuyá, el paso a seguir fue conocer el crecimiento de la bacteria *in vitro* en diferentes tiempos (0 , 6 , 12 , y 18 h), por eso se decidió realizar una cinética de crecimiento, para observar el comportamiento de la bacteria en tres diferentes escenarios, el primero es el desarrollo de la bacteria sin ningún factor que inhiba su crecimiento (control positivo), el segundo fue poner a crecer la bacteria, pero inoculado el extracto metanólico del maracuyá, el tercero es poner a crecer la bacteria pero aplicándole el antibiótico (Kanamicina).

Cabe considerar presentar los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento de los tres ensayos, un control positivo (bacteria), un control negativo (Kanamicina) y el extracto metanólico de maracuyá, se representan por el promedio de tres lotes independientes con tres repeticiones cada uno, además cada ensayo se presenta con tres diferentes tiempos (0, 6, 12, y 18 h) y se muestran en las Tablas 3 y 4 y Gráficas 4 y 5

Tabla 3. Promedios en valor de Absorbancia (A) de los diferentes ensayos realizados en la cinética de crecimiento de la bacteria In-vitro en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria, control negativo Kanamicina y el extracto metanólico del maracuyá.

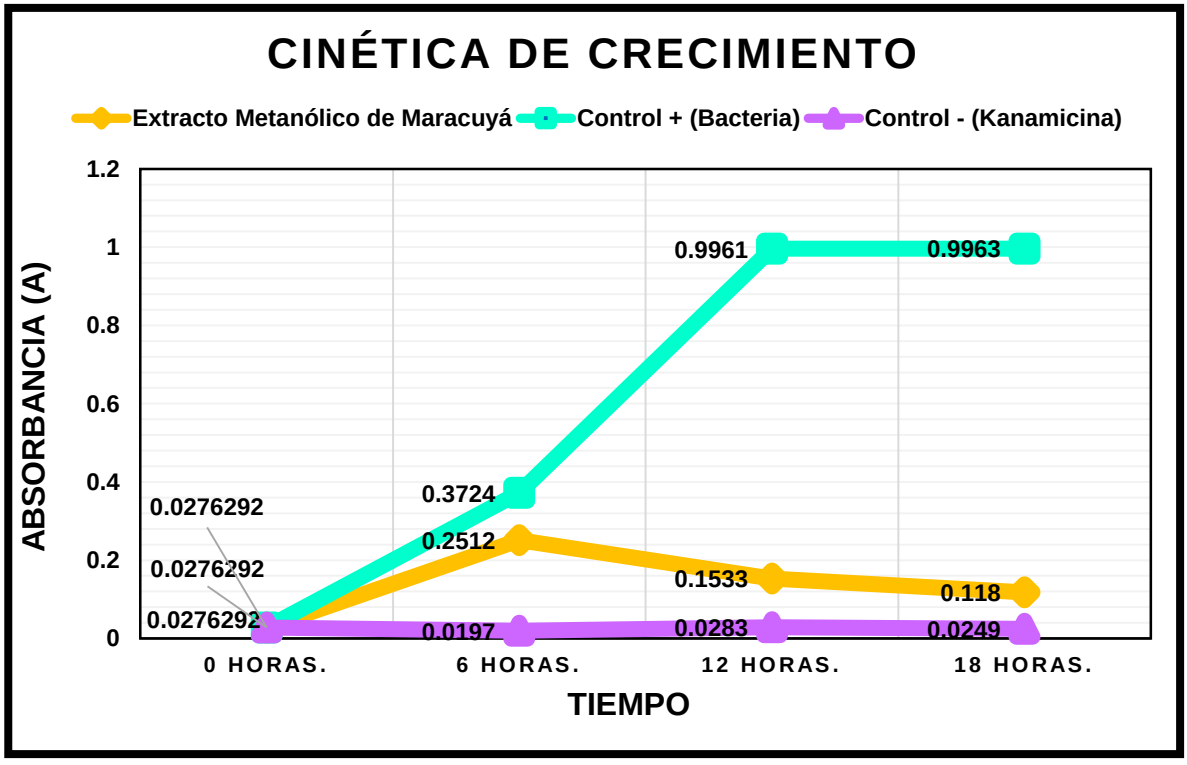
Absorbancia (A)												
Ensayo	Bacteria (Control +)				Kanamicina (Control -)				Extracto metanólico de Maracuyá			
Tiempo (horas)	0	06	12	18	0	06	12	18	0	06	12	18
Lote 1	0.0276292	0.3714	0.9976	0.9960	0.0276292	0.0196	0.0283	0.0250	0.0276292	0.2510	0.1520	0.1176
Lote 2	0.0276292	0.3747	0.9950	0.9969	0.0276292	0.0199	0.0283	0.0250	0.0276292	0.2513	0.1543	0.1180
Lote 3	0.0276292	0.3711	0.9956	0.9960	0.0276292	0.0196	0.0283	0.0245	0.0276292	0.2513	0.1536	0.1180
Promedio	0.0276292	0.3724	0.9961	0.9963	0.0276292	0.0197	0.0283	0.0249	0.0276292	0.2513	0.1533	0.1179

En la tabla 3 se exponen los valores de una cinética de crecimiento antimicrobiano a diferentes tiempos (0, 6, 12, y 18 h). En cada lote y en ensayo se presentan el promedio de tres repeticiones, con lo que se obtuvo el gran promedio de una cinética

de crecimiento. Donde podemos apreciar que los tres ensayos inician en el tiempo 0 hr, un valor de absorbancia de 0.0276; en primer lugar el control positivo obtuvo los siguientes valores en absorbancia, en 6 h. 0.3714, 12 h con 0.9961, y 18 h con 0.9963. Así mismo podemos observar el desarrollo de la bacteria (sin adición del extracto); su tratamiento con el antibiótico comercial muestra los siguientes resultados a 6, 12 y 18 hr, 0.0197, 0.0283, 0.0249, respectivamente. Cabe resaltar en este caso la bacteria no presenta crecimiento sino inhibición a partir de las seis horas; para el extracto metanólico de maracuyá, cuyos valores fueron 0.251, 0.153 y 0.117, respectivamente.

