



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE CUATRO PARTES DEL ÁRBOL DE ARRAYÁN
(*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) SOBRE
MICROORGANISMOS ENTEROPATÓGENOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL

P R E S E N T A:

IRIS MONTSERRAT VALENCIA VALLE

(No. DE CUENTA: 1322491, 41a Generación)

MODALIDAD: TESIS INDIVIDUAL

El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México, febrero 2022.





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**“EFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE CUATRO PARTES DEL ÁRBOL DE ARRAYÁN
(*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) SOBRE
MICROORGANISMOS ENTEROPATÓGENOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO AGRÓNOMO INDUSTRIAL

PRESENTA:

IRIS MONTSERRAT VALENCIA VALLE

(No. DE CUENTA: 1322491, 41a Generación)

Asesor Académico:

Dra. Dora Luz Pinzón Martínez

Asesor Adjunto:

Dra. María Dolores Mariezcurrena Berasain.



El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México, febrero, 2022.

RESUMEN

El arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) es un árbol y un recurso natural de climas subhúmedos poco estudiado, cuya producción es reportada en el Estado de Nayarit, aunque también se reporta en Sinaloa, y en algunos municipios de Sonora, Oaxaca, Michoacán, Estado de México, Veracruz, Chiapas, entre otras pocas, entidades federativas. El fruto recibe el mismo nombre y agroindustrialmente ha tenido presencia para la elaboración de licores y dulces, entre otros productos. Como parte de las especies del género *Psidium* es identificado como una opción potencial de importantes metabolitos. Entre los pocos reportes disponibles, las hojas y frutos se han utilizado principalmente, para aliviar padecimientos gastrointestinales y como adyuvante en la cicatrización de heridas, respectivamente. Por otro lado, en el ámbito agropecuario se requiere cada vez más de antimicrobianos y principalmente, que éstos sean de origen natural. Lo cual, ha dado lugar a un amplio número de investigaciones dirigidas a encontrar actividades biológicas, como la antibacteriana en plantas o arbustos medicinales, como ya largamente se ha reportado para Iguayaba (*Psidium guajava*). Cuya actividad antimicrobiana se ha analizado en extractos vegetales con etanol o metanol, u otros solventes polares y no polares, sobre diversas cepas bacterianas patógenas.

Así, existen muy pocos reportes sobre el arrayán a lo largo de la república mexicana tanto como una especie medicinal que consideren su potencial antimicrobiano como opción ante la necesaria búsqueda de antimicrobianos naturales efectivos dentro del sector agroalimentario. Por todo lo anterior, en el presente trabajo se estudió el efecto de la actividad antibacteriana de cuatro partes del árbol de arrayán *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied (fruto, semilla, hoja y corteza) en extractos

etanólicos 50% sobre los microorganismos enteropatógenos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 25922, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, principalmente.

El material biológico consistió en hojas, corteza, semilla y frutos de especímenes del estado de Guerrero para preparar extractos de las partes vegetales mediante maceración en etanol 50%. Se realizó la identificación de la dosis de menor concentración de cada extracto para proceder a analizar la inhibición del crecimiento bacteriano por efecto de los extractos, bajo el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Kirby-Bauer, con algunas modificaciones. Los resultados obtenidos, diámetros (mm) de los halos de inhibición, se sometieron a un análisis de varianza simple (ANDEVA) al 95% de confianza. Cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) se realizó una prueba de comparación de medias de Tuckey al 5%. Todas las cepas fueron inhibidas con diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) por todos los extractos estudiados, bajo las condiciones ensayadas. Los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, fueron inhibidos no solamente por los extractos de hojas y de frutos como la literatura ha reportado, sino también por los de semilla y corteza. Finalmente, se sugirió que los extractos vegetales en etanol 50% de las partes del árbol de arrayán estudiadas en el presente trabajo tienen potencial para ser utilizados y estudiados como antimicrobianos naturales en la vida de anaquel de diversos productos agropecuarios.

ABSTRACT

Arrayan (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) is a tree and a natura resource from sub-humid climates that has been little studied. Its production is reported mainly at Nayarit State; although, its presence has been also reported at Sinaloa, Sonora, Oaxaca, Michoacan, Mexico State, Veracruz, Chiapas, among other states. Arrayan fruit has the same name and in agroindustrial sector it was used to preparade liqueur and candies, and some traditional food products.

As a *Psidium* gender specie it has been identified as a second metabolites potential source. There were few reports available for arrayan, which mainly focused on leaves or fruits effects over some gastrointestinal illness or wound healing, respectably. In the other hand, in agroindustrial and food technology sectors more and more natural antimicrobials are required; then, several researchers were made to identify antibacterial activity from medicinal plants, trees or shrubberies. It has been well reported in guajava (*Psidium gujava*) ethanol and aqueous extracts or with some other polar or no polar solvents with an antibacterial effect over important pathogens bacteria strains

Throughout the Mexican Republic arrayan trees as a medicinal specie there were few scientific information available about its antimicrobial potential and there is an antibacterial natural sources screen needed in agroindustrial and food technology areas. Then, the main objective of the present research was to analyze the antibacterial activity from four different parts (leaves, bark, fruits, and seeds) arrayan tree *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied as 50% ethanolic extracts over enteropathogenic microorganisms such as *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica serotipo Enteritidis* ATCC 25922, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.

Vegetative material used was sampled at Guerrero State and it was used to prepare vegetal extracts per each vegetative (leaves and bark) and reproductive (seeds and fruits) tree parts y maceration

methodology in 50 ethanol solutions. First, the determination of the antibacterial effect from the less concentration doses per extract was made; after this, the bacterial inhibition growing effect was studied by the Kirby-Bauer disc superficial diffusion method with some modifications. Inhibition halos diameters sizes (mm) registered were analyzed by an Analysis of Variance (ANOVA) 95% confidence and significant statistical differences ($p \leq 0.05$) were analyzed by a Tuckey 5% mean comparison test. All bacterial strains grown were inhibited with significant statistical differences ($p \leq 0.05$) for all the vegetal extracts studied over the conditions tested. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 microorganisms were inhibited not only by leaves and fruits extracts, as literature has already mentioned, but also by bark and seeds extracts. Finally, it could be suggested that 50% ethanol fruits, seeds, bark and leaves extracts studied in the present report were considered as putative natural antimicrobials, which required more specific research to be used as antibacterial agents in life stock agroindustrial products.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE GENERAL	VII
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo General	4
2.2. Objetivos Específicos	4
III. HIPÓTESIS	5
IV. JUSTIFICACIÓN	6
V. REVISIÓN DE LITERATURA	7
5.1. Características generales de <i>P. sartorianum</i> (O. Berg) Nied	7
5.1.1. Taxonomía de <i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied	7
5.1.2. Corteza	7
5.1.3. Hojas	7
5.1.4. Fruto y semilla	8
5.1.5. Usos del árbol de arrayán	8
5.2. Extractos vegetales	8
5.2.1. Metabolitos primarios	9
5.2.2. Metabolitos secundarios	9
5.3. Tipos de extracción de extractos vegetales.....	9
5.3.1. Maceración	9
5.3.2. Percolación	9
5.3.3. Digestión	10
5.3.4. Infusión	10
5.3.5. Decocción	10

5.4.	Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)	10
5.4.1.	Inocuidad de los alimentos	11
5.5.1	Estructura celular de la bacteria	13
5.5.1.1.	Estructura interna	13
5.5.1.2.	Estructura externa	13
5.5.3.	Resistencia bacteriana	14
5.5.4.	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15
5.5.5.	<i>Listeria innocua</i> AST-062	16
5.5.7.	<i>Enterococcus</i> sp.	17
5.5.8.	Género <i>Salmonella</i>	17
5.5.9.	<i>Pseudomonas</i> sp.	17
5.5.11.	<i>Klebsiella</i> sp.	19
5.5.12.	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	20
5.6.	Control con antimicrobianos para microorganismos patógenos	21
5.7.	Metodologías para evaluación <i>in vitro</i> de actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal	22
5.7.1.	Método de difusión en agar	22
5.7.2.	Método de dilución	22
5.7.3.	Bioautografía	23
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1.	FASE I Preparación de los extractos vegetales	24
6.1.1.	Recolección del material vegetal	24
6.1.2.	Desinfección del material vegetal	25
6.1.3.	Secado del material vegetal	25
6.1.4.	Molienda del material vegetal	26
6.1.5.	Obtención de los extractos por el método de maceración	26
6.1.6.	Esterilización de los extractos por filtración	27
6.2.	FASE II pruebas microbiológicas	27
6.2.1.	Activación de microorganismos	27
6.2.2.	Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos del árbol de arrayán	28
6.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL	29
6.3.1.	Diseño estadístico	29

VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1	Determinación de la concentración mínima con actividad antimicrobiana para cada extracto	31
7.2	Actividad antimicrobiana	32
7.2.1.	Extracto de hojas de arrayán	33
7.2.2.	Extracto de corteza del árbol de arrayán	38
7.2.3.	Extracto de semilla del fruto de arrayán	41
7.2.4.	Extracto de fruto	45
VIII.	CONCLUSIONES	50
IX.	RECOMENDACIONES	52
X.	BIBLIOGRAFÍA	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de la comparación de medias Duncan 5% de las dosis a menor concentración que presentaron actividad antimicrobiana.....	31
Cuadro 2. Prueba de comparación de medias (Duncan 5%) del efecto de inhibición de los cuatro extractos de <i>Psidium sartorianum</i> (O. Berg) Nied sobre las diez bacterias y de la comparación del efecto de inhibición entre los extractos sobre cada una de las cepas microbianas bajo las condiciones ensayadas.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Deshidratación de hojas (A), corteza (B), fruto y semilla del fruto de arrayán (C).....	25
Figura 2. Molienda de las muestras.....	26
Figura 3. Baño maría de los extractos.....	27
Figura 4. Obtención del eluyente a partir de filtrado de los extractos.....	27
Figura 5. Acrodisco estériles utilizados	27
Figura 6. Esterilización por filtración de los extractos.....	27
Figura 7. Diámetros (cm) de los halos de inhibición presentados en el extracto de hojas de arrayán frente a las diez bacterias.....	34
Figura 8. <i>E. coli</i> ATCC 25922 en extracto de hojas.	35
Figura 9. <i>L. innocua</i> AST-062 en extracto de hojas.....	35
Figura 10. <i>B. subtilis</i> ATCC-662 en extracto de hojas.	35
Figura 11. <i>Enterococcus</i> sp. en extracto de hojas.....	35
Figura 12. <i>Salmonella entérica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> ATCC 13076 en extracto de hojas.....	36
Figura 13. <i>Pseudomona</i> sp. en extracto de hojas.....	36
Figura 14. <i>Staphylococcus</i> sp. en extracto de hojas.....	36
Figura 15. <i>Salmonella</i> sp. en extracto de hojas.....	36
Figura 16. <i>Klebsiela</i> sp. en extracto de hojas.....	37
Figura 17. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 en extracto de hojas.....	37
Figura 18. Diámetros (cm) de halos de inhibición presentados en el extracto de corteza de arrayán frente a las diez bacterias.....	39
Figura 19. <i>Salmonella enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> ATCC 13076 en extracto de corteza.....	40
Figura 20. <i>Pseudomonas</i> sp. en extracto de corteza.....	40
Figura 21. <i>Staphylococcus</i> sp. en extracto de corteza.....	40

Figura 22. <i>Salmonella</i> sp. en extracto de corteza.....	40
Figura 23. <i>Klebsiella</i> sp. en extracto de corteza.....	41
Figura 24. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 en extracto de corteza.....	41
Figura 25. Diámetros (cm) de halos de inhibición presentados por el extracto de semilla de arrayán frente a las diez bacterias ensayadas.....	42
Figura 26. <i>E. coli</i> ATCC 25922 en extracto de semilla.....	43
Figura 27. <i>L. innocua</i> AST-062 en extracto de semilla.....	43
Figura 28. <i>B. subtilis</i> ATCC-662 en extracto de semilla.....	43
Figura 29. <i>Enterococcus</i> sp. en extracto de semilla.....	43
Figura 30. <i>Salmonella entérica</i> serotipo <i>enteritidis</i> ATCC 13076 en extracto de semilla.....	44
Figura 31. <i>Pseudomonas</i> sp. en extracto de semilla.....	44
Figura 32. <i>Staphylococcus</i> sp. en extracto de semilla.....	44
Figura 33. <i>Salmonella</i> sp. en extracto de semilla.....	44
Figura 34. <i>Klebsiella</i> sp. en extracto de semilla.....	45
Figura 35. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19116 en extracto de semilla.....	45
Figura 36. Diámetros (cm) de halos de inhibición presentados en el extracto de fruto de arrayán frente a las diez bacterias estudiadas.....	46
Figura 37. <i>E. coli</i> ATCC-662 en extracto de fruto.....	47
Figura 38. <i>L. innocua</i> AST-062 en extracto de fruto.....	47
Figura 39. <i>B. subtilis</i> ATCC-662 en extracto de fruto.....	47
Figura 40. <i>Enterococcus</i> sp. en extracto de fruto.....	47
Figura 41. <i>Salmonella entérica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> ATCC 13076 en extracto de fruto.....	48
Figura 42. <i>Pseudomonas</i> sp. en extracto de fruto.....	48
Figura 43. <i>Staphylococcus</i> sp. en extracto de fruto.....	48

Figura 44. <i>Salmonella</i> sp. en extracto de fruto.....	48
Figura 45. <i>Klebsiella</i> sp. en extracto de fruto.....	49
Figura 46. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 en extracto de fruto.....	49

I. INTRODUCCIÓN

En México las plantas tienen una gran variedad de usos, destacando el medicinal y alimenticio, sin dejar atrás los usos como colorantes, aromatizantes, maderables, combustibles, materias primas para artesanías y forrajes entre otros (Caballero *et al.*, 1998).

La investigación científica ha cobrado mayor interés sobre las plantas medicinales, sugiriéndolas como material potencial para la prevención de las enfermedades, debido a la resistencia bacteriana que se ha generado por el uso inmoderado de antibióticos (Narayanan *et al.*, 2011; Gupta y Birdi, 2017). Durante el último siglo las plantas medicinales han generado importancia en extractos naturales y extractos de aceites esenciales por su actividad antimicrobiana. Los aceites esenciales obtenidos de especias y hierbas aromáticas tienen propiedades antimicrobianas y pueden contribuir a garantizar la inocuidad de los alimentos. Como es el caso del timol y el carvacrol, aceites esenciales presentes en el orégano (*Origanum vulgare* L.) y el tomillo (*Thymus vulgaris*), que se emplean en la industria alimenticia como antibacterianos. La actividad antimicrobiana y bactericida de diversos productos de plantas se ha asociado a compuestos fenólicos. El coeficiente fenólico de los aceites esenciales indica el grado de actividad de las distintas sustancias, con referencia a los fenoles (Ardila *et al.*, 2009).