A continuación, se presentan los resultados de la tabla 3 que fueron representados gráficamente; de manera general se puede observar la cinética de crecimiento de los tres diferentes ensayos que se le aplicaron la bacteria *Clavibacter michiganensis.*

Gráfica 4. Cinética de crecimiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, con la aplicación del extracto metanólico de maracuyá y un antibiótico comercial (Kanamicina) como control negativo.



En la gráfica 4 se observan tres curvas de crecimiento en función de la absorbancia y el tiempo de crecimiento, los cuales se les anota su valor a tres diferentes tiempos, 0 horas en donde este valor es igual para los tres ensayos, posteriormente se anota los valores a las 6, 12 y 18 horas. En primer lugar, se muestra el primer ensayo que es nuestro control la bacteria (sin adición del extracto), podemos ver su desarrollo de manera natural sin que ningún factor afecte su crecimiento y desarrollo. En segundo lugar, tenemos el ensayo del extracto metanolico de maracuyá, donde se observa que la bacteria con el extracto avanza su crecimiento hasta las seis horas después de ese tiempo la bacteria empieza a inhibir su crecimiento. Por otra parte, en el ensayo con el antibiótico su compartimiento es diferente, el crecimiento de la bacteria es lento y su inhibición resulta ser la más efectiva, al comparar dicho extracto con el control negativo Kanamicina como antibiótico comercial, podemos observar que el extracto metanólico de maracuyá podrían ser antibacteriano natural eficaz contra la bacteria.

Tabla 4. Promedios en valor de UFC/mLX10^8 de los diferentes ensayos realizados en la cinética de crecimiento de la bacteria *In-vitro* en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria, control negativo Kanamicina y el extracto metanólico del maracuyá.

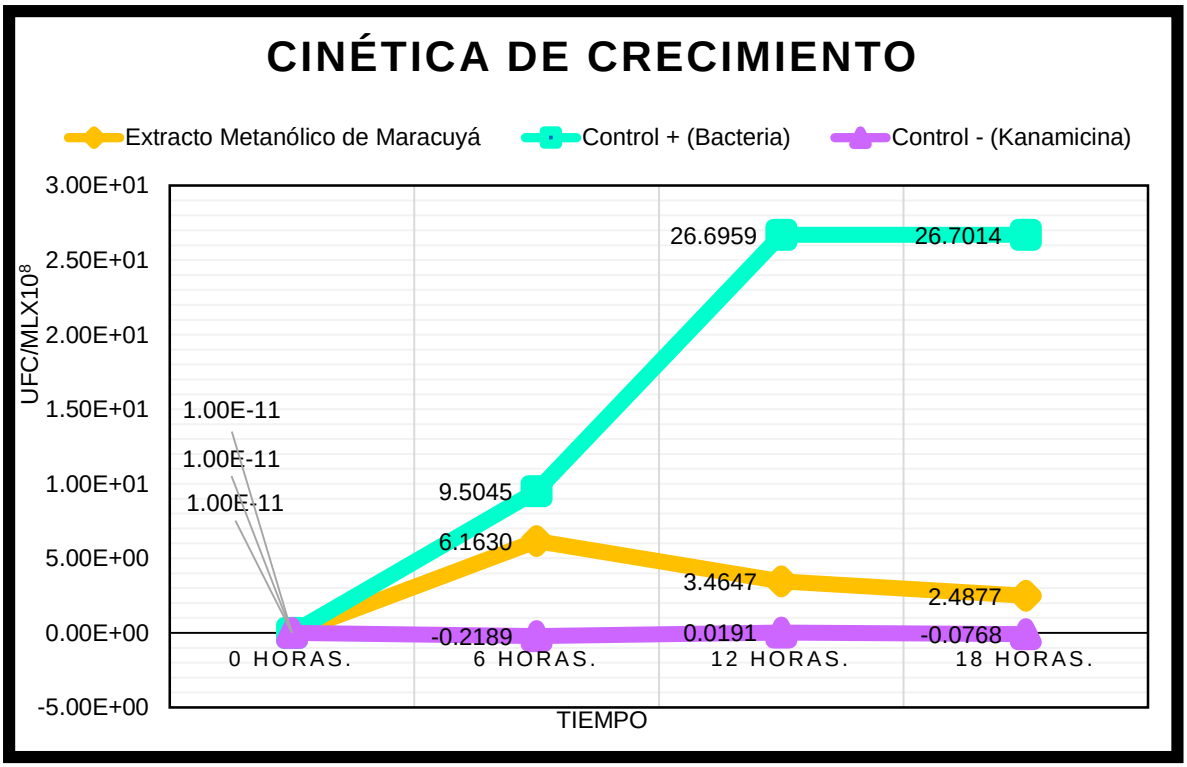
UFC/mLX10^8												
Ensayo	Bacteria (Control +)				Kanamicina (Control -)				Extracto metanólico de Maracuyá			
Tiempo (horas)	0	06	12	18	0	06	12	18	0	06	12	18
Lote 1	1.00E-11	9.47	26.73	26.69	1.00E-11	-0.2216	0.0191	-0.0727	1.00E-11	6.15	3.42	2.48
Lote 2	1.00E-11	9.56	26.66	26.71	1.00E-11	-0.2133	0.0191	-0.0709	1.00E-11	6.16	3.49	2.49
Lote 3	1.00E-11	9.46	26.68	26.69	1.00E-11	-0.2216	0.0191	-0.0865	1.00E-11	6.16	3.47	2.49
Promedio	1.00E-11	9.50	26.69	26.70	1.00E-11	-0.2189	0.0191	-0.0768	1.00E-11	6.16	3.46	2.48

Anteriormente, se presentaron los resultados que fueron convertidos a unidades formadoras de colonia (tabla 4) tomando como base un gráfico experimental que anticipadamente se había trabajado en el grupo de trabajo (Ortiz Méndez JM, 2019). Estandarizando él inoculo inicial a X UFC/ml en todos los tratamientos. Es decir, después de iniciar el cultivo de los tres ensayos a 37 °C y anotar el crecimiento inicial de 1.00E-11 UFC/mLX10^8 para este dato es igual para los tres ensayos, después para los tiempos de (6 hrs, 12 hrs, 18 hrs) se obtuvo lo siguiente; el ensayo

de la bacteria (sin adición del extracto), alcanzó los siguientes valores 9.50, 26.69 y 26.70 UFC/mLX10^8 para el ensayo con el antibiótico comercial se logró una reducción considerable en el crecimiento de la bacteria las lecturas fueron las siguientes -0.2189, 0.0191 y -0.0768 UFC/mLX10^8 con respecto al ensayo con el extracto metanólico se presenta de esta manera 6.16, 3.46 y 2.48 UFC/mLX10^8 respectivamente.