La riqueza biológica de México y su diversidad cultural se han traducido en el desarrollo de una vasta tradición etnobotánica. La cual, incluye el conocimiento, el uso y el manejo de una gran cantidad de especies vegetales. Sin embargo, México cuenta con plantas nativas con gran tradición de uso medicinal, con estudios de validación científica escasos como el caso de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied, que es un árbol frutal exótico poco conocido y difundido, comúnmente

conocido en la región como arrayán. El arrayán es un árbol que da frutos anuales que reciben el mismo nombre. Se produce tanto en climas templados subhúmedos como en climas con vegetación tropical. Sus frutos, además de comestibles y son utilizados para la producción de dulces tradicionales o licores de la misma índole, principalmente en el Estado de Sinaloa. En esa misma entidad federativa, las hojas que en ocasiones se utilizan junto con los frutos se han reportado como opciones dentro de la medicina tradicional de la región en lo llamado “remedios” que consisten en infusiones por decocción (25 g hojas en 250 mL aproximadamente de agua) para el tratamiento de dolores gastrointestinales e incluso para problemas de vías respiratorias, como la tos (Delgado *et al.*, 2005; Pío *et al.*, 2013). Delgado *et al.* (2005) en el mismo estudio, y Aguilar *et al.* (2016) han reportado el efecto antibacteriano contra cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* sp., así como la actividad antihelmíntica contra los céstodos *Hymenolepis nana* y *Taenia crassiceps* de extractos con hexano, cloroformo y metanol de los frutos del arrayán. Sin embargo, el uso de extractos vegetales con tales solventes polares y no polares dentro de la industria agroalimentaria origina complicaciones por la naturaleza química contraindicada de tales disolventes en los alimentos (Archundia, 2019; Díaz, 2020).

La información estadística y científica de esta especie es casi nula, el SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) mencionó al estado de Nayarit como único productor de arrayán, pero estados como Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Guerrero, Oaxaca, Durango, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Querétaro, Estado de México, Veracruz, Tabasco, Campeche, Chiapas y Yucatán también son regiones en donde se encuentra *P. sartorianum* (Delgado *et al.*, 2005; Rebollar *et al.*, 2013).

En la presente investigación se determinó la actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos (etanol 50%) de diferentes partes del árbol de arrayán: hojas corteza, fruto y

semilla sobre diferentes bacterias relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos, con el fin de determinar dicha actividad no solo es por parte de las hojas o de los frutos, sino identificar o descartar si las semillas o corteza presentaban o no actividad antimicrobiana sobre los microorganismos seleccionados, bajo las condiciones ensayadas en el presente trabajo. Lo anterior, se propuso como una primera acción para posteriores estudios con miras a determinar o realizar más análisis microbiológicos del potencial del material estudiado encaminado como fuentes naturales de antibióticos para animales o en la conservación de alimentos.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- ☐ Evaluar la actividad antibacteriana de cuatro partes del árbol de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) sobre microorganismos enteropatógenos.

2.2. Objetivos Especificos

- ☐ Obtener extractos vegetales en etanol al 50% de hoja, corteza, semilla y fruto del árbol de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied)
- ☐ Identificar los extractos etanólicos (10, 20, 30, 40 y 50 μ L) con mayor actividad antibacteriana sobre las principales bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria Innocua* AST-062, *Bacillus subtilis* ATCC 662, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115).
- ☐ Determinar la actividad antibacteriana de los cuatro extractos etanólicos sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria Innocua* AST-062, *Bacillus subtilis* ATCC 662, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, mediante el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Kirby-Bauer.

III. HIPÓTESIS

El extracto etanólico (50%) de las hojas de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) tendrá mayor actividad antibacteriana sobre microorganismos enteropatógenos relacionados con enfermedades transmitidas por alimento que los extractos etanólicos de corteza, semilla o de fruto.

IV. JUSTIFICACIÓN

El arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) es una especie poco estudiada que contiene diversos compuestos con potencial antibacteriano. Tales como, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos. Existen algunas investigaciones han reportado la presencia de poder antibacteriano por parte del fruto de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied), en regiones del país, como en el sur del Estado de México donde se encuentra de forma silvestre. En dicho lugar las hojas son usadas con interés medicinal para combatir diarreas y disenterías (Rebollar *et al.*, 2013).

El abuso en el uso de antibióticos ha ocasionado la resistencia a los mismos, lo cual ha llamado la atención para la seguridad alimentaria (OMS, 2018).

Por ello existe mayor interés en la búsqueda de sustancias de origen natural que sean o tengan poder de inhibir el crecimiento bacteriano, por lo que es necesario desarrollar mayor investigación sobre diferentes especies como en este caso *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied

El arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) además de ser fuente de alimento que se consume a baja escala, tradicionalmente se usa para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Delgado *et al.*, 2005; Rebollar *et al.*, 2013). Por esta razón, se decidió usar cuatro partes del árbol mediante extractos etanólicos para compararlas entre sí, con la finalidad de evaluar el efecto de la actividad antibacteriana sobre microorganismos enteropatógenos. Lo anterior, con la finalidad de explorar el potencial de tales extractos como métodos naturales o alternativos con efecto antibacteriano sobre bacterias patógenas al humano transmitidas mediante alimentos. Por lo tanto, estudiar el efecto antimicrobiano podría iniciar estudios para futuras investigaciones en la posible aplicación en alimentos o para elaborar biopelículas.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. Características generales de *P. sartorianum* (O. Berg) Nied

Psidium sartorianum (O. Berg) Nied, es un árbol de climas sub-húmedos considerado endémico de América y con presencia en varios Estados de la República Mexicana como sea citado. Los especímenes suelen tener una altura de hasta 15 m de altura y diámetros de hasta 60 cm. El tallo es recto con ramas ascendentes y gruesas. La parte superior del árbol es estrecha y densa (Delgado *et al.*, 2005).

5.1.1. Taxonomía de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied

- **Reino:** Plantae
- **División:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Subclase:** Rosidae
- **Orden:** Myrtales
- **Familia:** Myrtaceae
- **Género:** *Psidium*
- **Especie:** *P. sartorianum*

(Delgado *et al.*, 2005)

5.1.2. Corteza

La corteza externa es carnosa de color marrón con tonos amarillos y manchas grisáceas y se separan en pedazos lisos y finos. La corteza interna está dentro de la gama del marrón con tonos rosados (Pérez *et al.*, 1994).

5.1.3. Hojas

Las hojas son simples, lanceoladas o elípticas de 1.5 a 6.5 cm de largo y de 0.7 a 2.3 cm de ancho con base aguda redondeada y ápice agudo. El haz de la hoja es color verde con tonos amarillos y brillantes, el envés de la hoja es color verde pálido. Los peciolo son de 1 a 4 mm de alto y son glabros (Cezar *et al.*, 2009).

5.1.4. Fruto y semilla

El fruto del árbol de arrayán es una drupa color amarillo, de 1.0 a 2.5 cm de diámetro. El sabor es similar a la guayaba (*P. guajava*), dulce a ácido-dulce. El mesocarpio es caroso de 1 a 2 cm de ancho y tiene un cáliz frecuentemente persistente. Las semillas son angulares de 5 a 8 mm de longitud, duras y de color amarillo. La temporada de maduración de la fruta es principalmente de septiembre a marzo. Sin embargo, el arrayán (*P. sartorianum* (O. Berg) Nied) puede florecer más de una vez y puede producir frutos en otros meses del año (Rebollar *et al.*, 2013).

5.1.5. Usos del árbol de arrayán

El arrayán es un árbol del cual se obtiene madera para material de construcción. En la época de calor se utiliza para generar microclimas. El fruto es consumido de forma directa, cocinado o mezclado en atole de maíz, también es empleado como materia prima en la elaboración de pasteles, licores, mermeladas, néctares, jugos, vinagres, almíbares, aguas frescas, dulces, paletas de hielo y nieves. Por otra parte, a las hojas se les atribuye propiedades medicinales para combatir diarrea y disenterías (Cezar *et al.*, 2009).

5.2. Extractos vegetales

Son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, mediante el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otros solventes selectivos) y un proceso de extracción adecuado. Dependiendo de la parte vegetativa o reproductiva, el solvente y de la técnica de extracción, se puede obtener una diferente gama de sustancias como indicaron Santamaría *et al.* (2015) y Mendoza (2019).

5.2.1. Metabolitos primarios

Son todas aquellas sustancias desarrolladas durante el crecimiento de todas las plantas y son carbohidratos, proteínas, grasas, ácidos nucleicos y aminoácidos (Mendoza, 2019).

5.2.2. Metabolitos secundarios

Responden a la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores. Se induce la síntesis y acumulación de compuestos como alcaloides, terpenoides y fenilpropanoides que participan activamente matando directamente microorganismos patógenos o restringiendo su invasión al resto de la planta. Otra estrategia de la planta es producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana en contra de herbívoros o con actividad antioxidante (Sepúlveda *et al.*, 2003).

5.3. Tipos de extracción de extractos vegetales

5.3.1. Maceración

Es una extracción que consiste en colocar el material vegetal en forma de trozos o pulverizada dentro de un recipiente con un solvente (agua, alcohol o ambos) y dejar reposar por un periodo de tres o más días con agitación frecuente. Al final de este periodo se cuela y el resto sólido se exprime hasta lograr quitar el líquido remanente. El líquido así obtenido, se clarifica por decantación o filtración (Carrión y García, 2010).

5.3.2. Percolación

La percolación es el procedimiento más utilizado para la preparación de tinturas y extractos fluidos. El percolador es un recipiente cónico con una abertura superior en la cual, se le puede colocar una tapa circular horadada que permite el paso del líquido y somete a una ligera presión a los materiales colocados en él. Se coloca el material vegetal en el percolador de manera que permita el paso uniforme del disolvente hasta lograr un goteo uniforme (Carrión y García, 2010).

5.3.3. Digestión

La digestión es una forma de maceración con ligero calentamiento durante el proceso de extracción, siempre que la temperatura no altere los principios activos del material vegetal y así se logra una mayor eficiencia en la utilización del solvente. Las temperaturas más utilizadas son de 35 y 40 °C, aunque puede elevarse a no más de 50 °C. Se utiliza este proceso con aquellas partes vegetales más duras, o que contienen sustancias poco solubles (Álvaro, 2005).

5.3.4. Infusión

La infusión se lleva a cabo al sumergir las partes a utilizar de la planta en una cantidad de agua hirviendo, se deja reposar 15 min y se filtra mediante un tamiz o papel de filtro (Bruneton, 2001).

5.3.5. Decocción

Se somete la muestra en agua caliente hasta alcanzar la temperatura de ebullición, manteniéndolo así durante un periodo (Álvaro, 2005).

5.4. Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA)

Las enfermedades transmitidas por alimentos pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos de sustancias tóxicas producidas por microorganismos. Un brote de una ETA es definido como un incidente en el que dos o más personas presentan una enfermedad semejante después de la ingestión de un mismo alimento, y que los análisis epidemiológicos apunten al alimento como el origen de la enfermedad. Para que ocurra una ETA, el patógeno o su(s) toxina(s) debe(n) estar presente(s) en el alimento. Sin embargo, la sola presencia del patógeno no significa que la enfermedad ocurrirá (OMS y OPS, 2019).

En la mayoría de los casos de ETA se presentan las siguientes observaciones:

- El microorganismo enteropatógeno debe identificarse en una concentración que pueda ocasionar el proceso infeccioso o la producción de toxinas
- La muestra del alimento o el alimento en sí debe mostrar características intrínsecas para favorecer el crecimiento del patógeno.
- El alimento debe permanecer en una temperatura considerada de peligro por el tiempo necesario para que el microorganismo pueda producir toxinas o desarrollarse.
- La ingestión o consumo del alimento deberá ser la cantidad suficiente y que contenga el microorganismo para sobrepasar la barrera de susceptibilidad del individuo (OMS y OPS, 2019).

5.4.1. Inocuidad de los alimentos

Se define como inocuidad de los alimentos cuando se tienen los niveles seguros, o aceptables, así como, la ausencia de riesgos o peligros dentro de productos alimenticios que pudieran ocasionar daños en la salud de los comensales. En cuanto al tipo de peligros que se transmiten por alimentos estos se clasifican por su carácter físico, químico o biológico. Por lo general, dichos peligros no son visibles a la vista y comprenden virus, bacterias, hongos o productos químicos como residuos de pesticidas y hasta materiales o partículas físicas que no son propias del alimento. La inocuidad alimentaria es sumamente importante para generar alimentos que se garanticen como seguros y abarca todas las etapas de la cadena productiva, desde la producción, cosecha, procesos industriales, almacén, distribución, preparación y hasta lo referente para que pueda el alimento presentarse a los consumidores (FAO, 2019).

5.5. Bacterias

Son organismos unicelulares que por su origen evolutivo se clasifican como procariontes. Mismas, que pueden presentar formas de esferas (cocos), bastones (bacilos) y espirales (espirilos) con longitud de 0.5 a 10 μm . El material genético ácido desoxirribonucleico (ADN), se localiza en el citoplasma ya que este tipo de microorganismos carecen de organelos. Cuentan con pared celular compuesta de peptidoglicano, principalmente, así como de proteínas. Muchas bacterias tienen flagelos u otro sistema para su desplazamiento (CONABIO, 2019).

Se encuentran en casi todos los hábitats de la tierra y obtienen energía de una amplia variedad de fuentes de alimento. Algunas bacterias llevan a cabo fotosíntesis, otras obtienen energía de moléculas inorgánicas como azufre, amoníaco o nitritos y otras más, se alimentan de materia orgánica en descomposición para buscar nutrientes como fuentes de Carbono y de Nitrógeno, así como de micronutrientes (sales minerales). Se clasifican en base a su estructura celular, en cuanto a la composición y estructura de la pared celular, en dos grupos según la tinción de Gram, debido a la tinción que dicha estructura adquiere. Las Gram positivas se tiñen de color azul violeta y las Gram negativas de color rojo. La pared celular de las Gram positivas está formada por una única capa homogénea de 20 a 80 nm de grosor de peptidoglicano situada por fuera de la membrana celular. Por otro lado, las Gram negativas presentan una pared celular con una estructura con mayor complejidad al contar o tener una capa de 2 a 7 nm de grosor de peptidoglicano rodeada por una membrana externa y la membrana citoplasmática o interna. En comparación con el grosor de la pared celular presente en las Gram negativas, las Gram positivas presentan una pared celular más delgada, razón por la cual, durante la tinción de Gram en el paso de la decoloración con alcohol éste colorante, es arrastrado del interior celular y al contacto con la safranina, dichas células toman el color rojo de esta otra tintura (Vargas y Vargas, 2014; CONABIO, 2019).

5.5.1 Estructura celular de la bacteria

5.5.1.1. Estructura interna

Las bacterias no poseen membrana nuclear, núcleo, ni aparato mitótico. Esto las diferencia de las células eucariotas. Aunque no exista un núcleo delimitado hay una zona nuclear o nucleóide que contiene una gran molécula circular de ADN. El citoplasma carece de orgánulos delimitados por membranas. En el citoplasma se pueden apreciar plásmidos, vacuolas y ribosomas, y éste, es rodeado y delimitado por la membrana citoplasmática, seguido de la pared celular compuesta de lípidos. Algunas bacterias, además, presentan una segunda membrana lipídica (membrana externa) rodeada de la pared celular. El espacio entre la membrana citoplasmática y la pared celular o membrana externa se denomina espacio plasmático y las formaciones exteriores propias de la célula bacteriana, entre las que destacan los flagelos y los Pili que les permiten desplazarse (Pérez y Mota, 2006).

5.5.1.2. Estructura externa

La membrana celular separa el interior de la célula con el exterior, cumple así, la función de barrera osmótica, le otorga una permeabilidad selectiva y permite el ingreso de nutrientes y la salida de desechos, siendo una estructura relevante para la comunicación de la célula con lo que la rodea. Es una estructura compuesta por una bicapa lipídica donde los fosfolípidos que la componen y otorgan su peculiaridad presentan enlaces de tipo éster. En algunas bacterias termófilas o en arqueas de esa índole los ácidos grasos esterificados suelen ser de tipo saturados de cadenas medias. A diferencia de las arqueas la esterificación de los ácidos grasos en los lípidos de membrana comprenden enlaces de tipo éster y no de tipo éter. Dentro de la membrana citoplasmática se presentan moléculas receptoras que ayudan a estos microorganismos en la detección y respuesta a compuestos químicos del medio externo. Externo a la membrana citoplasmática la mayoría de

las bacterias presentan la ya mencionada pared celular. Misma que otorga rigidez y protección a las células. Los fármacos que bloquean la formación de la pared producen la lisis y causan la muerte de las bacterias susceptibles. La pared celular protege a las bacterias de sustancias tóxicas y es el sitio de acción de algunos antibióticos (Pírez y Mota, 2008; Megías *et al.*, 2017).

5.5.2. Actividad antibacteriana

Es la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento o proliferación de las bacterias. Son en esencia los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos microorganismos. Las sustancias con propiedades antibacterianas se clasifican en dos tipos según la acción que ejerce sobre la bacteria, estos son bactericidas y bacteriostáticos. Los antibacterianos pueden actuar de varias formas en las bacterias, en la pared celular para evitar su crecimiento, sobre la membrana celular para que sea permeable y que el principio tenga acceso al interior, en el ADN de la bacteria para dañar su estructura o sobre los ribosomas para que no sea capaz de sintetizar las proteínas que la mantienen con vida. Los bacteriostáticos bajo diversos mecanismos impiden el crecimiento de dichas células. Los agentes bactericidas inducen la muerte celular de modo irreversible, disminuyendo así la población bacteriana. Muchos antibacterianos se encuentran en las plantas, siendo estas un importante grupo de estas sustancias. Las cuales, pueden actuar como medicina natural (Cuca *et al.*, 2011).

5.5.3. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es la capacidad de los microorganismos de evolucionar y adaptarse para resistir los efectos de un antibacteriano como los antibióticos en nuevas formas patógenas a través de cambios en el genoma bacteriano. El uso irracional de antibióticos da como resultado el surgimiento de mecanismos de resistencia bacteriana ante los antibióticos a través de los años (García, 2006).

5.5.4. *Escherichia coli* ATCC 25922

Estos microorganismos son bacteria Gram negativas de forma bacilar pertenecientes a la familia de las enterobacterias. Las diferentes cepas de *E. coli* habitan desde el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales. Es un microorganismo anaerobio facultativo y crece a una temperatura óptima de 37 °C (Doyle *et al.*, 2001). La temperatura límite de crecimiento se sitúa alrededor de 7 °C, por lo tanto, la cadena de frío en la producción de alimentos es el facto requerido para evitar el crecimiento de *E. coli* en los alimentos. La congelación tiene pocos efectos sobre la población de este microorganismo en el alimento, y no garantiza la destrucción de un número suficiente de bacterias viables para asegurar su inocuidad. No obstante, muestra serias dificultades para el crecimiento en temperaturas mayores a 70 °C por lo tanto, a dichas temperaturas es fácil eliminarla y esto es la razón para la pasteurización de los alimentos y que la cocción correcta de los alimentos sea la mejor medida de control o eliminación de estas cepas (Leyva *et al.*, 2009).

Al ser una Gram negativa, este microbio presenta tres elementos: una membrana citoplasmática, membrana externa, y el espacio periplasmico. La pared celular está formada por petidoglicano. La cual, otorga el microorganismo rigidez y resistencia contra presiones osmóticas relativamente alta (Canet, 2016).

Algunos serotipos de *E. coli* producen enterotoxinas (verotoxina) responsable de las diarreas hemorrágicas, que suele complicarse hasta la presencia del síndrome hemolítico urémico, enfermedad letal en niños. Dicho aspecto es por lo cual, este microorganismo representa un peligro de Salud Pública (Canet, 2016).

La cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 es un microorganismo de control del Instituto de Estándares para Laboratorio y Clínica (CLSI) para pruebas de susceptibilidad. Especialmente como la toxina

LT y en pruebas de calidad. Se utiliza en la prueba de sensibilidad a neomicina, kanamicina, cefalexina, gentamicina, cefalotina, tetraciclina y cloranfenicol (Doyle *et al.*, 2001).

5.5.5. *Listeria innocua* AST-062

Listeria innocua es una de las seis especies que pertenecen al género *Listeria*. Se encuentra ampliamente en el medio ambiente (como el suelo) y en las fuentes de alimentos. Puede sobrevivir en pH y temperatura extremos, y una alta concentración de sal. En términos de apariencia, es una bacteria Gram positiva en forma de bastón y no forma esporas. Puede vivir individualmente u organizarse en cadenas con otras bacterias, es un mesófilo y opera en un rango de temperatura óptimo de 30 a 37 °C. *Listeria innocua* se parece mucho a los otros miembros de su familia, como la patógena transmitida por alimentos *L. monocytogenes*, pero se distingue por su carácter no patógeno (Mossel, 2006).

5.5.6. *Bacillus subtilis* ATCC662

Bacteria Gram positiva, aerobia, se encuentra comúnmente en el suelo. No resulta patógena para el ser humano, aunque en ocasiones puede contaminar los alimentos. Sin embargo, raramente llega a producir intoxicaciones alimentarias y es muy útil en diferentes tipos de industrias. Esta bacteria tiene un alto poder antifúngico, por lo que es muy útil en la agricultura para combatir algunas plagas de hongos. Al contacto con el patógeno, destruye sus paredes celulares, ocasionándole la muerte. Además; produce sideróforos, unos compuestos extracelulares con alta afinidad por el ion hierro, que previenen la germinación de los hongos causantes de la plaga (IVAMI, 2016).

5.5.7. *Enterococcus* sp.

Comprende un grupo de bacterias Gram positivas localizadas en el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Se localiza así mismo, en el tracto genitourinario, así como en el líquido salivar. Este grupo se ha definido por su carácter oportunista en humanos y por la capacidad de generar diversos padecimientos, como endocarditis, bacteriemias enterocóccicas, infecciones del tracto urinario, en el sistema nervioso central (aunque son raras), intrabdominal y pélvica. Este patógeno también es un indicador de contaminación fecal (Díaz *et al.*, 2010).

5.5.8. Género *Salmonella*

La salmonelosis es una enfermedad provocada por bacterias del género *Salmonella*. Generalmente se caracteriza por fiebre alta, dolor abdominal, diarrea, náusea y, a veces, vómitos. Los síntomas de la enfermedad comienzan a manifestarse entre 6 y 72 h (generalmente 12 a 36 h) después de la ingesta de alimentos contaminados y la enfermedad dura entre 2 y 7 días (Brenner *et al.*, 2000).

El 10 y el 22 de marzo del 2016 la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), lanzó una alerta sobre la presencia de *Salmonella* en pistaches (*Pistacia vera* L.) importados de Estados Unidos de la empresa Wonderful Co. La Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), notificó a la COFEPRIS que la empresa Wonderful Co. realizó el retiro voluntario de pistaches de la marca comercial Wonderful debido a que se detectó la presencia de *Salmonella* en el producto (COFEPRIS, 2016).

5.5.9. *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas sp. se conoce como un patógeno ubicuo de carácter oportunista y resistente a diversos tipos de antibióticos, así como persistente en el medio ambiente. Es el agente causal de diversas enfermedades intrahospitalarias, debido a la gran capacidad que este microorganismo presenta para la transferencia de plásmidos. Este microorganismo presenta forma bacilar de 0.5-

1.0 μm de diámetro y de largo 1.5-5.0 μm . poseen flagelos polares y es considerada como anaerobia facultativa, ya que presenta crecimiento en condiciones anaerobias asimilando el nitrógeno o a la arginina como aceptor de protones. El género *Pseudomonas* es persistente en el agua y en suelos, donde logra sobrevivir con requerimientos nutricionales mínimos. El principal microorganismo dentro de este género es *Pseudomonas aureuginosa* yes relacionado con al menos el 10% de las infecciones nosocomiales a nivel mundial (Paz *et al.*, 2019).

En humanos se presentan en ocasiones con las especies *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens* o *P. acidovorans* y se les atribuye ser los agentes etiológicos de foliculitis asociada, otitis externa, infecciones focales de partes blandas, úlceras pequeñas de las córneas, bacteriuria asintomática, así como en otras enfermedades sistémicas (INSHT, 2016).

La presencia de bacterias resistentes a antimicrobianos o a los antibióticos utilizados en clínica tanto de humanos como de animales ha sido el motor para que los investigadores giren la atención en la búsqueda de aquellos mecanismos de resistencia y presentar así, mayor información relevante para la disminución de la morbilidad ocasionada por estos patógenos. *Pseudomonas aureuginosa* es conocida como la especie de este género que no solo desarrolla mecanismo de resistencia a antibióticos si no que posee determinada patogenicidad dificultando el tratamiento a las infecciones que ocasiona (Cabrera, 2019).

5.5.10. *Staphylococcus* sp.

En el género *Staphylococcus*, la especie *S. aureus* es el microorganismo considerado como patógeno para humanos y animales, agente causal de infecciones nosocomiales y dentro de la comunidad. Las infecciones por este microorganismo generalmente son superficiales, agudas y piogénicas, con menor incidencia causan también osteomielitis endocarditis aguda o neumonía.

Dentro del ámbito intrahospitalario los *Staphylococcus* son importantes agentes etiológicos de infecciones en heridas quirúrgicas, de prótesis, entre otras. También la especie *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de producir toxinas mismas que son las ya identificadas como agentes causales del síndrome del shock tóxico, intoxicaciones alimentarias y el síndrome de piel escaldada (Seija, 2016).

Los *Staphylococcus*, tienen cocoide y son Gram positivos, así como catalasa- positivos que se divide en más de un plano para formar racimos tridimensionales de células. La presencia de estas bacterias puede ocasionar intoxicaciones alimentarias, mismas que se producen por la contaminación de alimentos, que suelen ser de elevado contenido en proteínas e hidratos de carbono como pasteles, helados y salsas, y con pH superior a 5, que permitirán un rápido crecimiento bacteriano. La mala refrigeración permite que el microorganismo prolifere, y si es una cepa productora de enterotoxina termoestable, la libera en cantidad suficiente como para producir intoxicación. El tiempo de incubación de esta bacteria en el huésped es relativamente corto (1 a 7 horas) y los síntomas son vómitos y diarrea de hasta 2 días de duración, en general sin fiebre, siendo normalmente de rápida recuperación. Este proceso sólo requiere hidratación y no necesita de tratamiento antibiótico (ICMSF, 1998).

Es resistente a las condiciones ambientales normales y también puede sobrevivir hasta tres meses en un cultivo a temperatura ambiente. Muere expuesto a temperaturas mayores de 60 °C por una hora. En cuanto a los agentes químicos, es sensible a la mayoría de los desinfectantes y antisépticos, que lo matan en pocos minutos (Seija, 2016).

5.5.11. *Klebsiella* sp.

Los microorganismos de este género son bacterias Gram negativas reportada como agentes etiológicos de diversos padecimientos infecciosos como son neumonías, infecciones en heridas

quirúrgicas, sepsis, en el tracto urinario e infecciones en tejidos blandos. Es un patógeno que presenta producción de carbapenemasas. Estos microorganismos son un problema de salud mundial por la facilidad con la que son transmitidas, así como por el impacto económico que se origina por la dificultad del tratamiento de los padecimientos que ocasionan. *Klebsiella pneumoniae* como se mencionó anteriormente produce las enzimas carbapenemasas (KPC), las cuales también se han reportado en otras enterobacterias, sin embargo, en este patógeno dichas encimas son la razón de que este microorganismo ocasiona un alto impacto clínico e los últimos años, ya que es el responsable de diversos brotes endémicos (Mossel *et al.*, 2006).

5.5.12. *Listeria monocytogenes* ATCC 19115

Las *Listerias* spp. son bacilos cortos, Gram positivos, esporógenos, catalasa-positivo y anaerobios facultativos. *Listeria monocytogenes* se define como un patógeno oportunista con la capacidad de multiplicarse y sobrevivir fuera de los animales hospedadores y con la capacidad de crecer en medios de cultivos simples. Dentro del hospedador su multiplicación es intracelular (ICMSF, 1998). La listeriosis es un padecimiento ocasionado por este microorganismo de origen alimentario y de interés de salud pública. Es considerada una infección grave y de carácter no entérico, *L. monocytogenes* difiere en muchos aspectos de los demás patógenos transmitidos por alimentos: es omnipresente, es resistente a condiciones ambientales diversas tales como el pH bajo y las concentraciones elevadas de NaCl, y es microaeróbica y psicrotrófica. Los cuales, son los distintos modos que permiten a la bacteria ser capaz de entrar en las plantas de tratamientos de alimentos, su capacidad para sobrevivir durante periodos de tiempo prolongados en el ambiente (tierra, plantas y agua), y su capacidad para crecer a temperaturas muy bajas (de 2 a 4 °C), tiene la capacidad de sobrevivir ya sea en la superficie o en el interior de alimento por prolongados

periodos, incluso bajo condiciones adversas así, *L. monocytogenes* es una preocupación principal en la industria agroalimentaria (Doyle *et al.*, 2001).

El 19 de marzo del 2015 la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), lanzó un comunicado a la población en donde la FDA instruyó a la compañía Blue Bell el retiro de sus productos en Estados Unidos por la probable asociación de casos de Listeriosis. Por lo tanto, Paletas Manhattan S.A. de C.V., importador y distribuidor de la marca Blue Bell, en México, realizó el retiro voluntario en los diversos canales de comercialización, como medida precautoria (COFEPRIS, 2016).