Así mismo como se graficaron los datos de la tabla 3, los datos convertidos de la tabla 4 se hizo de igual manera y se muestra en la gráfica 5.

Gráfica 5. Cinética de crecimiento de la bacteria *Clavibacter michiganensis*, con la aplicación del extracto metanólico de maracuyá y la aplicación de un antibiótico (Kanamicina) como control negativo.



El uso de las plantas como agentes de control de plagas es una práctica que existe desde los inicios de la especie humana. La etnobotánica es la ciencia que investiga la relación entre las plantas y la cultura humana en diferentes ambientes, la cual surge como un instrumento para rescatar tradiciones milenarias sobre los diversos

usos que el hombre le ha dado a estas y como alternativa de dar valor agregado a los recursos vegetales (Pino *et al*.,2004).

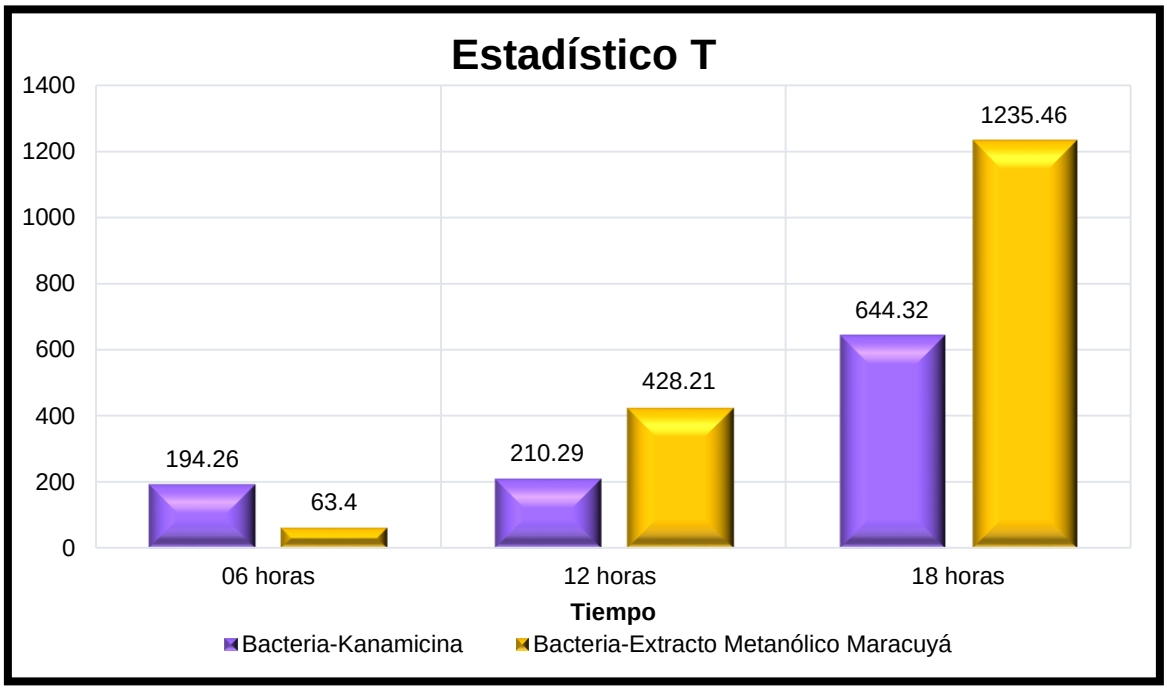
En las gráficas 3 y 4 se observan curvas de crecimiento en función de absorbancia y UFC/ mLX10^8 respectivamente las cuales son una muestra de la capacidad inhibitoria del extracto metanólico de maracuyá y el antibiótico Kanamicina. Estos resultados se pueden comparar con estudios realizados por (Noguera Nirza, 2019). Quien realizo estudios con extractos etanólicos de *Passiflora edulis* var. Flavicarpa para inhibir el crecimiento de la bacteria Gram positiva *Escherichia coli* lo que permite comparar que tanto el extracto etanólico y metanólico del maracuyá inhiben bacterias Gram positivas.

Otros estudios realizados en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí en la Facultad de Agronomía Veterinaria con extractos metanólicos de la planta de gobernadora (*Larrea tridentata*) mostró una buena actividad antimicrobiana de *Clavibacter michiganensis* (Martínez Emmanuel, 2019).

Tratamiento estadístico.

La validación y confiabilidad de nuestros resultados experimentales fueron analizados mediante un tratamiento estadístico $t - Student$ (grafico 6). De esta manera, y retomando que experimentalmente el extracto metanólico de maracuyá fue el mejor tratamiento para inhibir el crecimiento de *Clavibacter michiganensis*; al realizar el análisis estadístico con un nivel de confiabilidad del 95 % se validó dicho resultado. Los datos generados en la estadística se presentan en anexos (anexo 8-14).

Gráfica 6. Valores de Estadístico T de los ensayos de la cinética de crecimiento.



Mediante el análisis del estadístico de prueba t-Student se corroboró que la tendencia observada en la gráfica 6, es significativa a las gráficas 4 y 5; lo que permite observar que el antibiótico comercial resulto ser más efectivo al ser un químico ya probado, el extracto metanólico de maracuyá podrían ser antibacteriano natural eficaz contra la bacteria, ya que también resulta tener una incidencia considerablemente en el desarrollo de la bacteria.