5.6. Control con antimicrobianos para microorganismos patógenos

Gran parte de las especies vegetales poseen distintos componentes bioactivos que hacen que las plantas tengan propiedades antiinflamatorias, antidiarreicas, antifúngicas, antibacterianas, insecticida y antiespasmódica (Suleiman *et al.*, 2016). Estas propiedades se explican por la presencia de sustancias activas capaces de combatir enfermedades que ponen en riesgo a la población, tomando en cuenta el gran potencial de las plantas como fuentes de medicamentos antimicrobianos desde la antigüedad hasta los tiempos actuales cuya finalidad es controlar la prevalencia de enfermedades infecciosas, contrarrestar los problemas de resistencia de los microorganismos, disminuir los efectos colaterales que causan los antimicrobianos de síntesis química y por otra parte está la necesidad que ha llevado a los investigadores del área de alimentos, farmacéutica y agricultura a buscar fuentes nuevas de origen vegetal que contengan compuestos bioactivos. Además, está documentado que ciertas especies vegetales contienen compuestos capaces de inhibir bacterias patógenas causantes de enfermedades infecciosas (Cruz *et al.*, 2012)

5.7. Metodologías para evaluación *in vitro* de actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal

Los métodos para evaluar actividad antibacteriana están clasificados en tres grupos principales: métodos difusión, métodos de dilución y bioautografía (Ramírez y Marín, 2009).

5.7.1. Método de difusión en agar

Este método en agar presenta la ventaja de que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (método de Kirby-Bauer). Este método en disco o en pozo, es actualmente recomendado por el comité de ensayos de susceptibilidad de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de E.U.

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana mediante la estimación de un halo de inhibición de crecimiento sobre la superficie. Este método consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo. Posteriormente, se colocan discos de papel impregnados con el extracto o antibiótico a probar y que se pone en contacto con el agar para que se difunda y se formen halos inhibición al crecimiento de la bacteria ensayada (Ramírez y Marín, 2009).

5.7.2. Método de dilución

Este método determina el crecimiento de microorganismos en presencia de concentraciones de antimicrobianos, que se encuentran diluidos en el medio de cultivo. Es una técnica fácil para evaluar diferentes grupos de bacterias principalmente heterotróficas, aerobias totales o bacterias reductoras. El método consiste en inocular una serie de frascos que contienen 9 mL del medio de cultivo apropiado según el tipo de bacteria que se quiera evaluar con 1 mL de la muestra usando una jeringa descartable, estéril, de 1 ó 2 mL de capacidad. Se inocula el primer frasco, sin retirar la aguja se agita el mismo, se invierte y se retira 1 mL que se inocula en el 2° frasco. Con una

nueva jeringa, se retira 1 mL del frasco N° 2, previamente agitado, y se inocula el frasco N° 3 y así sucesivamente, utilizando una nueva jeringa para cada frasco (Picazo., 2000; Andrews., 2001).

5.7.3. Bioautografía

Este método es una variante del método de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluarán las propiedades antimicrobianas es colocado sobre una placa de cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto. La CCF es un método ideal para la separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el solvente, evitando así la posible actividad de este (Sánchez *et al.*, 2016).

La bioautografía es empleada como una técnica preliminar de tamizaje fitoquímico, para detectar compuestos que afectan las tasas de crecimiento de microorganismos en mezclas y matrices complejas, como los extractos de plantas (Colorado *et al.*, 2007).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio, se realizó en el laboratorio de Calidad de Productos Agropecuarios de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Universitario “El Cerrillo”, El Cerrillo Piedras Blancas, Estado de México.

El experimento, se desarrolló en dos fases: La primera, relacionada con la preparación de los extractos vegetales que se llevó a cabo con hojas, fruto, semilla y corteza del árbol de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) de la localidad de Tenexcontitlán, Guerrero. La segunda fase, relacionada con la aplicación de las pruebas microbiológicas realizadas con los microorganismos: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria innocua* AST-062, *Bacillus subtilis* ATCC-662, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Los microorganismos mencionados fueron donados en cepas por el laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), Instituto Tecnológico de Veracruz.

6.1. FASE I Preparación de los extractos vegetales

6.1.1. Recolección del material vegetal

El material vegetal se colectó el 16 de febrero del 2019 en la localidad de Tenexcontitlán (El Ranchito), situado en el Municipio de Tetipac, Guerrero en las coordenadas 18° 40' 26" N 99° 39' 52" O a 1760 msnm (Google maps, 2018). Las hojas fueron recolectadas de árboles sanos y de la parte central del mismo, evitando hojas con daño mecánico o biológico. Los frutos de igual manera fueron tomados de la misma parte. Se seleccionaron aquellos que no mostraron ningún tipo de daño. La corteza fue removida con apoyo de una navaja. El material biológico se procesó al día siguiente de los muestreos, para lo cual el material se almaceno extendido sobre las mesas de

trabajo a temperatura ambiente. Lo anterior, a fin de realizar los ensayos bajo la influencia únicamente de las variables que se proponen (Salem *et al.*, 2011; Palomares, 2019).

6.1.2. Desinfección del material vegetal

Las hojas y frutos se desinfectaron mediante la inmersión durante 30 minutos en una disolución de hipoclorito de sodio al 1% (Moreno, 2019; Roque 2019).

6.1.3. Secado del material vegetal

Las muestras (hojas y corteza) se colocaron sobre charolas de acero inoxidable para airearse y posteriormente, se sometieron a deshidratación en una incubadora Felisa, modelo FE133A a una temperatura de 50°C, 48 h (Figura 1). En caso del fruto, este fue separado de la semilla y ambos se secaron durante 72 h (Salem *et al.*, 2011; Archundia *et al.*, 2019).



Figura 1. Deshidratación de hojas (A), corteza (B), fruto y semilla del fruto de arrayán (C).

6.1.4. Molienda del material vegetal

Cada una de las muestras se pulverizaron en el molino eléctrico (General electric Modelo 5XBG00G) con una criba de 20 micras (Figura 2).



Figura 2. Molienda de las muestras.

6.1.5. Obtención de los extractos por el método de maceración

La extracción fue realizada por medio del método de maceración. Se realizó un extracto hidroalcohólico con etanol 50 % en 50 mL de volumen final, con una concentración 125 mg/mL de material vegetal pulverizado. Se preparó un extracto para cada una de las partes vegetales (hojas, corteza) y de las partes reproductivas (fruto y semilla) a estudiar. Se colocaron las muestras en frascos ámbar con los 50 mL del solvente y se homogenizaron con movimientos circulares, 1 min. Finalmente, se dejaron macerar por 72 h a temperatura ambiente y en un lugar oscuro. Al término de la maceración las muestras se colocaron a baño maría analógico (Stable Temp de Colpe-Parmer), a 39 °C, 30 min como se observa en la Figura 3. Posteriormente, se filtró el contenido de cada frasco con papel filtro (Whatman 240 nm) sobre vasos de precipitado (Figura 4) para obtener el eluyente. El líquido filtrado se centrifugó a 1000 rpm, 5 min para separar los sólidos que aun pudieron haberse quedado.



Figura 3. Baño maría de los extractos



Figura 4. Obtención del eluyente a partir de filtrado de los extractos

6.1.6. Esterilización de los extractos por filtración

Los extractos obtenidos se esterilizaron por medio de filtración. Para lo cual, se utilizaron acrodiscos estériles para jeringa (PALL de nylon, 0.2 μm) (Figuras 5 y 6). Los extractos filtrados ya estériles se depositaron en frascos ámbar estériles y se almacenaron en refrigeración.



Figura 5. Acrodisco estériles utilizados



Figura 6. Esterilización por filtración de los extractos

6.2. FASE II pruebas microbiológicas

6.2.1. Activación de microorganismos

Primero se reactivaron los microorganismos que se encontraban en microtubos Eppendorf (60 % glicerol con caldo LB) a -80°C . Para esto se tomó el 1% (100 μL) de muestra y se pasaron a medio líquido (caldo Luria Bertani) para incubarlas a 37°C . Después de 18 h de crecimiento se tomaron 100 μL de inóculo y se pasaron a un tubo con 9 mL de caldo LB. Se agitaron el equipo vórtex

(Genie) y se dejó incubar a 37°C, 2 h. Posteriormente, se realizaron tres diluciones seriadas de 1 mL en tubos con 9 mL de agua peptonada para ajustar el inóculo al equivalentemente al patrón de turbidez 0.5 de McFarland para una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL (Picazo, 2000; Archundia, 2019).

6.2.2. Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos del árbol de arrayán

Se utilizó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco de Kirby-Bauer del CLSI con algunas modificaciones (Bullain *et al.*, 2017). Se colocó el inóculo (1 mL) de cada una de las diez bacterias en cajas Petri previamente estériles e identificadas. Se le agregó 15 mL de agar y se homogenizó. Se dejó un minuto hasta que gelificó.

Se depositaron los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro previamente impregnados del extracto a evaluar en dosis de 10, 20, 30, 40 y 50 μ L con tres repeticiones cada uno, para determinar la concentración del extracto más eficiente frente a cada una de las bacterias. Una vez determinada la concentración idónea por cada extracto se repitió el mismo procedimiento para la actividad antibacteriana de cada concentración de cada extracto. Ya determinada la concentración menor que presentase inhibición bacteriana ésta se consideró para cada extracto contra las cepas ensayadas. Para el ensayo de la actividad antimicrobiana, primeramente, en condiciones estériles se inoculó con 1 mL la caja por vaciado en placa, posteriormente se colocaron los discos impregnados de cada extracto sobre las cajas Petri. Las cuales, se sometieron a refrigeración por 4 h, 4 °C para permitir la difusión de los extractos y después se incubaron a 37 °C, 24 h (Ramírez y Marin, 2009). La actividad antimicrobiana se determinó de acuerdo con el CLSI Instituto de Estándares de clínica y laboratorio (del inglés, *Clinical and Laboratory Estándar Institute*) (2012) con ligeras modificaciones de Díaz (2020). Para lo cual, la presencia de un halo de inhibición alrededor de los acrodiscos se consideró como el efecto antibacteriano de cada extracto. Se midió

dicho diámetro del halo de inhibición (mm) con un vernier y se compararon los efectos de los extractos de hojas, corteza, semilla y fruto sobre cada bacteria, con la finalidad de encontrar si los extractos mostraban actividad antibacteriana sobre las bacterias (Díaz, 2020).

6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

6.3.1. Diseño estadístico

Para identificar si los extractos vegetales tenían algún efecto de actividad antibacteriana sobre las cepas ensayadas se realizó un diseño experimental de un Análisis de Varianza Simple (ANDEVA) al 95% de confianza para identificar la concentración como dosis mínima en μL del extracto vegetal que presentara dicho efecto, para ser utilizado en el disco para las pruebas posteriores. Para lo cual, las variables independientes fueron las dosis de los extractos de cada parte estudiada del árbol (10, 20, 30, 40 y 50 μL) y las variables de respuesta fueron los diámetros de inhibición (mm) obtenidos de cada dosis en cada una de las bacterias estudiadas. Al observarse diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) se aplicó una prueba de comparación de medias de Duncan al 95% de confianza. La siguiente parte del presente trabajo consistió en analizar el efecto antibacteriano de la dosis mínima de cada extracto seleccionada de lo citado anteriormente. Para lo cual, se ejecutó otro análisis de Varianza Simple (ANDEVA) al 95% de confianza para identificar las diferencias entre el efecto antibacteriano de los cuatro extractos obtenidos sobre las 10 cepas analizadas. Los tratamientos fueron los extractos vegetales de las partes vegetativas (hojas y corteza) y los de las partes reproductivas (fruto y semillas) del árbol de arrayán y las variables de respuesta fueron los diámetros de inhibición de las 10 cepas de bacterias (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria Innocua* AST-062, *Bacillus subtilis* ATCC 662, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115), bajo las condiciones ensayadas.

Finalmente, cuando se identificaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) se aplicó una prueba de comparación de medias de Duncan al 95% de confianza. Todos los análisis de hicieron por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron con el software estadístico Statgraphic Plus (Batanero y Bernabeu, 2008).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Determinación de la concentración mínima con actividad antimicrobiana para cada extracto

Inicialmente se obtuvieron los resultados de los diámetros (mm) de los halos de inhibición de cada una de las concentraciones mínimas (10, 20, 30, 40 y 50 μL) que presentaron la mayor actividad antimicrobiana de cada uno de los cuatro extractos. Dichos resultados se analizaron mediante un ANDEVA para encontrar si hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las dosis mencionadas para cada extracto. Como se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre tratamientos (las dosis o concentraciones de cada extracto ya mencionadas) se realizó un análisis de comparación de medias por Duncan al 5 %. Los resultados del análisis estadístico reflejaron que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre las dosis ensayadas en cada extracto (Cuadro 1). Por lo tanto, como se indica en el cuadro 1 se decidió conservar las siguientes dosis consideradas como la concentración mínima con mayor actividad antibacteriana de cada extracto para el siguiente ensayo. Para el extracto de hojas se consideró 40 μL , para el extracto de corteza y el de semilla 50 μL y finalmente, se consideraron 40 μL del extracto de fruto.

Cuadro 1. Resultados de la comparación de medias Duncan 5% de las dosis a menor concentración que presentaron actividad antimicrobiana.

Extracto	Dosis				
	10 μL	20 μL	30 μL	40 μL	50 μL
	$\bar{x} \pm \text{DS}$ mm				
Hojas	5.09 \pm 4.29a	6.53 \pm 4.45a	9.70 \pm 4.16b	10.70 \pm 2.25c	12.01 \pm 2.46c
Corteza	0.8 \pm 2.44a	5.7 \pm 3.84b	7.00 \pm 4.79b	7.83 \pm 5.35c	9.40 \pm 5.13c
Semilla	1.6 \pm 3.25a	6.50 \pm 3.31b	8.76 \pm 1.10c	9.83 \pm 1.28c	11.06 \pm 1.48d
Fruto	4.09 \pm 4.18a	7.70 \pm 2.96b	9.45 \pm 2.01b	15.15 \pm 18.40c	13.62 \pm 1.56c

Las letras a, b, c y d denotan las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) entre filas, \bar{X} = media aritmética, DS = desviación estándar.

Las concentraciones mínimas que con actividad antimicrobiana que se encontraron para cada extracto se utilizaron respectivamente en la siguiente fase. En la cual, se estudió el efecto de inhibición sobre las cepas estudiadas.

7.2 Actividad antimicrobiana

Los resultados de los diámetros (mm) de los halos de inhibición de cada una de las bacterias tras el efecto o por efecto de cada uno de los cuatro extractos (hojas, corteza, semilla y frutos) se analizaron mediante un análisis de varianza simple (ANDEVA). El cual, indicó que hubo diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos (tipo de extracto) bajo las condiciones ensayadas. Por lo tanto, se realizó un análisis de comparación de medias por Duncan al 5% (Cuadro 2.).

Cuadro 2. Prueba de comparación de medias (Duncan 5%) del efecto de inhibición de los cuatro extractos de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied sobre las diez bacterias y de la comparación del efecto de inhibición entre los extractos sobre cada una de las cepas microbianas bajo las condiciones ensayadas.

Bacteria	Extracto de Hojas	Extracto de Corteza	Extracto de Semilla	Extracto de Fruto
	$\bar{x} \pm DS$ mm	$\bar{x} \pm DS$ mm	$\bar{x} \pm DS$ mm	$\bar{x} \pm DS$ mm
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10.75±0.95a	15.77±0.33d	10.75±1.69a	11.07±0.81c
<i>L. innocua</i> AST-062	10.75±0.50a	16.37±0.37e	10.92±1.49a	12.70±0.60d
<i>B. subtilis</i> ACC662	17.25±0.95d	16.02±0.33d	16.20±1.35b	14.02±0.09e
<i>Enterococcus</i> sp.	13.50±0.57c	13.45±0.59b	14.32±1.53b	11.12±0.45c
<i>S. enterica</i> serotipo <i>Enteritidis</i> ATCC 13076	12.50±0.57b	12.52±0.42a	14.45±0.57b	11.35±0.43c
<i>Pseudomonas</i> sp.	12.25±0.95b	14.80±0.54c	13.97±0.27b	10.17±0.22b
<i>Staphylococcus</i> sp.	12.50±1.29b	12.00±0.80a	14.62±0.74b	8.67±0.53a
<i>Salmonella</i> sp.	14.00±2.00c	15.15±0.85d	11.37±0.57a	10.80±0.35by
<i>Klebsiella</i> sp.	13.75±1.70c	16.35±1.17e	11.37±0.57a	11.45±0.36c
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 662	11.00±2.16a	15.17±0.22d	14.50±3.08b	11.12±0.15c

Las letras a, b, c y d denotan las diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) entre filas, \bar{X} = media aritmética, DS = desviación estándar.

La prueba de comparación de medias para cada extracto se describe a continuación.

7.2.1. Extracto de hojas de arrayán

Como se mencionó antes, a partir de los resultados del Cuadro 1 se utilizó la concentración de 40 μ L de este extracto para impregnar los discos de 6 mm de diámetro utilizados en la actividad antimicrobiana.

Los resultados de las medias de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos por los extractos bajo las condiciones ensayadas fueron de 10.75-17.25 mm. La prueba de comparación de medias (cuadro 2) indicó que se formaron cuatro grupos estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El primer grupo que presentó los menores diámetros de halos de inhibición se formó de las bacterias *E. coli* ATCC 25922, *L. innocua* AST-062 y *L. monocytogenes* ATCC 19115. El segundo grupo fue formado por *S. entérica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas* sp. y *Staphylococcus* sp. El tercer grupo, se formó por *Enterococcus* sp., *Salmonella* sp. y *Klebsiela* sp., y por un último grupo con el valor más alto a *B. subtilis* ATCC 662, que presentó el mayor diámetro de halo de inhibición de 17.25 mm a partir de este extracto (Cuadro 2) (Figura 7).

B. subtilis ATCC 662 fue la bacteria con mayor susceptibilidad ante este extracto con un halo promedio de inhibición de 17.25 mm. Así mismo, el extracto tuvo menor efecto antibacteriano sobre *E. coli* ATCC 25922, *L. innocua* AST-062 y *L. monocytogenes* ATCC 19115 que fueron las bacterias que mayor resistencia pusieron al formar halos con diámetros de 10.75, 10.75 y 11.0 mm, respectivamente.

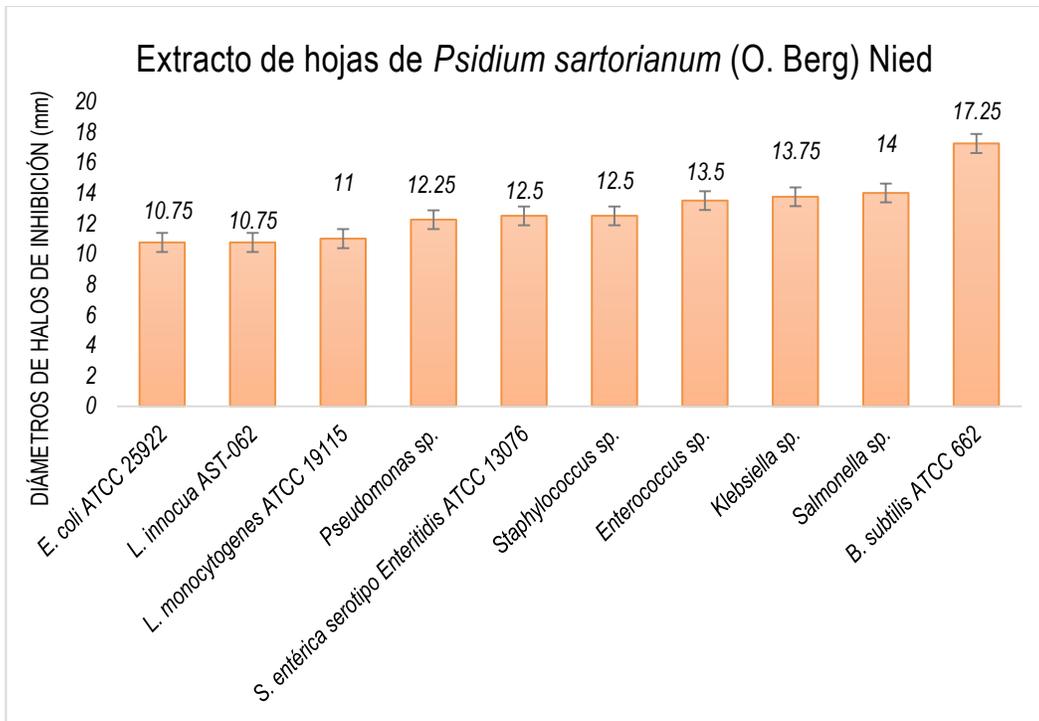


Figura 7. Diámetros (mm) de halos de inhibición presentados en el extracto de hojas de arrayán frente a las diez bacterias ensayadas.

En las siguientes figuras de 8 a 17 se muestran los ensayos biológicos con el extracto vegetal de hojas de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied, evaluado con cada una de las bacterias.

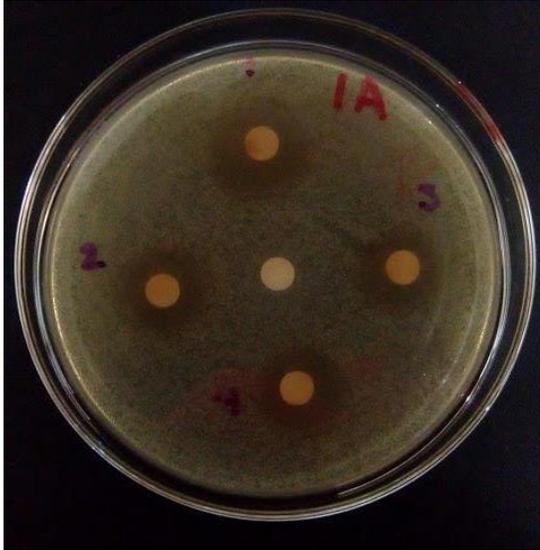


Figura 8. *E. coli* ATCC 25922 en extracto de hojas.

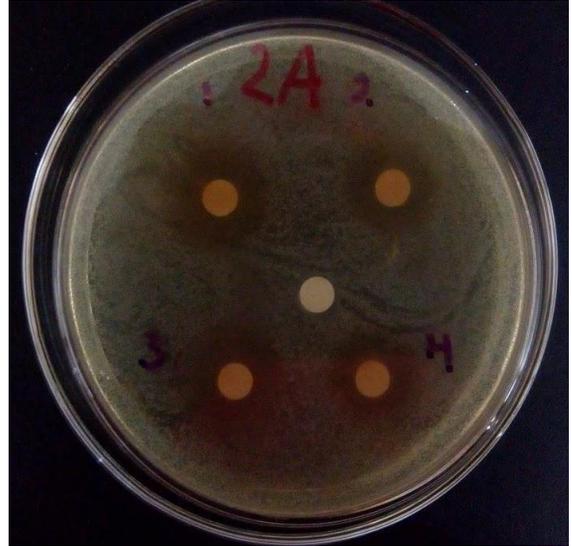


Figura 9. *L. innocua* AST-062 en extracto de hojas.

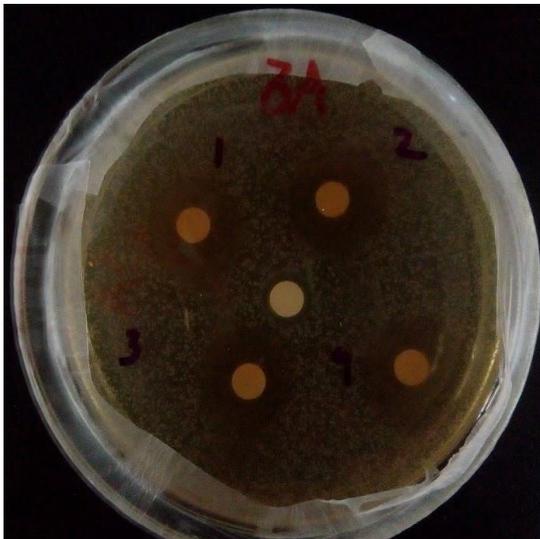


Figura 10. *B. subtilis* ATCC-662 en extracto de hojas.

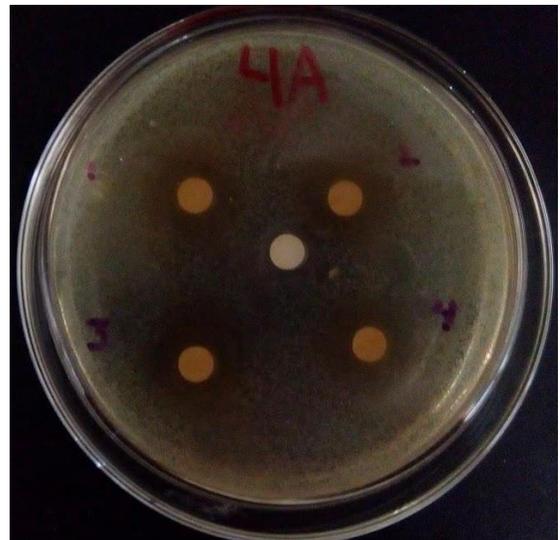


Figura 11. *Enterococcus* sp. en extracto de hojas.

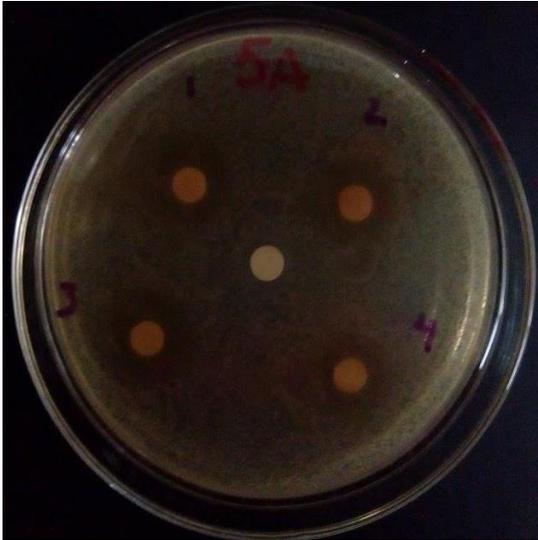


Figura 12. *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076 en extracto de hojas.

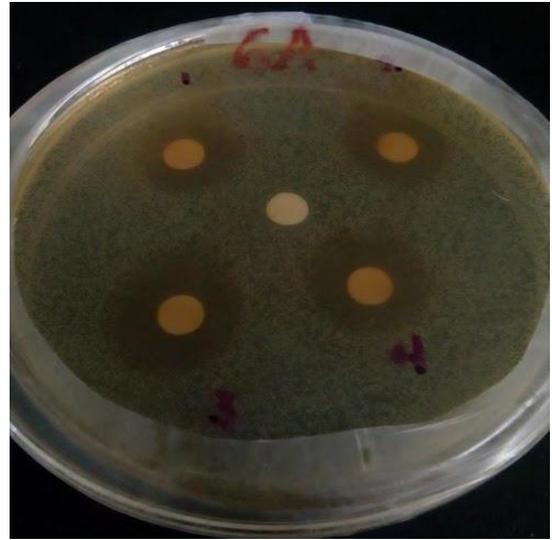


Figura 13. *Pseudomonas* sp. en extracto de hojas.



Figura 14. *Staphylococcus* sp. en extracto de hojas.



Figura 15. *Salmonella* sp. en extracto de hojas.

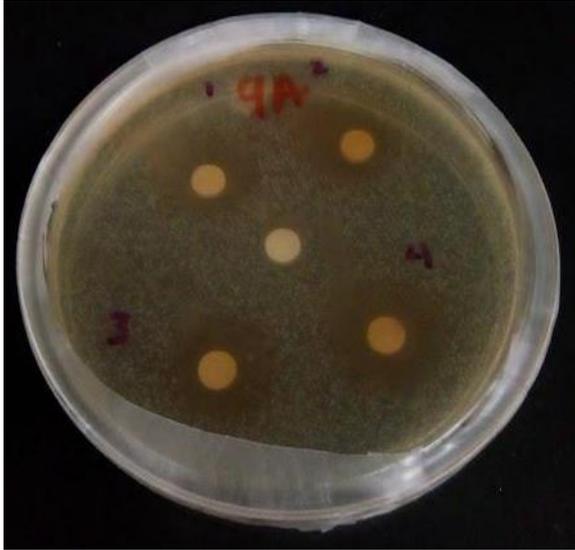


Figura 16. *Klebsiela* sp. en extracto de hojas.

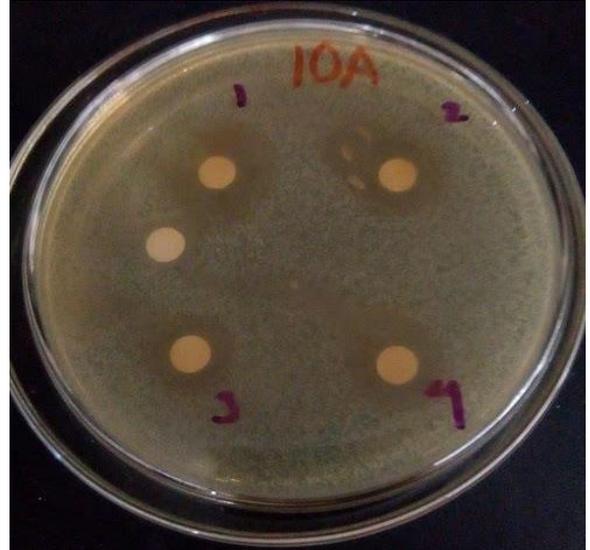


Figura 17. *L. monocytogenes* ATCC 19115 en extracto de hojas.

Existen muy pocos reportes de la actividad antimicrobiana del arrayán, sobre todo por partes vegetales. La mayoría de los estudios de este árbol se han enfocado al contenido de antioxidantes. (Quijada, 2018; Pio *et al.*, 2013).