10.3 Ensayo antimicrobiano *In-vivo.*

Después de haber probado todos los tratamientos en *In-vitro* valorando su mejor incidencia sobre el crecimiento de *Clavibacter michiganensis*, se procedió a seleccionar dos grupos de semillas de jitomate infectadas, el primer grupo de semillas no se le aplicó un tratamiento previo antes de su siembra, ya que será el control positivo, mientras el segundo grupo de semillas se sumergió en el extracto metanólico de maracuyá durante una noche a temperatura ambiente y protegidas

de la luz. Los dos grupos de semillas fueron lavadas con agua destilada y cultivadas en un suelo estéril en condiciones controladas en una cámara de crecimiento a 16/8 horas luz-oscuridad, 40% de humedad relativa y 20 °C, desde el inicio y durante cuatro semanas. Después transcurrido el tiempo se procedió a la selección de las hojas con mayor desarrollo y se procedió al aislamiento del patógeno, como ya se ha descrito. Los resultados de la actividad antimicrobiana y el control positivo se representan por el promedio de tres lotes independientes con tres repeticiones cada uno y se muestran en las Tablas 5 y 6 y Graficas 7 y 8

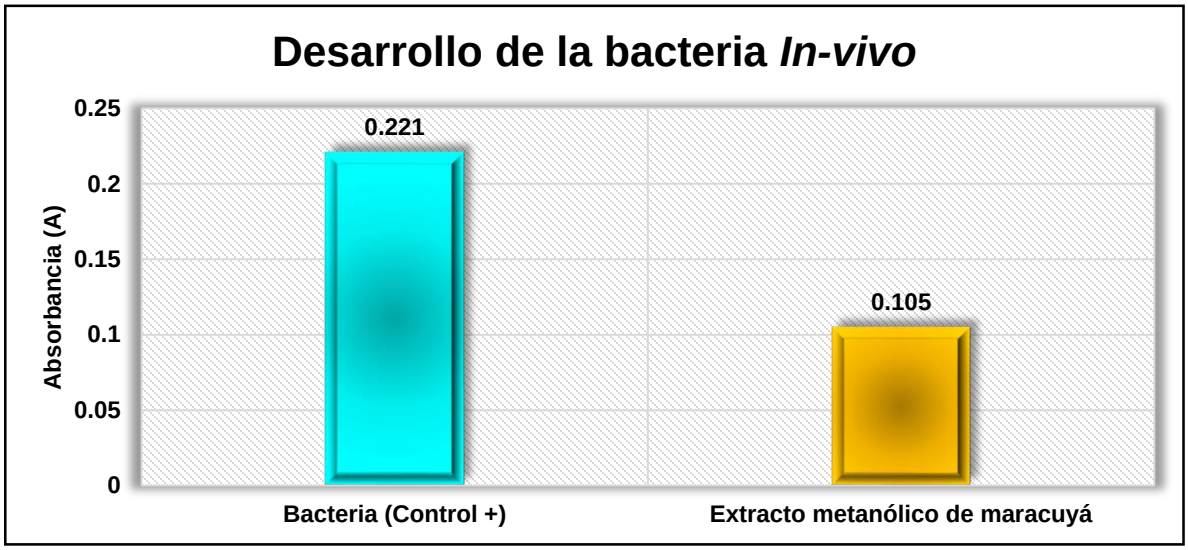
Tabla 5. Promedios en valor de Absorbancia (A) de los diferentes ensayos realizados en *In-vivo* en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria y el extracto metanólico del maracuyá.

Absorbancia (A)		
Tratamiento	Control + Bacteria	Extracto Metanólico Maracuyá (Passiflora edulis)
Lote 1	0.221	0.108
Lote 2	0.222	0.103
Lote 3	0.220	0.104
Promedio	0.221	0.105

En la tabla 5 se presentan los valores de crecimiento antibacteriano registrado indirectamente mediante espectroscopia de UV-Vis a una longitud de onda de 550 nm. En cada lote y ensayo se presenta el promedio de tres repeticiones con los que se obtuvo un gran promedio de crecimiento a 16/8 horas luz-oscuridad de la inoculación del cultivo *in vivo*. Podemos apreciar que el control positivo alcanzó un desarrollo en absorbancia de 0.221 como valor máximo; su tratamiento con el extracto metanólico de maracuyá inhibió el crecimiento hasta 0.105.

A continuación, se presentan los resultados de la tabla de 5 que fueron representados gráficamente; de manera general se puede observar el crecimiento de la cepa Gram positiva de *Clavibacter michiganensis* (Control +), el extracto metanólico de maracuyá.

Gráfica 7. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con el extracto metanólico de maracuyá *in vivo* en valores promedio de Absorbancia (A).



En este experimento se obtuvo como resultado que el extracto metanólico de maracuyá, fue capaz de disminuir la carga bacteriana de *Clavibacter michiganensis* en plántulas de jitomate bajo condiciones controladas, corroborando los resultados *In-vitro,* donde este efecto también fue visible, con la aplicación del extracto la carga bacteriana se logró disminuir un 47.5%.