Flores y Aquipucho, (2019), estudiaron el efecto antibacteriano de hojas de guayaba (*Psidium guajava*) en extractos en etanol y con una concentración de material vegetativo ligeramente superior hojas) (133.33 mg/ml), con respecto al presente trabajo (125 mg/ml) Los cuales, los valores fueron similares a los del presente estudio. Se obtuvieron para *E. coli* ATCC 25922 halos de 7.6 a 13.4 mm los cuales, fueron valores no muy alejados al presente estudio (10.75 ± 0.5). Para *S. aerus* ATCC 25923 se obtuvieron halos de 7.7 a 28.3 mm, los cuales fueron valores incluso superiores a lo obtenido a este trabajo 12.50 mm (Cuadro 2). Cabe mencionar que los extractos evaluados en este trabajo se sugieren con la ventaja de estar en etanol al 50% y que dicha menor concentración de alcohol los propone con una menor toxicidad, por lo tanto, pudieran ser mejores opciones para usarse en la industria de alimentos.

7.2.2. Extracto de corteza del árbol de arrayán

Como se mencionó antes (Cuadro 1) se utilizó la concentración de 50 μ L de este extracto para impregnar los discos de 6 mm utilizados en la actividad antimicrobiana.

Los resultados de las medias de los diámetros de los halos de inhibición oscilaron entre 12 y 16.37 mm. El comportamiento de cada bacteria fue diferente frente al extracto de corteza por lo que se aplicó un multifactorial indicando que hubo diferencias significativas y se procedió a realizar la prueba de comparación de medias por Duncan al 5% para identificar a las bacterias más susceptibles o resistentes, como se muestra en la Figura 18. La cual, arrojó que existieron 5 grupos estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). En el primer grupo con las bacterias que mostraron menores halos de inhibición se encontró a *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076 y *Staphylococcus* sp. El segundo grupo fue formado por *Enterococcus* sp. El tercer grupo presentó a *Pseudomonas* sp. El cuarto grupo lo formaron *B. subtilis* ATCC 662, *Salmonella* sp., *L. monocytogenes* ATCC 19115 y *E. coli* ATCC 25922. Finalmente, los mayores halos de inhibición fueron por *L. innocua* ATCC-062 y *Klebsiella* sp. que fueron las bacterias con mayor susceptibilidad ante el extracto con diámetros de halos de inhibición de 16.37 y 16.45 mm, respectivamente (Figura 18).

Staphylococcus sp. y *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076 fueron las bacterias que mayor resistencia demostraron al formar los halos más pequeños de inhibición de 12 y 12.52 mm, respectivamente.

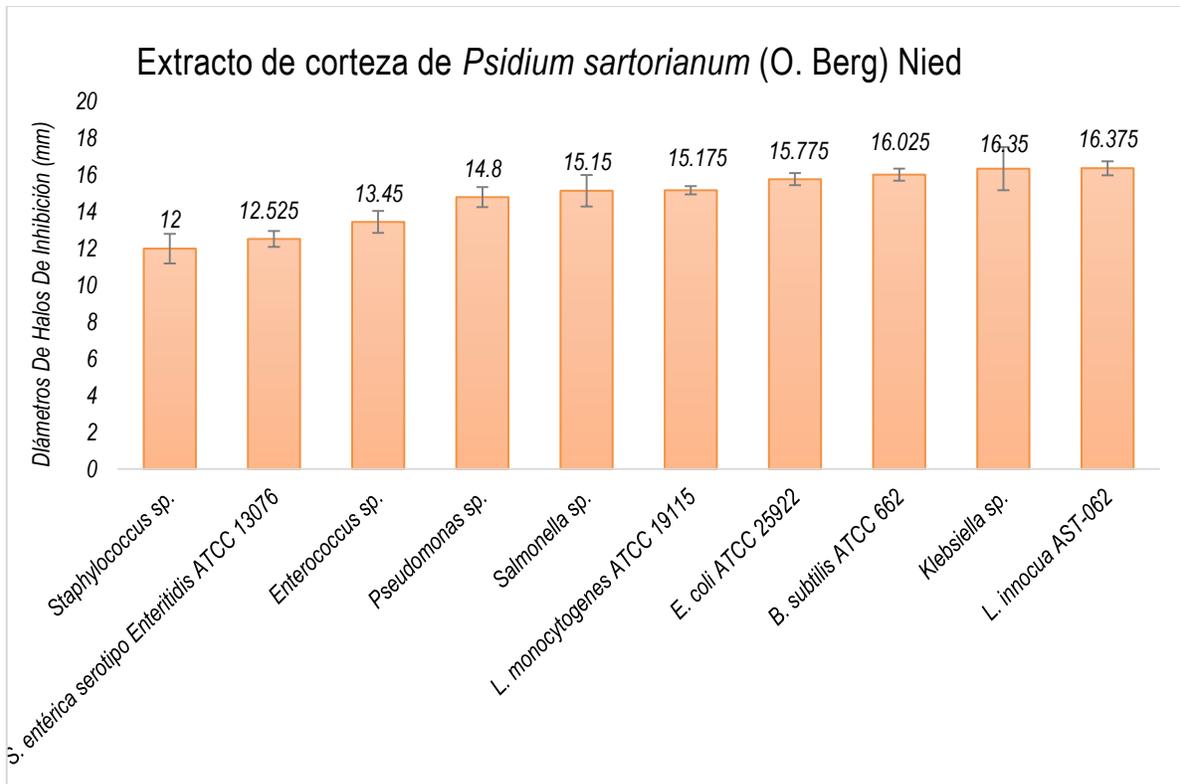


Figura 18. Diámetros (mm) de halos de inhibición presentados en el extracto de corteza de arrayán frente a las diez bacterias ensayadas.

En las siguientes figuras de 19 a 24 se muestran los ensayos biológicos con extracto vegetal de corteza de árbol de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied, evaluado con cada una de las bacterias.



Figura 19. *Salmonella* entérica serotipo *Enteritidis* ATCC 13076 en extracto de corteza.



Figura 20. *Pseudomonas* sp. en extracto de corteza.

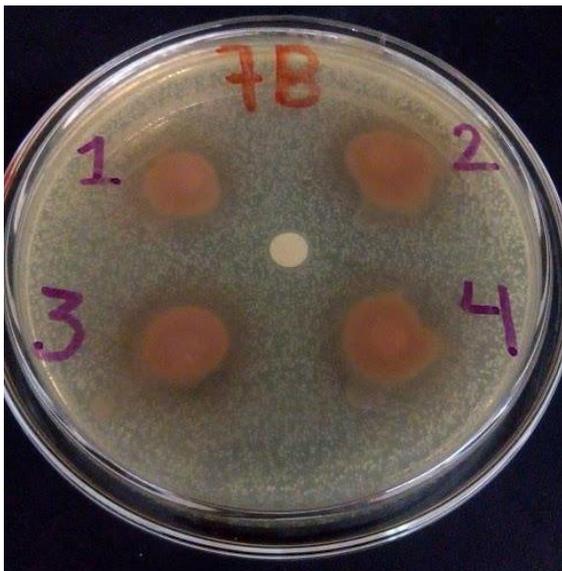


Figura 21. *Staphylococcus* sp. en extracto de corteza.

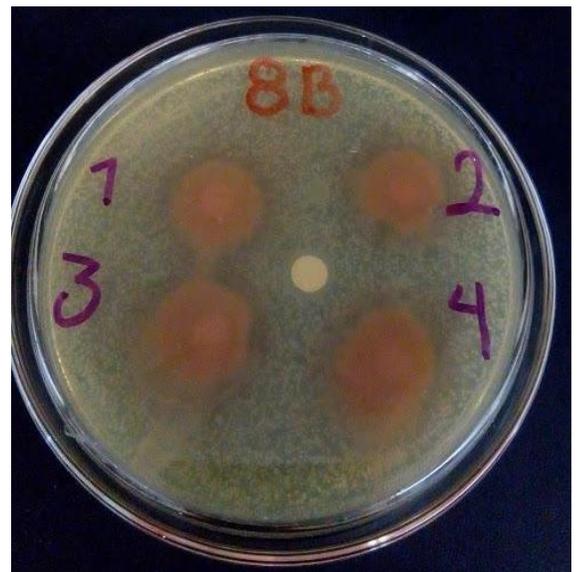


Figura 22. *Salmonella* sp. en extracto de corteza.

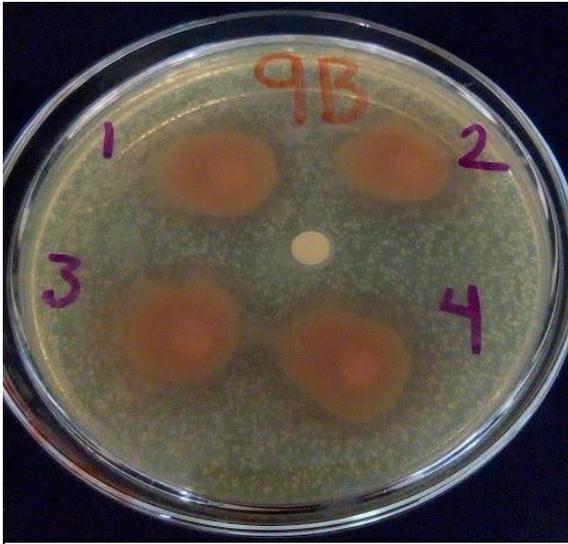


Figura 23. *Klebsiella* sp. en extracto de corteza.



Figura 24. *L. monocytogenes* ATCC 19115 en extracto de corteza.

No existen reportes de la actividad antimicrobiana de esta parte vegetal del arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied). Sin embargo, en otra especie del mismo género, guayaba agria (*Psidium friendrichsthalianum*) se estudiaron extractos en hexano y etanol (25 mg/mL) de la corteza. No obstante, no reportan actividad antimicrobiana mediante esta misma prueba, sino reportaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Bacillus cereus* ATCC 11778 (Cruz *at al.*, 2012). Cabe mencionar que los extractos que se manejaron no se pueden utilizar en alimentos, principalmente el que contenía hexano, por lo tanto, los extractos del presente trabajo se sugieren a la ventaja de utilizarse para consumo humano o de animales.

7.2.3. Extracto de semilla del fruto de arrayán

Como se mencionó antes (Cuadro 1) se utilizó la concentración de 50 μ L de este extracto para impregnar los discos de 6mm utilizados en la actividad antimicrobiana.

Los resultados de las medias de los diámetros de los halos de inhibición fueron de 10.75 a 17.25 mm. El comportamiento de cada bacteria fue diferente frente al extracto de semilla y se encontraron diferencias significativas y se procedió a realizar una prueba de comparación de medias por Duncan al 5% para identificar a las bacterias más susceptibles o resistentes como se muestra en la Figura 25. Lo cual, indicó que hubo dos grupos estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). El primer grupo con los menores halos de inhibición comprendió a *E. coli* ATCC 25922, *L. innocua* AST-062, *Salmonella* sp. y *Klebsiella* sp. (Cuadro 2). El grupo con las bacterias más sensibles a este extracto al haber presentado diámetros mayores en los halos de inhibición comprendió a *B. subtilis* ATCC 662, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis ATCC 13076, *Pseudomona* sp., *Staphylococcus* sp. y *L. monocytogenes* ATCC 19115.

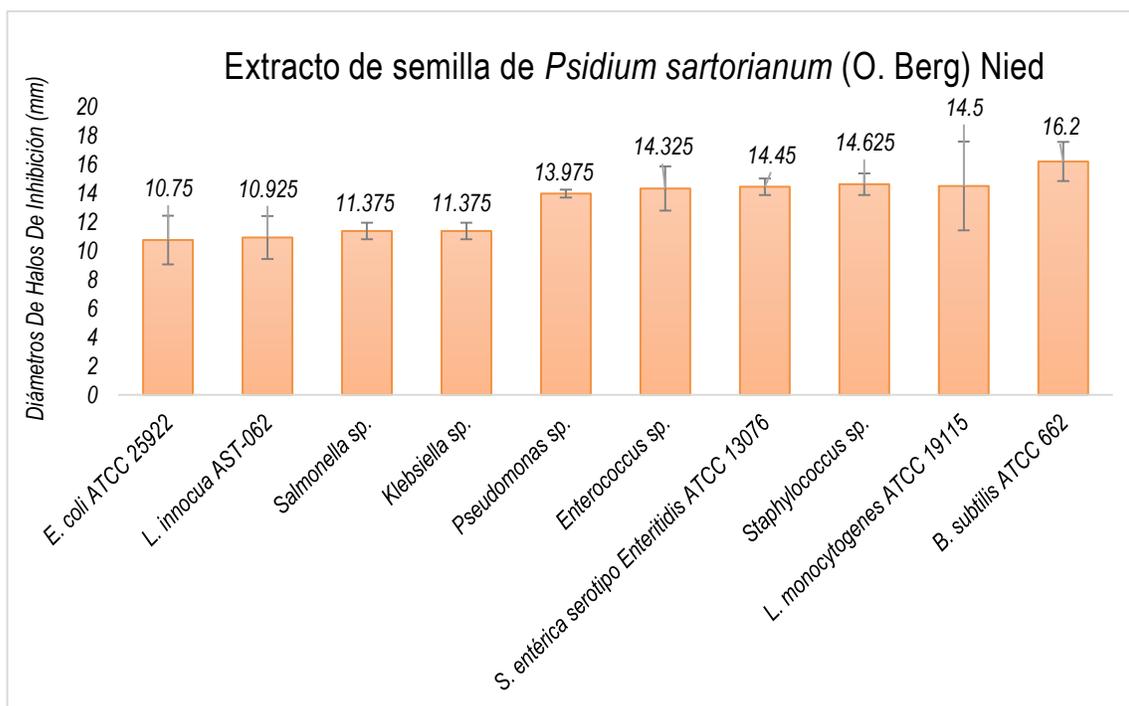


Figura 25. Diámetros (mm) de halos de inhibición presentados por el extracto de semilla de arrayán frente a las diez bacterias ensayadas.

En las siguientes figuras de 26 a 35 se muestran los ensayos biológicos con extracto vegetal de semilla de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied, evaluado con cada una de las bacterias.

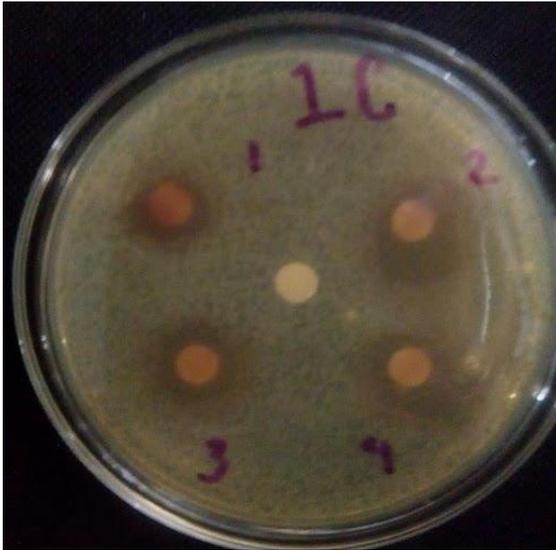


Figura 26. *E. coli* ATCC 25922 en extracto de semilla.