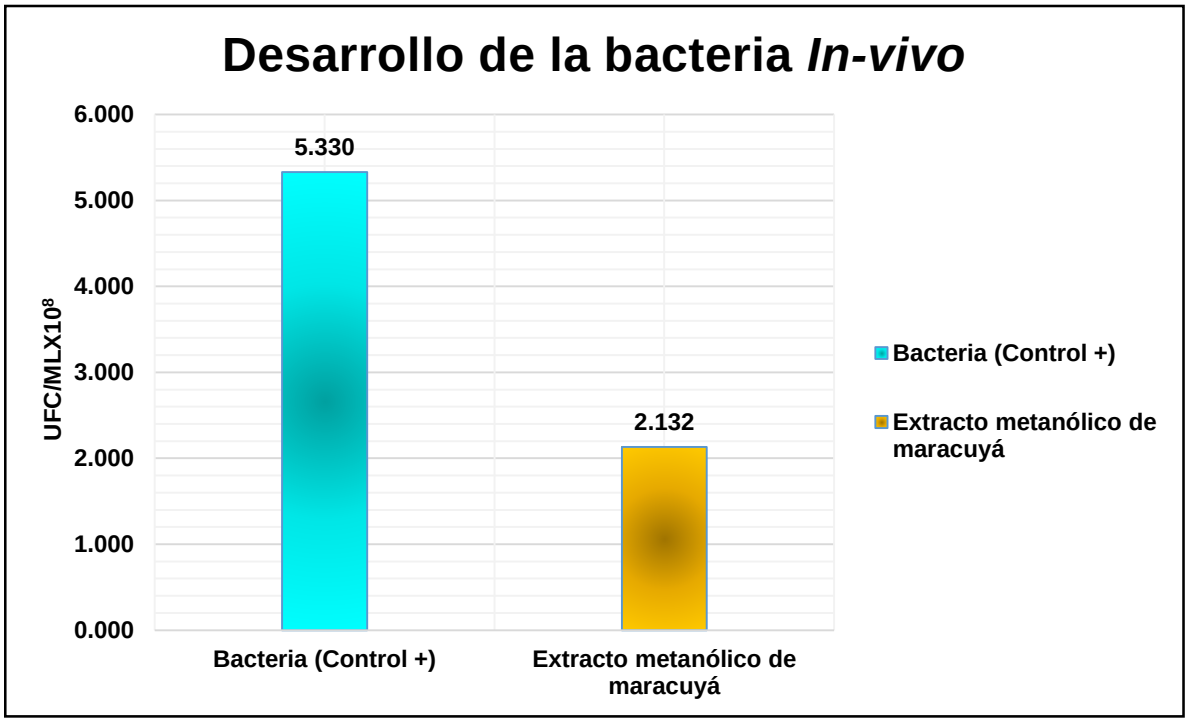
Tabla 6. Promedios en valor de UFC/mLX10^8 de los diferentes ensayos realizados en *In-vivo* en tres lotes independientes, con el control positivo bacteria y el extracto metanólico del maracuyá.

UFC/mLX10^8		
Tratamiento	Control + Bacteria	Extracto Metanólico Maracuyá (Passiflora edulis)
Lote 1	5.329965	2.21512
Lote 2	5.35753	2.077295
Lote 3	5.3024	2.10486
Promedio	5.330	2.132

Con respecto a los datos de la tabla 6 estos fueron obtenidos de la tabla 5 que fueron convertidos a unidades formadoras de colonia tomando como base un gráfico experimental que anteriormente se había trabajado (Ortiz Méndez JM, 2019). Ajustando él inoculo inicial a X UFC/mL en todos los tratamientos. Por consiguiente, después de transcurrido el tiempo del desarrollo de las plántulas de jitomate y haber seleccionado las hojas de los dos ensayos, se procedió a tomar los datos de la

actividad microbiana en tres lotes diferentes con tres repeticiones cada uno (gráfica 8).

Gráfica 8. Inhibición de *Clavibacter michiganensis* con el extracto metanólico de maracuyá *in vivo* en valores promedio de unidades formadoras de colonia (UFC/mL x 10^8)



Los resultados de la tabla 7 fueron representados gráficamente; de manera general se puede observar que en la fase experimental *in vivo* al aplicar el extracto metanólico de maracuyá en las semillas de jitomates infectadas con la bacteria *Clavibacter michiganensis* y transcurrido el tiempo de crecimiento mencionado, selección de hojas con mayor desarrollo y posteriormente el aislamiento de la bacteria, se obtiene los resultados en valor de UFC/mLX10^8 y se observa que el control positivo tuvo un valor de 5.330 y el extracto metanólico de maracuyá 2.132 al comparar ambas mediaciones podemos observar que hubo una disminución del 47.5% que este valor nos indica que el extracto metanólico de maracuyá es un candidato idóneo como antibiótico natural contra la bacteria *Clavibacter michiganensis.*

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

11. CONCLUSIONES.

- De los seis tratamientos, el extracto metánolico de maracuyá fue el más efectivo contra *Clavibacter michiganensis.* Con el cual se observó una inhibición del 47.5% en fase experimental de *in-vivo*.
- El extracto metanólico de la *Passiflora edulis f. flavicarpa* arrojó considerables efectos antimicrobianos sobre *Clavibacter michiganensis,* por lo tanto, se sugiere replicar los ensayos en laboratorio para mostrar su eficacia en plantas de jitomates enfermas.
- De los seis tratamientos se puede concluir que por los menos cuatro fueron significativos.
- Los extractos de *Hibiscus sabdariffa* fueron los menos eficientes contra la bacteria *Clavibacter michiganensis.*
- Esta investigación ofrece una alternativa amigable para desarrollar productos antimicrobianos naturales, disminuyendo en campo el uso de agentes de origen químico, favoreciendo la salud y el ambiente.

12. PERSPECTIVAS.

- Realizar pruebas con diferentes solventes y/o métodos de extracción para observar si hay mayor incidencia sobre el crecimiento bacteriano.
- Preparar los cultivos de los extractos en condiciones controladas para obtener un mayor y mejor rendimiento.
- Se recomienda profundizar la investigación en la caracterización fitoquímica enfocada a esclarecer la composición, cantidades y el tipo de fenoles o metabolitos asociados con el efecto inhibitorio sobre esta y otras cepas bacterianas.
- Realizar antibiogramas y halos de inhibición
- Evaluar el efecto del tipo de tejido y la edad de las plantas con los rendimientos y eficiencia de la propiedad evaluada.

REFERENCIAS

13. REFERENCIAS.

1. Amarula. (23 de mayo de 2009). flordejamaica.org. Obtenido de flordejamaica.org: http://www.flordejamaica.org/index.htm
2. Azmir J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahen, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., Omar, A., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. J. Food Eng. 117, 426–436.
3. B. O. Akanbi, O. D. Bodunrin, and S. Olayanju, "Phytochemical screening and antibacterial activity of Passiflora edulis," Researcher, vol. 3, no. 5, pp. 9–12, 2011.
4. Borboa, F. J.; Rueda, P. E.; Acedo, F. E.; Ponce, J. F.; Cruz, M.; Grimaldo, J. O. y García, O. A. M. 2009. Detección de Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis en el tomate del estado de Sonora, México. Rev. Fitotec. Mex. 32(4):319-326.
5. De León, L.; Siverio, F.; López, M. M. and Rodríguez, A. 2011. Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. Plant dis. 95(11):1328-1338.
6. Dzotam, J. K., Touani, F. K., and Kuete, V. (2016). Antibacterial and antibioticmodifying activities of three food plants (Xanthosoma mafaffa Lam., Moringa oleifera (L.) Schott and Passiflora edulis Sims) against multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria. BMC Complement. Altern. Med. 16, 1–8. doi:10.1186/s12906-016-0990-7
7. E.M. Abdallah, Antibacterial activity of Hibiscus sabdariffa L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant Acinetobacter baumannii, J. Acute Dis. 5 (6) (2016) 512–516.
8. EPPO. 2010. Diagnostics. Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus. Bulletin 40:353-364.
9. Fatmi, M. and Schaad N. W. 2002. Survival of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in infected tomato stems under natural field conditions in California. Ohio, and Morocco. Plant Pathol. 51:149-154.
10. Flores, D. 2014. Mexico: tomato annual: production down slightly next year while exports up slightly. USDA foreign agricultural service. Gain report number: MX4043.
11. Ceferino Flores; Sebastián Buono; Sergio Giorgini. Enfermedades de tomate: guía de consulta, 1a ed. – Yuto: Ediciones INTA, 2012.
12. Green RJ (2004). Antioxidant Activity of Peanut Plant Tissues. Master's Thesis. North Carolina State University. USA.
13. Alshami, A.E. Alharbi, Hibiscus sabdariffa extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of Candida albicans isolated from recurrent urinary tract infections, Asian Pac. J. Trop. Biomed. 4 (2) (2014) 104–108.

14. Jabeur, E. Pereira, L. Barros, R.C. Calhelha, M. Soković, M.B.P. Oliveira, I.C.F.R. Ferreira, Hibiscus sabdariffa L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents, Food Res. Int. 100 (2017) 717–723.
15. Ipek Suntar, Haroon Khan, Seema Patel, Rita Celano and Luca Rastrelli (2018) An Overview on Citrus aurantium L.: Its Functions as Food Ingredient and Therapeutic Agent, Hindawi Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume 2018, Article ID 7864269, 12 pages https://doi.org/10.1155/2018/7864269
16. J. Zhen, T. Villani, Y. Guo, Y. Qi, K. Chin, M.-H. Pan, C.-T. Ho, J.E. Simon, Q. Wu, Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of Hibiscus sabdariffa leaves, Food Chem. 190 (2015) 673–680.
17. J.M. Nzikou, G. Bouanga-Kalou, L. Matos, F.B. Ganongo-Po, P.S. Mboungou- Mboussi, F.E. Moutoula, E. Panyoo-Akdowa, T.H. Silou, S. Desorby, Characteristics and nutritional evaluation of seed oil from roselle (Hibiscus sabdariffa L.) in Congo- Brazzaville, Curr. Res. J. Biol. Sci. 3 (2) (2011) 141–146.
18. Manza M. J. A. 2005 Producción y Comercialización de Maracuyá en México Disponible en Biblioteca UAAAN.
19. Martínez Castro Emmanuel (2019) EXTRACTOS DE ESPECIES VEGETALES NATIVAS DE SAN LUIS POTOSÍ PARA CONTROL DEL FITOPATÓGENO Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis" [Tesis de grado] UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
20. Natalia Manousi, Ioannis Sarakatsianos, Victoria Samanidou (2019) EXTRACTION TECHNIQUES OF PHENOLIC COMPOUNDS AND OTHER BIOACTIVE COMPOUNDS FROM MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS Engineering Tools in the Beverage Industry. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815258-4.00010-X
21. Ncube N. S., Afolayan A. J., Okoh A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. 2008
22. Normas regionales de la NAPPO (NAPPO). 2013. Organización norteamericana de protección a las plantas sobre medidas fitosanitarias (NRMF):1-8 pp.
23. Ortiz Méndez José Miguel, Jiménez Romano Guadalupe, Hinojosa Moya J. Jesús (2019), en prensa.
24. Pereira Abarca, V. P. (2015) ESTUDIO A LA APLICACIÓN DE TRES FRECUENCIAS Y DOS DOSIS DE N-P-K MÁS UNA FÓRMULA DE FERTILIZANTE FOLIAR EN EL CULTIVO DE MARACUYÁ [Tesis de grado] Universidad de Guayaquil.
25. Pereira, M. G., Maciel, M. G., Haminiuk, G. M., Hamerski, C. W. I., Bach, F., Hamerski, F., et al. (2019). Effect of extraction process on composition, antioxidant and antibacterial activity of oil from Yellow Passion Fruit (Passiflora edulis Var. Flavicarpa) Seeds. Waste Biomass Valorizati. 10, 2611–2625. doi: 10.1007/s12649-018-0269-y

26. Pino, N. y H. Valois. 2004. Ethnobotanical of four black communities of municipality of Quibdó, Choco-Colombia. Lyona, Journal Ecology and Application: 7(2). 1-9.
27. Ramaiya, S. D., Bujang, J. S., and Zakaria, M. H. (2014). Assessment of total phenolic, antioxidant, and antibacterial activities of Passiflora species. Hindawi Publ. Corp. 2014, 167309. doi: 10.1155/2014/167309.
28. Robards K (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. J Chromatog A 1000:657–691
29. Rotta, E. M., Rodrigues, C. A., Jardim, I. C. S. F., Maldaner, L., and Visentainer, J. V. (2019). Determination of phenolic compounds and antioxidant activity in passion fruit pulp (Passiflora spp.) using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. LWT– Food Sci. Technol. Int. 100, 397–403. doi: 10.1016/ j.lwt.2018.10.052.
30. S. Kannan, B. P. Devi, and B. Jayakar, “Antifungal activity of isolated compound from the leaves of Passiflora edulis Sims,” Current Pharma Research, vol. 1, no. 1, pp. 35–37, 2010.
31. SENGUL M, YILDIZ H, GUNGOR N, CETIN B, ESER Z, ERCISLI S. 2009. Total phenoliccontent, antioxidan and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pak. J. Pharm. Sci.
32. SISTEMA DE INFORMACIÓN AGROALIMENTARIA Y PESQUERA (SIAP). 2021 Escenario mensual de productos agroalimentarios Jitomate Rojo https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/621464/Escenario_Tomate_rojo__Jitomate__feb_2021.pdf
33. Thangaraj, P., Parimelazhagan, T., 2016. Pharmacological Assays of Plant-Based Natural Products, vol. 71. Springer International Publishing.
34. Thomas, B., Vithiya, B. S. M., Prasad, T. A. A., Mohamed, S. B., Magdalane, C. M., Kaviyarasu, K., et al. (2019). Antioxidant and photocatalytic activity of aqueous leaf extract mediated green synthesis of Silver Nanoparticles using Passiflora edulis f. Flavicarpa. J. Nanosci. Nanotechnol. 19, 2640–2648. doi: 10.1166/ jnn.2019.16025
35. TSUCHIYA H, IINUMA M. 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from Sophora exigua. Phytomedicine. 7(2):161-165.
36. Xirui He, Luan F, Yang Y, Wang Z, Zhao Z, Fang J, Wang M, Zuo M and Li Y (2020) Passiflora edulis: An Insight into Current Researches on Phytochemistry and Pharmacology. Front. Pharmacol. 11:617. doi: 10.3389/fphar.2020.00617
37. Zas, P., and John, S. (2017). Phytochemical investigation and antioxidant activities of Passiflora edulis (Passion fruit) leaves from Ukhrul district, Manipur, India. World J. Pharm. Res. 6, 793–801. doi: 10.20959/wjpr201714-9978.