Figura 27. *L. innocua* AST-062 en extracto de semilla.

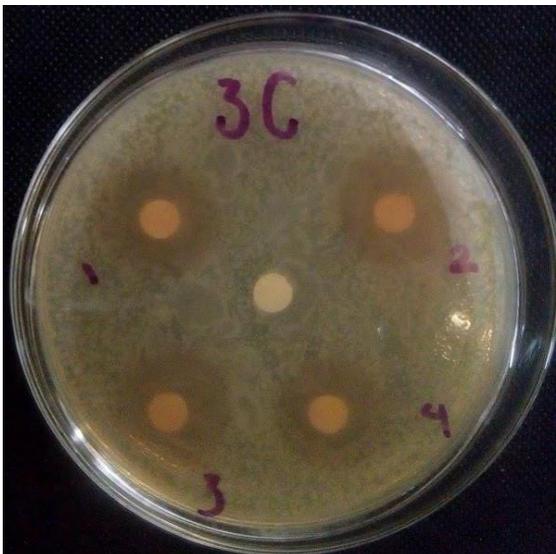


Figura 28. *B. subtilis* ATCC-662 en extracto de semilla.



Figura 29. *Enterococcus* sp. en extracto de semilla.

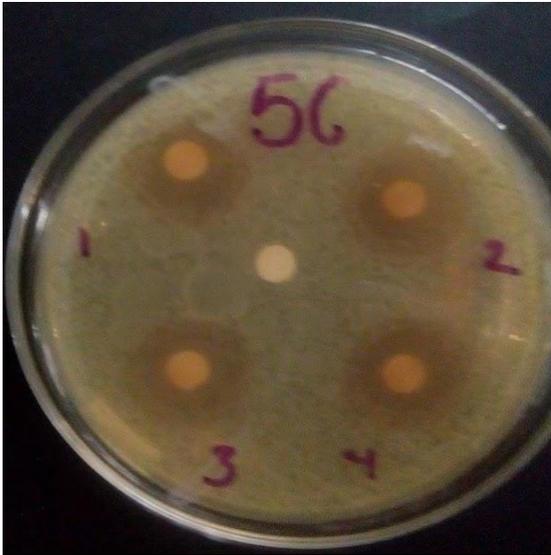


Figura 30. *Salmonella* entérica serotipo *Enteritidis* ATCC 13076 en extracto de semilla.

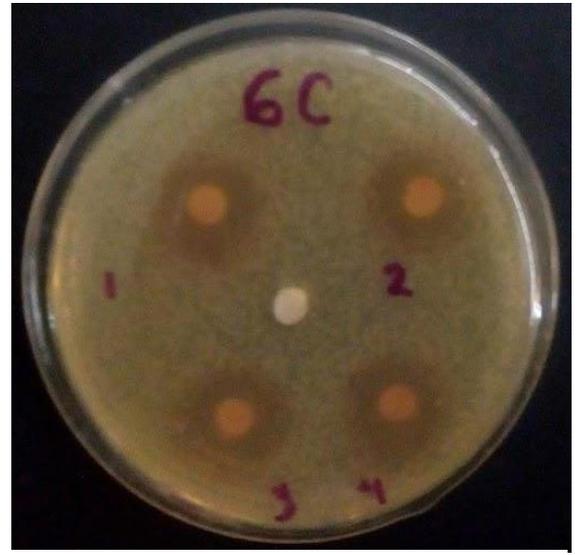


Figura 31. *Pseudomona* sp. en extracto de semilla.

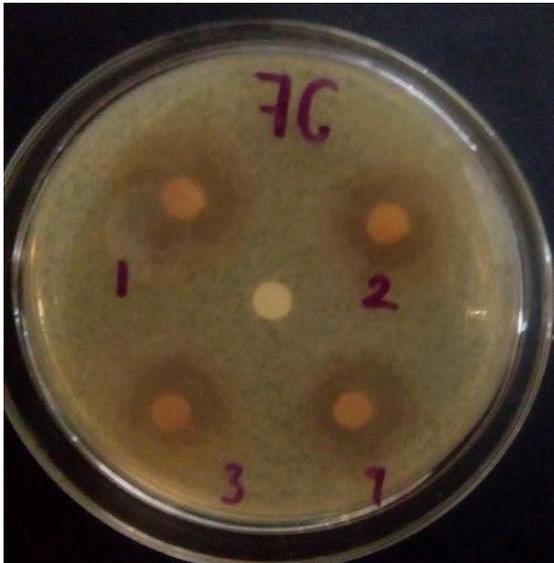


Figura 32. *Staphylococcus* sp. en extracto de semilla.

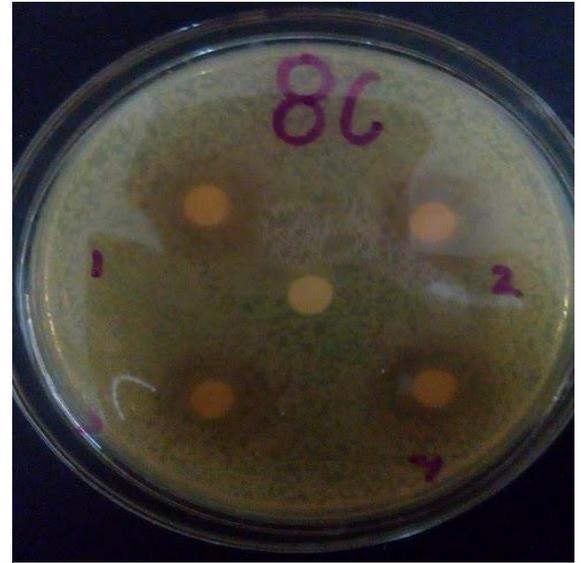


Figura 33. *Salmonella* sp. en extracto de semilla.

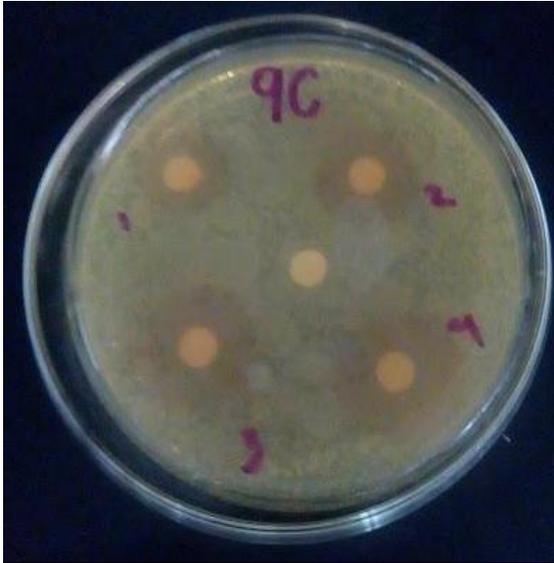


Figura 34. *Klebsiella* sp. en extracto de semilla.

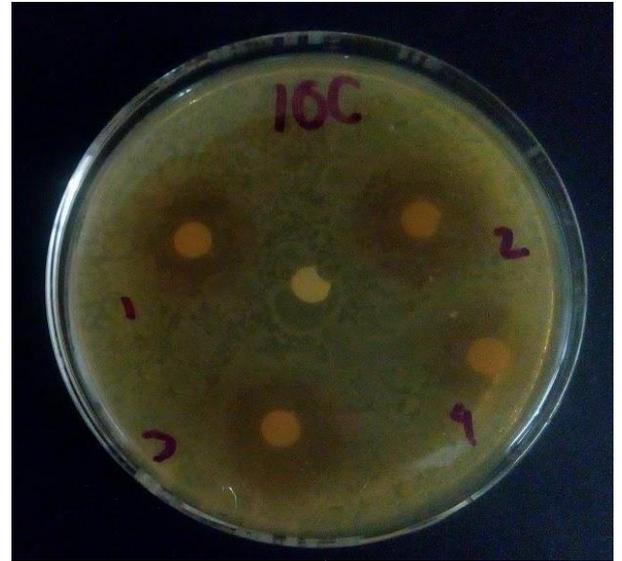


Figura 35. *L. monocytogenes* ATCC 19115 en extracto de semilla.

7.2.4. Extracto de fruto

Como se mencionó antes (Cuadro 1) se utilizó la concentración de 40 μ L de este extracto para impregnar los discos de 6 mm utilizados en la actividad antimicrobiana. Los resultados de las medias de los diámetros de los halos de inhibición fueron de 8.67 a 14.02 mm.

El efecto del extracto de fruto sobre las diez bacterias estudiadas de acuerdo con el ANDEVA mostró que hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y, por lo tanto, se procedió a realizar una prueba de comparación de medias por Duncan al 5% para identificar las bacterias más susceptibles o resistentes como se muestra en la Figura 36. Lo cual, indicó que se formaron cinco grupos estadísticamente diferentes. El primer grupo con la bacteria que se sugiere como la más resistentes al haber presentado el menor diámetro en los halos de inhibición (8.67 mm) fue *Staphylococcus* sp. El segundo grupo comprendió a *Salmonella* sp. y *Pseudomona* sp. El tercer grupo comprendió a las bacterias *E. coli* ATCC 25922, *Enterococcus* sp., *S. enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Klebsiella* sp. y *L. monocytogenes* ATCC 19115. Finalmente, con el halo más grande resultó *L.*

innocua AST-062 y *B. subtilis* ATCC 25922 como las bacterias más sensibles a este extracto con un halo de 12.07 mm y 14.025 mm (Cuadro 2).

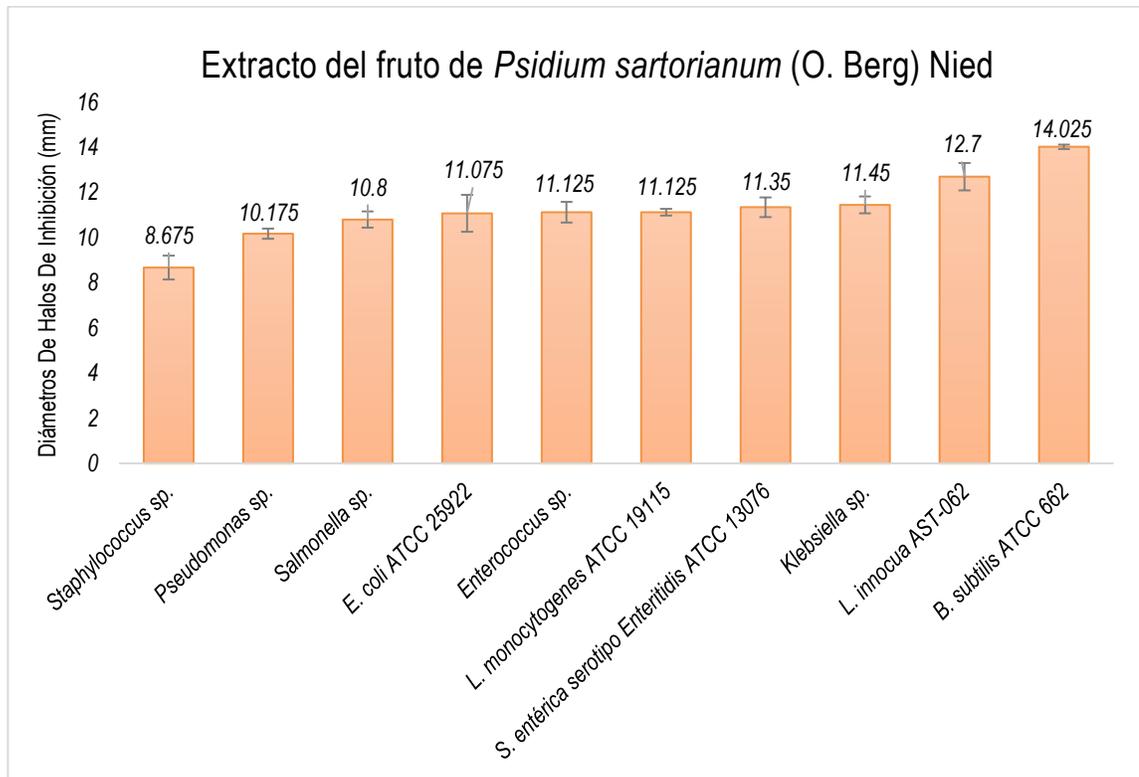


Figura 36. Diámetros (mm) de halos de inhibición presentados en el extracto de fruto de arrayán frente a las diez bacterias estudiadas.

En las siguientes figuras de la No. 37 a la 46 se muestran los ensayos biológicos con extracto vegetal de fruto de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied, evaluado con cada una de las bacterias.



Figura 37. *E. coli* ATCC 25922 en extracto de fruto.

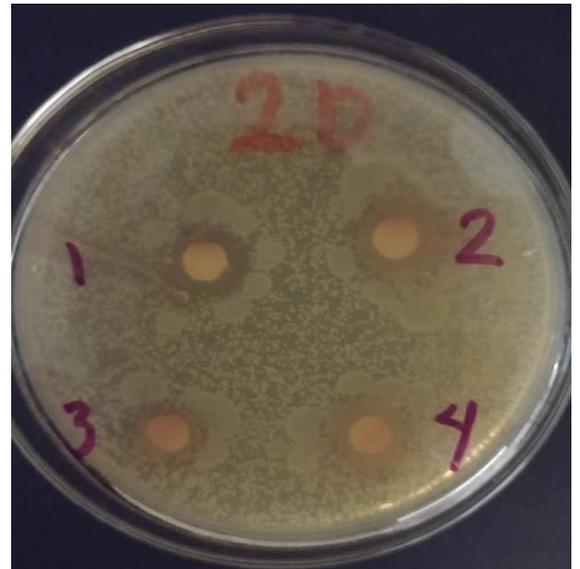


Figura 38. *L. innocua* AST-062 en extracto de fruto.

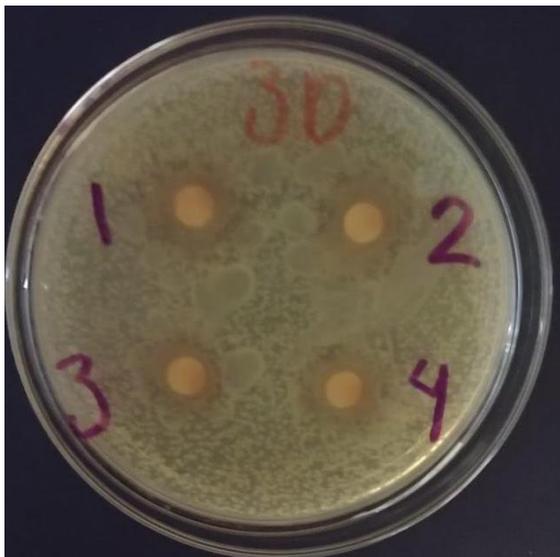


Figura 39. *B. subtilis* ATCC-662 en extracto de fruto.