ANEXOS

14. ANEXOS.

Anexo 1: Resultados de la prueba T-Student Bacteria-Kanamicina Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Kanamicina
Media Absorbancia (A)	0.996111111	0.028333333
Varianza Absorbancia (A)	9.61111E-06	0.000181
Media UFC/mLX10^8.	26.69590278	0.019108333
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302803	0.13752909
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	9.53056E-05	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.072415946	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	210.2920205	
P(T<=t) una cola	2.87526E-29	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	5.75052E-29	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p ≤ α → p. valor= 2.87E-29 ≤ α = 0.05

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t ≥ t_0 → t= 210.29295 ≥ t_0= 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 2: Resultados de la prueba T-Student Bacteria-Maracuyá Acuoso Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Maracuyá Acuoso
Media Absorbancia (A)	0.996111111	0.548
Varianza Absorbancia (A)	9.61111E-06	0.00001375
Media UFC/mLX10^8.	26.69590278	14.34372
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302803	0.010447652
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	1.16806E-05	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.008875227	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	278.137931	
P(T<=t) una cola	3.28236E-31	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	6.56472E-31	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p ≤ α → p. valor= 3.28E-31 ≤ α = 0.05

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t ≥ t_0 → t= 278.137931 ≥ t_0 = 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 3: Resultados de la prueba T-Student Bacteria-Maracuyá Metanólico Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Maracuyá Metanólico
Media Absorbancia (A)	0.996111111	0.117888889
Varianza Absorbancia (A)	9.61111E-06	4.111E-06
Media UFC/mLX10^8.	26.69590278	2.487707222
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302803	0.003123742
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	6.86111E-06	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.005213273	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	711.2355447	
P(T<=t) una cola	9.83E-38	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	1.96671E-37	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p ≤ α → p. valor= 9.83E-38 ≤ α = 0.05

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t ≥ t_0 → t= 711.2355447 ≥ t_0 = 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 4: Resultados de la prueba T-Student Bacteria-Naranja Agria Acuoso Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Naranja Agria Acuoso
Media Absorbancia (A)	0.996111111	0.652666667
Varianza Absorbancia (A)	9.61111E-06	2.25E-06
Media UFC/mLX10^8.	26.69590278	17.22885667
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302803	0.001709616
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	5.93056E-06	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.004506209	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	299.1679484	
P(T<=t) una cola	1.02282E-31	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	2.04565E-31	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p ≤ α → p. valor= 1.02E-31 ≤ α = 0.05

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t ≥ t_0 → t= 299.1670484 ≥ t_0 = 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 5: Resultados de la prueba T-Student Bacteria-Naranja Agria Metanólico Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Naranja Agria Metanólico
Media Absorbancia (A)	0.996111111	0.59633333
Varianza Absorbancia (A)	9.61111E-06	1.50E-06
Media UFC/mLX10^8.	26.69590278	15.67602833
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302803	0.001139744
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	5.55556E-06	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.004221273	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	359.8	
P(T<=t) una cola	5.34E-33	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	1.06825E-32	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p $\leq \alpha \rightarrow$ p. valor= 5.34E-33 $\leq \alpha = 0.05$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t $\geq t_0 \rightarrow$ t= 359.8 $\geq t_0 = 1.745883676$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 6: Resultados de la prueba T-Student Bacteria-Jamaica Acuoso Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Jamaica Acuoso
Media Absorbancia (A)	0.996111111	0.995333
Varianza Absorbancia (A)	9.61111E-06	1.50E-06
Media UFC/mLX10^8.	26.69590278	26.67446333
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302803	0.001139744
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	5.55556E-06	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.004221273	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	0.7	
P(T<=t) una cola	0.246990244	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	0.493980489	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p $\leq \alpha \rightarrow$ p. valor= 0.025 $\geq \alpha$ = 0.05

  Decisión: No se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t $\geq t_0 \rightarrow$ t= 0.7 $\leq t_0$ = 1.745883676

  Decisión: No se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 7: Resultados de la prueba T-Student Bacteria-Jamaica Metanólico Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Jamaica Metanólico
Media Absorbancia (A)	0.996111111	0.794
Varianza Absorbancia (A)	9.61111E-06	1.33E-05
Media UFC/mLX10^8.	26.69590278	21.12471
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302803	0.010067737
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	1.14306E-06	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.00868527	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	126.8127081	
P(T<=t) una cola	9.36E-26	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	1.8715E-25	
Valor crítico de t (dos colas)	2.119905299	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p $\leq \alpha \rightarrow$ p. valor= 9.36E-26 $\leq \alpha = 0.05$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t $\geq t_0 \rightarrow$ t= 126.8127081 $\geq t_0 = 1.745883676$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 8: Resultados de la prueba T-Student Cinética de crecimiento Bacteria-Kanamicina, Bacteria-Maracuyá Metanólico 0 horas Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales			
	Bacteria	Kanamicina	Maracuyá Metanólico
Media Absorbancia (A)	0.0276292	0.0276292	0.0276292
Varianza Absorbancia (A)	1.35416E-35	1.35416E-35	1.35416E-35
Media UFC/mLX10^8.	1E-11	1E-11	1E-11
Varianza UFC/mLX10^8.	2.93638E-54	2.93638E-54	2.93638E-54
Observaciones	9	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	1.3541E-35		
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	2.9363E-54		
Grados de libertad	16		
Alfa (α)	0.05		
Estadístico t	0		
P(T<=t) una cola	0.5		
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676		
P(T<=t) dos colas	1		
Valor crítico de t (dos colas)	2.1199		

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p $\leq \alpha \rightarrow$ p. valor= 0.05 $\geq \alpha$ = 0.05

  Decisión: No se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t $\geq t_0 \rightarrow$ t= 0 $\leq t_0$ = 1.745883676

  Decisión: No se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 9: Resultados de la prueba T-Student Cinética de crecimiento Bacteria-Kanamicina 6 horas Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Kanamicina
Media Absorbancia (A)	0.372444	0.0197
Varianza Absorbancia (A)	2.92E-05	4.70E-07
Media UFC/mLX10^8.	9.5045311	-0.2188695
Varianza UFC/mLX10^8.	0.02218	0.0003571
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	1.4836E-05	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.01127312	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	194.2684	
P(T<=t) una cola	1.0214E-28	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	2.0428E-28	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1199	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p $\leq \alpha \rightarrow$ p. valor= 1.0214E-28 $\leq \alpha = 0.05$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t $\geq t_0 \rightarrow$ t= 194.2684 $\geq t_0 = 1.745883676$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 10: Resultados de la prueba T-Student Cinética de crecimiento Bacteria-Maracuyá Metanólico 6 horas Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Maracuyá Metanólico
Media Absorbancia (A)	0.372444	0.251222
Varianza Absorbancia (A)	2.92028E-05	3.69444E-06
Media UFC/mLX10^8.	9.504531	6.163040
Varianza UFC/mLX10^8.	0.221891	0.002807
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	1.64486-E05	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.012498	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	63.4050	
P(T<=t) una cola	5.99809E-21	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	1.19962E-20	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1199	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p $\leq \alpha \rightarrow$ p. valor= 5.99809E-21 $\leq \alpha = 0.05$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t $\geq t_0 \rightarrow$ t= 63.4050 $\geq t_0 = 1.745883676$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 11: Resultados de la prueba T-Student Cinética de crecimiento Bacteria-Kanamicina 12 horas Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Kanamicina
Media Absorbancia (A)	0.996111	0.028333
Varianza Absorbancia (A)	9.611111E-06	0.000181
Media UFC/mLX10^8.	26.695902	0.019108
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302	0.137529
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	9.53056E-05	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.072415	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	210.2920205	
P(T<=t) una cola	2.87526E-29	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	5.75052E-29	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1199	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p ≤ α → p. valor= 2.87526E-29 ≤ α = 0.05

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t ≥ t_0 → t= 210.2920205 ≥ t_0 = 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 12: Resultados de la prueba T-Student Cinética de crecimiento Bacteria-Maracuyá Metanólico 12 horas Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Maracuyá Metanólico
Media Absorbancia (A)	0.996111	0.153333
Varianza Absorbancia (A)	9.611111E-06	0.00002525
Media UFC/mLX10^8.	26.695902	3.464733
Varianza UFC/mLX10^8.	0.007302	0.019185
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	1.74306E-05	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.013244246	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	428.2168159	
P(T<=t) una cola	3.29703E-34	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	6.59406E-34	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1199	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p ≤ α → p. valor= 3.29703E-34 ≤ α = 0.05

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t ≥ t_0 → t= 428.2168159≥ t_0 = 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 13: Resultados de la prueba T-Student Cinética de crecimiento Bacteria-Kanamicina 18 horas Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Kanamicina
Media Absorbancia (A)	0.996311	0.24855
Varianza Absorbancia (A)	4.38611E-07	2.0020E-05
Media UFC/mLX10^8.	26.701415	0.015211
Varianza UFC/mLX10^8.	0.000333	0.015211
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	1.02294E-05	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.007772631	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	644.3223098	
P(T<=t) una cola	4.77806E-37	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	9.55611E-37	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1199	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p ≤ α → p. valor= 4.77806E-37 ≤ α = 0.05

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t ≥ t_0 → t= 210.2920205 ≥ t_0 = 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Anexo 14: Resultados de la prueba T-Student Cinética de crecimiento Bacteria-Maracuyá Metanólico 18 horas Absorbancia (A) / UFC/mLX10^8.

Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	Bacteria	Maracuyá Metanólico
Media Absorbancia (A)	0.996311	0.117888
Varianza Absorbancia (A)	4.38611E-07	4.11111E-06
Media UFC/mLX10^8.	26.701415	2.487707
Varianza UFC/mLX10^8.	0.000333	0.003123
Observaciones	9	9
Varianza agrupada Absorbancia (A)	2.27486E-06	
Varianza agrupada UFC/mLX10^8.	0.001728506	
Grados de libertad	16	
Alfa (α)	0.05	
Estadístico t	1235.469782	
P(T<=t) una cola	1.43113E-41	
Valor crítico de t (una cola)	1.745883676	
P(T<=t) dos colas	2.86227E-41	
Valor crítico de t (dos colas)	2.1199	

Hipótesis:

$H_0 = \mu_1 \leq \mu_2$

$H_a = \mu_1 > \mu_2$

- **Regla de rechazo: método del valor-p.**

  Rechazar H_0 si valor-p $\leq \alpha \rightarrow$ p. valor= 1.43113E-41 $\leq \alpha = 0.05$

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

- **Regla de rechazo: método del valor crítico.**

  Rechazar H_0 si estadístico t $\geq t_0 \rightarrow$ t= 1235.469782 $\geq t_0$ = 1.745883676

  Decisión: Se rechaza la hipótesis nula.

Complejo Regional Centro

Tecamachalco