Figura 40. *Enterococcus* sp. en extracto de fruto.



Figura 41. *Salmonella* entérica serotipo *Enteritidis* ATCC 25922 en extracto de fruto.



Figura 42. *Pseudomonas* sp. en extracto de fruto.

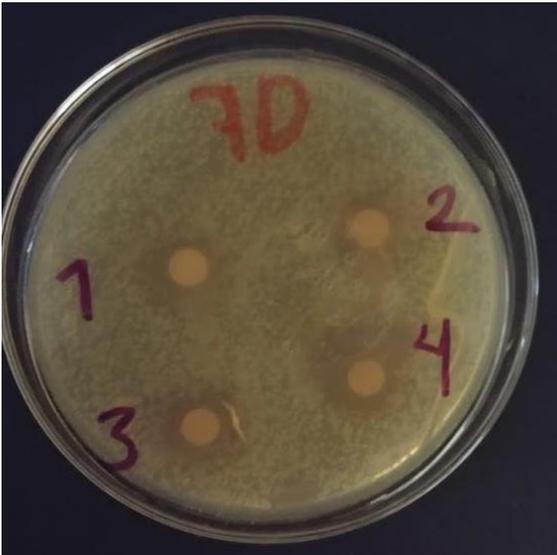


Figura 43. *Staphylococcus* sp. en extracto de fruto.



Figura 44. *Salmonella* sp. en extracto de fruto.



Figura 45. *Klebsiella* sp. en extracto de fruto.



Figura 46. *L. monocytogenes* ATCC 19115 en extracto de fruto.

VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron los extractos vegetales en etanol al 50% de dos partes vegetales (hoja, corteza) y de dos partes reproductivas (semilla y fruto) del árbol de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied).
- Se determinó que a diferencia de lo citado en otros reportes, en donde el uso de las frutas con los frutos del árbol de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) han sido utilizados como parte de tratamientos tradicionales sobre infecciones gastrointestinales, en el presente estudio todos los extractos hidroalcohólicos no solamente dichas partes, sino también los extractos de las hojas junto con los de semilla y corteza, mostraron actividad antimicrobiana sobre todas las cepas probadas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria innocua* AST-062, *Bacillus subtilis* ATCC 662, *Enterococcus* sp., *Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115), bajo las condiciones ensayadas.
- Se identificó que la actividad bacteriana para los extractos de las dos partes vegetales (hoja, corteza) y de las dos partes reproductivas (semilla y fruto) del árbol de arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied) se encontró en dosis entre un rango de 40-50 μ L, bajo las condiciones ensayadas.
- Se determinó que los cuatro extractos hidroalcohólicos de hojas, corteza, semilla y fruto presentaron actividad antibacteriana sobre cepas enteropatógenas relevantes al ser agentes etiológicas de enfermedades transmitidas por alimentos (*Salmonella enterica* serotipo *Enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115) por lo que, podrían sugerirse bajo estudios posteriores por

dicho potencial antimicrobiano para incluirse dentro del ámbito agroalimentario, como podría ser en envases activos.

IX. RECOMENDACIONES

Determinar la Capacidad Mínima inhibitoria de los extractos con mejores resultados (corteza, hojas y semilla) tanto de los presentes extractos en etanol 50% y en extractos acuosos.

Realizar más pruebas para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de corteza, hojas y semillas tales como; concentración mínima inhibitoria, así como, completar una caracterización fisicoquímica (Contenido de fenoles totales, actividad antioxidante, determinación del contenido de saponinas y pH) que sugiera resultados contundentes para proponer estudios más detallados de los extractos.

Analizar el potencial antibacteriano de los extractos del presente trabajo como parte de la formulación de biopelículas o envases activos, para evaluar la dicha propiedad sobre la elongación de la vida de anaquel de productos agropecuarios.

X. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aguilar L., Díaz S., Delgado F., Willms K., Zurabian R. 2016. Methanol extract from *Psidium sartorianum* (Arrayán) berries induces in vitro damage on *Taenia crassiceps* WFU cysticerci. *International Journal of Herbal Medicine*. 4: 30-35.
- 2) Álvaro G. 2005. Obtención, Caracterización y Evaluación de las Propiedades Físico-Químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como las tinturas del rizoma y de la fronda de Calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. 162 p
- 3) Archundia E., Pinzón D., Salem A., Mendoza P., Mariezcurrena M. 2019. Antioxidant and antimicrobial capacity of three agroindustrial residues as animal feeds. *Agroforestry Systems*. 1:1-10.
- 4) Archundia E., 2019. Desarrollo de la biopelícula activa, que aumente la vida de anaquel en carne de bovino. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del estado de México, México. 194 p.
- 5) Andrews J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48: 5-16.
- 6) Ardila M., Vargas A., Pérez J., Mejía L. 2009. Ensayo Preliminar de la Actividad Antibacteriana de Extractos De *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 8: 47-57.
- 7) Batanero M., Bernabeu.2008. Errores frecuentes en el análisis de datos en educación y psicología. Facultad de educación y humanidades del campus de melilla. 38:9-23p.
- 8) Brenner F., Villar R., Angulo F., Tauxe R., Swaminathan B. 2000. *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 2495-2467.

- 9) Bruneton J. 2001. Farmacognosia fitoquímica plantas medicinales 2da Edición. Acribia. España. 1120p.
- 10) Bullaín M., Santana D., Corría W. 2017. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *Colubrina arborencens* (MILL) sarg. *QuimicaViva*. 2: 31-39.
- 11) Caballero J., Casas A., Cortes L., Mapes C. 1998. Patrones en el conocimiento, uso y manejo de plantas en pueblos indígenas de México. *Estudios atacameños arqueología y antropología Surandinas*. 6: 181-195.
- 12) Cabrera C. 2019. Actividad antimicrobiana de un sistema a base de un extracto vegetal tres aceites esenciales. Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Perú (En línea). Disponible en: <https://doi.org/10.15381/ci.v22i1.16811>. Fecha de consulta: febrero 2019.
- 13) Carrión A., García C. 2010, Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica Tesis de licenciatura. Universidad de la Cuenca Facultad de Ciencias Químicas, Ecuador. 150p.
- 14) Canet J. 2016. *Escherichia coli*: características, patogenicidad y prevención. Betelgeux christeyns food higiene. Sitio web: <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prev> Fecha de consulta: Septiembre 2020.
- 15) Cezar R., De Olivera L., Barnes C., Sousa J. 2009. Aracas del género *Psidium*: principales especies, ocurrencia, descripción y usos. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuaria sitio web: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/697560/1/doc266.pdf>. Fecha de consulta: Abril 2019

- 16) CLSI (Clinical and laboratory standar institute). 2012. Perfor-mance standars for antimicrobial disk susceptibility test. Approved standard, 7th end document M02-A11. 32(1).
- 17) COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios). 2016. Alertas Sanitarias de Alimentos. COFEPRIS. Sitio web: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/116581/1_Comunicado_Helados_Bulle_Bell_19032015. Fecha de Consulta: Abril 2019.
- 18) CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad). 2019. Bacterias. Sitio web: https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/gran_familia/Bacterias/bacteria.html. Fecha de consulta: Mayo 2019.
- 19) Colorado J., Galeano E., Martínez A. 2007. Desarrollo de la bioautografía directa como método de referencia para evaluar la actividad antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 14(1): 67-71.
- 20) Cruz E., Moreno J., Hidalgo D., Martinez J., Chavez M. 2012. Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L. Boletin latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas. 11(4): 354-361.
- 21) Cuca L., Coy C., Coy E., Moreno J. 2011. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. Revista Cubana de Farmacia. 45 (2): 275-282.
- 22) Delgado F., Díaz S., Salazar G., Uribe M., Vega R. 2005. *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied. An indigenous plant to Mexico, from biology to biological activity. Recent Progress in Medicinal Plants. 3: 81 114.

- 23) Doyle M., Beuchat L., Montville T. 2001. Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras. España: Acribia. 400 p.
- 24) Díaz T. 2020. Análisis de los compuestos bioactivos, actividad antimicrobiana y relación con el territorio de tres plantas medicinales con la región mazahua del Estado de México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de México.
- 25) Díaz M., Rodríguez C., Zhurbenko R. 2010. Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 48: 147-161.
- 26) Flores A., Aquipucho E. 2019. Efecto antimicrobiano del extracto de hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) sobre *Staphylococcus aureus* atcc 25923, *Escherichia coli* atcc 25922 y *Cándida albicans* ATCC 10231, arequipa-2018. Tesis de licenciatura. Universidad privada Autónoma del Sur, Perú. 120p.
- 27) FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2019. Inocuidad Alimentaria. FAO. Sitio web: <http://www.fao.org/food-safety/es/>. Fecha de consulta: abril 2019.
- 28) García C. 2006. Actividad Antibacteriana de Extractos Vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila. México. 128p.
- 29) Google Maps. 2018. Mapa del mundo. septiembre 20, 2019, de google Sitio web: [tps://satellites.pro/Mapa_del_Mundo#18.591505,-99.423712,10](https://satellites.pro/Mapa_del_Mundo#18.591505,-99.423712,10).
- 30) Gupta P., Birdi T. 2017. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine. 8: 266-275.
- 31) INSHT (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo). 2016. *Pseudomonas aeruginosa*. 22 marzo 2018, de DATABIO Sitio web:

- <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Pseudonas%20aeruginosa%202017.pdf>. Fecha de consulta: marzo 2019.
- 32) IVAMI (Instituto Valenciano de Microbiología). 2016. *Bacillus subtilis* (grupo de especies *Bacillus subtilis*): cultivo cualitativo y cuantitativo, identificación y detección de toxinas. Instituto Valenciano de Microbiología Sitio web: <https://www.ivami.com/es/informacion-general>. Fecha de consulta: marzo 2019.
- 33) ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), 1998. Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos. Volumen 5. España: Acribia, S.A. 500 p.
- 34) Leyva V., Martino T., Puig Y., Carrera J., Cabrera M. 2009 ¿Qué factores influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos en los alimentos? Departamento de Microbiología de los Alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Sitio web: https://www.academia.edu/7735201/Qu%C3%A9_factores_influyen_en_el_crecimiento_y_supervivencia_de_los_microorganismos_en_los_alimentos Fecha de consulta: septiembre 2020.
- 35) Megías M., Molist P., Y Pombal M. 2017. Atlas de la histología animal y vegetal la célula. Departamento de biología funcional y ciencias de la salud Universidad de vigo Sitio web Disponible en: <https://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/atlas-celula-01-introduccion.pdf>. Fecha de consulta: Abril 2019.
- 36) Mendoza K. 2019. Efecto del tipo de solvente sobre la concentración de compuestos bioactivos, saponinas y características físicas de extractos de hojas de guayaba

- (*Psidium guajava* L.) y aguacate (*Persea americana* Mill). Tesis de licenciatura. Universidad autónoma del estado de México. México. 76p.
- 37) Mossel D., Moreno B., y Struijk C. 2006. Microbiología de los Alimentos. España: ACRIBIA S.A.
- 38) Moreno K. 2019. Desarrollo de una biopelícula activa a base de lecitina de soya para productos agropecuarios. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas Olancho, Honduras.50p.
- 39) Narayanan A., Raja S., Ponmurugan K., Kandekar S., Natarajaseenivasan K., Maripandi A., Mandeel Q. 2011. Antibacterial activity of selected medicinal plants against multiple antibiotic resistant uropathogens: a study from Kolli Hills, Tamil Nadu, India. Beneficial microbes. 9: 235-243.
- 40) OMS, OPS (Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud). 2019. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. OMS Sitio web: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos&Itemid=41432&lang=es. Fecha de consulta: abril 2019.
- 41) OMS (Organización Mundial de la Salud). 2018. La resistencia a los antimicrobianos. OMS. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>. Fecha de consulta: mayo 2019.
- 42) Roque A. 2019. Efecto de la concentración de extractos hidroalcohólicos sobre la obtención de compuestos bioactivos de aguacate (*Persea americana* Mill) y guayaba (*Psidium guajava* L.) Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 131 p.

- 43) Paz V., Mangwani S., Martínez A., Álvarez D., Solano S., Vázquez R. 2019. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. Revista chilena de infectología. 36: 180-189.
- 44) Palomares I., 2019. Obtención de fenoles totales de extractos hidroalcohólicos en diferentes tiempos de maceración de hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) y de aguacate (*Persea americana* Mil.). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 120 p.
- 45) Pérez C., Rebollar S., Quintanar A. 1994. Estudio anatómico de la madera de *Psidium sartorianum* (*myrtaceae*) y *Cordia gerascanthus* (*boraginaceae*). Acta Botánica Mexicana. 27: 89-97.
- 46) Picazo J. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. 11: 1-25.
- 47) Pío J., Díaz S., López M., Uribe M., Willms K., López G., Montes J., Delgado F. 2013. Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L. Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied.) y ayale (*Crescentia alata* Kunth). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 12: 356-364.
- 48) Pérez, M., Mota, M. 2006. Morfología y estructura bacteriana. Universidad de la República Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene Sitio web Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>. Fecha de consulta: abril 2019.

- 49) Quijada A. 2018. Fenoles, flavonoides, actividad antioxidante y antibacteriana en extractos de frutos de *Psidium sartorianum*, *Malpighia mexicana* y *Sageretia* sp. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 59p.
- 50) Ramírez L., Marín D. 2009. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 42: 263-268.
- 51) Rebollar S., Rubí M., González F. 2013. Producción y Comercialización de *Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied En el sur del Estado de México. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 33: 514-526.
- 52) Salem A., Jimenez F., Mejia P., Gonzales M., Albarrán A., Rojo R., Tinoco J. 2011 Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *End Livestock Science*. 2: 192-200.
- 53) Sánchez E., Castillo S., García P. 2016. Actividad antimicrobiana. *Investigación en plantas de importancia médica OmniaScience*. 77-100.
- 54) Santamaría S., González A., Astorga F. 2015. Extractos Vegetales Aplicación Para la reducción del Estrés. *Revista de nutrición Animal*. 1: 75-80 p.
- 55) Sepúlveda G., Porta H., Rocha M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 355-363.
- 56) Seija V. 2016. Género *Staphylococcus*. Universidad de la República Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene Sitio web Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/Staphylococcus.pdf>. Fecha de consulta: septiembre 2020.

- 57) Suleiman M., Ogah I., Okobia B., Adeyemi O., Olatunji K., Ige I. 2016. A review on antibacterial properties of extracts from *Psidium* spp. and effect of the extraction solvent. Pakistan journal of medicine and dentistry, 5: 47-56.
- 58) Vargas T. y Vargas A. 2014. Morfología bacteriana. Revista de actualización clínica. 49: 2595-2598.